

REKOMBİNANT İNSAN KEMİK MORFOGENETİK PROTEİNİ-2 TARAFINDAN İNDÜKLENEN KEMİK OLUŞUMUNDA HÜCRESEL CEVABIN İNCELENMESİ

Cansu ALPASLAN*

Ö Z E T

Kemik morfogenetik proteinlerinin kemik oluşumunu indükleyici etkisi olduğu bilinmekle birlikte kemik oluşumuna yol açan hücreyel olaylar tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışma rekombinant insan kemik morfogenetik proteini-2 (rhBMP-2)'nin deri altına yerleştirilmesini takiben gelişen hücreyel olayların belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. İmplantasyonu takiben üçüncü günde kemik oluşumunda önemli rolü olduğu düşünülen mezenşimal hücre proliferasyonu ve yeni damar formasyonu gözlenirken, dördüncü günde kırıkta, beşinci günde ise kemik formasyonu izlenmiştir. rhBMP-2'nin kemik indüksiyonunu kan hücreleri, stromal hücreler ve mezenşimal hücreler arasında ilişkiyi stimüle ederek gerçekleştirdiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler : Kemik Morfogenetik Proteini, kemik indüksiyonu.

GİRİŞ

Kemik formasyonu pek çok hücrenin lokal ve sistemik regülatörler aracılığı ile etkileşimini içeren oldukça karmaşık bir mekanizmadır. Demineralize kemiğin iskelet dışı bir bölgede kemik oluşumunu indüklediğinin gösterilmesi (1, 2) bu aktiviteden sorumlu moleküllerin araştırılması yönünde yapılan çalışmaların başlangıcını oluşturmuştur. Kemikten farklı yapılar sahip çok sayıda büyüme faktörü izole edilerek bu aktiviteden sorumlu tutulmuştur (3 - 6). Son yıllarda yapılan çalışmalarla kemik oluşumundan sorumlu moleküllere bir seri Kemik Morfogenetik Proteini (Bone Morphogenetic Protein-

SUMMARY

Cellular Respanse In Recombinant Human Morphogenetic Protein-2 Induced Bone Formation

Although bone inductive property of bone morphogenetic proteins is well known, the accurate cellular mechanisms that lead to bone formation is not clear. This study was undertaken for the characterization of cellular response following subcutaneous implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). Mesenchymal cell proliferation and angiogenesis, that is thought to be of crucial importance in bone formation was observed on day 3, followed by cartilage formation on day 4 and bone formation on day 5. It was concluded that rhBMP-2 induce bone formation by stimulating cell to cell interactions between blood cells, stromal cells and mesenchymal cells.

Key Words : Bone Morphogenetic Protein, bone induction.

BMP) eklenmiştir (7, 8). BMP'ler bugüne kadar izole edilebilen büyüme faktörleri arasında kırıkta ve kemik oluşumunu stimüle eden en aktif faktörlerdir (9).

Kemik oluşumunda rol oynayan hücreler arası ilişkilerin detaylı olarak anlaşılabilmesi, kemik oluşumunu stimüle eden yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. BMP'ler tarafından oluşturulan ke-

mik formasyonu, kırık iyileşmesi ve embriyolojik kemik oluşumunu taklit ettiği için kemik oluşumu ve kemik rezorbsiyonundan sorumlu hücrelerin ve hücreler arası etkileşimin incelenmesi için oldukça uygun bir model oluşturmaktadır (11). Kemikten elde edilen BMP'ler gibi rhBMP-2 bugüne kadar kırıkta ve kemik oluşumunu indüklediği gösterilen tek moleküldür (11). Ancak kemik oluşumundaki etki mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değildir.

