

## **OSTEOGROW – nova terapija za koštanu regeneraciju**

**Lovorka GRGUREVIĆ, Ivo DUMIĆ-ČULE, Slobodan VUKIČEVIĆ**

*Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,  
Centar za translacijska i klinička istraživanja,  
Laboratorij za mineralizirana tkiva, Zagreb, Hrvatska*

*Dopisivanje s:*

*Prof. dr. sc. Lovorka Grgurević, dr. med.  
Laboratorij za mineralizirana tkiva,  
Centar za translacijska i klinička istraživanja  
Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu  
Šalata 11  
Zagreb, 10000 HR  
Phone: 00385 1 4566 812  
Fax: 00385 1 4566 822  
E-mail: lgrgurev@mef.hr*

### **Sažetak**

Cilj ovog istraživanja je procijeniti djelotvornost rhBMP6 (Genera istraživanja) u cijeljenju kritičnog defekta lakatne kosti kod kunića u usporedbi s komercijalno dostupnim nosačem. Model je prethodno opisan u nekoliko objavljenih studija i odobren od strane etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u cilju testiranja sigurnosti i učinkovitosti nove naprave. U navedenom pokusu korišteni su odrasli mužjaci novozelandskih bijelih kunića. Koštani defekti ispunjeni su autolognim krvnim ugruškom sa ili bez dodatka rhBMP6 te rhBMP7 na kolagenoj spužvici kao nosaču. Životinje su praćene u periodu od 8 tjedana. Stvaranje novog koštanog tkiva praćeno je radiografski svaka dva tjedna nakon implantacije. Rezultati pokazuju da su implantati koji su se sastojali od autolognog ugruška i rhBMP6 rezultirali potpunim premoštenjem koštanog defekta ulne. Niti jedna od kontrolnih životinja koje su tretirane samo

autolognim ugruškom kao nosačem (bez BMP6) nije postigla premoštenje koštanog defekta. Cijeljenje koštanog defekta korištenjem autolognog ugruška s rhBMP6 u usporedbi s kolagenom spužvicom natopljenom rhBMP7 bilo je puno brže i učinkovitije, bez znakova lokalne upale i edema. Novi autologni nosač s rhBMP6 na novi i učinkovit način rješava problem poticanja i stvaranja novog koštanog tkiva te premoštenje koštanog defekta i tako predstavlja novo moguće rješenje za sve nedostatke koji su proizašli korištenjem postojećih komercijalno dostupnih nosača.

**Ključne riječi:** koštana regeneracija, BMP6, nosač, koštani defekt

## Uvod

Kost na prvi pogled djeluje kao čvrsta, nepromjenjiva i beživotna tvar, no u stvarnosti kost je aktivan organ koji se kontinuirano pregrađuje. Koštane stanice osteoklasti kontinuirano razgrađuju kost, dok ih osteoblasti obnavljaju stvarajući novo koštano tkivo. Postupak koštane pregradnje je kontinuiran proces koji u fiziološkim uvjetima održava ravnomjernu homeostazu koštane gustoće do tridesetih godina, da bi nakon četrdesete postupno opadala sposobnost obnavljanja koštane mase. Prijelomi u starijih ljudi rezultiraju povećanim mortalitetom i morbiditetom. Bolovi i imobilizacija nakon prijeloma u bolesnika s osteoporozom onemogućuju kretanje i smanjuju kvalitetu života (1). Ubrzavanje cijeljenja i skraćivanje vremena do punog opterećenja kosti osnovni je cilj regenerativne medicine usmjerene prema koštanoj biologiji. Učestalost sekundarnih intervencija nakon prijeloma iznosi od 6 do 10%, što znatno povećava troškove zdravstvenih osiguranja, opterećujući tako zdravstveni sustav.

U posljednja dva desetljeća značajno je unaprijeđeno razumijevanje mehanizama regeneracije kosti, koje u principu imitira embrionalni razvoj kosti. Gotovo odmah nakon oštećenja ili loma kosti, započinje se proces cijeljenja. Kod prijeloma kosti dolazi do oštećenja krvnih žila te formiranja ugruška na mjestu prijelomne pukotine, koji aktivira citokinsku kaskadu te u konačnici dovodi do stvaranja kalusa i nove kosti. U našim istraživanjima ugrušak se koristi kao nosač za osteogene molekule (koštane morfogenetske proteine, engl. BMP Bone Morphogenetic Protein), koje značajno doprinose procesu koštane regeneracije, a čija je uloga pomno istraživana posljednjih godina.

