

# MEDICINA REGENERATIVĂ ÎN RESTABILIREA ȚESUTURILOR SCHELETICE

## REGENERATIVE MEDICINE AND SKELETAL TISSUE RECOVERING

## РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА И ВОССТАНОВЛЕНИЕ СКЕЛЕТНЫХ ТКАНЕЙ

Nacu Viorel<sup>1,2</sup>, Coșciug Stanislav<sup>1</sup>, Cobzac Vitalie<sup>1</sup>, Tatiana Țimbălar<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laborator Inginerie tisulară și culturi celulare, USMF "Nicolae Testemițanu"

<sup>2</sup> Banca de țesuturi și celule umane

### Rezumat

Medicina regenerativă în terapia regenerativă poate utiliza transplant tradiționale autologice, alogene sau combinate, care includ 3D polimeri biodegradabili și celule diferențiate sau slab diferențiate. În calitate de transplant celular pot fi utilizate celule medulare autogene sau alogene – din sângele din cordonul ombilical. Sistemele geno-expresive, de asemenea, pot fi combinate cu structuri sintetice tridimensionale și cu celule pentru controlul distribuției temporale și spațiale a factorilor regenerativi. Procesele naturale de formare și regenerare ale oaselor necesită expresia coordonată a multor molecule, incluzând factori de creștere, proteine morfogenetice și factori specifici de transcripție. Cunoștințele actuale în ce privește regenerarea osului permit stimularea proceselor de regenerare cu ajutorul ingineriei tisulare. Ingineria genetică este o direcție nouă în încercarea de a obține o fuziune osoasă bună. Această abordare, posibil, va permite de a obține reconstrucția defectelor osoase și stimularea fuziunii osoase în cazul dereglării acesteia.

**Cuvinte cheie:** medicina regenerativă, regenerația osoasă, terapie celulară, terapie genetică.

### Summary

Biological methods for bone regeneration are needed to reverse bone loss caused by diverse agents. Regenerative therapies could use traditional autogenous, allogeneous bone grafting or composite grafts including resorbable 3D scaffolds and differentiated or non-differentiated cells. As cells grafts could be: autogenous bone marrow cells or allogeneous cord blood stem cells. Also, gene expression systems will be combined with cells seeded in precise three-dimensional configurations on synthetic scaffolds to control both temporal and spatial distribution of regenerative factors. The natural processes of bone formation and repair require the coordinated expression of many molecules; including growth factors, bone morphogenetic proteins, and specific transcription factors. Current knowledge related to bone and fracture repair describes how tissue engineering, may mimic critical aspects of these natural processes.

**Key words:** tissue engineering, bone regeneration, bone grafts, stem cells, demineralized bone matrix.

### Резюме

Регенеративная медицина в регенеративной терапии может использовать традиционные аутологичные, аллогенные или комбинированные трансплантаты включающие биодеградирующие 3D губки и дифференцированные или малодифференцированные клетки. В качестве клеточного трансплантата могут быть использованы аутогенные костномозговые клетки или аллогенные – из пуповинной крови. Генно экспрессивные системы также могут быть комбинированы с тридименсиональными синтетическими структурами и с клетками для контроля временного и пространственного распределения регенеративных факторов. Натуральные процессы образования и восстановления кости требуют координированной экспрессии множества молекул, включающих факторы роста, морфогенетические белки и специфические транскрипционные факторы. Сегодняшние знания регенерации кости позволяют стимулировать восстановительные процессы с помощью тканевой инженерии. Генная инженерия является новым направлением при попытке получения хорошего костного сращения. Такой подход, возможно, позволит добиться реконструкции костных дефектов и стимулировать костное сращение в случаях ее нарушения.

**Ключевые слова:** регенеративная медицина, регенерация кости, клеточная терапия, генная терапия.

### Actualitatea temei

Medicina regenerativă are ca bază datele acumulate de embriologie, biologie moleculară, genomică, proteomică, biologia celulei, știința biomaterialelor și întrunește următoarele strategii: terapia celulară, care reprezintă implantarea de celule pentru restabilirea țesuturilor deteriorate, ingineria tisulară, și terapia genică, utilizate pentru substituția sau vindecarea țesuturilor nefuncționale [8].

