

BÖLÜM 12

KEMİK MORFOJENETİK PROTEİN ÖZELLİKLERİ VE ORTOPEDİDE KULLANIM ALANLARI

Aybars KIVRAK¹

GİRİŞ

Kemik morfojenetik proteinlerinden (Bone morphogenetic proteins-BMP) bahsedecek olursak, transforming growth faktör β ailesinde bulunan çok işlevli büyüme faktörleridir. Bu büyüme faktörleri; uzuvların gelişimi, endokondral kemikleşme, kırıkta ve kemik onarımı sırasında üretilmektedir. Kemik morfojenetik proteinlerin varlığı 18. yüzyılın ortalarında ortaya kondu, kemik gelişiminden sorumlu olan bu proteinler, 18. yüzyılın sonlarına doğru insan BMP'lerinin izole edilmesine kadar bilinmiyordu. Yapılan araştırmalarda 15 BMP üyesi tanımlanmıştır. BMP'lerin oluşturduğu sinyal, serin/treonin kinaz reseptörlerinin alt tipleri aracılığıyla iletilir. Üç tip-1 reseptörün BMP ligandlarını bağladığı ve bu proteinlerin; hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve kontrollü hücre ölümünün düzenlenmesinde yer aldığı bulunmuştur. BMP'leri benzersiz kılan özellik, kemik, kırıkta, bağ ve tendon oluşumunu hem ortotopik hem de heterotopik bölgelerde tetikleyebilme kapasiteleridir. Bu farklı özellikleri, BMP'lerin önemli bir protein haline gelmesini sağlamış ve üzerinde birçok araştırma yapılmasını gerektirmiştir. Çeşitli hayvan çalışmaları, bu proteinlerin spinal füzyon gereken durumlarda, büyük kemik defektlerinin onarımında, kaynamayı hızlandırma ve eklem kırıkta lezyonlarını iyileştirme potansiyelini göstermiştir. Birçok laboratuvar, BMP'leri kemik dokusundan üretmek ve saflaştırmak zor olduğu için, bu proteinleri heterolog sistemlerde rekombinant formda üretmek için çaba sarf etmektedir.

Bu yazımızda, BMP yapısı, moleküler etki mekanizmaları ve önemi ile kırıkta ve kemikle ilgili hastalıkların tedavisi için sağlık alanındaki uygulamalarından bahsedilecektir.

¹ Uzm. Dr., Adana Avrupa Hospital, aybarskivrak@gmail.com

GENEL BİLGİLER

BMP'ler olarak da bilinen kemik morfojenetik proteinlerinin keşfinden bu yana, birçok araştırmacı, BMP'lerin osteojenik hücrelerin kök ve mezenkimal hücre farklılaşmasını tetikleyerek kemik oluşturabilen proteinler olduğunu göstermiştir (1). Modern moleküler biyoloji teorileri, BMP'lerin morfojenetik proteinler olduğunu ve genomda morfojenetik bir bölgenin oluşumunu başlatmaya teşvik eden moleküller olduğunu belirtmektedir. BMP'ler bir konsantrasyon gradyanından geçerek gelişim sürecini değiştirir. Hücreler, önceden belirlenmiş bir model ve mekansal düzenlemeyi takip ederek, bu uyarana yanıt olarak çoğalır ve farklılaşır. BMP'ler, fiziksel ve kimyasal açıdan, hücreler tarafından salgılanan ve farklı hücre türlerinin plazma zarında bulunan reseptörlere ligand görevi gören proteinlerdir. Bu otokrin ve parakrin etkiler, hücre ve doku organizasyonunu oluştururlar.

BMP'lerin kemik oluşumu sürecindeki üstlendiği görev, kırıkların iyileşmesi ve kemiklerin onarımı sırasında iyi bir şekilde anlaşılmıştır. Ektopik bölgelerde ve kemik kusurlarında yapılan çeşitli hayvan deneylerinde, BMP'ler kemik dokusu oluşumunu tetikleyebilir. BMP'lerin heterotopik kemikleşmeye neden olduğu hücresel ve moleküler mekanizmalar hakkında uzun süredir çok az şey bilinmekteydi. Öncelikle, BMP'lerin hücresel ve moleküler etki mekanizmalarının tam olarak anlaşılması, potansiyel klinik uygulamaların geliştirilmesi için son derece önemlidir. Yetersiz kalınan bazı hastalıkların tedavisinde tıpta önemli bir yol katedilmesini sağlama ihtimali yüksektir.