Bu çalışma rhBMP-2'nin iskelet dışı bir bölgeye implantasyonunu takiben gelişen hücresel cevabın ve hücreler arası ilişkinin incelenerek, kemik doku oluşumundaki etki mekanizmasının belirlenebilmesi amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL VE METOD

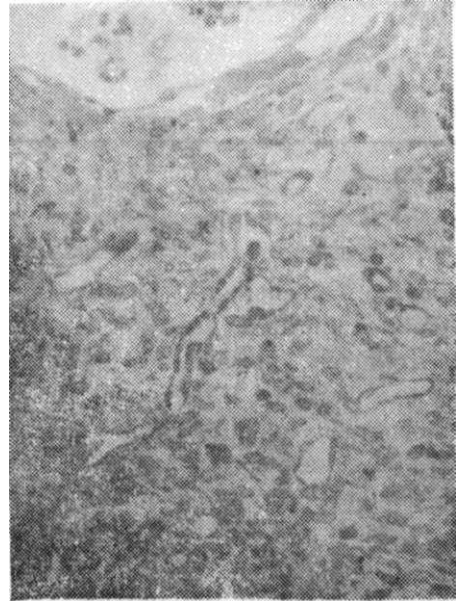
Steril petri kaplarında her hayvan için 20 µg rhBMP-2, polilaktik asit-poliglikolik asit kopolimeri yapısında ve 250 µm çapındaki pöröz-mikro küreler ve diğer bir rattan temin edilen 200 µl kan ile karıştırıldı (rhBMP-2 Yamanouchi Pharmaceuticai Co. Ltd., Tokyo tarafından sağlandı).

Deney hayvanı olarak kullanılan 24 adet Long Evans ratının göğüs bölgesi traş edilerek deri insizyonu yapıldı ve elde edilen bu karışım deri altına implante edildi. İnsizyonlar primer olarak kapatıldı. İmplantların yerleştirilmesinden 1, 3, 4, 5, 6 ve 7 gün sonra hayvanlar eter ve ketamin (10 mg/100 gr) ile anestezi altına alındı. Kalbin sol ventrikülünden girilerek önce Ringer solüsyonu ve takiben 250 cc % 3 oranında glutaraldehit içeren 0.05 M kakodilat bafır ile fikse edildi. Deri altına yerleştirilen implantlar çevre dokular ile birlikte çıkartılarak aynı fiksatif solüsyon içinde 4°C'de 1 gece bekletildi. Spesimenler % 4.13 etilen diamin tetrasetik asit (EDTA) ile (pH 7.4) 4°C de 7 gün süreyle dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyonu takiben spesimenler küçük parçalara bölünerek % 1'lik osmium tetroksit (OsCM ile ikinci kez fikse edildi. Değişen derecelerde etanol ile (% 70, % 80, % 90, % 95, % 100) ikişer kez 10'ar dakika dehidre edildi. Propilen oksitte iki kez 10'ar dakika bekletildikten sonra Epok 812 (Oken, Tokyo,

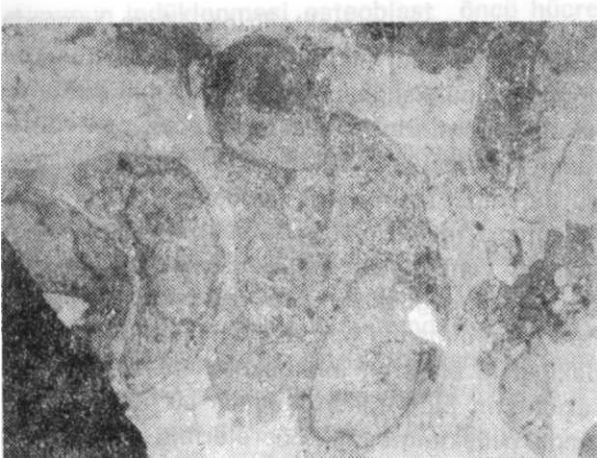
Japonya) rezine gömüldü. Işık mikroskobunda incelemek için cam bıçakla C.5 [1 kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyandı. Elektron mikroskobunda incelemek üzere Porter-Blum MT-1 mikrotomu (Sorvall Porter Blum Ultramicrotome MT-1, Ivan Sorvall Inc., New Town, Connecticut) kullanılarak 60-90 nm kesitler alındı. Bu kesitler bakır gridler ile toplandı; tannik asit, uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanarak elektron mikroskobu ile incelendi.

