

КОСТНЫЕ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ БЕЛКИ (ВМР): ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА, ПЕРСПЕКТИВЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ В ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ

В. В. Зайцев, А.С. Карягина, В.Г. Лунин

ФГУ «Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова Росмедтехнологий»,

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Наиболее перспективным направлением повышения остеоиндуктивности костных имплантатов и усиления регенерации соединительной ткани является создание биокомпозитных материалов, содержащих основные компоненты ткани и активные белковые субстанции — факторы роста.

В 1965 г. Urist сделал основополагающее открытие, доказав, что деминерализованный костный метрике способен вызывать образование новой кости вследствие биохимической активизации костных белков [42]. Описанные Urist как «особые остеоиндуктивные белки», позже определенные как «костные морфогенетические белки», или «bone morphogenetic protein» (ВМР), в течение 40 лет были предметом активного изучения фундаментальной науки, экспериментов на животных и клинических апробаций. Согласно результатам современных исследований костные морфогенетические белки являются самыми важными факторами регенерации кости и хряща. Опыты на животных и широкое клиническое применение продемонстрировали эффективность ВМР в качестве активного стимулятора остеогенеза, по своему регенераторному потенциалу равного или превосходящего аутологичный костный материал.

Современные биомедицинские технологии предусматривают использование данных остеоиндукторов в виде рекомбинантных белков (rhВМР), фиксированных на носителях, которыми могут быть синтетические, биологические, минеральные или биокомпозитные полимеры.

Общая характеристика **ВМР**. Основная функция ВМР — поддержание процесса костеобразования во взрослом организме. По современным научным представлениям, ВМР — это многофункциональные ростовые факторы, принадлежащие к суперсемейству В-трансформирующего фактора роста. ВМР действуют на рецепторы клеточной мембраны и играют значительную роль в регулировании роста, дифференцирования и апоптоза различных типов клеток включая остеобласты, хондробласты, нервные и эпителиальные клетки [27].

ВМР являются трансмембранными димерными белками. Димеры ВМР стабилизированы дисульфидными связями (по три связи внутри каждого мономера и одна — между мономерами), что служит предпосылкой для остеоиндуктивности белка. Потеря одной из этих связей приводит к потере возможности стимулировать костеобразование. Молекула ВМР состоит из 110-140 аминокислотных остатков. К настоящему времени идентифицировано 20 видов ВМР. Наиболее полно изученными применительно к регенерации кости и хряща являются ВМР-2 и ВМР-7, однако есть сообщения об активном участии в остео-генезе и хондрогенезе и других видов ВМР.

ВМР устойчивы к температурному воздействию до 65 °С, к действию 2N соляной кислоты, 6M мочевины и 4M гуанидину, но инактивируются трипсином, легко связываются с гепарином. Устойчивость ВМР к воздействию колагеназы используется при биохимической экстракции их из костного матрикса.

Локализации **ВМР**. Место локализации ВМР — неклеточный соединительнотканый матрикс, содержащий остеопрогениторные и мезенхимные клетки. ВМР синтезируются остеобластами, хондроцитами и их предшественниками.

Отмечена повышенная активность ВМР в ростовых зонах большеберцовой кости (эпифиз, метафиз, хрящ). В хондронидных образованиях костного матрикса определяли

наибольшую концентрацию BMP-7 (OP-1) [11]. Кроме скелета, BMP выражены во множестве несkeletalных участков организма — возможно, с этим связаны их множественные несkeletalные функции. Высокое содержание BMP отмечено в простате и плаценте [21]. BMP сконцентрированы в пе-риодонтальных волокнистых структурах и пульпе зуба. Деминерализованный костный матрикс содержит комбинацию нескольких видов BMP и других ростовых факторов, при этом BMP являются главным фактором, определяющим его остеиндуктив-ность [47].

Методы получения BMP. Известны два технологических направления получения BMP — биохими-

ческая экстракция из деминерализованного костного матрикса и синтез с применением генной инженерии (rhBMP). В 90-е годы прошлого столетия основным способом получения BMP была биохимическая экстракция из костного матрикса с помощью 4M солянокислого гуанидина с последующей очисткой путем электрофореза. Из 100 кг деминерализованной костной массы можно получить около 57 мг BMP с молекулярной массой 15000-57000 кДа.

Трудоемкость процесса биохимической экстракции определяет целесообразность получения белков с применением генной инженерии. Технологическими этапами получения рекомбинантных — rhBMP являются:

- генноинженерная сборка биологической конструкции — гена молекулы белка с известной последовательностью аминокислотных остатков;
- введение созданной молекулы в клетки бактерии *E. Coli*;
- наработка достаточного объема бактериальной массы для получения необходимого количества белка;
- выделение белка из бактериальной массы и его биохимическая очистка.