KEMİK MORFOJENETİK PROTEİNLERİNİN YAPISI

1900'lü yılların ortalarında bu proteinlerin incelenmesi sonucunda, demineralize kemik matriksinin, kemirgenlerde deri altı ve kas içi dokularda endokondral kemik oluşumunu tetikleme kapasitesine sahip olduğunun gözlemlenmesiyle başlamıştır (1,2). Daha sonra kemikten düşük moleküler ağırlıklı bir glikoprotein izole edildi ve bunun ektopik olarak yerleştirildiğinde kemik oluşumunu desteklediği çalışmalarda gösterildi (2).

Demineralize kemik matriksi, BMP'lerin izolasyonu ve saflaştırılması için tercih edilen bir biyomateriyaldir, bu moleküller dişte de bulunabilir (3). Dekalsifiye sıgır kemiğinin kemik enfeksiyonu tedavisinde kullanılabileceği 18. yüzyılın sonunda gösterildi. 20. yüzyılın ortalarında Lacroix, kemiğin endüktif rolü hipotezini ortaya attı ve ona osteogenin adını verdi. Birkaç yıl sonra, tavşanın demineralize liyofilize kemik matrisinin kas sistemine implante edildiğinde yeni kemik oluşumunu tetikleyebildiği tesadüfen bulundu (1).

Ektopik kemik oluşumunun uyarılması, farelere implante edilen tavşan, köpek, sıgır ve insan ksenojenik demineralize kemik matrisinin uygulanması ile net

bir şekilde gösterilmiştir. Ancak, diğer türlerde sıçan allojenik matriks ve doğal BMP'ler ektopik kemik oluşumuna neden olmazlar. Bu nedenle, BMP'lere farklı hayvan türlerinin tepkileri farklı olabilir ve immünolojik faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. BMP'lerin veya demineralize kemik matriksinin endüktif özelliklerinden yararlanılarak, intramembranöz kemik gelişimi ile kemik defektlerine uygulanması klinik olarak önem arz edebilir. Endokondral kemik oluşumunun tamir edilmesi, bu malzemelerin endüktif etkisini doğrulamaktadır.

Kemik morfojenetik proteinleri TGF- β ailesine ait proteinlerdir. Bu proteinler büyük öncü moleküller olarak üretilirler. Dimerize olduktan sonra, proteolitik olarak bölünerek, bir konsensüs Arg-X-X-Arg bölgesinde olgun dimerler oluştururlar. N-terminal bölgesinin, işlenmiş olgun proteinin stabilitesini kontrol ettiği ve bölünme bölgesine bitişik aşağı akış sekansının, bölünmenin etkinliğini belirlediği gösterilmiştir (5).

BMP'ler, disülfid bağları ile bağlanan dimerlerden oluşur ve kemik oluşumu için bu dimerizasyon şarttır. Homodimer ve heterodimer moleküller olarak aktif olan 15 BMP alt aileye ayrılır. BMP'ler, düşük moleküler kütleyle sahip glikoproteinlerdir ve TGF- β ailesinin bir parçası olarak BMP'leri içeren ortak dizilerin doğrulanmış hizalanmış bölümlerine sahiptir (6). TGF- β isimli sitokinler, kemik matriksinde BMP'lere göre daha yüksek miktarlarda bulunurlar. BMP-2, alkalin fosfataz ve osteokalsin gibi osteoblast farklılaşma belirteçlerini tetikler veya artırırken, TGF- β 1 osteokalsin ekspresyonunu ve alkalik fosfataz aktivitesini önemli ölçüde inhibe eder (7).

BMP-7 osteojenik protein 1'in (OP-1) üç boyutlu yapısı çözüldü (7,8) ve OP-1 ile TGF- β 2 arasında sınırlı sekans özdeşliği olmasına rağmen ortak bir polipeptit katını paylaştıklarını gösterdi. OP-1 ve TGF- β 'nin benzerliği %38'den azdır, fakat BMP-2 ve BMP-5'e göre sırasıyla %60 ve %85 olmak üzere daha yüksektir. Monomer, üç disülfid bağı, monomer çekirdeğini oluşturan sistein düğümü ve iki parmak benzeri çıkıntı oluşturan düğümden çıkan dört antiparalel β -tabaka şeridi sunar. Yapılan çalışmalarda BMP-2A geninin kromozom 20'de bulunduğu tespit edildi (9).