SONUÇLAR

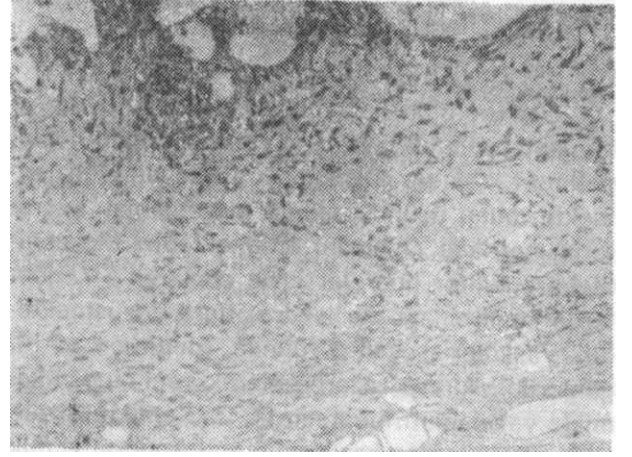
Birinci günde geçici polimorf nükleer lökosit infiltrasyonu gözlemlendi. Üçüncü günde yoğun mezenşimal hücre proliferasyonu, çeşitli hücrelerde mitoz ve yeni damar oluşumunda belirgin artış vardı (Resim 1). Elektron mikroskobu ile incelendiğinde şişkin endotelial hücrelerle karakterize yeni damarların oluştuğu ve bu damarların hemen yakınında mezenşimal hücrelerle kan hücreleri arasında hücrelerarası ilişkinin olduğu gözlemlendi (Resim 2). Yine, elektron mikroskobu düzeyinde kemik iliği kökenli stromal hücrelerle differansiye olmamış mezenşimal hücreler arasında yakın ilişki olduğu göz-



Resim 1. İmplantasyonu takiben 3. günde hücre proliferasyonu ve yeni damar oluşumunda belirgin bir artış olduğu görülmektedir. (Toluidin mavisi x 40).

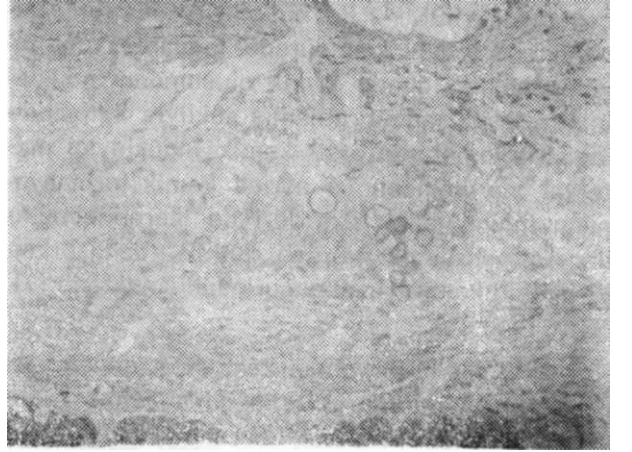


Resim 2. Elektron mikroskobu düzeyinde yeni oluşmuş kan damarının hemen yakınında kan hücresi ile mezenşimal hücre arasındaki ilişki görülmektedir.

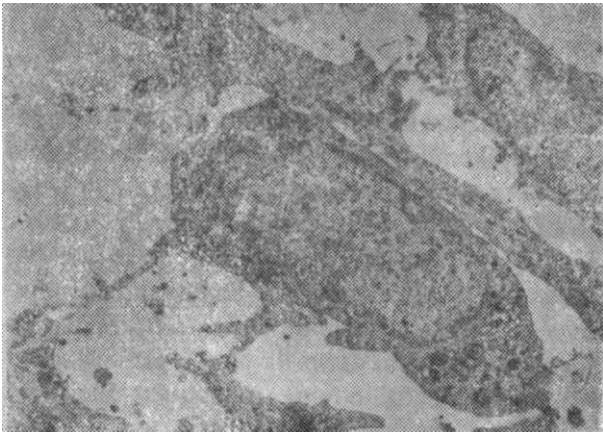


Resim 4. İmplantasyonu takip eden 4. günde kondrosit formasyonu görülmektedir. (Toluidin mavisi x20).

