

## REKOMBİNANT İNSAN KEMİK MORFOGENETİK PROTEİNİ - 2'NİN İNVİVO ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Cansu ALPASLAN\*

### Ö Z E T

Rekombinant teknikle üretilen insan kemik morfojenetik proteini-2 (rhBMP-2) aktif bir kemik indükleyici molekül olmakla birlikte, klinik uygulamalarda kullanılabilmesi için uygun bir taşıyıcıyı gerektirmektedir. Bu çalışmada polilaktik asit poliglikolik asit kopolimeri ve kan pıhtısı taşıyıcı olarak kullanılarak rhBMP-2'nin invivo etkinliği immünohistokimyasal olarak araştırılmıştır. Materyalin deri altına implantasyonunu takiben deney grubunda birinci haftada kırık ve kemik formasyonu, üçüncü haftada kemik iliği formasyonu gözlenirken, kontrol grubunda altıncı haftada bile kemik veya kırık formasyonu gözlenmemiştir. Polilaktik asit poliglikolik asit kopolimeri deney ve kontrol gruplarında altıncı haftada rezorbe olmuş, istenmeyen herhangi bir reaksiyona sebep olmamış, böylece rhBMP-2 için uygun bir taşıyıcı olarak kullanılabileceğini kanıtlamıştır.

Anahtar Kelimeler : Kemik Morfojenetik Proteini, taşıyıcı.

### GİRİŞ

Demineralize kemik parçacıklarının ektopik bir bölgeye implante edildiğinde, embriyolojik kemik oluşumu veya kırık iyileşmesindeki benzer bir şekilde kemik oluşumunu indüklediği ilk kez Urist (1) tarafından deneysel olarak gösterilmiştir. Demineralize kemikte, kemik oluşumundan sorumlu tutulan aktif faktörün protein yapısında olduğu belirlenmiş ve kemik morfojenetik proteini (Bone Morphogenetic Protein - BMP) olarak adlandırılmıştır. Kemik tamir olayında ve hatta kemiğin normal yapısının korunmasında önemli rolleri olduğu düşünülen BMP'lerden bugüne kadar 7 adedinin moleküler ya-

### SUMMARY

In Vivo Efficacy of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2

Recombinant human bone morphogenetic protein-2 that is an active bone inductive molecule, requires a delivery system for clinical applications. In vivo efficacy of rhBMP-2 was studied immunohistochemically, using polylactic acid polyglycolic acid copolymer as a delivery system. Following subcutaneous implantation, cartilage and bone formation was observed by 1 week and bone marrow by 3 weeks in the experimental group; whereas control group did not reveal such findings even at 6 weeks. Polylactic acid polyglycolic acid copolymer resorbed by 6 weeks both in the experimental and control groups; and proved to be a suitable delivery system for rhBMP-2 without causing unfavorable reactions.

Key Words : Bone Morphogenetic Protein, delivery system.

pısı belirlenerek BMP-1'den BMP-7'ye kadar adlandırılmıştır (2 - 5). Sığır kemiğinde kemik indüksiyonundan sorumlu aktif proteinler izole edilip, aminoasit dizilimlerinden yararlanarak moleküler yapıları belirlenmiş ve genetik mühendisliği yardımıyla sataştırılarak üretilebilmiştir. BMP-1 dışında diğer 6 BMP'nin aminoasit dizilimi benzer olup Transforming Büyüme Faktörü - beta (TGF - beta) grubu ile de çok yakın benzerlik göstermektedir (4, 5).

\* G.Ü. Dişhekimliği Fakültesi, Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı, Öğretim Üyesi.

Oral ve maksillofasial cerrahi konseptlerini değiştirebilecek son gelişmelerden birisi BMP'lerin klinik kullanımda yer alması olmuştur (6). Ancak BMP'nin elde edilebilmesi için çok fazla miktarda kemiği gerektirmesi yaygın kullanımını olanaksız kılmaktadır (2). En yeni gelişmelerden birisi olan ve BMP'lerin rekombinant teknik yardımıyla üretilebilmesine olanak sağlayan yöntemlerin geliştirilmesi uygun kemik bulma zorunluluğunu ortadan kaldırmaktadır (7). Bu teknikle rekombinant insan BMP mRNA'sı bir tip insan osteosarkom hücresinden (U20S) elde edildikten sonra DNA yapısı belirlenmekte ve insana ait bu DNA dizilimi Chinese Hamster Ovary (CHO) hücrelerine kopyalanarak üretilebilmektedir (5). Ancak klinik vakalarda kullanımından önce rekombinant insan morfogenetik proteini-2 (rekombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2)'nin uygun bir taşıyıcı kullanılarak kemik oluşumundaki etkinliğinin hayvan çalışmaları ile gösterilmesi gereklidir. Bu çalışma polilaktik asit poliglikolik asit kopolimeri ve kan pıhtısı taşıyıcı olarak kullanıldığında rhBMP-2'nin etki mekanizmasının ve taşıyıcısının etkinliğinin *in vivo* ortamda immünohistokimyasal olarak incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

## MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada 32 adet 5 haftalık beyaz Long Evans ratı kullanıldı. Deney hayvanlarının göğüs bölgesine orta hattan deri insizyonu yapılarak künt diseksiyonla alttaki kas doku ile deri arasında materyalin yerleştirilmesine uygun boşluk oluşturuldu. 20 µg rhBMP-2, 200 µl kan pıhtısı ve sentetik bir taşıyıcı yardımıyla göğüs bölgesinde deri altına bilateral olarak yerleştirildi. Sentetik taşıyıcı olarak 250 µm çapında ve polilaktik asit - poliglikolik asit kopolimeri yapısında pöröz mikro küreler kullanıldı. Kontrol hayvanlarında ise deri altına sadece kan pıhtısı ve sentetik taşıyıcı yerleştirildi. İnsizyonlar primer olarak kapatılarak deri üzerinde implant materyalinin yerleştirildiği bölge küçük metal küpeler ile işaretlendi.

implant materyalinin yerleştirilmesini takiben 1, 3, 5 ve 6. haftalarda deney ve kontrol

grupları için 4'er hayvan tartılarak eter ve 10 mg/100 gr ketamin ile anestezi altına alındı. Diaframa paralel olarak yapılan deri ve kas insizyonu ile intraperitoneal boşluğa ulaşıldı ve buradan da göğüs kafesine girilerek kalbin sol ventrikülünden sokulan plastik bir kanül yardımıyla hayvanlara fiksatif solüsyon verildi. İmmünohistokimyasal inceleme amacıyla hayvanlar 250 cc 1/4 Karnovski solüsyonu ile fikse edildi. Fiksasyonu takiben deri diseke edilerek implant edilen materyaller alttaki kas doku ve kaburgalar ile birlikte blok olarak çıkartıldı. Postoperatif fiksasyon amacıyla elde edilen spesimenler 1 saat 1/4 Karnovski solüsyonunda bekletildi, daha sonra kakodilat bafır içeren şişelere alındı. Spesimenler % 4.13'lük etilen diamin tetrasetik asit (EDTA) da (pH 7.3) 4°C'de 10-21 gün süreyle dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyonu takiben spesimenler küçük parçalara kesilerek değişen derecelerde etanol ile (% 70, % 80, % 90, % 95, % 100) ikişer kez 10'ar dakika süreyle dehidre edildi. Spesimenler immünohistokimyasal değerlendirme için dehidrasyonu takiben Technovit 8100 rezine (Heraeus Kulzer GmbH, Philipp-Reis-Strasse 8, D-6393 Wehrheim /TS) gömüldü. Porter-Blum MT-1 mikrotomu kullanılarak cam bıçak yardımıyla 2 µm'lik kesitler alındı. Alınan kesitler tartarik asite dirençli asit fosfataz aktivitesinin (TRAP) tayini için Azo boyası ve ardından metilen mavisi ile boyanarak ışık mikroskobunda incelendi.