Regenerarea țesuturilor scheletice reprezintă una din direcțiile prioritare de dezvoltare a ingineriei tisulare, aplicabilitatea lor clinică fiind deja un fapt împlinit [6].

Ortopedia-traumatologia este considerată una dintre

specialitățile chirurgicale care evoluează cel mai rapid, datorită colaborării cu alte specialități, care se ocupă de refacerea țesuturilor (chirurgia vasculară, plastică și reparatorie, maxilo-facială, neurochirurgia, etc.), dar și cu ramuri specializate ale metalurgiei, chimiei polimerilor, biomaterialelor, nanoingineriei, fizicii și altele, pentru elaborarea și perfecționarea implanturilor ortopedice și prepararea de noi substituenți tisulari.

Ingineria tisulară include șase domenii de cooperare: 1. biomaterialele – reprezintă suportul fizic, de natură organică sau sintetică, pentru ghidarea refacerii țesutului de către celulele specifice; 2. celulele necesare pentru refacerea țesutului specific [9]; 3. biomecanica – studiază proprietățile native ale țesuturilor

și semnalelor mecanice locale necesare pentru diferențiere; 4. biomoleculile, (factori de creștere, hormoni locali, semnale intercelulare, morfogene) care orientează diferențierea celulară și expresia anumitor gene pentru sinteza proteinelor specifice; 5. informatica, care generează analiza datelor despre expresia și secvențialitatea genelor și a proteinelor, modelajul tisular și celular computerizat, sistemele de control a calității, baze de date; 6. designul ingineresc, destinat proiectării sistemelor 2D și 3D, bioreactoare, stocarea și transportul țesuturilor obținute [1].

Sinteza matricei extracelulare este asigurată de osteoblaste și parțial de osteocite, iar resorbția este realizată de către osteoclaste. Fiind diferite după structură și funcție, aceste celule în ansamblu fac același lucru – remodelarea osoasă. Evident că ele interacționează reciproc [2].

**Scopul studiului** a constituit evaluarea eficacității grefelor celulare și combinate cu și fără matrice osoasă demineralizată în tratamentul consolidărilor lente și pseudartrozelor.

**Materiale și metode:** matrice osoasă alogenă demineralizată, celule autologice nucleate din măduva osoasă și celule ombilicale alogene. Au fost studiate nivelul fosfatazei acide și fosfatazei alcaline, radiografia oaselor, tomografia computerizată și scintigrafia cu tehnecium 99m.

### Rezultate și discuții

Acest studiu a fost realizat pe 189 pacienți: 65 cu fracturi neconsolidate ale membrului superior: clavicula – 4, braț – 19; os radial – 9; ulna – 8; ambele oase ale antebrăului – 8, scafoidul carpian – 14, falangele – 3. 124 cu dereglări de consolidare la oasele membrului inferior: osul femural – 41; patela – 2, osul tibial – 81 cazuri. În calitate de grup de control au fost pacienții operați cu autogrefare osoasă.

În 16 cazuri au fost utilizate celule ombilicale, în restul 173, celule autologice din măduva osoasă.

Deși osul pare inert, este un țesut viu, dinamic și capabil să se adapteze la condițiile mediului extern prin procese metabolice active și remodelare continuă [4].

Componentul celular este reprezentat prin patru tipuri de celule: pe stratul superficial al osului sunt situate osteoblaste, osteoclaste și celulele bordante, mai profund sunt localizate osteocitele care, ca și celelalte, sunt derivate ale celulelor mezenchimale locale, numite și celule osteoprogenitoare. Osteoblastele produc matricea organică a osului care apoi se mineralizează. Conținutul bogat în acizi ribonucleici, enzime relevă că aceste celule sunt foarte active. Ele sunt bogate în organele implicate în sinteza proteică, în cea mai mare parte fiind vorba de procolagenul I, care se unește în microfibrile de collagen I în spațiul extracelular. Totodată osteoblastele sunt principalele surse care secretă în matricea extracelulară mai multe componente ale ei: osteonectine, osteocalcine, proteoglicani, sialoproteine, alte glicoproteine și unii factori de creștere. Osteocitele reprezintă osteoblaste maturizate înconjurată de matrice extracelulară maturizată. Celulele bordante sunt inactive și acoperă suprafețele osoase care nu sunt în proces de reorganizare, se presupune că pot fi celule progenitoare ale osteoblastelor sau sunt celule osteoblastice în repaus, care îndeplinesc rolul de barieră între os și țesuturile adiacente. Totodată se crede că ele reglează formarea cristalelor de hidroxiapatită în os și asigură metabolismul țesutului osos [3, 17].