Тестирование *in vivo* (экспериментальная модель эктопического кальциноза) остеиндуктивности rhBMP-7 на коллагеновой губке в дозе 40 нг BMP на 1 мл коллагена показало (по сравнению с контролем):

- 20-кратное увеличение объема минерального компонента (кальцификата);
- 3-кратное увеличение объема остеоида (к 90-м суткам имплантации);
- 4-кратное повышение активности щелочной фос-фатазы;
- 5-кратное увеличение содержания остеокальцина

[31].

Во второй половине 90-х годов рекомбинантный белок BMP-7 был произведен в овариальных клетках млекопитающих.

Механизм действия BMP. Интенсивно проводимые исследования по изучению молекулярных и клеточных механизмов костеобразования показывают, что в процессе остеогенеза в месте перелома принимают участие различные ростовые факторы (цитокины), которые влияют друг на друга, взаимодействуют с несколькими типами клеток и, возможно, BMP являются среди них наиболее важными и активными остеиндукторами.

BMP синтезируются скелетными клетками и одновременно их активизируют. Источник BMP — ос-теопрогениторные и мезенхимные стволовые клетки, а также остеобласты и хондроциты [50]. После синтеза, распространяясь через градиент концентрации, BMP локально проявляют свою активность в следующих вариантах: взаимодействуют с рецепторами на мембране клеток-мишеней, формируя белковый комплекс [27]; вступают в контакт с внеклеточными белками-антагонистами (noggin, chordin), прекращая при этом свою активность [19]. На сигналы BMP могут отвечать: клетки-мишени — плюрипотентные мезенхимные стволовые клетки, остеобласты, миобласты, фибробласты, нервные клетки; маркеры метаболизма кости — щелочная фосфатаза, остеокальцин, остеопонин, остеоонектин.

BMP стимулируют увеличение числа клеток; вызывают ускоренную дифференцировку мезенхимных

стволовых клеток в хондробласты и остеобласты [48]; усиливают синтез коллагена;

повышают активность щелочной фосфатазы; увеличивают синтез остеокальцина; стимулируют синтез внеклеточного матрикса и его последующую минерализацию [20].

Участвуя в хондрогенезе и остеогенезе, ВМР стимулируют костеобразование в последовательности, подобной эмбриональному морфогенезу. Остеогенез с помощью ВМР — это последовательный каскад событий со следующими главными фазами: хемотаксис; быстрое деление мезенхимных остеопрогенитор-ных клеток; дифференцировка мезенхимных стволовых клеток в хондробласты и формирование хряща; ангиогенез и синтез внеклеточного матрикса; замена хряща на костную ткань [26]. Все типы клеток, участвующих в процессе костеобразования, являются клетками-мишенями для ВМР. В пределах скелета клетки-мишени ВМР расположены в перихондрии, периостии, пластинках роста, суставном хряще [28]. ВМР совместно с компонентами матрикса (при использовании биологического или синтетического носителя) активизируют процесс, приводящий к дифференцировке в зоне имплантации остеопрогенитор-ных клеток с последующим формированием кости [8].

Функции ВМР в организме строго отрегулированы. Взаимодействие ВМР с рецепторами на мембране клеток-мишеней может тормозиться внеклеточными белками-антагонистами (noggin, chordin), которые связывают ВМР и предотвращают их последующую активность. Этот механизм, возможно, является реакцией защиты организма от чрезмерной активности ВМР при остеогенезе. Опыты на трансгенных мышцах со значительным содержанием белка noggin в костях скелета демонстрировали выраженную остеопению [39].

Балансом между концентрацией ВМР и активностью их антагонистов можно управлять с целью ускорения регенерации кости. Подавление активности noggin или chordin ускорило остеогенез в экспериментах *in vitro* [13], однако современные биологические методы поовышения остеоиндуктивности костных имплантатов акцентированы на поставку значительных концентраций ВМР на различных типах носителей [24].

Характеристика носителей ВМР. Главная роль носителя (система доставки) ВМР после имплантации заключается в сохранении этих остеоиндукторов на участке их биологического действия в течение длительного, клинически обоснованного времени. Длительный выход малых или начальный выброс значительных количеств ВМР крайне отрицательно сказывается на регенераторных процессах [34].

