

Наиболее значимая роль в этих процессах отводится стволовым клеткам — гетерогенной популяции клеток, которые находятся в крови, жировой ткани, крови пуповины и костном мозге [12]. Они способны мигрировать в область активного воспалительного процесса в ответ на выделяющиеся хемокины, а также участвуют в процессе регенерации [13]. Фенотип культивированных *in vitro* стволовых клеток: CD14-, CD34-, CD45-, CD44+, CD106+, CD146+, CD166+. У лабораторных животных фенотип может отличаться. Так, например, у стволовых клеток кроликов не представлены антигены CD29 и CD90 [14, 15]. Исследовано потенцирующее влияние аспириата костного мозга на остеогенез. После трансплантации стволовые клетки мигрируют в область перелома и стимулируют сращение в результате секреции BMP-2. Кроме того, вследствие снижения секреции IL-1, IL-6, TNF происходит модуляция иммунного ответа без существенного влияния на синтез ИЛ-10 и ИЛ-13 [17].

В работах С. Niu и соавт., Е. Vueno и соавт., J. Connolly и соавт., Р. Hernigou и соавт., посвященных изучению влияния костного мозга на остеогенез и интеграцию трансплантатов, доказан положительный эффект при введении его аспириата в область оперативного вмешательства и установлено, что концентрация стволовых клеток в нем существенно выше, чем в крови [16, 18–21]. Этот факт объясняет целесообразность применения костномозгового аспириата при выполнении костной пластики.

При применении стволовых аутоклеток в моделях на лабораторных животных выявлено, что увеличение костной мозоли происходит в результате усиления остеогенеза и хондрогенеза [17]. Аллогенные стволовые клетки также способствовали формированию спондиллодеза, при этом побочные эффекты не наблюдались [15]. По данным экспериментальных исследований в моделях на животных, трансплантаты из гидроксиапатита, трикальцийфосфата в сочетании со стволовыми клетками успешно использовали при реконструкции краниофациальных дефектов и критических дефектов длинных трубчатых костей [22–39].

Несмотря на обнадеживающие результаты применения стволовых клеток, вопрос в отношении безопасности метода остается открытым. Опубликованы сообщения о том, что пролиферация стволовых клеток может стать неконтролируемой, а мезенхимальные стволовые клетки — туморогенными [43], кроме того, в области восприимчивого ложа было отмечено формирование саркомы, предположительно из-за супрессии противоопухолевого иммунитета [44].

Таким образом, эффективность и безопасность клеточных технологий с применением стволовых клеток остаются недостаточно изученными. В настоящее время в большинстве стран эти технологии еще не одобрены для клинического применения. В связи с этим количество работ, посвященных клиническому применению стволовых клеток, остается небольшим. Значительная часть

из них посвящена успешному замещению костного дефекта трансплантатом со стволовыми аутоклетками [18, 40, 41], также доказано, что трансплантация аллогенного костного мозга усиливала остеогенез при *osteogenesis imperfecta* [42].

Перспективным является изучение влияния факторов роста на репаративные процессы костной ткани, так как известно, что они стимулируют миграцию клеток, их дифференцировку и ангиогенез. Выполнено достаточно большое количество экспериментальных работ, однако их результаты не отличаются однородностью исследований вследствие частой несопоставимости дизайнов исследований. Наиболее часто применялись следующие факторы роста — *bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)*, *BMP-7/osteogenic protein 1 (OP-1)*, *fibroblast growth factor (FGF)*, *platelet-derived growth factor (PDGF)*, *transforming growth factor beta 3 (TGF-β3)*, *vascular endothelial growth factor (VEGF)*, *platelet growth factor (PIGF)*.

В настоящее время получены как экспериментальные, так и клинические результаты применения **BMP-2** [45–47]. Выявлено, что при применении данного цитокина происходит усиление остеогенеза в 1,2–21 раз, однако постоянное неконтролируемое выделение фактора не всегда благоприятно сказывалось на остеогенезе. До сих пор не установлена оптимальная концентрация BMP-2, разброс применяемых доз составляет от 5 до 100 мкг. Есть данные, что действие факторов BMP-2 и BMP-7 синергично, так как при их совместном применении остеогенез усиливался в 1,5 раза по сравнению с моделями, в которых каждый фактор использовался изолированно. При одновременном применении VEGF и BMP-2 наблюдали еще большую выраженность процессов остеогенеза, так как первый фактор стимулирует неоангиогенез, а второй — остеогенную дифференцировку клеток [4]. Тем не менее мета-анализ работ с клиническим применением BMP-2 ставит под сомнение целесообразность применения этого фактора в связи с недоказанной эффективностью, а также в связи с существенным риском осложнений (общая частота составила 11%, а частота выявления злокачественных опухолей — 3,4%). Помимо этого, отмечались патологические иммунные реакции, наблюдения почечной недостаточности и наджелудочковой аритмии [48–50].

Другой подходящей основой для разработки остеоиндуктивных материалов принято считать **BMP-7**. Тем не менее результаты, полученные по итогам экспериментов, неоднородны и с большим разбросом полученных данных: усиление остеогенеза происходило в 1,1–95 раз, причем применяемые дозы препарата варьировали от 100 мкг до 3,5 мг. Вследствие такой неоднородности дизайна исследований выводы в отношении завышенности эффекта от вводимой дозы и результативности применения фактора часто являются взаимоисключающими. При комбинированном применении BMP-7 синергизм выявлен только в сочетании с BMP-2, в то время как с другими цитокинами и стволовыми клетками положительного эффекта не получено [4].