În studiul nostru am folosit măduvă osoasă colectată din spina iliacă postero-superioară, de la subiecți sănătoși, fără maladii sistemice, tuberculoză, hepatite, etc. Grefa medulară obținută a fost transportată în laborator (170) sau în Banca de țesuturi umane (3) și procesată [7].

Pentru separarea celulelor stem mezenchimale a fost utilizat gradientul de concentrație cu densitatea de 1,077 g/cm<sup>3</sup>, în tuburi sterile de polipropilen, unde a fost cu precauție aplicată grefa colectată, pentru a evita amestecarea ei cu soluția de separare. Ulterior tuburile au fost centrifugate în centrifuga cu termoreglator Hitech la 1000 rpm timp de 20 de minute la temperatura de 8°C, cu o pipetă sterilă se colectează celulele mononucleate, se spală de soluție prin amestecare cu mediu nutritiv, centrifugare la 1000 rpm timp de 10 minute, temperatura de 8°C. Celulele obținute au fost cultivate pe mediu nutritiv DMEM (HIMEDIA); 100 un/ml gentamicină și penicilină (SIGMA) și substanțe adjuvante în incubatorul CO<sub>2</sub> "Binder", concentrația CO<sub>2</sub> 5%, umiditatea 95% în flacoane cu suprafața de 25 cm<sup>2</sup> (NUNC). Celulele au fost cultivate până la 4 pasaje [14, 19].

Măduva osoasă conține un număr limitat de celule stem, care se presupune a fi de 1%. Cantitatea celulelor mononucleate din măduva osoasă a fost majorată până la 100-250x10<sup>6</sup>, în funcție de caz, după care a fost efectuată transplantarea. Numărul celulelor vii a fost determinat prin utilizarea soluției albastru de trepan de 1% (CI 23850, Germania) în hemocitometru (camera Goriaev, Rusia) și a constituit 91,2±1,5%.

Celulele sângelui cordonului ombilical uman au fost colectate nemijlocit după naștere și ligaturarea lui (n=50). Grefele celulare au fost prelevate numai de la gravide cu anamneză impecabilă, testate în perioada de gestație în vederea excluderii HBsAg, hepatitei virale C, HIV, citomegalovirusului, sifilisului. În majoritatea cazurilor probele au fost colectate cu placenta in utero (n=46, 92%), în celelalte ex utero (n=4, 8%). Volumul mediu de sânge ombilical prelevat a constituit 74,66±24,98 ml, cantitatea celulelor predecesorii CD 34 - 0,79±0,048x10<sup>9</sup>, vitalitatea 93,47±0,37% (p<0,05) [14, 16].

Grefa compozită a fost obținută prin combinarea matricei osoase demineralizate [18] cu celule osteomedulare autologice sau celule ombilico-placentare. În majoritatea cazurilor grefa a fost obținută nemijlocit înaintea inoculării prin asocierea a două grefe celulare auto- sau alogenă și osoasă alogenă (10 cazuri), prin utilizarea ingineriei tisulare, care constă în creșterea acestor celule pe suport tridimensional: aloos demineralizat morcelizat (6 cazuri).

Stabilirea proliferării celulare în prezența osului alogen procesat prin diferite metode demonstrează că în prezența osului demineralizat celulele proliferază mai activ către ziua a cincea (2,60±0,05 x 10<sup>6</sup>) comparativ cu lotul în care a fost testat osul conservat în soluție 0,25% formaldehidă (0,02±0,03 x 10<sup>6</sup>) p<0,05 (tabelul 3.2).

Trei grupe de factori influențează procesul de reparație osoasă:

1. substanțele hormonale (parathormonul; hormonul de creștere; estrogenii; 1,25 dihidrocholecalciferol, IGF 1 și 2) [17];
2. moleculele produse local și activate prin acțiune autocrină sau paracrină (IGF 1 și 2; proteina morfogenetică osoasă (BMP), prostoglandinele E2 (PGE2), IL-1, TNFα, GM-CSF, TGFβ, FGF 2);
3. moleculele prezente în matricea osoasă extracelulară (FGF2, TGFβ, GM-CSF, IGF 1 și 2) sunt inactive, dar se

activizează de către celulele osteogene.