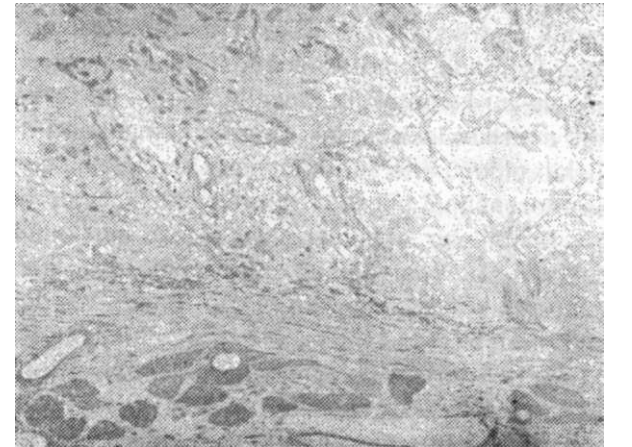
lendi (Resim 3). Ancak üçüncü günde kırıkta veya kemik oluşumu gözlenmedi. Dördüncü günde mezenşimal hücre proliferasyonunun izlendiği bölgede, mezenşimal hücreler arasında kondrositlerin oluştuğu gözlemlendi (Resim 4). Beşinci günde ise kırıkta formasyonu yanında kemik formasyonu da başlamıştı (Resim 5). Altıncı günde kemik oluşumunun artarak devam ettiği ve implantın iç kısımlarına doğru sokularak ilerlediği gözlemlendi (Resim 6). Yedinci günde ise kalsifiye kırıkta dokusunun çok çekirdekli dev hücreler tarafından rezorbe edilerek yerini yeni oluşan kemiğe bırakmakta olduğu gözlemlendi.



Resim 5. İmplantasyonu takip eden 5. günde kemik formasyonu görülmektedir. (Toluidin mavisi x 20).



Resim 3. Elektron mikroskobu düzeyinde stromal hücre ile mezenşimal hücre arasındaki ilişki görülmektedir.



Resim 6. İmplantasyon sonrası 6. günde kemik formasyonundaki artış görülmektedir. (Toluidin mavisi x 20).

TARTIŞMA

Deminerale kemik ektopik bir bölgeye implantasyonunu takip eden birinci günde geçici polimorf nükleer lökosit infiltrasyonu gözlenmekte, bunu üçüncü günde mezenşimal hücrelerin matrikse ataçmanı izlemektedir. Mezenşimal progenitor hücreler hızla çoğalarak 6-7. günlerde kondroblast ve kondrositlere dönüşmektedir. Vaskülarizasyon 9. günde izlenirken 10-12. günlerde kırık rezorbe olarak yeni oluşan kemikle yer değiştirmektedir (1, 2). Kemikten izole edilen BMP'lerden bazılarının endokondral kemik oluşumunda izlenen bu olaylar serisini taklit ederek kemik oluşumunu indüklediği gösterilmekle birlikte, kemik oluşumunu hangi hücreleri etkileyerek gerçekleştirdiği bilinmemektedir. Bu çalışmada rhBMP-2 de bu olaylar serisini izleyerek ancak daha kısa sürede, implantasyonu takiben beşinci günde kemik oluşumunu indüklemiştir. BMP saflaştırılmamış şekliyle kullanıldığında az miktarda aktif kemik indükleyici materyal içerdiğinden ve ayrıca kemik formasyonunu inhibe edici faktörleri de içerebileğinden saflaştırılarak üretilen rhBMP-2 daha erken ve kaliteli kemik oluşumunu indüklemektedir (7).

BMP implantasyonunu takiben 3. günde mezenşimal hücrelerde belirgin bir çoğalma izlenmiştir. BMP direkt olarak hücrelerde bölünmeye sebep olarak etki edebileceği gibi çevredeki mezenşimal hücreler üzerinde kemotaksik bir etki oluşturarak da hücre artışına sebep olabilir. Yapılan invitro bir çalışmada deminerale rat kemik matriksinin kas kökenli mezenşimal hücreler üzerinde kemotaksik etkisi olduğu gösterilmiş ve bu kemotaksik sinyalin deminerale kemik matriksi içeriğindeki protein komponenti ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (12). Üçüncü günde mezenşimal hücre proliferasyonu yanında diğer önemli bir bulgu da yeni damar oluşumundaki artışıdır. Yeni damar oluşumunun daha sonraki kemik oluşumu için büyük önem taşıdığı bildirilmiştir (13, 14). Yeni damar oluşumu öncü hücrelerin kan dolaşımıyla implantasyon bölgesine gelmesi açısından oldukça önemli olabilir. İnvitro ortamda çeşitli hücre tipleri BMP'ye karşı çoğalmalarını arttırarak veya azaltarak cevap vermektedir. Osteoblastik ve osteoprogenitor hücreler genellikle hücre proliferasyonunu