Определенный интерес представляет фактор роста **FGF-2**. Доза препарата, содержащая этот фактор в экспериментах, имела диапазон от 0,01 до 200 мкг. При применении **FGF-2** происходило усиление остеогенеза в 1,1-16,4 раза, причем эффект был дозозависим. Предполагаемые эффекты действия **FGF-2** — неангиогенез и остеогенез, тем не менее некоторые авторы считают, что фактор роста фибробластов в большей степени влияет на хондрогенез, чем на остеогенез [4, 51, 52]. Также было выявлено, что при постоянном поступлении данного фактора роста в область остеогенеза эффективность его снижалась. При совместном применении **BMP-2** и **FGF-2** фактор роста фибробластов достоверно тормозил остеогенез, снижая эффективность применения первого [4].

По данным литературы, также определена роль **PDGF** как митогена, усиливающего неангиогенез. В экспериментальной модели установлено, что он ускоряет регенерацию в области костного дефекта в 1,4-2,4 раза, а применяемые дозы варьировали 0,01-80 мкг. Тем не менее сообщалось о снижении костной плотности в области остеогенеза при применении высоких доз данного фактора [4]. Представлены наблюдения, где при совместном применении **PDGF** и **VEGF** сращения переломов вообще не происходило, а при применении и **BMP-2** последний усиливал остеогенез. Авторы предполагают, что фактор **PDGF** необходим для энхондрального окостенения [4].

TGF- β — один из наиболее важных факторов, стимулирующих остеогенез, однако роль его неоднозначна. В большинстве случаев действие этого фактора приводит к формированию хряща с последующим окостенением. Изолированное применение **TGF-3** приводило к повышению интенсивности остеогенеза в 1,75-3 раза, но в некоторых случаях происходило формирование хряща без увеличения костной массы. Существенно увеличивалась эффективность при применении **TGF-3** с **BMP-2** — тогда интенсивность остеогенеза увеличивалась в 5 раз [4]. В экспериментах на мышцах было выявлено, что **TGF-1** увеличивает синтез м-РНК маркеров остеобластов и щелочной фосфатазы и тормозит экспрессию остеокальцина [53—55]. Выраженность его эффектов зависит от плотности клеток, стадии дифференцировки и концентрации, имеет двухфазное действие [56—58]. Кроме того, этот фактор оказывает зависимое от концентрации воздействие на дифференцировку остеобластов [56, 59]. Помимо того, что **TGF-1** является основным фактором индукции остеогенеза, он стимулирует дифференцировку **IL-17** клеток, которые стимулируют остеокластогенез, а также активируют синтез провоспалительных цитокинов [60]. Однократное воздействие **TGF-1** в дозе 1 нг/мл приводит к дифференцировке остеобластов, тогда как повторное воздействие тормозит их дифференцировку [61, 62]. Основной механизм ингибирования при повторном воздействии — снижение синтеза **IGF-1** [62]. При повторном введении **TGF-1** в дозе 0,1 нг/мл значительно снижается синтез м-РНК щелочной фосфатазы

и **IGF-1**. После инициации **TGF-1** дифференцировки остеобластов ключевым фактором, ответственным за дальнейшую дифференцировку, является **IGF-1**. Добавление экзогенного **IGF-1** в дозе 200 нг/мл восстанавливает синтез щелочной фосфатазы остеобластами, устраняя вызванную **TGF-1** супрессию [62].

Важным фактором дифференцировки остеобластов, а также роста кости, является **IGF-1** (инсулиноподобный фактор роста), который вырабатывается остеоцитами и зрелыми остеобластами и депонируется в кости, высвобождаясь по мере резорбции. Цитокин не вызывает остеогенную дифференцировку стволовых клеток, однако усиливает функцию зрелых остеобластов [62, 63]. **IGF-1** связан с модулированием механотрансдукции в костной ткани [63]. Повышение синтеза инсулиноподобного фактора роста является ранним ответом костной ткани на механическую нагрузку. Гиперсекреция **IGF-1**, вызванная у трансгенных мышей, приводила к повышенному остеогенезу в ответ на механическую нагрузку [64—66]. При отсутствии нагрузки на кость введение **IGF-1** не приводит к повышенному остеогенезу [67, 68]. Повреждение в гене **IGF-1** остеобластов приводит к значительному снижению остеогенеза в ответ на механическую нагрузку [69]. Роль цитокина в остеоинтеграции при костной пластике исследована в экспериментальной модели на животных — совместное применение **IGF-1** и **PDGF** положительно влияло на интеграцию трансплантатов [70].

Известно, что ведущими звеньями патогенеза при повреждении костной ткани являются некроз и гипоксия. Доказано, что **VEGF** необходим для формирования нормальной сосудистой сети в местах повреждения ткани [71]. Введение трансплантатов, содержащих **VEGF**, в область костного дефекта усиливает васкуляризацию и увеличивает костную массу в 1,6-2 раза [71]. Но есть и сообщения о том, что при введении трансплантатов с **VEGF** в область дефекта происходило лишь усиление ангиогенеза без увеличения костной массы [4]. Такое отличие результатов обусловлено тем, что важна кинетика высвобождения фактора роста: необходимо длительное постепенное высвобождение **VEGF**, в противном случае возможно формирование капилляров без связи с сосудистым руслом или образование ангиом при гиперстимуляции [72].