Repararea osoasă se caracterizează printr-un șir (cascadă) de evenimente: inițial în focar are loc concentrarea celulelor stem mezenchimale, care este dirijată prin atracție chimică (hemotaxis); urmează proliferarea celulelor sub acțiunea semnalelor mitogene în direcție osoasă, cartilagineasă și se activizează angiogeneza. Procesul reparator osos este ajutat de elementele matricei osoase demineralizate, din care au fost izolate 8 proteine osteogenetice (BMP 1-8) care aparțin superfamiliei TGFβ. BMP asigură diferențierea osteoblastică, concomitent BMP asigură și condrogeniza. Ca exemplu, BMP4 micșorează catabolismul condrocitelor și stimulează sinteza proteoglicanilor; BMP 7 asigură chondrogeniza [5, 6].

În ingineria tisulară sunt utilizate două strategii de bază:

- 1) Creșterea celulelor in vitro pe transplant și inocularea grefei compozite în defectul osos;
- 2) Implantarea matricei și umplerea ei ulterioară cu celulele-gazdă.

Mecanismele de diferențiere a osteoblastelor din celule stem mezenchimale necesită interfață biomimetică, stimulenți mecanici, factori solubili intracelulari și extracelulari și contact intercelular [10, 15].

CSM și UFC-F (unitățile de formare a coloniilor fibroblastice) pot fi induse in vivo pentru a prolifera și a se diferenția în linii osteoblastice, utilizând dexametazonă, acid ascorbic și glicerofosfat. În aceste condiții celulele cresc, se diferențiază și se maturizează [14].

Utilizarea măduvei osoase pentru stimularea regenerării osului este argumentată prin existența celulelor predecesorii în ea. Din celulele stem mezenchimale localizate în stroma măduvei osoase se pot dezvolta în anumite condiții osteoblaste, fibroblaste, condroblaste și adipocite. Deși măduva osoasă este principalul rezervor de celule stem mezenchimale, există lucrări care menționează prezența acestora într-o varietate de alte țesuturi. Acestea sunt periostul, țesutul conjunctiv muscular, măduva fetală, curentul sangvin, ficatul, sângele periferic, cordonul ombilical. Se pot izola celule cu potențial MSC-like din placentă și amnion. Coastele și corpurile vertebrale sunt mai greu accesibile și măduva lor nu prezintă o densitate celulară suficient de mare pentru recoltare, în special la adult [12, 14].

Celulele fetale, ca și țesuturile embrionare, nu au un sistem imun dezvoltat, ceea ce micșorează probabilitatea complicațiilor după transplantare. La acest tip de celule pot fi atribuite și celulele obținute din sângele ombilical. Ele dispun de un grad mare de proliferare și sunt capabile să formeze colonii de celule care participă la regenerarea organului. Concomitent cu celulele stem se administrează și un complex de citochine și factori de creștere care stimulează regenerarea țesuturilor [5].

Materialele suport pentru celule, citochine, factori de creștere pot fi repartizate în cinci grupe mari: os demineralizat; materiale din colagenă; polimeri resorbabili (biodegradabili) sintetici; materiale din calciu fosfat și alte materiale care mai pot servi ca suport tridimensional.

Stimularea osteogenezei în focar reprezintă elementul-cheie în tratamentul pseudartrozilor, deoarece aceasta reprezintă relansarea osteoformării, fără de care nu poate exista o evoluție spre consolidarea pseudartrozei.

Ca urmare a studiului comparativ, se poate spune că matricea osoasă demineralizată cu cultura celulară autologică osteomedulară, celulele ombilico-placentare și autoosul spongiform din osul iliac stimulează formarea țesutului osos în

spațiul interfragmentar al osului. Totodată, folosirea aloosului morcelizat demineralizat în combinație atât cu celule autologice, cât și cu cele ombilico-placentare au un efect regenerativ mai pronunțat comparativ cu utilizarea numai a celulelor măduvei osoase. Reprezentând o structură tridimensională, osul demineralizat și morcelizat este un bun suport pentru grefele celulare, asigurând creșterea celulelor în interiorul spongiei într-un anturaj aproape de cel obișnuit pentru creșterea și dezvoltarea celulelor osteoblastice. MOD reprezintă o spongie de colagen de tip I, care tocmai este carcasa osoasă [11].