Современными биомедицинскими требованиями к носителям ВМР являются:

- биологическая совместимость с окружающими тканями;
- физиологическая биодegradация с образованием нетоксичных продуктов распада;
- синхронизированность по времени биодegradации носителя с осуществляемой ВМР индукцией новой кости;
- бимодальная пористая структура, способствующая ангиогенезу, и остеоиндуктивность (для твердых форм носителей);
- возможность фиксации ВМР на структурах носителя без снижения остеоиндуктивности;
- способность защиты ВМР от распада и денатурации;
- способность сохранения биологической активности ВМР после его фиксации на носителе;
- контролируемый «выпуск» биологически активного ВМР в месте его действия;
- возможность точной, строго определенной локализации ВМР в зоне имплантации (неконтролируемый выход белка за зону его локализации на носителе наиболее опасен при различных вариантах спон-дилодеза);
- возможность удобной и эффективной стерилизации;
- устойчивость при хранении в течение длительного времени;
- технологичность процесса изготовления при коммерческом производстве.

Задаваемые биомеханические характеристики используемого носителя зависят от места его применения и предполагаемой регенерации того или иного вида соединительной ткани: при регенерации костной ткани это — пористость и механическая прочность, при

восстановлении хрящевой ткани — устойчивость к выраженным компрессионным нагрузкам. Применяя различные типы носителя ВМР, можно добиться снижения дозы ВМР при сохранении клинически эффективной регенерации костной ткани [27].

Биохимическая фиксация ВМР на носителе. Одной из главных биологических характеристик носителя является возможность задержки ВМР в месте его предполагаемого действия в течение времени, достаточного для формирования новой кости. Данный процесс зависит от варианта биохимической фиксации ВМР к структурам носителя, вида носителя, химических факторов среды в процессе фиксации (рН, температуры, концентрации солей), биологических характеристик rhВМР (наличие участков фиксации в молекуле ВМР).

В настоящее время общепризнанным технологическим принципом применения ВМР является его биохимическое соединение (или механическое пропитывание) с биodeградируемыми носителями, в качестве которых могут выступать синтетические полимеры, природные полимеры, аллогенная или ксе-ногенная кость, гелевые или пастообразные формы биологических либо синтетических полимеров, биоконпозиты. Остается неясным, почему клинически значимые дозы биохимически очищенных, или рекомбинантных, ВМР значительно превышают остеоиндукционные дозы эндогенных ВМР, присутствующих в здоровом человеческом организме.

Биологические носители ВМР. Деминерализованный костный матрикс. Аллогенные костные имплантаты, используемые более чем в 35% всех случаев применения имплантатов в травматологии и ортопедии, имеют определенные преимущества перед другими «заменителями» костной ткани. Все известные методы химического и физического воздействия, используемые при изготовлении костного имплантата, оказывают существенное влияние на его остеоиндуктивность и в конечном итоге — на клиническую эффективность применения готового изделия. Остеоиндуктивность костного имплантата в значительной мере зависит также от исходного донорского костного материала. Многие исследователи отмечают край-

не нестабильные или низкие показатели остеоиндуктивности аллогенных костных имплантатов, произведенных в разных тканевых банках. Биологическая оптимизация или активизация остеоиндуктивности аллогенных или ксеногенных костных имплантатов может быть достигнута процессом деминерализации с добавлением остеоиндуктивных белков либо других ростовых факторов. ВМР-2 совместно с деминерализованным костным матриксом в экспериментах на крысах демонстрировал повышенное образование остеоида по сравнению с таковым при применении аутологичной кости [32].

Добавляя ВМР-7 к аллогенному костному имплантату, в экспериментах на собаках получали более высокий процент костных сращений, чем при использовании аутологичной кости [15]. Было проведено сравнение по степени влияния на остеогенную дифференцировку мезенхимных стволовых клеток и активность щелочной фосфатазы таких материалов как: деминерализованный костный матрикс (ДКМ), деминерализованный костный матрикс с добавлением ВМР-7 (ДКМ+ВМР-7), костный коллаген + ВМР-7, костный коллаген, замороженный костный имплантат, замороженный костный имплантат с ВМР-7. Выявлено, что ДКМ + ВМР-7 в большей степени стимулировал остеогенную дифференцировку мезенхимных стволовых клеток и активизацию щелочной фосфатазы [38].

Коллагеновые губки. Фиксация ВМР на коллагене происходит путем ионного связывания и зависит от изоэлектрического заряда коллагена и ВМР. Изменение этого заряда приводило к 100-кратному различию в количестве фиксированного ВМР [41]. Известными формами коллагена как носителя остеоиндуктивного белка являются полностью деминерализованный костный матрикс, коллагеновые губки, мембраны, гели [12].

Природные полимеры-носители ВМР. Хитозан — биodeградируемый полимер, полученный в результате дезацетилирования природного полимера хитина. Соединение хитозана с синтетическими полимерами может служить эффективным носителем rhВМР.