## SONUÇLAR

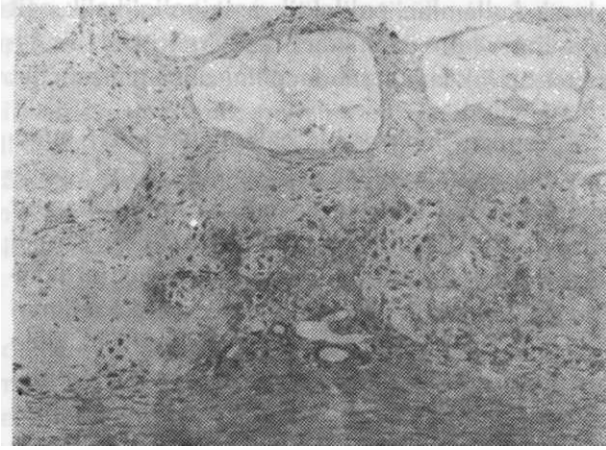
rhBMP-2'nin kan pıhtısı ve sentetik taşıyıcı yardımıyla deri altına implante edildiği deney grubunda birinci haftada sınırlı bir bölgede lokalize kıkırdak formasyonu ve sentetik taşıyıcının periferinde kemik formasyonu gözlemlendi (Resim 1, 2). Üçüncü haftada kemik formasyonunun pöröz mikro kürelerin arasındaki boşluklarda ve içlerinde de yer aldığı gözlemlendi (Resim 3). Yeni oluşan kemik yüzeyinde osteoblastlar ve TRAP boyası ile pozitif olarak boyanan osteoklastlar kemikte aktif bir yeniden şekillenme olduğuna işaret etmekteydi. Üçüncü haftada implantın iç kısımlarında kemik iliği formasyonu olduğu ve hematopoetik hücrelerin yer aldığı gözlemlendi (Resim 4). Beşinci haftada kemik ve



Resim 1. rhBMP-2'nin subkutan olarak implante edildiği deney grubunda birinci haftada sınırlı bir bölgede izlenen kıkırdak formasyonu (Azo boyası ve metilen mavi x 20).



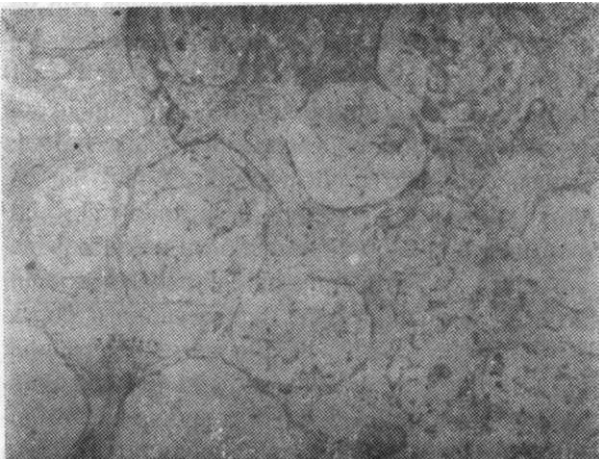
Resim 4. Deney grubunda 3. haftada kemik iliği formasyonu ve hematopoetik hücreler görülmektedir. (Azo boyası ve metilen mavi x40).



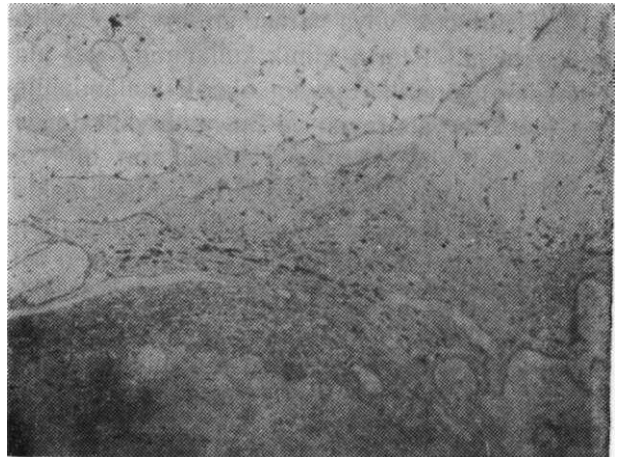
Resim 2. Deney grubunda 1. haftada taşıyıcının perilerinde kemik formasyonu görülmektedir. (Azo boyası ve metilen mavi x 20).

kemik iliği formasyonu aynı biçimde devam etmekte olup taşıyıcının büyük bir kısmının rezorbe olduğu dikkati çekti. Altıncı haftada ise taşıyıcının tamamen rezorbe olduğu saptandı (Resim 5).