KEMİK MORFOJENETİK PROTEİNLERİNİN SİNYAL KASKADI

Osteogenez, üç önemli aşamadan oluşan bir dizi olayı içerir: mezenkimal hücrelerin göçü ve çoğalması, mezenkimal hücrelerin farklılaşması, kıkırdak oluşumu ve son olarak kıkırdakın kemikle yer değiştirmesidir. İmplantasyondan birkaç gün sonra mezenkimal hücrelerin adezyonunu ve proliferasyonunu artırarak, plazma fibronektinin demineralize kemik matrisine bağlanmasıyla tetiklenir. Kondrojeniz 5 gün sonra gözlenir ve 7-8 günde zirveye ulaşır. 9 gün sonra kıkırdak hipert-

rofisi ve mineralizasyonu gözlenir. Osteoblast farklılaşması anjiogeneze bağlıdır ve en yüksek seviyeye 10.-11. günde ulaşır (10). Yeniden şekillenen endokondral kemik, bir hematopoetik bölge haline gelir. Demineralize kemik matriksi, embriyolarda iskelet morfogenezinin ve yetişkinlerde kemik onarımının ilk olaylarını taklit eden morfojenetik bir olay dizisine yanıt verir.

Kemik morfogenezini için belirli anahtar sinyallerin tanımlanması, BMP'nin, TGF- β üst ailesinin bir sinyal molekülü olarak hücre zarındaki özel bir tip 2 reseptörüne bağlanarak bir kompleks oluşturmasını içerir. Bu kompleks, BMP-reseptör 2-reseptör 1 kompleksinin oluşumunu tetikler. Reseptörler, kendi kendini fosforile eden ve bir TGF- β dönüştürücü ailesi olan Smad proteinlerini fosforile etme yeteneği kazanan transmembran serin/treonin kinaz proteinleridir. Smad'lar, BMP reseptörlerinin sinyal iletimi için kullanılan bir ailedir ve yapı ve işlevlerine göre üç alt gruba ayrılır: reseptör-düzenlenmiş Smad'ler (R-Smad'ler), ortak aracı Smad'ler ve inhibe edici Smad'ler. R-Smad'ler, aktive edilmiş serin/treonin kinaz reseptörleri (BMP-reseptör 2-reseptör 1 kompleksi) tarafından fosforile edilir. R-Smad'ler daha sonra ortak aracı Smad'lerle etkileşerek hetero-oligomeric kompleksler oluşturur ve bu kompleksler çekirdeğe yer değiştirerek çeşitli hedef genlerin transkripsiyonunu düzenler (11). Smad'lerin DNA'ya kendi başlarına bağlanıp bağlanmadığı ve spesifik bağlanma bölgelerini tanıyıp tanımadığı açık değildir.

BMP-2'nin BMP-5, BMP-6 veya BMP-7 ile transient co-ekspresyonu veya BMP-4'ün BMP-7 ile transient co-ekspresyonu, heterodimerik BMP'yle herhangi bir tek BMP'nin ifadesinden daha fazla BMP aktivitesi ile sonuçlanır (12).

Son araştırmalar, spesifik BMP antagonistlerini (örneğin noggin ve chordin) ve DAN ailesinin üyelerini (örneğin gremlin) tanımlamıştır. Bu tür antagonistler, BMP'ye spesifik reseptörleri ile aynı afinite ile bağlanarak sinyal iletimini bloke eder ve böylece kemik oluşumunu azaltır. Bu nedenle, bu antagonistler, aşırı kemik oluşumu ile karakterize edilen patolojik durumlarda terapötik olarak kullanılabilirler (13).

BMP-3'ün osteogenez üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir ve TGF- β /aktivine benzer bir sinyal yolu sunar (14). BMP-3, BMP-2'nin aktivitesini inhibe etme yeteneği gösterir ve bu, TGF- β /aktivin ve BMP sinyal yollarındaki ortak bileşenler arasında bir rekabetin sonucu olabilir. BMP-3, demineralize kemikte en bol bulunan BMP olduğundan, diğer BMP'lerin in vivo osteojenik aktivitesini modüle ederek muhtemelen önemli bir rol oynar.

Bu sonuçlar, ekzojen BMP'lerden oluşan ürünlerin kullanıldığı kemik rejenerasyonu için BMP-3 miktarının belirlenmesinin klinik açıdan büyük önem taşıdığını göstermektedir. BMP'lerin osteojenik potansiyeli, antagonistlerin varlığı

durumunda azalır. Ancak BMP-3, kemik hipermineralizasyonu ile karakterize edilen osteopetroz gibi hastalıkların tedavisinde kullanılabilir.