Grefelecombinat (compozite), osteomatricea demineralizată cu celulele osteomedulare sau ombilico-placentare, fiind o asociere a două grefe cu capacități osteoinductiv pronunțate, permit completarea reciprocă a capacităților lor și obținerea unei grefi noi. Această grefă compozită se menține în regiunea inoculării și activizează procesul de regenerare stagnat [8, 14].

Indiferent de metoda utilizată pentru stimularea formării regeneratului osos, succese în această direcție pot fi obținute numai asigurând următoarele condiții de bază:

1. imobilitatea (osteosinteza) stabilă a fragmentelor osoase;
2. alimentarea, vascularizarea suficientă a grefelor; de aceea grosimea transplanturilor corticale nu trebuie să depășească 2 cm;
3. lipsa în alotransplant a elementelor medulare osoase, purtătoare ale unor capacități antigenice pronunțate, care poate provoca reacția gazdă contra transplant, se produce prin demineralizarea și decelularizarea țesuturilor.

Investigațiile radiologice și scintigrafice ale oaselor, executate periodic pentru a supraveghea și aprecia activitatea procesului de regenerare, denotă convingător că procesele osteoinductive evoluează activ la nivelul amplasării grefelor. Astfel, dacă pe scintigrama efectuată până la inoculare acumularea radiofarmaceuticului este diminuată în regiunea afectată, apoi după 2 luni tabloul se schimbă evident prin formarea unei zone de captare intensă a acestui preparat, indicând o vasculogeneză activă la acest nivel.

Utilizarea grefelor compozite în pseudartroze ale scafoidului carpian determină păstrarea lungimii și formei scafoidului carpian. Citochinele din grefa celulară și alți factori morfoinductivi secretați de celulele implantate activizează procesul de regenerare și de neovasculogeneză, care tocmai favorizează consolidarea acestui os capricios. Din numărul total de 14 pacienți, în 12 cazuri a fost obținută consolidarea fragmentelor cu rezultate anatomice și funcționale satisfăcătoare.

Mecanismul de acțiune a celulelor transplantate rămâne în mare măsură neelucidat până la sfârșit și, deseori, folosirea practică a metodei anticipează argumentarea științifică [13].

S-a observat că după transplantarea celulară se activizează proliferarea celulelor lojei recipiente și restabilirea parțială sau integrală a structurii și funcției organului. Acțiunea morfoinductivă este argumentată prin eliminarea citochinelor de către celulele transplantate și interacțiunea intercelulară cu celulele-gazdă. Totodată, celulele embrionare de la donator formează colonii în organele afectate ale recipientului și, proliferând, înlocuiesc celulele deteriorate ale organismului, formând țesut funcțional morfologic corespunzător regiunii afectate [13, 18, 20].

Tehnologia ingineriei tisulare și celulare include mai multe etape:

1. obținerea materialului autologic destinat separării din el a celulelor mezenchimale necesare pentru transplantare;

2. cultivarea celulelor in vitro pentru obținerea cantității necesare de celule și diferențierea lor în direcția respectivă prin utilizarea factorilor de creștere;

3. alegerea suportului adecvat, spongie sau șablon care servește drept matrice pentru celule și le permite să crească în direcția necesară;

4. transplantarea celulelor sau materialului mixt (compozit) fără risc de rețet al grefei.

Probabil, transplantarea celulară are avantaje în raport cu terapia genică și cea peptidică, din considerente că celulele au o acțiune mai fină asupra țesuturilor. Celula este cea care dispune de proprietatea de a controla nivelul optimal necesar al factorilor de creștere pe care-i secretă pentru a acționa în focarul patologic [11, 14].

Ingenieria tisulară este viitorul științei medicale și baza medicinei regenerative.

## Concluzii

1. Cercetările efectuate de noi ne-au permis să deducem că osteogeneza reparatorie în os depinde direct de componentul celular și de factorii humoral care participă în reglarea acestui proces complicat în organismul cu osteogeneză deprimată, rezultate pozitive fiind obținute în 81,9% cazuri.