arttırarak cevap vermektedirler. Aynı zamanda BMP mezenşimal hücrelerin çeşitli fenotiplere dönüşümünü sağlamaktadır. Normal şartlarda kemik hücrelerine dönüşmeyecek olan differansiye olmamış hücreler, BMP'nin stimülasyonu ile kemik hücrelerine dönüşmektedir (15). Bu çalışmada invivo olarak da benzer bulgular gözlenmiş, yeni oluşan kan damarları ve bu yolla bölgeye geldiği düşünülen kan hücreleri ile differansiye olmamış mezenşimal hücreler arasındaki ilişki elektron mikroskobu düzeyinde gösterilmiştir. Elde edilen bulgular bu hücreler arasındaki ilişkinin kemik hücrelerinin oluşumunda oldukça önemli bir basamağı oluşturduğunu düşündürmektedir.

İmplantasyonunu takiben rhBMP-2 beşinci günde kırık ve kemik oluşumunu indüklemiştir. rhBMP-2'nin periost kökenli hücreler üzerindeki etkisini araştıran invitro bir çalışmada rhBMP-2'nin kemik oluşum süresini azalttığı ve oluşan kemik miktarını arttırdığı ancak kırık oluşumu üzerinde bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Tavuk periost hücrelerinden oluşan kültür ortamındaki hücreyel ve moleküler olaylar kırık iyileşmesindeki olaylara benzediğinden, kırık iyileşmesindeki periost kemik oluşumunda rhBMP-2'nin kırık oluşumundan değil kemik oluşumundan sorumlu olduğu öne sürülmüştür (16). Benzer olarak bu çalışmada da kemik oluşumu için geçen süre kısalmıştır. rhBMP-2 invivo olarak hem kırık hem kemik oluşumunu indüklemiştir. Yani, rhBMP-2 implantasyonu endokondral kemik oluşumunu sağlamıştır ancak kırık oluşumu için geçen süre kısalmaştır.

Gerek kırık iyileşmesinde gerekse de embriyolojik kemik gelişimi sırasında osteoblastların mezenşimal öncü hücrelerin farklılaşması sonucu oluştuğu kabul edilmektedir. Osteoblast öncü hücrelerin orijini ise tam olarak bilinmemekle birlikte periostta ve kemik iliği stromasında bulunduğu düşünülmektedir. Kırık iyileşmesinde osteoblastların ilk olarak periost ile kemik arasında gözlenmesi osteoblast öncü hücrelerin periost kaynaklı olduğunu ve lokal olarak salınan sinyallerle osteoblastlara dönüştüğünü göstermektedir (17). Ancak bu çalışmada ektopik bir bölgede BMP tarafından kemik olu-

şununun indüklenmesi osteoblast öncü hücrelerin sadece periost kökenli olmadığını göstermektedir.

İnvitro olarak kemik iliği kökenli stromal hücrelerin indükleyici bir maddenin mevcudiyetinde osteoblastlara, aynı zamanda da osteoblastik farklılaşma kapasitesine sahip differansiye olmamış hücrelere dönüştüğü gösterilmiştir (18). Bu çalışmada da kemik oluşumunda rol oynadığı düşünülen stromal hücrelerle differansiye olmamış mezenşimal hücreler arasındaki ilişki elektron mikroskopu düzeyinde gösterilmiştir.

rhBMP-2 implantasyonunu takiben yeni damar oluşumu ve mezenşimal hücre proliferasyonunda belirgin bir artış oluştu. BMP'nin mezenşimal hücre proliferasyonu ile yeni damar oluşumunu stimüle ettiğini ve daha sonra da kan hücreleri ve mezenşimal hücreler, ayrıca kemik iliği kökenli stromal hücreler ve differansiye olmamış mezenşimal hücreler arasında etkileşime sebep olarak kemik oluşumunu indüklediğini düşündürmektedir.