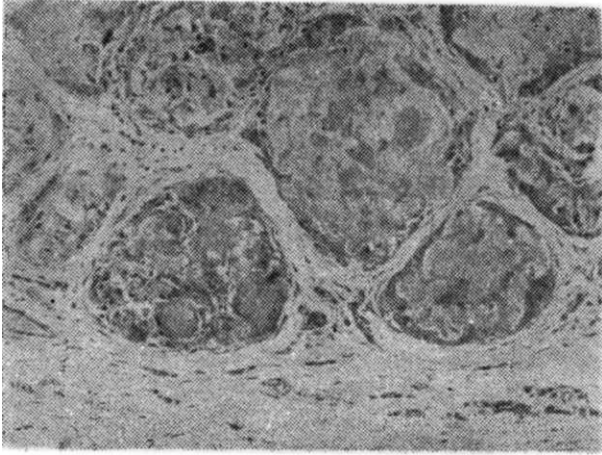
Deney grubu ile kıyaslandığında kontrol grubunda hiç bir dönemde kemik ve kıkırdak oluşumu gözlenmedi (Resim 6). Sadece sentetik taşıyıcı ve kan pıhtısının implante edildiği kontrol grubunda iltihabi reaksiyon veya yabancı cisim reaksiyonu gözlenmedi. Taşıyıcı deney grubundaki ile benzer olarak altıncı haftada rezorbe oldu.



Resim 3. Deney grubunda 3. haftada pöröz mikro küreler arasında kemik formasyonu görülmektedir. (Azo boyası ve metilen mavi x 20).



Resim 5. Deney grubunda 6. haftada kemik ve kemik iliği formasyonunun yanısıra taşıyıcının tamamen rezorbe olduğu izlenmektedir (Azo boyası ve metilen mavi x 10).



Resim 6. Kontrol grubunda 4. haftada bile kırkırdak veya kemik oluşumu gözlenmemektedir. (Azo boyası ve metilen mavi x 20).

## TARTIŞMA

Bu çalışmada deri altına polilaktik asit poliglikolik asit kopolimeri ve kan pıhtısı ile birlikte implante edilen rhBMP-2 yedinci günde kırkırdak ve kemik oluşumunu, 21. günde de kemik iliği oluşumunu indükleyerek canlı kemik dokusu oluşumunu sağlamıştır. Diğer çalışmalarda (7) bildirilen bulguların aksine kemik oluşumu kırkırdak oluşumunu takiben oluşmamıştır. Kemik ve kırkırdak oluşumu 7. günde farklı lokalizasyonlarda gözlenmiştir.

BMP'lerin klinik kullanıma girmesiyle yakın bir gelecekte otojen kemik greftlerinin kullanımını azalabilecek veya tamamen ortadan kaldıracaktır. BMP'lerin klinik kullanımda yer alabilmesine yönelik, taşıyıcı olarak kullanılacak biomateryal arayışı ve bu materyallerin daha çok geliştirilmesi ise çalışmaların en çok yoğunlaştırıldığı alanlardan birini oluşturmaktadır. BMP'nin lokal olarak kemik oluşumunu indükleyebilmesi için bir taşıyıcı yardımıyla o bölgede immobilize edilmesi gereklidir. Bu amaçla aktif matriksten arıtılmış allojenik kemik veya otojen kemik taşıyıcı olarak kullanıldığında kemik indüksiyonu sağlanmıştır (8 -10). Ancak BMP'nin insanlarda yaygın olarak kullanılabilmesi için biyolojik uyumu iyi olan, kolay elde edilebilir ve uygulanabilir olan ve aynı zamanda kemik dokunun gelişimi için uygun bir yapı

oluşturan sentetik bir taşıyıcının etkinliğinin gösterilmesi gereklidir.

BMP bir taşıyıcı olmaksızın tek başına kullanıldığında kemik indüksiyonun oluşması için çok fazla miktarda kullanılması gerekmiştir (7). Taşıyıcının fonksiyonu hücre sel cevap gelişinceye kadar indüktif proteinleri o bölgede immobilize etmesi olabilir. BMP'ler için ideal taşıyıcının belirlenmesi başarılı bir osteoindüktif implantın geliştirilebilmesi açısından oldukça büyük önem taşımaktadır. İdeal olarak taşıyıcı implant sınırları içinde BMP'nin kemik oluşumunu stimüle etmesini sağlamalıdır. Aynı zamanda biyolojik uyumu iyi olmalı, vücutta yıkılarak metabolik olarak uzaklaştırılabilir, yeni oluşan kemikle tamamen yer değiştirmeli, BMP için inert olmalıdır (11). Bu çalışmada taşıyıcı olarak kullanılan polilaktik asit poliglikolik asit kopolimeri bu özellikleri taşıyarak ideal bir taşıyıcı olarak kullanılabilirliğini düşündürmüştür.