2. Dezvoltarea biotehnologiilor, biologiei moleculare și celulare a fost și este influențată de transplantarea celulară, actualmente fiind una dintre disciplinele biologiei și medicinei care cunoaște o dezvoltare foarte intensivă. Acest curent își găsește reflectarea și în tratamentul diferitor afecțiuni ale aparatului locomotor.

3. Multitudinea preparatelor bioplastice propuse pentru ameliorarea regenerării osoase reflectă starea actuală a lucrurilor: până în prezent nu există o grefă unanim acceptată, care ar satisface cerințele medicinei. Pe lângă anumite avantaje, fiecare din aceste metode comportă și deficiențe.

## Bibliografie

- 1) Ababai I., Ciobanu P., Ghidirim Gh., Nacu V., Sroiti I. Optimizarea regenerării reparatorii a țesuturilor și imunogenezei locale în contextul funcționării nanosistemelor naturale. Chișinău: „Tipografia centrală”, 2011, 336 p.
- 2) Buttery L.D., Bourne S., Xynos J.D., et al. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng*, (2001) 7:p. 89–99.
- 3) Chen F., Chen S., Tao K. et al. Marrow-derived osteoblasts seeded into porous natural coral to prefabricate a vascularised bone graft in the shape of a human mandibular ramus: experimental study in rabbits. *Br. J.Oral. Maxillofac. Surg.* 2004. Vol. 42, 6. p. 532-537.
- 4) Farge D. Les greffes. *Traité de Médecine* 4 edition, Paris, 2004, p.3086-3145
- 5) French A., Wood S. & Trounson A. Human therapeutic cloning (NTSC): Applying research from mammalian reproductive cloning. *Stem Cell Reviewers*, 2006 Dec ;2 (4):p. 265-276
- 6) Faulkner A., Geesink I., Kent J., Fitzpatrick D., Human tissue engineered products, drugs or devices?, *BMJ* 2009, 326: p.1159-1160
- 7) Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application, second edition, 2015, 705p.
- 8) Jilka R. L. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone Volume* 40, Issue 6, June 2007, p. 1434-1446.
- 9) Kuh S.U., Cho Y.E., Yoon D.H. et al. Functional recovery after human umbilical cord blood cells transplantation with brain-derived neurotrophic factor into the spinal cord injured rat. *Acta Neurochir. (Wien)* 2005, 147: p.985-992.
- 10) Lee R.H., Kim B., Choi I. et al., Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue, *Cell Physiol Biochem* 14 (2004), pp. 311–324.
- 11) Luyten F.P., Del’Accio F., Bari C., Skeletal tissue engineering, opportunities and challenges. *Best Practice and Research, Clin. Rheumatology*, Vol 15, No. 5, 759-770, 2001
- 12) Mageed A.S., Pietryga D.W., DeHeer D.H. et al., Isolation of large numbers of mesenchymal stem cells from the washings of bone marrow collection bags: characterization of fresh mesenchymal stem cells, *Transplantation* 83 (2007), p. 1019–1026.
- 13) Maillat M., *Biologie cellulaire*, Masson, Paris, 2002, p.10-31.
- 14) Nacu V. Optimizarea regenerării osoase posttraumatice dereglate. Chișinău: „Tipografia –Sirius”, 2010. 188 p.
- 15) PHILLIPS A. T. M., BROWN D. T., ORAM T. Z., HOWIE C. R., USMANI A. S. The elastic properties of morsellised cortico-cancellous bone graft are dependent on its prior loading, *Journal of biomechanics* 2006, vol. 39, Nr.8, p.1517-1526.
- 16) Revencu T, Trifan V, Nacu L, Gutium T, Globa L, Motoc AG, Nacu V. Collection, isolation and characterization of the stem cells of umbilical cord blood. *Rom J Morphol Embryol.* 2013;54(2): p. 291-7.
- 17) Theoleyre S., Wittrant Y., Tat S. K. et al. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: Involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15: p. 457–475.
- 18) Топор Б. М. Комбинированные пластические материалы из костного матрикса и эмбриональных тканей. Дис. Д-ра хабилитата мед.наук. – М., 1991, 354 с.
- 19) Фриденштейн А. Я., Лалыкина К. С. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. *М. Медицина*, 1973, - 224 с.