Гомолог **VEGF**, плацентарный фактор роста (**PlGF**), оказывает значимое влияние на воспалительный процесс. Принимая во внимание важность ангиогенеза и воспалительного процесса в репарации переломов, в различных исследованиях выдвинуты предположения о том, что **PlGF** также играет роль в регенерации костной ткани. Есть данные, подтверждающие его важность в 4 ключевых процессах восстановления кости. Во-первых, **PlGF** необходим для эффективной инициации воспалительного процесса и ангиогенеза в ответ на повреждение. Во-вторых, он влияет на пролиферацию и дифференциацию мезенхимальных клеток-предшественников. В-третьих, стимулирует образование хряща опосредованно с

помощью цепочек матричных металлопротеиназ (MMPs). В-четвертых, PIGF обязателен для оптимального ремоделирования вновь образованной кости [73]. В других источниках PIGF рассматривается как механорегулирующий ген в мезенхимальных стволовых клетках (MSC), чей уровень экспрессии чувствителен к величине и длительности стимуляции. При его секреции происходит аутокринное действие на MSC, в результате чего повышается остеогенная дифференцировка при низких концентрациях (20 нг/мл). При более высоких концентрациях (50 нг/мл) индуцируется остеокластогенез и ангиогенез. Таким образом, обеспечиваются предпосылки для процессов костного ремоделирования и репарации [74]. По результатам исследований было выявлено, что механочувствительные гены в MSC способны функционально запустить ремоделирование кости и восстановление переломов [74]. Кроме того, в исследованиях *in vitro* доказан факт хемотаксиса мезенхимальных клеток-предшественников в ответ на PIGF [73, 74]. Доказано, что эта многофункциональность является выгодной в процессах регенерации костной ткани. Терапевтические стратегии, направленные на ускорение заживления кости в случаях застарелых или несросшихся переломов, требуют применения нескольких факторов, дополняющих друг друга, например, таких как ангиогенный и остеогенный факторы VEGF и BMP-4. В связи с этим представляется перспективным применение цитокина с полимодальным действием. Также можно предположить, что, используя PIGF, не потребуется дополнительно насыщать трансплантат стволовыми клетками, так как они будут мигрировать в трансплантат или к его границе.

Несмотря на то что работы, изучающие возможное влияние **HGF (hepatocyte growth factor)** на регенерацию костной ткани, не распространены, они заслуживают определенного внимания. Этот цитокин уникален благодаря двум свойствам: он обладает проангиогенным действием и является хемоаттрактантом (так же, как и PIGF) для стволовых мезенхимальных клеток. Градиент этого фактора вызывает миграцию стволовых клеток вследствие того, что на их поверхности представлен специфический рецептор [75, 76]. В эксперименте в качестве носителя данного фактора может быть использован фибриновый и коллагеновый гель. Постепенно высвобождаясь в результате хемотаксиса, HGF будет приводить к инвазии трансплантата стволовыми клетками [77, 78].

Помимо факторов роста, доказана существенная роль **медиаторов воспаления** не только при воспалительных и аутоиммунных заболеваниях, но и, как ни парадоксально, регенерации и ремоделировании костной ткани. По данным исследований, применение противовоспалительных препаратов или удаление гематомы приводит к увеличению сроков сращения перелома [79—81]. IL-1 является одним из основных регуляторов синтеза провоспалительных цитокинов. Известно, что большую роль в триггерном ангиогенезе во время воспаления играют IL-6 и IL-8. Предполагается

значительная роль IL-6 в ранних стадиях репаративного процесса костной ткани [82]. В целом имеется достаточно противоречивая информация о роли цитокинов в процессе регенерации и ремоделировании костной ткани. Так, есть данные, что IL-1 вызывает быструю дифференцировку стволовых клеток в остеобласты [83]. В ответ на стимуляцию стволовых клеток IL-1 происходило усиление секреции BMP-2, IL-8, TNFSF11, IL-6 [84]. IL-1 усиливает минерализацию матрикса, запуская альтернативный механизм. Известно, что минерализация матрикса очень сильно ингибируется анионами пирофосфата, при этом баланс между анионами фосфат-пирофосфат является важным регулятором минерализации [85—87]. В основе механизма действия IL-1 лежит снижение пирофосфата, который является ингибитором минерализации матрикса. Обычно увеличенная скорость минерализации сочетается с увеличением активности щелочной фосфатазы, но этого не происходит при воздействии IL-1. Также этот цитокин не приводит к индукции синтеза других маркеров остеогенеза [88]. Опубликованы данные, что IL-1 тормозит рост и дифференцировку стволовых клеток, но стимулирует рост и дифференцировку преостеобластов. Тем не менее значительной роли введенного дополнительно IL-1 при сращении перелома не выявлено. В то же время известно, что IL-1 участвует в дифференцировке остеокластов [89, 90].

Также, благодаря участию в воспалительных процессах, регуляции обмена веществ костной ткани и ангиогенеза, определенный интерес представляет мультимодальный цитокин **IL-6** [91]. Основным его эффектом, изученным *in vivo*, является преобладание костной резорбции над остеогенезом. Мезенхимальные стволовые клетки экспрессируют низкие концентрации рецептора цитокина IL-6, который, вероятно, необходим для их активации [12]. Тем не менее, *in vitro* не выявлено значительного влияния цитокина на дифференцировку стволовых клеток, происходило лишь некоторое увеличение минерализации матрикса [12]. Тем не менее есть данные, что IL-6 может вызывать прямое ингибирование остеокластов [92].

IL-17 α и TNF- α — медиаторы, ответственные за костную деструкцию при ревматоидном артрите и других аутоиммунных процессах [93—96]. IL-17 стимулирует остеокластогенез, а TNF- α за счет ингибирования BMP-2 также опосредованно стимулирует дифференцировку остеокластов [97]. Действие цитокинов зависит от окружения, эти же цитокины приводят к оссификации связок и сухожилий при анкилозирующем спондилите. Такое отличие действия цитокинов объясняется отсутствием остеокластов в связках и сухожилиях [98]. При исследовании механизма потери костной массы при гипоэстрогемии выявлено, что дефицит эстрогенов приводит к гиперсекреции IL-17, вследствие чего происходит увеличение выделения проостеокластогенных цитокинов IL-1, IL-6. Блокирование этого цитокина предотвращает потерю костной массы [99]. При фор-

мировании остеокластов и в процессах ремоделирования костной ткани большое значение имеет баланс цитокинов IFN- и IL-17 [100]. IFN- даже в небольших дозах тормозит остеокластогенез [101, 102]. IFN-, IL-12, IL-4 значительно уменьшают экспансию клеток, продуцирующих IL-17 [103].