K A Y N A K L A R

1. Urist, M.R.: Bone: Formation by Autoinduction. Science (WVash. DC), 150 : 893-899, 1965.
2. Reddi, A.H., Huggins, C. : Biochemical Sequences in the Transformation of Normal Fibroblasts in Adolescent Rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69 : 1601-1605, 1972.
3. Urist, M.R., DeLange, R.J., Finerman, G.A.M.: Bone Cell Differentiation and Growth Factors. Science (WVash. DC), 220: 680-686, 1983.
4. Schveiberer, L., Hallfeldt, K., Mandelkow, H.: Osteoid Induction. Crthopade, 15 (1) : 3-9, 1986.
5. Hauschka, P.V., Msvrakos, A.E., lafrati, M.D., Doleman, S.E., Klagsbrun, M. : J. Biol. Chem., 261 (27) : 12665-12674, 1986.
6. Tsutsumi, S. : Purification and Properties of a Growth Factor From Human Bone Matrix, Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi, 61 (11) : 1285-1292, 1987.
7. Wozney J.M., Rosen V. Celeste A.J., Mitsock L.M., Whitters M.J., Kriz R.W., Hevick R.M., Wang E.A. : Novel Regulators of Bone Formation : Molecular Clones and Activities Science, 242 : 1528-1534, 1988.
8. Celeste A.J., Iannazzi J.A., Tcvlor R.C., Hevick R.M., Rosen V., Wang E.A., vWozney J.M.: Identification of Transforming Growth Factor Family Members Present in Bone-Inductive Protein Purified from Brovine Bone. Proc. Nail. Acad. Sci. USA. 87 : 9843-9847, 1990.
9. Vwozney, 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.
10. Rosen, V., Thies, R.S. : The Bone Morphogenetic Proteins in Bone Formation and Repair. Trends Genet., 8 : 97-102, 1992.
11. Wang E.A., Rosen V. D'iaessandro J.S., Bauduy M., Cordes P., Harada T., Israel D.I., Hewick R.M., Kerns, K.M. LaPan, P., Luxenberg, D.P., McOuaid, D., Moutsatsos, I.K., Neve, J., Wozney, J.M. : Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein Induces Bone Formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 2220-2224, 1990.
12. Landesman, R. Reddi, A.H.: Chemotaxis of Muscle-Derived Mesenchymal Cells to Bone Inductive Proteins of Rat. Calcif. Tissue Int., 39 : 259-262. 1986.
13. Foidart, J.M. Reddi, A.H. : Immunofluorescent Localization of Type IV Collagen and Laminin during Endochondral Bone Differentiation and Regulation by Pituitary Growth Hormone. Dev. Biol., 75 : 130-136, 1980.
14. Paralkar, V.M., Vukicevic, S., Reddi, A.H. : IGF-beta 1 Binds to Collagen IV of Basement Membrane Matrix: Implications for Development. J. Biol. Chem., 143 : 303-308, 1991.
15. Ekelund, A., Brosio, O., Nilsson, O.S : Experimental Induction of Heterotopic Bone. Clin. Orthop. Rel. Res., 263 : 102-112, 1991.
16. Iwasaki, M., Nakahara, H., Nakace, T., Kimura, T., Takaoka, K., Çaplan, A.I., Ono, K.: Bone Morphogenetic Protein 2 Stimulates Osteogenesis but Does Not Affect Chondrogenesis in Osteochondrogenic Differentiation of Periosteum-Derived Cells. J. Bone Miner. Res., 9: 195-1204, 1994.
17. Sandberg, M.M., Aro, H.T., Vuorio, E.I. : Gene Expression During Bone Repair. Clin. Orthop. Rel. Res., 289 : 292-312, 1993.
18. Rickard, D.J., Sullivan, T.A., Shenker, B.J., Leboy, S.P., Kazhdan. I.: Induction of Rapid Osteoblast Differentiation in Rat Bone Marrow Stromal Cell Cultures by Dexamethasone and BMP-2. Dev. Biol., 161 : 21E-22C. 1994.