Yapılan invitro bir çalışmada hücre ataçmanının ve osteoblast gelişiminin en fazla polilaktid- glikolid yüzeylerde, en az hidroksilapatit yüzeylerde, hidroksilapatit/polilaktid- glikolid yüzeylerde ise orta derecede olduğu gösterilmiştir (12). Polilaktik asit poliglikolik asit kopolimeri biyolojik uyumu iyi olan ve biodegrade olabilen bir materyal olup, plak şekli ortognatik cerrahi sonrası osteosentez amacıyla kullanıldığında geç komplikasyonlar olmaksızın normal iyileşme sağlanmıştır (13). Bu çalışmada rhBMP-2'nin taşıyıcısı olarak kullanılan polilaktik asit poliglikolik asit kopolimeri istenmeyen bir reaksiyona sebep olmamış ve kemik indüksiyonuna izin vererek 6. ayda tamamen rezorbe olmuştur. Miyamoto ve arkadaşları (14) polilaktik asit - polietilen glikol blok kopolimerinin BMP için uygun bir taşıyıcı olduğunu ileri sürerek 3. haftada rezorbe olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bu çalışmada kemik oluşumunun 3. haftada mikro küreler arasındaki boşluklara doğru sokularak devam ettiği ve taşıyıcının halen matriks görevini sürdürdüğü gözlenmiştir. Bunun yanısıra degrade olan polimerlerle 40 gün süresince günlük sabit dozda ilaç salınımı sağlandığı bildirilmiştir (15). Bu nedenle rhBMP-2 taşıyıcısının 6. haftada rezorbe olması kemik oluşumunun daha uzun indüklenmesi açısından avantaj olabilir. Kortikal kemik defektlerine implante edilen po-

lilaktid poliglükolid kopolimerinin absorpsiyonu ile yeni kemik oluşumu arasında bir bağlantı bulunmamakla birlikte degradasyon hızlı olduğunda kemik rejene>asyonunun inhibe olduğu gözlenmiştir (16).

Reddi ve arkadaşları (17, 18) demineralize kemik tozunun kemik indüksiyon kapasitesinin partikül büyüklüğüne bağlı olduğunu bildirerek 74-420 µm büyüklüğündeki partiküllerin kemik oluşumunu indüklediğini ancak 44-74 µm büyüklüğündekilerin indüklediğini bildirmişlerdir. Yine, Syftestad ve Urist(19) partikül büyüklüğü 125 u.m'den küçük olduğunda kemik indüksiyonunun oluşmadığını bildirmişlerdir. Bunun sebebi implantın yapısının hücreler için bir atinite oluşturması ve vaskülarizasyon için uygun bir iskeletsel yapı sağlaması olabilir. Nitekim, demineralize kemik partikülleri sıkıştırılıp kas içine implante edildiğinde vaskülarizasyonun geciktiği ve buna bağlı olarak da rekalsifikasyon ve kemik gelişiminin geciktiği bildirilmiştir (20). Bu çalışmada Ha mikro kürelerin 250 fım büyüklüğünde oluşu erken kemik formasyonunda rol oynayan önemli faktörlerden biri olabilir.

rhBMP-2'nin polilaktik - poliglükolik asit kopolimeri ve kan pıhtısı ile birlikte deri altına implantasyonu ile kemik iliğini de içeren canlı kemik dokusunun indüksiyonu, klinik uygulamalarda polilaktik asit poliglükolik asit kopolimerinin rhBMP-2 için uygun bir taşıyıcı olabileceğini düşündürmektedir.