Значительную роль в дифференцировке остеокластов играет M-CSF, но выявлен еще один лиганд для рецептора CSF1-R — **IL-34**, выработку которого стимулирует TNF-. Он имеет существенное значение в формировании остеокластов [104, 105]. **IL-20** — также один из значимых цитокинов, участвующих в дифференцировке остеокластов, а антитела к нему значительно усиливают остеогенез [106]. Эффектом **IL-4** и **IL-13** является торможение резорбции кости, поскольку они ингибируют предшественников остеокластов. Оба цитокина приводят к выработке остеопротегрина (OPG), который является ложным рецептором для RANKL (receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand), предотвращая резорбцию костной ткани. IL-4 более эффективно ингибирует предшественников остеокластов, но оба цитокина эффективны в отношении стимуляции OPG продукции остеобластами [107]. Также среди цитокинов, влияющих на ремоделирование костной ткани, следует отметить **IL-11**, который стимулирует рост миелоидных клеток, ингибирует развитие адипоцитов, при этом стимулирует развитие остеокластов [108-112]. Опубликованы данные, что этот цитокин препятствует потере костной массы [113]. Так, при отсутствии физической нагрузки происходит резорбция костной ткани, а при механической нагрузке на костную ткань происходит усиление дифференцировки остеобластов и увеличение транскрипции IL-11 [114—119].

Безусловно, что при выполнении спондилодеза важен правильный подбор костнозамещающего материала по физическим свойствам и биосовместимости, однако этого может быть недостаточно для достижения хорошего результата, особенно при сниженной реактивности организма. Клеточные и тканевые технологии являются перспективным направлением, целью которого является воздействие на реактивность тканей, тем не менее полученные в этой области знания до настоящего времени носят несколько фрагментарный характер, часто встречаются взаимоисключающие выводы вследствие неоднородности дизайна исследований. Доказано, что для действия цитокинов важны доза, скорость и длительность выделения из носителя, а также микроокружение. Кроме того, необходимо знание этапов, когда требуется тот или иной цитокин. Применение низкодифференцированных клеток всегда вызывает некоторое опасение в отношении непредсказуемости процессов пролиферации и дифференцировки и неуправляемости этими процессами. В связи с этим считают перспективными работы, направленные на дифференцировку стволовых клеток. Принимая во внимание этот аспект, можно предположить, что эффективнее использовать клетки, которые обладают свойствами преостеобластов. Очевидно, что при

применении цитокинов возможны нежелательные побочные системные эффекты и аллергические реакции. Основываясь на имеющихся фактах, можно сделать заключение, что многие цитокины для дифференцировки стволовых клеток могут быть применены экстракорпорально. В этом случае уже до трансплантации клетки могут приобрести необходимые свойства, следовательно, системное действие цитокинов существенно уменьшится. С учетом неуклонного роста хирургических вмешательств по поводу патологии позвоночника, распространенности остеопороза и частоты неудовлетворительных результатов вследствие псевдоартроза, очевидна острая необходимость в разработке клеточных технологий, которые смогли бы помочь преодолеть проблему неоптимальной реактивности организма и замещения костных ауто трансплантатов при остеопорозе, компенсируя недостатки алло- и ксенопластики.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Булкин Анатолий Алексеевич — клинический ординатор-нейрохирург, e-mail: anatolbulkin@gmail.com

Боков Андрей Евгеньевич — канд. мед. наук, старший научный сотрудник группы позвоночно-спинномозговой патологии отделения нейрохирургии, e-mail: andrei_bokov@mail.ru

Алейник Александр Яковлевич — канд. мед. наук, научный сотрудник группы позвоночно-спинномозговой патологии отделения нейрохирургии, e-mail: aaleynik@yandex.ru

Млявух Сергей Геннадьевич — канд. мед. наук, зав. нейрохирургическим отделением, e-mail: spinedoc@bk.ru

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Einhorn T.A. Enhancement of fracture-healing. J Bone Joint Surg Am. 1995; 77:940—956.
2. Marsh D. Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion. ClinOrthop. 1998:S22—30.
3. Praemer A., Furner S., Rice D.P. Musculoskeletal Conditions in the United States. 2. RosemontIL: The American Academy of Orthopaedic Surgeons; Park Ridge, Illinois: 1999.
4. Gothard D., Smith E.L., Kanczler J.M. et al. Tissue engineered bone using select growth factors: A comprehensive review of animal studies and clinical translation studies in man. Eur Cell Mater. 2014 Oct 6; 28:166-207; discussion 207-8.
5. Boden S.D. et al. Biology of lumbar spine fusion and use of bone graft substitutes: present, future, and next generation. Tissue Eng. 2000 Aug;6(4):383-99.
6. Bessa P.C., Casal M., Reis R.L. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). J Tissue Eng Regen Med. 2008;2(2—3):81—96.
7. Sundelacruz S., Kaplan D.L. Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. Semin Cell Dev Biol. 2009;20(6):646—655.
8. Roy T.D., Simon J.L., Ricci J.L. et al. Performance of degradable composite bone repair products made via three-dimensional fabrication techniques. J Biomed Mater Res A. 2003; 66(2):283—291.
9. Karageorgiou V., Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. Biomaterials. 2005;26(27):5474—5491.
10. Buser D., Schenk R.K., Steinemann S. et al. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium

- implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res.* 1991;25(7):889–902.
11. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41–49.
 12. Lieder R., Sigurjonsson O.E. The Effect of Recombinant Human Interleukin Osteogenic Differentiation and YKL Mesenchymal Stem Cells. *Biores Open Access.* 2014 Feb 1;3(1):2910.1089/biores.2013.0035.
 13. Bueno E.M., Glowacki J. Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration. *Nat Rev Rheumatol.* 2009;5(12):685–697.
 14. Neman J., Hambrecht A., Cadry C., Jandial R. Stem cell therapeutic potential for bone tissue engineering. *Biologics.* 2012;6:47. doi: 10.2147/BTT.S22407. Epub 2012 Mar 9.
 15. Lee T.H., Huang Y.H., Chang N.K. et al. Characterization and spinal fusion effect of rabbit mesenchymal stem cells. *BMC Res Notes.* 2013 Dec 10;6:528. doi: 10.1186/1756
 16. Niu C.C., Lin S.S., Yuan L.J. et al. Identification of mesenchymal stem cells and osteogenic factors in bone marrow aspirate and peripheral blood for spinal fusion by flow cytometry and proteomic analysis. *J Orthop Surg Res.* 2014 May 3;9:32. doi: 10.1186/1749
 17. Granero Jansen E.D., Mortlock D.P., Spagnoli A. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells.* 2009 Aug;27(8):1887.
 18. Bueno E.M., Glowacki J. Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration. *Nat Rev Rheumatol.* 2009;5(12):685–697.
 19. Connolly J.F., Guse R., Tiedeman J., Dehne R. Autologous marrow injection for delayed unions of the tibia: a preliminary report. *J Orthop Trauma.* 1989;3(4):276–282.
 20. Hernigou P., Poignard A., Manicom O. et al. The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. *J Bone Joint Surg Br.* 2005;87(7): 896–902.
 21. Friedenstein A.J., Piatetzky-Shapiro I.I., Petrakova K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966;16(3): 381–390.
 22. De Kok I.J., Peter S.J., Archambault M., et al. Investigation of allogeneic mesenchymal stem cell-based alveolar bone formation: preliminary findings. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(4):481–489.
 23. Mankani M.H., Kuznetsov S.A., Fowler B. et al. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape. *Biotechnol Bioeng.* 2001;72(1):96–107.
 24. Tsuchida H., Hashimoto J., Crawford E. et al. Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats. *J Orthop Res.* 2003;21(1):44–53.
 25. Kon E., Muraglia A., Corsi A. et al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res.* 2000 Mar 5;49(3):328–37.
 26. Shang Q., Wang Z., Liu W. et al. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *J Craniofac Surg.* 2001 Nov;12(6):586–93; discussion 594–5.
 27. Mankani M.H., Kuznetsov S.A., Shannon B. et al. PG. Canine cranial reconstruction using autologous bone marrow stromal cells. *Am J Pathol.* 2006 Feb;168(2):542–50.
 28. Liu G., Zhao L., Zhang W. et al. Repair of goat tibial defects with bone marrow stromal cells and beta-tricalcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med.* 2008 Jun;19(6):2367–76. Epub 2007 Dec 25.
 29. Giannoni P., Mastrogiacomo M., Alini M. et al. Regeneration of large bone defects in sheep using bone marrow stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008 Jul;2(5):253–62. doi: 10.1002/term.90.
 30. Dumas A., Moreau M.F., Ghürardi R.K. et al. Bone grafts cultured with bone marrow stromal cells for the repair of critical bone defects: an experimental study in mice. *J Biomed Mater Res A.* 2009 Sep 15;90(4):1218–29. doi: 10.1002/jbm.a.32176.
 31. Xu J.Z., Qin H., Wang X.Q. et al. Repair of large segmental bone defects using bone marrow stromal cells with demineralized bone matrix. *Orthop Surg.* 2009 Feb;1(1):34–41. doi: 10.1111/j.2757-7861.2008.00007.x.
 32. Nair M.B., Varma H.K., Menon K.V. et al. Reconstruction of goat femur segmental defects using triphasic ceramic-coated hydroxyapatite in combination with autologous cells and platelet-rich plasma. *Acta Biomater.* 2009 Jun;5(5):1742–55. doi: 10.1016/j.actbio.2009.01.009. Epub 2009 Jan 21.
 33. Chang S.C., Lin T.M., Chung H.Y. et al. Large-scale bicortical skull bone regeneration using ex vivo replication-defective adenoviral-mediated bone morphogenetic protein-2 gene-transferred bone marrow stromal cells and composite biomaterials. *Neurosurgery.* 2009 Dec;65(6 Suppl):75–81; discussion 81–3. doi: 10.1227/01.NEU.0000345947.33730.91.
 34. Chang S.C., Chung H.Y., Tai C.L. et al. Repair of large cranial defects by hBMP-2 expressing bone marrow stromal cells: comparison between alginate and collagen type I systems. *J Biomed Mater Res A.* 2010 Aug;94(2):433–41. doi: 10.1002/jbm.a.32685.
 35. Xiao C., Zhou H., Ge S. et al. Repair of orbital wall defects using bioacral scaffolds combined with bone marrow stem cells enhanced by human bone morphogenetic protein-2 in a canine model. *Int J Mol Med.* 2010 Oct;26(4):517–25.
 36. Zhou H., Deng Y., Bi X. et al. Orbital wall repair in canines with beta-tricalcium phosphate and induced bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013 Nov;101(8):1340–9. doi: 10.1002/jbm.b.32951. Epub 2013 May 17.
 37. Gardel L., Afonso M., Frias C. et al. Assessing the repair of critical size bone defects performed in a goat tibia model using tissue-engineered constructs cultured in a bidirectional flow perfusion bioreactor. *J Biomater Appl.* 2014 Jan 9;29(2):172–185. [Epub ahead of print]
 38. Fernandes M.B., Guimarães J.A., Casado P.L. et al. The effect of bone allografts combined with bone marrow stromal cells on the healing of segmental bone defects in a sheep model. *BMC Vet Res.* 2014 Feb 5;10:36. doi: 10.1186/1746-6148-10-36.
 39. Ronca A., Guarino V., Raucci M.G. et al. Large defect-tailored composite scaffolds for in vivo bone regeneration. *J Biomater Appl.* 2014 Nov;29(5):715–27. doi: 10.1177/0885328214539823. Epub 2014 Jun 20.
 40. Quarto R., Mastrogiacomo M., Cancedda R. et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med.* 2001;344(5):385–386.
 41. Maracci M., Kon E., Moukhachev V., et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng.* 2007;13(5):947–955.
 42. Horwitz E.M., Prockop D.J., Fitzpatrick L.A. et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 1999;5(3):309–313.
 43. Tolar J., Nauta A.J., Osborn M.J. et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2007;25(2):371–379.
 44. Tasso R., Augello A., Carida M. et al. Development of sarcomas in mice implanted with mesenchymal stem cells seeded onto bioscaffolds. *Carcinogenesis.* 2009;30(1):150–157.
 45. Pensak M., Hong S., Dukas A. et al. The role of transduced bone marrow cells overexpressing BMP-2 in healing critical-sized defects in a mouse femur. 2015 Jun;22(6):467–75. doi: 10.1038/gt.2015.14. Epub 2015 Mar 26.
 46. Shakir S., MacIsaac Z.M., Naran S. et al. Transforming growth factor beta 1 augments calvarial defect healing and promotes suture regeneration. *Tissue Eng Part A.* 2015 Mar;21(5–6):939–47. doi: 10.1089/ten.TEA.2014.0189. Epub 2015 Feb 6.
 47. Kim I.G., Hwang M.P., Du P. et al. Bioactive cell-derived matrices combined with polymer mesh scaffold for osteogenesis and bone healing. *Biomaterials.* 2015 May;50:75–86. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.01.054. Epub 2015 Feb 16.
 48. Mesfin A., Buchowski J.M., Zebala L.P. et al. High-dose rhBMP-2 for adults: major and minor complications: a study of 502 spine cases. *J Bone Joint Surg Am.* 2013 Sep 4;95(17):1546–53. doi: 10.2106/JBJS.L.01730.
 49. Moshel Y.A., Hernandez E.I., Kong L., et al. Acute renal insufficiency, supraventricular tachycardia, and confusion after recombinant human bone morphogenetic protein-2 implantation for lumbosacral spine fusion. *J Neurosurg Spine.* 2008 Jun;8(6):589–93. doi: 10.3171/SPI/2008/8/6/589.