Koštani morfogenetski proteini čine skupinu od dvadesetak molekula, uglavnom čimbenika rasta i diferencijacije s mogućnošću indukcije stvaranja i rasta nove

kosti (2). Pored uloga u koštanom metabolizmu BMP-ovi značajno sudjeluju i u drugim fiziološkim procesima, tako da se njihova uloga smatra iznimno pleotropnom (3). Potvrđena je značajna uloga koštanih morfogogenetskih proteina u razvoju koštanog i živčanog sustava, očiju, bubrega i srca. U ovom trenutku je kost jedini organ ljudskog tijela koji se može u potpunosti regenerirati. Ubrzanu ili manjkavu regeneraciju moguće je potaknuti primjenom koštanih morfogogenetskih proteina na mjestu loma, bez obzira na razinu aktivnosti fizioloških mehanizama cijeljenja kod pacijenta. Do današnjeg dana na tržištu su zastupljena dva proteina, označena kraticama BMP2 i BMP7, iz grupe koštanih morfogogenetskih proteina, koji čine osnovu za naprave za poticanje rasta i regeneraciju kosti: Medtronic INFUSE Bone Graft koji sadrži rekombinantni protein BMP2 te Olympus OP-1 koji sadrži rekombinantni protein BMP7 (4, 5).

Navedene molekule koriste se u kombinaciji s kravljim kolagenom, koji je imunogen i uzrokuje upalu na mjestu ugradnje između slomljenih krajeva kosti. Zbog velike količine proteina koji se primjenjuju nastaju neželjene posljedice, primjerice okoštavanje okolnih mišića, oteklina, upala i bol i koštana resorpcija. Naš novi proizvod se zove OSTEOGROW (koštani rast), a umjesto kravljeaga kolagena kao nosač za BMP molekule koristi modificirani krvni ugrušak samoga pacijenta i time zadržava svojstvo autolognosti i biokompatibilnosti (6). Umjesto BMP7 i BMP2 koristi se BMP6 protein, koji ima znatno bolje značajke od drugih članova obitelji BMP-ova, što smo potvrdili u našim pretkliničkim istraživanjima tijekom proteklih nekoliko godina, od kojih je samo jedan mali dio njegove učinkovitosti prikazan i u ovom radu (7). BMP6 molekula otpornija je na djelovanje endogenih antagonista BMP molekula, kao što su Chordin i Noggin, stoga će se u novoj napravi primjenjivati znatno manje količine BMP6 u usporedbi s trenutačno komercijalno dostupnim napravama koje se baziraju na drugim molekulama BMP-a (8).

U ovom radu želimo pokazati kako OSTEOGROW predstavlja potencijalni inovativni medicinski proizvod za cijeljenje i regeneraciju koštanog tkiva.

## **Materijali i metode**

Djelatna tvar rhBMP6 (Genera istraživanja) i rhBMP7 (Olympus) konačne koncentracije 1 mg/ml. Konačna koncentracija rhBMP6 i rhBMP7 u nosaču bila je 0,05 mg/ml.

## **Model kritičnog defekta ulne u kunića**

Model kritičnog defekta koristili smo u procjeni cijeljenja kosti u odraslih bijelih novozelandskih laboratorijskih kunića.

Premedikacija se provela u skladu s tjelesnom masom životinja i.m. mješavinom ketamina 20 mg/kg i ksilapana 3 mg/kg, a održavanje anestezije vršilo se s 2-3% isofluranom.