#### KAYNAKLAR

- Urist, M.R. : Bone: Formation by Autoinduction. Science (Wash. DC), 150 : 893-899, 1965.
- Wozney J.M., Rosen V., Celeste A.J., Mitsock L.M., VWhitters M.J., Kriz R.W., Hewick R.M., Wang E .A. : Novel Regulators of Bone Formation : Molecular Clones and Activities. Science, 242 : 1528-1534, 1988.
- Luyten, F.P., Cunningham, N.S., Ma, S., Muthukumar, N., Hammonds, R.G., Nevins, W.B., Wood, W.I., Reddi, A.H.: Purification and Partial Amino Acid Sequence of Osteogenin, a Protein Initiating Bone Differentiation. J. Biol. Chem., 264 : 13377-13380, 1989.
- Celeste A.J., Iannazzi J.A., Taylor R.C., Hewick R.M., Rosen V., Wang E.A., Wozney J.M.: Identification of Transforming Growth Factor (3 Family Members Present in Bone-Inductive Protein Purified from Bovine Bone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 : 9843-9847, 1990.
- Wozney, J.M. : Bone Morphogenetic Proteins and Their Gene Expression. In : M. Noda ed. : Cellular and Molecular Biology of Bone. Academic Press, Inc., San Diego, pp. 131-167, 1993.
- Stoelinga. P.J.W. : Editorial. Int. J. Oral Maxillofac Surg., 23 : 193, 1994.
- Wang E.A., Rosen V., D'alessandro J.S., Bauduy M., Cordes P., Harada T., Israel D.I., Hewick R.M., Kerns, K.M. LaPan, P., Luxenberg, D.P., McQuaid, D., Moutsatsos, I.K., Nove, J. Wozney, J.M.: Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein Induces Bone Formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 : 2220-2224, 1990.
- Johnson, E.E., Urist, M.R., Finerman, G.A. : Repair of Segmental Defects of the Tioia With Cancellous Bone Grafts Augmented With Human Bone Morphogenetic Protein. A Preliminary Report. Clin. Orthop., 236 : 249-257, 1988.
- Johnson, E.E., Urist, M.R., Finerman, G.A. : Bone Morphogenetic Protein Augmentation Grafting of Resistant Femoral Nonunions. Clin. Orthop., 230 : 257-265, 1988a.
- Johnson, E.E., Urist, M.R., Finerman, G.A. : Resistant Nonunions and Partial or Complete Segmental Defects of Long Bones. Treatment With Implants of a Composite of Human Bone Morphogenetic Protein (BMP) and Autolyzed, Antigen-Extracted, Allogenic (AAA) Bone. Clin. Orthop., 277 : 229-237, 1992.
- Toriumi, D.M., East, C.A., Larrabee, W.F. : Osteoinductive Biomaterials for Medical Implantation. Journal of Long-Term Effects of Medical Implants. 1 (1) : 53-77, 1991.
- Elgandy, H.M., Norman, M.E., Keaton, A.R., Laurencin, C.T. : Osteoblast-like Cells (MC3T3-E1) Proliferation on Bioerodible Polymers: an Approach Towards the Development of a Bone-bioerodible Polymer Composite Material. Biomaterials, 14 (4) : 263-269, 1993.
- Suuronen, R. Laine, P., Pohjonen, T., Lindqvist, C : Sagittal Ramus Osteotomies Fixed With Biodegradable Screws : A Preliminary Report. J. Oral Maxillofac. Surg., 52 : 715-720, 1994.
- Miyamoto, S., Takaoka, K., Okada, T., Toshikawa, H., Hashimoto, J., Suzuki, S., Ono, K. : Polylactic Acid-Polyethylene Glycol Block Copolymer. A New Biodegradable Synthetic Carrier for Bone Morphogenetic Protein. Clin. Orthop., 294 : 333-343, 1993

15. Refajo, M.F., Arroyo, M.H. : Sustained Delivery of Retinoic Acid from Microspheres of Biodegradable Polymer in Proliferative Vitreoretinopathy. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 34 (9): 2743-2751, 1993.
16. Winet, H., Hollinger, J.O.: Incorporation of Polylactide- Polyglycolide in a Cortical Defect: Neoosteogenesis in a Bone Chamber. J. Biomed. Mater. Res., 27 (5) : 667-676, 1993.
17. Reddi, A.H., Huggins, C.B. : Influence of Transplanted Tooth and Bone on Transformation of Fibroblasts. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 143 : 634-637, 1973.
18. Sampath, T.K., Reddi, A.H.: Importance of geometry of the Extracellular Matrix in Endochondral Bone Differentiation. J. Celi Biol., 98 : 2192-2197, 1984.
19. Eyftstad, G., Urist, M.R.: Degradation of Bone Matrix Morphogenetic Activity by Pulverization. Clin. Orthop., 141 : 281-286, 1979.
20. Yamashita, K., Horisaka, Y., Okemoto, Y., Yoshimura, Y. Matsumoto, N., Kawada, J., Takagi, T.: Architecture of Implanted Bone Matrix Gelatin Influences Heterotopic Calcification and New Bone Formation. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 197 (3): 342-347, 1991.