50. Fu R., Selph S., McDonagh M., et al. Effectiveness and harms of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spine fusion: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2013 Jun 18;158(12):890-902. doi: 10.7326/0003-4819-158-12-201306180-00006.
51. Guo X., Zheng Q., Kulbatski I. et al. Bone regeneration with active angiogenesis by basic fibroblast growth factor gene transfected mesenchymal stem cells seeded on porous beta-TCP ceramic scaffolds. *Biomed Mater.* 2006 Sep;1(3):93-9. doi: 10.1088/1748-6041/1/3/001. Epub 2006 Jun 5.
52. Maehara H., Sotome S., Yoshii T., et al. Repair of large osteochondral defects in rabbits using porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J Orthop Res.* 2010 May;28(5):677-86. doi: 10.1002/jor.21032.
53. Zhao L., Jiang S., Hantash B.M. Transforming growth factor 1 induces osteogenic differentiation of murine bone marrow stromal cells. *Tissue Eng. Part A* 2010;16: 725–733 [PubMed].
54. Kwok S., Partridge N.C., Srinivasan N. et al. Mitogen-activated protein kinase-dependent inhibition of osteocalcin gene expression by transforming growth factor-1. *J. Cell. Biochem.* 2009; 106:161–169 [PubMed]
55. Sun J.C., Hu Y., Zheng L.L. et al. Influence of healing process of extraction on related growth factors in microcrew-bone interface of implanted titanium microscrews near the extraction wounds. *Sichuan Da XueXueBao Yi Xue Ban.* 2015 Mar; 46(2):222-7.
56. Zhang H., Ahmad M., Gronowicz G. Effects of transforming growth factor-1 (TGF-1) on in vitro mineralization of human osteoblasts on implant materials. *Biomaterials* 2003;24: 2013–2020 [PubMed]
57. Alliston T., Choy L., Ducey P., et al. TGF--induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J.* 2001;20:2254–2272 [PMC free article] [PubMed]
58. Kaji H., Naito J., Sowa H., Sugimoto T., Chihara K. Smad3 differentially affects osteoblast differentiation depending upon its differentiation stage. *Horm. Metab. Res.* 2006;38:740–745 [PubMed]
59. Centrella M., Ji C., Casanovich S., McCarthy T.L. Rapid flux in transforming growth factor- receptors on bone cells. *J. Biol. Chem.* 1996;271:18616–18622. [PubMed]
60. Weaver C.T., Harrington L.E., Mangan P.R. et al. Th17. An effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006;24: 677–688. [PubMed]
61. Ochiai H., Yamamoto Y., Yokoyama A., et al. Dual nature of TGF-1 in osteoblastic differentiation of human periodontal ligament cells. *J. Hard Tissue Biol.* 2010;19: 187–1.
62. Ochiai H., Okada S., Saito A., et al. Inhibition of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) expression by prolonged transforming growth factor-1 (TGF-1) administration suppresses osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2012 Jun 29;287(27):22654-61. doi: 10.1074/jbc.M111.279091. Epub 2012 May 9.
63. Lau K.H., Kapur S., Kesavan C. et al. Up-regulation of the Wnt, estrogen receptor, insulin-like growth factor-I, and bone morphogenetic protein pathways in C57BL/6J osteoblasts as opposed to C3H/HeJ osteoblasts in part contributes to the differential anabolic response to fluid shear. *J BiolChem* 2006;281:9576-88.
64. Lean J.M., Mackay A.G., Chow J.W. et al. Osteocytic expression of mRNA for c-fos and IGF-I: an immediate early gene response to an osteogenic stimulus. *Am J Physiol* 1996; 270:E937-45.
65. Kawata A., Mikuni-Takagaki Y. Mechanotransduction in stretched osteocytes--temporal expression of immediate early and other genes. *BiochemBiophys Res Commun* 1998;246:404-8.
66. Reijnders C.M., Bravenboer N., Tromp A.M., et al. Effect of mechanical loading on insulin-like growth factor-I gene expression in rat tibia. *J Endocrinol* 2007;192:131-40.
67. Sakata T., Halloran B.P., Elalieh H.Z. et al. Skeletal unloading induces resistance to insulin-like growth factor I on bone formation. *Bone* 2003;32:669-80.
68. Sakata T., Wang Y., Halloran B.P. et al. Skeletal unloading induces resistance to insulin-like growth factor-I (IGF-I) by inhibiting activation of the IGF-I signaling pathways. *J Bone Miner Res* 2004;19:436-46.