Zahvati na laboratorijskim kunićima izvedeni su u sterilnim uvjetima kirurške dvorane pod anestezijom i analgezijom i prema metodologiji opisanoj u literaturi (9). Životinje su nasumično raspoređene u 3 grupe (n = 8):

Grupa A: Kontrola. Kritični defekt ulne ispunjen autolognim ugruškom bez dodatka rhBMP6

Grupa B: Kritični defekt ulne ispunjen kolagenom spužvicom (Helistat) uz dodatak 50 µg rhBMP7

Grupa C: Kritični defekt ulne ispunjen autolognim ugruškom uz dodatak 50 µg rhBMP6

Prema pravilima sterilnosti – asepsa, laboratorijski kunići su tijekom operativnog zahvata bili prekriveni sterilnim platnom uz prikaz i pristup samo operativnom polju. Bočnim rezom, duljine oko 2,5 centimetara kroz kožu i mišićno tkivo prikazala se podlaktična kost-ulna. Dio ulne dužine 15 mm (veliki defekt) odstranjen je pneumatičnom pilom (Aesculap pila) uz ispiranje fiziološkom otopinom (0,9% NaCl), rezanjem 20 mm proksimalno od zgloba šake te 15 mm proksimalno od prvog reza. Nakon odstranjenja dijela ulne u defekt se ugradio autologni ugrušak sa ili bez rhBMP6 odnosno kolagena spužvica natopljena sa rhBMP7 uz prethodno ispiranje fiziološkom otopinom ostataka kosti i koštane srži. Radi mehaničkog stabiliteta, palčana kost je ostala netaknuta tako da se nisu koristili unutarnji ili vanjski fiksacijski uređaji. Mekana tkiva su se zatvorila po slojevima kako bi se nosač zadržao, pri čemu je korišten 3-0 VICRYL plus antibakterijski (polyglactin 910) konac (Ethicon) za mišićno tkivo te 3-0 PROLENE plavi monofilamentni polipropilenski konac (Ethicon) za kožu. Za postoperativnu analgeziju životinje su dobile karprofen 5-15 mg/kg s.c. 2x dnevno kroz dva dana, a nakon toga po potrebi. Simptomi boli su se nadzirali kroz učestalo promatranje: škr gutanja zubima, pogrbljeno sjedenje u jednom kutu kaveza, brzo i plitko disanje, nezainteresiranost za hranu i vodu. Životinjama je bilo dozvoljeno normalno kretanje, pristup vodi i hrani ad libitum. Radiološke slike prednjih udova snimljene su odmah nakon operacije te 2, 4, 6 i 8 tjedana nakon ugradnje nosača na Veterinarskom fakultetu.

## **Uzimanje uzoraka krvi iz zečje rubne površinske ušne vene (1,5 ml)**

Kod laboratorijskih kunića krv se uzimala iz marginalne ušne vene, pomoću jednokratne igle (23-25 gauge). Krzno koje se nalazi na uhu se obrijalo i dezinficiralo alkoholom.

## **Priprema autolognog nosača**

Priprema autolognog nosača započela je uzimanjem uzoraka krvi (1,5 ml pune krvi) iz ušne vene kunića u epruvete bez antikoagulantne tvari (citrat, EDTA), nakon čega se u njih odmah dodalo 50 µg rhBMP6 (Genera istraživanja). U kontrolnoj grupi umjesto rhBMP6 dodana je jednaka količina pomoćne tvari. Tako pripremljeni nosači ostavljeni su sat vremena na sobnoj temperaturi do potpune koagulacije. Nosač sa rhBMP7 pripremio se tako da se kolagena spužvica dimenzija 2x2 cm natopila sa rhBMP7 sat vremena prije ugradnje. Nosač je nakon toga bio spreman za upotrebu.

## **Etika/etički standardi**

Svi postupci tijekom obavljanja pokusa bili su provedeni sukladno: Zakonu o zaštiti životinja (NN 135/06); Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u pokusima ili u druge znanstvene svrhe (NN 47/11) i Etičkom kodeksu Sveučilišta u Zagrebu (čl. 16, čl. 19).

## **Rezultati**

Rezultati navedenog istraživanja pokazali su da ugrađeni nosači koji se sastoje od autologne krvi i rhBMP6 dovode do potpunog radiološki potvrđenog premoštenja koštanog defekta. Niti jedna od kontrolnih životinja tretiranih samo s ugruškom kao nosačem (bez rhBMP6) nije dovela do premoštenja kritičnog koštanog defekta. Cijeljenje koštanog defekta u grupi životinja koja je kao nosač imala kolagenu spužvicu sa rhBMP7 dovela je do potpunog premoštenja u pet životinja, nepotpunog premoštenja u jedne životinje, dok je stvaranje kosti izostalo u dvije životinje. Cijeljenje koštanog defekta s autolognim nosačem i rhBMP6 bilo je brže i potpunije nego ono kod kojeg je korištena kolagena spužvica kao nosač i rhBMP7. (Slika 1)



**Slika 1.** Kritični defekt ulne kod kunića 8 tjedna nakon operativnog zahvata.  
A: Kontrolna skupina; B: Defekt ispunjen s 50 µg rhBMP7 na kolagenoj spužvici (Helistat); C: defekt ispunjen s 50 µg rhBMP6 u ugrušku.