Возможными сочетаниями также являются хитозан-альгинатные гели с мезенхимными стволовыми клетками и rhBMP-2, хитозан-желатин с rhBMP-2, хитозан с синтетическим полимером PGA. Биологические мембраны на основе хитозановых на-нофибрилл с добавлением rhBMP-2 демонстрировали в экспериментах *in vitro* остеогенную дифференцировку [22].

Желатин — гидролизуемая форма коллагена, поперечно связанного при тепловой обработке. В качестве носителей BMP чаще использовались гидрогели желатина. Гидрогель желатина способен фиксировать большее количество BMP, чем коллагеновые губки. Эффективность желатина как носителя BMP-2 исследовалась в экспериментах на животных [36]. Одним из недостатков этого носителя является склонность к быстрой биodeградации. Увеличение длительности биodeградации желатиновых носителей производилось с помощью биохимической сшивки глута-ровым альдегидом, однако при этом отмечалась токсичность желатинового матрикса, что проявлялось в замедлении остеонной дифференцировки клеточной культуры в исследованиях *in vitro*.
Цитотоксический

эффект зависел от концентрации используемого для сшивки желатина глутарового альдегида, снижение токсичности регистрировалось после 4-суточной отмывки сшитого матрикса от глутарового альдегида [И].

BMP-2, фиксированный на сшитом глутаровым альдегидом гидрогеле желатина, демонстрировал большую остеондуктивность, чем BMP-2 без желатинового матрикса [51]. При исследовании в экспериментах на кроликах биокомпозита на основе желатина и трикальцийфосфата отмечалась более высокая остеондуктивность при меньших концентрациях кальцийфосфата. Данный биокомпозит обладал большей склонностью к биodeградации при воздействии коллагеназы и вызывал повышение активности щелочной фосфатазы в месте имплантации носителя при больших концентрациях трикальцийфосфата [37]. Сшитый глутаровым альдегидом желатиновый метрике в виде микросфер *in vitro* демонстрировал более длительный «выпуск» BMP, чем биodeградируемый синтетический полимер [23].

Минеральные носители BMP. Главным преимуществом минеральных носителей на основе фосфатов кальция перед коллагеновыми носителями является возможность значительного снижения эффективной дозы BMP за счет того, что биокерамические носители одновременно обладают остеондуктивны-ми и остеокондуктивными свойствами.

Гидроксиапатит. Костная ткань на 70% состоит из гидроксиапатита — формы фосфата кальция. Гидроксиапатит в качестве носителя BMP исследовали в виде гранул, порошка, блоков [40]. С целью повышения остеондуктивности к гидроксиапатиту с BMP-2 добавляли коллаген, коллагеновую губку, трикальцийфосфат. Эти композиции успешно тестировали на экспериментальных моделях *in vivo* и *in vitro* [35]. Было отмечено, что для биохимической фиксации на гидроксиапатите BMP может находиться в водной фазе или в лиофилизированной форме, технологический процесс не требует повышения температуры, что уменьшает риск денатурации белка-остеондук-тора.

Наноразмерные носители BMP. Носители BMP наноразмеров (до 100 нм) успешно исследовались в многочисленных экспериментах. Микросферы биode-радируемого синтетического полимера PLGA были способны фиксировать большее количество BMP, вызывая повышение остеондуктивности в опытах на крысах и кроликах [30]. В экспериментах на кроликах повышенную остеондукцию демонстрировал биокомпозит, состоящий из нанодисперсного гидроксиапатита, коллагена и BMP [49].

Микросферы декстрана и желатина (20-40 мкм) в смеси с термостабилизированными гидрогелями декстрана и желатина с фиксированными BMP-2 исследовались на предмет активизации перидонтальной регенерации в экспериментах на собаках. В зависимости от соотношения компонентов биокомпозита длительность выхода BMP-2 колебалась от 18 до 28 сут [3].

Клиническое применение BMP

Паста «Ossigraft» с rhBMP-7 в лечении переломов длинных костей

Применение rhBMP-7 в виде коллагеновой пасты «Ossigraft» при лечении больных с открытыми пере-

ломами большеберцовой кости способствовало достижению сращения переломов в большем проценте случаев, сокращало частоту повторных хирургических вмешательств. При этом более высокие дозы BMP были эффективнее [4, 17, 25]. При применении пасты «Ossigraft» в сочетании с аутологичной костью или аллогенным деминерализованным костным матрикс-сом показано (на небольшом клиническом материале) сокращение сроков заживления переломов по сравнению с таковыми при использовании только аутологичной кости [1]. BMP-7 не вызывал аллергических реакций, не отмечалось гетеротопического образования кости вне зоны имплантации [16, 40].