69. Kesavan C., Wergedal J.E., Lau K.H. et al. Conditional disruption of IGF-I gene in type I alpha collagen-expressing cells shows an essential role of IGF-I in skeletal anabolic response to loading. *Am J PhysiolEndocrinolMetab* 2011; 301:E1191-7.
70. Sheng M.H., Lau K.H., Baylink D.J. Role of Osteocyte-derived Insulin-Like Growth Factor I in Developmental Growth, Modeling, Remodeling, and Regeneration of the Bone. *J Bone Metab.* 2014 Feb;21(1):41-54. doi: 10.11005/jbm.2014.21.1.41. Epub 2014 Feb 28.
71. Geiger F., Lorenz H., Xu W., et al. VEGF producing bone marrow stromal cells (BMSC) enhance vascularization and resorption of a natural coral bone substitute. *Bone.* 2007 Oct;41(4):516-22. Epub 2007 Jul 6.
72. Wernike E., Montjovent M.O., Liu Y. et al. VEGF incorporated into calcium phosphate ceramics promotes vascularisation and bone formation in vivo. *Eur Cell Mater* 2010;19:30-40.
73. Maes C., Coenegrachts L., Stockmans I. et al. Placental growth factor mediates mesenchymal cell development, cartilage turnover, and bone remodeling during fracture repair. *J. Clin. Invest.* 2006;116:1230–1242. doi:10.1172/JCI26772.
74. Mccoy R., Widaa A., Watters K., et al. Orchestrating Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells—Identification of Placental Growth Factor as a Mechanosensitive Gene with a Pro-Osteogenic Role. *STEM CELLS EXPRESS* July 29, 2013. VC AlphaMed Press 1066-5099/2013 doi: 10.1002/stem.1482
75. Neuss S., Becher E., Wöeltje M., et al. Functional expression of HGF and HGF receptor/cmet in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells* 2004;22:3:405–414.
76. Vogel S., Trapp T., Borger V. et al. Hepatocyte growth factor-mediated attraction of mesenchymal stem cells for apoptotic neuronal and cardiomyocytic cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2010;67:2:295–303.
77. Ibault M.M., Hoemann C.D., Buschmann M.D. Fibronectin, vitronectin, and collagen I induce chemotaxis and haptotaxis of human and rabbit mesenchymal stem cells in a standardized transmembrane assay. *Stem Cells and Development* 2007;16: 3:489–502.
78. Van de Kamp J., Jahnen-Dechent W., Rath B., et al. Hepatocyte growth factor-loaded biomaterials for mesenchymal stem cell recruitment. *Stem Cells Int.* 2013;2013:892065. doi: 10.1155/2013/892065. Epub 2013 Jun 18.
79. Kolar P., Gaber T., Perka C., et al. Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia. *ClinOrthopRelat Res* 2011;469: 3118-3126.
80. Mountziaris P.M., Spicer P.P., Kasper F.K., Mikos A.G. Harnessing and modulating inflammation in strategies for bone regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2011;17:393-402.
81. Simon A.M., Manigrasso M.B., O'Connor J.P. Cyclooxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002;17:963-976.
82. Gracie J.A., Robertson S.E., McInnes I.B. Interleukin-18. *J LeukocBiol* 2003;73: 213-224.
83. Sonomoto K., Yamaoka K., Oshita K., et al. Interleukin-1 induces differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts via the Wnt-5a/receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 pathway. *Arthritis Rheum.* 2012 Oct;64(10):3355-63. doi: 10.1002/art.34555.
84. Czekanska E.M., Ralphs J.R., Alini M., Stoddart M.J. Enhancing inflammatory and chemotactic signals to regulate bone regeneration. *Eur Cell Mater.* 2014 Oct 23;28:320-34.
85. Fleisch H., Russell R. G., Straumann F. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature* 1966;212: 901–903 [PubMed]
86. Hessler L., Johnson K. A., Anderson H.C., et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002;99: 9445–9449 [PMC free article] [PubMed]
87. Johnson K., Terkeltaub R. Inorganic pyrophosphate (PPi) in pathologic calcification of articular cartilage. *Front. Biosci.* 2005;10:988–997 [PubMed]
88. Ferreira E., Porter R.M., Wehling N., et al. Inflammatory cytokines induce a unique mineralizing phenotype in mesenchymal stem cells derived from human bone marrow. *J Biol Chem.* 2013 Oct 11;288(41):29494-505. doi: 10.1074/jbc.M113.471268. Epub 2013 Aug 22.