**Grupa A** (Kontrola: samo ugrušak, bez rhBMP6). Niti jedna od životinja nije premostila defekt u promatranom periodu od 8 tjedana. Koštani kalus se formirao na slobodnim koštanim krajevima uz potpuni nedostatak premoštenja koštanog defekta, što je prikazano na radiološkim slikama u 8. tjednu pokusa. (Slika 1A)

**Grupa B** (50 µg rhBMP7 i kolagena spužvica (Helistat)). 5/8 životinja potpuno je premostilo defekt u periodu od 8 tjedana. (Slika 1B)

**Grupa C** (50 µg of rhBMP6 u ugrušku). 8/8 životinja potpuno je premostilo defekt u period od 8 tjedana. (Slika 1C)

## Rasprava

U ovom radu pokazali smo učinkovitost nove osteogene naprave OSTEOGROW u koštanom cijeljenju. Nova naprava se sastoji od autolognog nosača koji sadrži perifernu krv, što značajno smanjuje upalni proces koji se javlja kao česta nuspojava postojećih komercijalnih nosača. Komercijalni nosači sadrže goveđi kolagen, koji pored mogućnosti izazivanja upalne reakcije može prenijeti i razne viruse odnosno prione uzročnike kravljeg ludila odnosno encefalopatije.

Velike količine BMP-a u oba postojeća komercijalna proizvoda ne djeluju aktivno uslijed ograničenja kapaciteta vezivanja na kolagenu spužvicu. Do tada nije postojalo dovoljno razumijevanje mehanizma djelovanja BMP2 i BMP7 u navedenim nosačima. Visoke koncentracije BMP-a mogu uzrokovati stvaranje koštanog tkiva i na ektopičnim mjestima odnosno tamo gdje to nije poželjno, npr. u mišićnom tkivu. Osim toga na mjestu ugradnje dovode do koštane resorpcije (10, 11).

U novoj napravi OSTEOGROW u punu krv se dodaje rhBMP6 u malim količinama koje dovode do ubrzanja i poticanja koštanog cijeljenja, što je potvrđeno i u navedenom radu, ali i u prijašnjim pretkliničkim istraživanjima (12). BMP6 ima posebnu karakteristiku, a to je utjecaj na diferencijaciju matičnih stanica prema koštanim i hrskavičnim stanicama (13). Iako BMP6 pokazuje značajnu homologiju aminokiselinskog slijeda u usporedbi s drugim BMP molekulama, istraživanja su pokazala 20 puta veći afinitet BMP6 za BMP receptor tipa IA nego BMP7, što potvrđuje njihove zajedničke, ali i razlikovne karakteristike vezivanja na receptore i prijenos signala u stanicu (8). Osim navedenoga potvrđena je i razlika u građi između navedenih molekula koja značajno utječe na njihovu aktivnost. U staničnim kulturama BMP6 primijenjen izvana dovodi do diferencijacije mezenhimalnih matičnih stanica u smjeru osteoblasta i stvaranja koštanih nodula uz smanjenje broja osteoklasta, za razliku od BMP2 i BMP7. Molekula BMP6 otkrivena je u cirkulaciji čovjeka i miša (14), a njegova sistemska primjena u štakora dovodi do povećanja koštane mase u modelu osteoporoze (7). Kada se testiraju jednake količine BMP2, BMP6 i BMP7 na autolognom nosaču u modelu kritičnog prijeloma ulne kod kunića, pokazalo se da je BMP6 učinkovitiji te da dovodi do ubrzanja koštanog cijeljenja. Jedan dio navedene učinkovitosti BMP6 potvrđen je i u ovom radu. Navedeno proizlazi iz istraživanja koja su pokazala manju osjetljivost BMP6 na endogene inhibitore (Noggin) te disocijaciju od endogenih inhibitora nakon vezivanja kompleksa BMP-noggin na površinske stanične receptore. Upravo zbog toga je manja količina BMP6 potrebna za postizanje efikasnosti nove naprave (8). Kao nosač BMP6 u