Паста «Ossigraft» с rhBMP-7 в хирургическом лечении вертебральной патологии.

Эффективность применения rhBMP-7 для достижения костного сращения при вертебральной патологии оказалась сопоставимой или незначительно превосходила эффективность аутологичного костного материала [9]. При использовании пасты «Ossigraft» с rhBMP-7 не наблюдалось проявлений системной токсичности препарата, не отмечалось стеноза позвоночного канала или смещенного формирования кости [43, 44].

В исследовании, включавшем 9 пациентов в возрасте от 21 года до 24 лет с факторами риска костных несращений (недостаточность надпочечников, гипертония, длительное курение, ожирение, гипертиреоз, ревматоидный артрит), выявлено, что BMP-7 безопасен и эффективен для достижения спондилодеза [6]. Vassago и соавт. [43, 45] обследовали 36 пациентов, подвергшихся хирургическому лечению по поводу дегенеративного поясничного спондилолиза со стенозом позвоночного канала. У одной части больных применялась паста «Ossigraft» с rhBMP-7 совместно с аутооттрансплантатом из гребня подвздошной кости (основная группа), у другой части пациентов — только аутооттрансплантат из гребня подвздошной кости (контрольная группа). Через 1 год наблюдения костное сращение констатировано в основной группе в 86%, в контрольной — в 73% случаев, через 4 года — соответственно в 69 и 50%.

Kanayama и соавт. [10] сопоставили эффективность применения пасты «Ossigraft» с rhBMP-7, смешанной с керамическими гранулами, и аутооттрансплантатов из гребня подвздошной кости. У 19 пациентов с дегенеративным спондилолизом на уровне L3~L4 или L4~5 был произведен заднебоковой спондило-дез. У 9 пациентов использовали BMP-7 (основная группа), у 10 — аутооттрансплантат из гребня подвздошной кости (контрольная группа). Костное сращение достигнуто в основной группе у 78% (7 из 9) больных, в контрольной — у 90% (9 из 10). При гистологическом исследовании полноценное костное сращение констатировано у 57% (4 из 7) пациентов основной и у 78% (7 из 9) пациентов контрольной группы. Образование жизнеспособной кости отмечено в 6 из 7 случаев применения BMP-7 и во всех случаях применения аутооттрансплантатов.

Рекомбинантный rhBMP-2 на коллагеновой губке ACS «Infuse» в лечении переломов длинных костей. Govender и соавт. [6] сообщают о клиническом применении rhBMP-2 на коллагеновой носителе в дозе 0,75 мг/мл (суммарная доза 6 мг) и 1,50 мг/мл (суммарная доза 12 мг). В исследование были включены 450 пациентов из 11 стран с открытыми перело-

мами большеберцовой кости. Всем пострадавшим производился интрамедуллярный остеосинтез титановым стержнем. RhBMP-2/ACS «Infuse» накладывали на место перелома перед закрытием раны (основная группа). Контролем служила группа больных, лечившихся без применения BMP. Через 12 мес после операции обследован 421 (94%) пациент. В основной группе сращение переломов наступало в более короткие сроки, чем в контроле. Положительный эффект rhBMP-2 был дозозависимым: при применении его в дозе 1,50 мг/мл реже отмечались гнойные осложнения, быстрее происходило заживление раны, реже требовались повторные хирургические вмешательства. В целом в основной

группе сращение перелома без повторных вмешательств достигнуто у 74% пациентов против 54% в контрольной группе. Данные этого исследования способствовали одобрению Европейским агентством по оценке лекарственных продуктов (ЕМЕА) в 2002 г. и Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в 2004 г. применения rhBMP-2/ACS при лечении открытых переломов большеберцовой кости методом интрамедуллярного остеосинтеза [6].

Применение рекомбинантного rhBMP-2 на коллагеновой губке ACS «Infuse» в вертебологии. При использовании rhBMP-2 на коллагеновой губке ACS «Infuse» отмечена идентичная или большая частота достижения костного сращения тел позвонков по сравнению с таковой при применении аутологичного трансплантата из гребня подвздошной кости. Сообщается о получении костного сращения у 94,5% из 143 больных [2], у 93,8% из 67 [7], у 99% из 21 [18], у 100% из 49 пациентов [33]. При этом отсутствовали осложнения, характерные для хирургического забора аутологичной кости.

Побочные действия rhBMP, противопоказания к клиническому применению

Побочные эффекты применения BMP встречаются редко и проявляются в виде местной эритемы и незначительного отека в месте внедрения остеоиндуктора. Отмечают повышенную биодеградацию ал-логенного деминерализованного костного имплантата при добавлении к нему BMP [5].