89. Lange J., Sapozhnikova A., Lu C., et al. Action of IL-1 β during fracture healing. *J Orthop Res.* 2010 Jun;28(6):778-84. doi: 10.1002/jor.21061.
90. Lee Y.M., Fujikado N., Manaka H., et al. IL-1 plays an important role in the bone metabolism under physiological conditions. *Int Immunol.* 2010 Oct;22(10):805-16. doi: 10.1093/intimm/dxq431. Epub 2010 Aug 2.
91. Sims N.A., Walsh N.C. GPI30 cytokines and bone remodeling in health and disease. *BMB Rep.* 2010;43:513-523.
92. Yoshitake F., Itoh S., Narita H., et al. Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF- κ B signaling pathways. *J Biol Chem.* 2008 Apr 25;283(17):11535-40. doi: 10.1074/jbc.M607999200. Epub 2008 Feb 22.
93. Miossec P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes Infect* 2009;11:625-30. doi:10.1016/j.micinf.2009.04.003
94. Koenders M.I., Marijnissen R.J., Devesa I. et al. Tumor necrosis factor-interleukin-17 interplay induces S100A8, interleukin-1 β , and matrix metalloproteinases, and drives irreversible cartilage destruction in murine arthritis: rationale for combination treatment during arthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63:2329-39. doi:10.1002/art.30418
95. Kotake S., Udagawa N., Takahashi N., et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* (1999) 103:1345-52. doi:10.1172/JCI15703
96. Lubberts E., Joosten L.A., van de Loo F.A., et al. Overexpression of IL-17 in the knee joint of collagen type II immunized mice promotes collagen arthritis and aggravates joint destruction
97. Marupanthorn K., Tantrawatpan C., Tantikanlayaporn D., et al. The Effects of TNF- α on Osteogenic Differentiation of Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Med Assoc Thai.* 2015 Apr;98Suppl 3:S34-40.
98. Carter S., Braem K., Lories R.J. The role of bone morphogenetic proteins in ankylosing spondylitis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2012; 4:293-9. doi:10.1177/ 1759720X12444175
99. Tyagi A.M., Srivastava K., Mansoori M.N. et al. Estrogen Deficiency Induces the Differentiation of IL-17 Secreting Th17 Cells: A New Candidate in the Pathogenesis of Osteoporosis *PLoS One.* 2012;7(9):e44552. doi: 10.1371/journal.pone.0044552. Epub 2012 Sep 10.
100. Yago T., Nanke Y., Kawamoto M., et al. IL-23 induces human osteoclastogenesis via IL-17 in vitro, and anti-IL-23 antibody attenuates collagen-induced arthritis in rats. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(5):R96.
101. Kotake S., Nanke Y., Mogi M., et al. IFN- γ -producing human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes via the expression of RANKL. *Eur J Immunol.* 2005 Nov;35(11):3353-63.
102. Takayanagi H., Ogasawara K., Hida S., et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature.* 2000 Nov 30;408(6812):600-5.
103. Park H., Li Z., Yang X.O., et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005, 6:1133-1141.
104. Chen Z., Bukri K., Vdardniemi J., et al. The critical role of IL-34 in osteoclastogenesis. *PLoS One.* 2011 Apr 8;6(4):e18689. doi: 10.1371/journal.pone.0018689.
105. Yu Y., Yang D., Qiu L., et al. Tumor necrosis factor- α induces interleukin-34 expression through nuclear factor- κ B activation in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Mol Med Rep.* 2014 Sep;10(3):1371-6. doi: 10.3892/mmr.2014.2353. Epub 2014 Jun 25.
106. Hsu Y.H., Chen W.Y., Chan C.H., et al. Anti-IL-20 monoclonal antibody inhibits the differentiation of osteoclasts and protects against osteoporotic bone loss. *J Exp Med.* 2011 Aug 29;208(9):1849-61. doi: 10.1084/jem.20102234. Epub 2011 Aug 15.
107. Yamada A., Takami M., Kawawa T., et al. Interleukin-4 inhibition of osteoclast differentiation is stronger than that of interleukin-13 and they are equivalent for induction of osteoprotegerin production from osteoblasts. *Immunology.* 2007 Apr;120(4):573-9.
108. Kodama Y., Takeuchi Y., Suzawa M., et al. Reduced expression of interleukin-11 in bone marrow stromal cells of senescence-accelerated mice (SAMP6): relationship to osteopenia with enhanced adipogenesis. *J Bone Miner Res* 1998;13: 1370-1377.
109. Keller D.C., Du X.X., Srour E.F. et al. Interleukin-11 inhibits adipogenesis and stimulates myelopoiesis in human long-term marrow cultures. *Blood* 1993;82:1428-1435.
110. Du X., Williams D.A. Interleukin-11: review of molecular, cell biology, and clinical use. *Blood* 1997;89:3897-3908.
111. Kawashima I., Ohsumi J., Mita-Honjo K., et al. Molecular cloning of cDNA encoding adipogenesis inhibitory factor and identity with interleukin-11. *FEBS Lett* 1991;283: 199-202.
112. Girasole G., Passeri G., Jilka R.L., Manolagas S.C. Interleukin-11: a new cytokine critical for osteoclast development. *J Clin Invest* 1994;93:1516-1524.
113. Takeuchi Y., Watanabe S., Ishii G., et al. Interleukin-11 as a stimulatory factor for bone formation prevents bone loss with advancing age in mice. *J Biol Chem* 2002;277:49011-49018.
114. Burr D.B., Robling A.G., Turner C.H. Effects of biomechanical stress on bones in animals. 2002; *Bone* 30: 781-786.
115. Knothe Tate M.L. Whither flows the fluid in bone? An osteocyte's perspective. *J Biomech* 2003;36:1409-1424.
116. Jaworski Z.F., Liskova-Kiar M., Uhthoff H.K. Effect of long-term immobilisation on the pattern of bone loss in older dogs. *J Bone Joint Surg* 1980;Br 62-B:104-110.
117. Morey E.R., Baylink D.J. Inhibition of bone formation during space flight. *Science* 1978;201: 138-141.
118. Kodama Y., Nakayama K., Fuse H., et al. Inhibition of bone resorption by pamidronate cannot restore normal gain in cortical bone mass and strength in tail-suspended rapidly growing rats. *J Bone Miner Res* 1997;12:1058-1067.
119. Robling A.G., Castillo A.B., Turner C.H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng* 2006;8:455-498.