novoj napravi OSTEOGROW koristi se periferna autologna krv koja ne dovodi do upalne i imunološke reakcije kao kod postojećih komercijalnih nosača. Novi nosač je vrlo fleksibilan s dobrim biomehaničkim karakteristikama. Osim što se može ugraditi na mjesto koštanog defekta nosač se može i injicirati, što je također velika prednost u odnosu na postojeće nosače. BMP6 je u autolognom nosaču vrlo stabilan i aktivan kroz duži vremenski period koji je potreban da se ostvari potrebna aktivnost odnosno koštana regeneracija. Na osnovu navedenih istraživanja prijavljen je projekt OSTEOGROW. FP7 projekt dobiven je 2012. kroz financiranje od strane EU (više informacija na [www.osteogrow.eu](http://www.osteogrow.eu).) Projekt se trenutno nalazi u fazi I/II kliničkih istraživanja. Aktivnost naprave će se testirati u području koštane metafize, gdje je potvrđeno da BMP2 i BMP7 molekula nemaju učinak na koštanu regeneraciju.

## Izjava o sukobu interesa

Autori LG i SV sudjeluju u projektu Osteogrow koji financira Europska komisija za znanost u okviru FP7 HEALTH programa [FP7/2007-2013] ugovor n°HEALTH-F4-2011-279239, a koordinator je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. IDC izjavljuje da nema sukob interesa.

## Literatura:

1. Musculoskeletal injuries report: incidence, risk factors and prevention. Rosemont IL: American Academy of orthopedic surgeons; 2000.
2. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-9.
3. Vukicevic S, Stavljenic A, Pecina M. Discovery and clinical applications of bone morphogenetic proteins. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:661-71.
4. The BMP2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma (BESTT) Study Group; Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Orpan A. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of 450 patients. *J Bone Joint Surg-Am* 2002;84-A:2123-2134
5. Bishop GB, Einhorn TA. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop* 2007; 31:721-7
6. Vukicevic S, Oppermann H, Verbanac D, Jankolija M, Popek I, Curak J, et al. The clinical use of bone morphogenetic proteins revisited: a novel biocompatible carrier device OSTEOGROW for bone healing. *Int Orthop* 2014;38:635-647.
7. Simic P, Culej JB, Orlic I, Grgurevic L, Draca N, Spaventi R, et al. Systemically administered bone morphogenetic protein-6 restores bone in aged ovariectomized



- rats by increasing bone formation and suppressing bone resorption. *J Biol Chem*, 2006 281:25509-21.
8. Song K, Krause C, Shi S, Patterson M, Suto R, Grgurevic L, et al. Identification of a key residue mediating bone morphogenetic protein (BMP)-6 resistance to noggin inhibition allows for engineered BMPs with superior agonist activity. *J Biol Chem* 2010;285:12169-80.
  9. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC, Whitecloud TS 3rd. The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76:827-38.
  10. Fu R, Selph S, McDonagh M, Peterson K, Tiwari A, Chou R, et al. Effectiveness and harms of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spinal fusion: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2013;158:890-902.
  11. Simmonds MC, Brown JV, Heirs MK, Higgins JP, Mannion RJ, Rodgers MA, et al. Safety and effectiveness of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for spinal fusion: a meta-analysis of individual-participant data. *Ann Intern Med* 2013;158:877-89.
  12. Vukicevic S, Grgurevic L, Oppermann H; Genera Istraživanja d.o.o. Whole blood coagulum device. United States Patent US8197840 B2. 2012.
  13. Grasser WA, Orlic I, Borovecki F, Riccardi KA, Simic P, Vukicevic S, et al. BMP-6 exerts its osteoinductive effect through activation of IGF-I and EGF pathways. *Int Orthop*. 2007;31:759-65.
  14. Grgurevic L, Macek B, Healy DR, et al. Circulating bone morphogenetic protein 1-3 isoform increases renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:681-92.