При серологическом тестировании пациентов, в лечении которых использовался rhBMP на биологических носителях, определялось наличие антител к рекомбинантному остеоиндуктору, применяемому на коллагеновой губке, однако при этом чаще выявлялись антитела к коллагеновому носителю, чем к самому rhBMP [29]. Возможными противопоказаниями к применению rhBMP являются: беременность, недоразвитие скелета, онкологическая патология, гиперчувствительность к BMP и коллагену. На данном этапе клинических исследований rhBMP не рекомендуют применять у детей.

Заключение. Несмотря на положительные результаты научно-клинических исследований по изучению костных морфогенетических белков, ряд вопросов этой проблемы остается нерешенным. Главными из них являются: выбор эффективной технологии получения BMP, выбор адекватного биодеградируемого носителя для BMP, определение вариантов химической фиксации BMP на биодеградируемом носителе, определение клинически эффективной дозы BMP

в зависимости от этиологии, локализации, выраженности патологического процесса, пути снижения коммерческой стоимости BMP. Экспериментальные и клинические исследования BMP в настоящее время проводятся практически во всех странах мира. Участие большого числа ведущих зарубежных научно-исследовательских центров, а также подключение значительных материально-финансовых ресурсов позволяют надеяться на дальнейшую эффективную разработку проблемы и успешное применение данного остеоиндуктора в практической медицине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bilic R., Simic P., Jelic M. et al. Osteogenic protein-1 (BMP-7) accelerates healing of scaphoid non-union with proximal pole sclerosis // *Int. Orthop.* — 2006. — Vol. 30. — P. 128-134.
2. Burkus J.K., Sandhu H.S., Gornet M.F., Longley M.C. Use of rhBMP-2 in combination with structural cortical allografts: clinical and radiographic outcomes in anterior lumbar spinal surgery // *J. Bone Jt Surg.* — 2005. — Vol. 87A. N 6. — P. 1205-1212.
3. Chen F.M., Zhao Y.M., Zhang R. et al. Periodontal regeneration using novel glycidyl methacrylated dextran (Dex-GMA)/gelatin scaffolds containing microspheres loaded with bone morphogenetic proteins // *J. Control. Release.* — 2007. — Vol. 121. — P. 81-90.
4. Fricdlaender G.E., Perry C.R., Cole J.D. et al. Osteogenic protein 1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial non-unions // *J. Bone Jt Surg.* — 2001. — Vol. 83A. — P. S151-S158.
5. Fukuroku J., Inoue N., Rafiee B. et al. Extracortical bone-bridging fixation with use of cortical allograft and recombinant human osteogenic protein-1 // *J. Bone Jt Surg.* — 2007. — Vol. 89A, N 7. — P. 1486-1496.
6. Govender S., Csimma C., Genant H.K., Valentin-Orpan A. The BMP-2 evaluation in surgery for tibial trauma

- (BESTT) study group. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of 450 patients //J. Bone Jt Surg. — 2002. — Vol. 84A. — P. 2123-2134.
7. *Haid R.W., Branch C.L. Jr, Alexander J.T., Burkus J.K.* Posterior lumbar interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein type 2 with cylindrical interbody cages //Spine J. — 2004. — Vol. 4. — P. 527-539.
 8. *Jeppsson C.* BMP implants in bone formation. Studies in rabbits and rats. — Department of Orthopedics. Lund University, 2003.
 9. *Johnsson R., Stromqvist B., Aspenberg P.* Randomized ra-diostereometric study comparing osteogenic protein-1 (BMP-7) and autograft bone in human noninstrumented posterolateral lumbar fusion: Volvo Award in clinical studies //Spin. — 2002. — Vol. 27. — P. 2654-2661.
 10. *Kanayama M., Hashimoto T., Shigenobu K. et al.* A prospective randomized study of posterolateral lumbar fusion using osteogenic protein-1 (OP-1) versus local autograft with ceramic bone substitute; emphasis of surgical exploration and histologic assessment //Spine. — 2006. — Vol. 31. — P. 1067-1074.
 11. *Kawakami T., Kawai T., Kimura A. et al.* Characteristics of bone morphogenetic protein-induced chondroid bone: his-tochemical, immuno-histochemical and in situ hybridization examinations //J. Int. Med. Res. — 2001. — Vol. 29, N 6. — P. 480-487.
 12. *Kirker-Head C.A.* Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins //Adv. Drug. De-liv. Rev. — 2000. — Vol. 43. — P. 65-92.
 13. *Kwong F.N., Richardson S.M., Evans C.H.* Chordin knockdown enhances the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells //Arthritis. Res. Ther. — 2008. — N 10. — P. 65.
 14. *Liu H.C., Yao C.H., Sum J.S. et al.* Osteogenic evaluation of glutaraldehyde crosslinked gelatin composite with fetal rat calvarial culture model. — 2001. — Vol. 25, N 8. — P. 644-654.
 15. *Lewandrowski K.U., Nanson C., Calderon R.* Vertebral osteolysis after posterior interbody lumbar fusion with recombinant human bone morphogenetic protein 2: a report of five cases //Spine J. — 2007. — Vol. 7J5.-P. 609-614.
 16. *McKee M.D., Schemitsch E.H., Waddell J.P., Wild L.* The treatment of long bone nonunion with rhBMP: results of a prospective pilot study //Am. Acad. Orthop. Surg. 71st. Annual meeting, San Francisco, 2004. — P. 242.
 17. *McKee M.D., Schemitsch E.H., Waddell J.P. et al.* The effect of human recombinant bone morphogenetic protein (RHBMP-7) on the healing of open tibial shaft fractures: results of a multi-center, prospective, randomized clinical trial //Proceedings of the 18th Annual Meeting of the Orthop. Trauma Ass. — Toronto, 2002. — P. 157-158.
 18. *Mummaneni P.V., Pan J., Haid R.W., Rodts G.E.* Contribution of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to the rapid creation of interbody fusion when used in transforaminal lumbar interbody fusion: a preliminary report //J. Neurosurg. Spine. — 2004. — N 1. — P. 19-23.
 19. *Ohikawara B., Iemura S., Ten Dijke P., Veno N.* Action range of BMP is defined by its N-terminal basic aminoacid core //Curr. Biol. — 2002. — Vol. 12. — P. 205-209.
 20. *Osycka A.M., Diefenderfer D.L., Bhargava C, Leboy P.S.* Different effects of BMP-2 Marrow stromal cells from human and rat bone //Cells Tissues Organs. — 2004. — Vol. 176, N 1-3. — P. 109-119.
 21. *Paralkar V.M., Vail A.L., Crasser W.A. et al.* Cloning and characterization of a novel member of the transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein family //J. Biol. Chem. — 1998. — Vol. 273, N 22. — P. 13760-13767.
 22. *Parfc Y.J., Kim K.H., Lee J.Y. et al.* Immobilization of bone morphogenetic protein -2 on a nanofibrous chitosan membrane for enhanced guided bone regeneration //Biotech-nol. Appl. Biochem. — 2006. — Vol. 43. Pt 1. — P. 17-24.
 23. *Patel Z.S., Yamamoto M., Ueda H. et al.* Biodegradable gelatin microparticles as delivery systems for the controlled release of bone morphogenetic protein-2 //Acta Bio-mater. — 2008. — Vol. 4, N 5. — P. 1126-1138.
 24. *Potter E., Ferreira E., Andriamanalijaona R. et al.* Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression //Bone. — 2007. — Vol. 40. — P. 1078-1087.
 25. *Ristiniemi J., Flinkkila T., Hyvonen P. et al.* RhBMP-7 accelerated the healing of distal tibial fractures treated by external fixation //J. Bone Jt Surg. — 2007. — Vol. 89B. — P. 265-272.
 26. *Reddi A.H.* Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration //Nat. Biotechnol. — 1998. — Vol. 16; N 3. — P. 247-252.
 27. *Reddi A.H.* Morphogenetic messages are in the extracellular matrix: biotechnology from bench to bedside //Biochem. Soc. Trans. — 2000. — Vol. 28. — P. 345-349.
 28. *Rountree R.B., Schoor M., Chen H. et al.* BMP receptor-signaling is required for post natal maintenance of articular cartilage //PLOS Biol. — 2004. — Vol. 2. — P. 355.
 29. *Roux P. et al.* OP-1 enhances dendritic growth from cerebral cortical neurons in vitro //Exp. Neurol. — 1999. — Vol. 160, N 1. — P. 151-163.
 30. *Ruhe P.Q., Hedberg E.L., Padron N.T. et al.* Biocompatibility and degradation of poly(DL-lactic-co-glycolic acid) calcium phosphate cement composites //J. Biomed. Mater. Res. — 2005. — Vol. 74, N 4. — P. 533-544.
 31. *Sampath T.K., Maliakal G.C., Hauschka P.V.* Recombinant human osteogenic protein-1 (rhOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro //J. Biol. Chem. — 1992. — Vol. 267, N 28. — P. 20352-20362.
 32. *Schwartz Z., Somers A., Mellonig J.T. et al.* Addition of human recombinant bone morphogenetic protein-2 to

- inactive commercial human demineralized freeze-dried bone allograft makes an effective composite bone inductive implant material //J. Periodontol. — 1998. — Vol. 69, N 12. — P. 1337-1345.
33. *Schwender J.D., Holly L.T., Rouben D.P., Foley K.T.* Minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion (TLIF): technical feasibility and initial results //J. Spin. Disord. Tech. — 2005. — Vol. 18. — P. S1-S6.
34. *Seeherman H., Wozney J.M.* Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopaedic tissue regeneration //Cytokine Growth Factor Rev. — 2005. — Vol. 16. — P. 329-345.
35. *Shimaoka H., Dohi Y., Ohgushi H. et al.* Recombinant growth/differentiation factor-5 (GDF-5) stimulates osteogenic differentiation of marrow mesenchymal stem cells in porous hydroxyapatite ceramic //J. Biomed. Mater. Res. — 2004. — Vol. 68. — P. 168-176.
36. *Takahashi Y., Yamamoto M., Yamada K. et al.* Skull bone regeneration in nonhuman primates by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel //Tissue Eng. — 2007. — Vol. 13. — P. 293-300.
37. *Takahashi Y., Yamamoto M., Tabata.* Enhanced osteoinduction by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from biodegradable sponge composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate //Biomaterials. — 2005. — Vol. 26, N 23. — P. 4856-4865.
38. *Tsiridis E., Ali Z., Bhalla A. et al.* In vitro and in vivo optimization of impaction allografting by demineralization and addition of rh-OP-1 //J. Orthop. Res. — 2007. — Vol. 25, N 11. — P. 1425-1437.
39. *Tsumaki N., Nakase T., Miyaji T. et al.* Bone morphogenetic protein signals are required for cartilage formation and differently regulate joint development during skeletogenesis //J. Bone Miner. Res. — 2002. — Vol. 17. — P. 898-906.
40. *Tsurugu E., Takita H., Itoh H. et al.* Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis //J. Biochem. (Tokyo). — 1997. — Vol. 121—P. 317-324.
41. *Uludag H., D'Augusta D., Palmer R. et al.* Characterization of rhBMP-2 pharmacokinetics implanted with biomaterial carriers in the rat ectopic model //J. Biomed. Mater. Res. — 1999. — Vol. 46. — P. 193-202.
42. *Urist M.R.* Bone: formation by autoinduction //Sciens. — 1965. — Vol. 150. — P. 893-899.
43. *Vaccaro A.R., Patel T., Fischgrund J. et al.* A pilot safety and efficacy study of OP-1 putty (rhBMP-7) as an adjunct to iliac crest autograft in posterolateral lumbar fusions //Eur. Spine J. — 2003. — Vol. 12. — P. 495-500.
44. *Vaccaro A.R., Patel T., Fischgrund J. et al.* A pilot study evaluating the safety and efficacy of OP-1 putty (rhBMP-7) as a replacement of iliac crest autograft in posterolateral lumbar arthrodesis for degenerative spondylolisthesis //Spine. — 2004. — Vol. 29. — P. 1885-1892.
45. *Vaccaro A.R., Patel T., Fischgrund J. et al.* A 2-year follow-up pilot study evaluating the safety and efficacy of op-1 putty (rhbmp-7) as an adjunct to iliac crest autograft in posterolateral lumbar fusions //Eur. Spine J. — 2005. — Vol. 14. — P. 623-629.
46. *Van Houwelingen A., McKee M.D.* Treatment of osteopenic humeral shaft nonunion with compression plating, humeral cortical allograft struts and bone grafting //J. Orthop. Trauma. — 2005. — Vol. 19. — P. 36-341."
47. *Wang E.A., Rosen V., Cordes P. et al.* Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors //Proceedings of the Natural Acad. of Sciens USA. — 1988. — Vol. 85. — P. 9484-9488.
48. *Wang E.A., Israel D.I., Kelly S. et al.* Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells //Growth Factors. — 1993. — Vol. 9. — P. 57-71.
49. *Wang Y.J., Lin F.H., Sun J.S. et al.* Collagen-hydroxyapatite microspheres as carriers for bone morphogenetic protein-4 //Artif. Organs. — 2003. — Vol. 27. — P. 162-168.
50. *Wozney J.M., Rosen V.* Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair //Clin. Orthop. — 1998. — N 346. — P. 26-37.
51. *Yamamoto M., Takahashi Y., Tabata Y.* Enhanced bone regeneration at a segmental bone defect by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel //Tissue Eng. — 2006. — Vol. 12, N 5. — P. 1305-1311.