KEMİK MORFOJENETİK PROTEİNLERE KARŞI BAĞIŞIKLIK TEPKİSİ

BMP'lerin implantasyonu sonrası aktive olan bağışıklık mekanizmaları hakkında tam bir fikir birliği oluşmamıştır ve bu konuda bazı karışıklıklar ve tartışmalar vardır. Allojenik BMP'lerin ve kollajen olmayan proteinlerin tek başına uygulanması orta düzeyde bir bağışıklık tepkisine yol açabilir ancak BMP'nin osteoindüktif kapasitesini azaltmaz. Bir BMP-kollajen olmayan proteinin yüksek dozu, anti-BMP antikörlerinin üretilmesine neden olabilir ve BMP'nin osteoindüktif etkisini engelleyebilir (15). Allojenik veya ksenojenik BMP'lerin implantasyonu, makrofajlar, lenfositler ve plazma hücrelerinin toplanmasını ve antikörlerin üretimini teşvik ederek osteogenezi inhibe edebilir. Bazı araştırmalar türe özgü bir etki gösterirken, diğerleri ksenojenik BMP'nin 100 mg'a kadar olan dozlarının güvenli olduğunu ve tespit edilebilir bir bağışıklık tepkisi oluşturmadığını göstermektedir (16, 17). Ancak BMP'lerin ikinci implantasyonunun, kritik boyutlu lezyonların tedavisinde, bağışıklık tepkisinin yoğunlaşmasına ve ksenojenik BMP'nin etkinliğinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir. RhBMP implantasyonundan sonra bağışıklık yanıtının analizi tam olarak incelenmemiş olmasına rağmen, yapılan öncül çalışmalar, rhBMP-2 implantasyonunun köpeklerin çene kemiği kusurlarına yerleştirilmesinden sonra anti-rhBMP-2 üretmediğini bildirmiştir. BMP'lerin kemik oluşumunu tetiklemesi, implantasyon sonrası bağışıklık tepkileriyle ilişkilendirilebilir. Bu nedenle, BMP'lerin ortopedik ve diş hekimliği alanında kullanımında güvenilirliğini sağlamak için daha fazla çalışma yapılması gereklidir. Bu çalışmalar, BMP'lerin implantasyonu sonrası bağışıklık tepkilerinin yanı sıra BMP'lerin olası yan etkilerini de içermelidir. Bu çalışmalar, BMP'lerin uzun vadeli güvenilirliğini değerlendirmeye odaklanmalıdır ve bu süreçte klinik denemelerin sonuçları dikkate alınmalıdır.

KEMİK MORFOJENETİK PROTEİNLERİ İÇİN HEDEF HÜCRELER

Çeşitli hücre hatları üzerindeki hücrel ve moleküler etkilerini gösteren demineralize kemik matrisi ve saflaştırılmış veya rekombinant BMP'ler, çok sayıda araştırma tarafından incelenmiştir. BMP'lere yanıt veren hücre hatları arasında pluripotent mezenkimal hücreler, kemik iliği hücreleri, osteoblast öncüleri, miyoblastlar, fibroblastlar ve nöral hücreler yer almaktadır. BMP'ler, alkalın fosfataz, paratiroid hormonu reseptörü, osteokalsin, osteopontin ve osteonektin gibi birçok kemik metabolizması belirtecinin modülasyonunu sağlar. BMP'lerin sinyal

iletim mekanizmaları hala belirsiz olsa da, birikmiş kanıtlar, BMP aracılı yanıtın kıkırdak ve kemik gelişimi sırasında spesifik reseptörlerin kullanımını içerdiğini göstermektedir. BMP'lerin, organogenezin erken aşamalarında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

Mezenkimal ve embriyonik hücrelerde, BMP'lerin en etkileyici etkisi, bu hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını uyararak kıkırdak oluşumunu ve alkalik fosfataz aktivitesini uyarma yeteneğidir. Başka hormonlar veya sitokinler, bu kemik metabolizması belirteçlerinin seviyesini kontrol edemez. BMP'lerin düşük konsantrasyonlarının in vitro deneylerinde, mezenkimal hücrelerin adipositlere farklılaşmasını teşvik ettiği, ancak yüksek konsantrasyonlarda ise osteoblast farklılaşmasını teşvik ettiği dikkate değer bir bulgudur. Bu, etkisini tahmin etmek için BMP dozlarının belirtilmesi gerektiğini vurgulanmaktadır (19). rhBMP-2 ile tedavi edilen osteoblastlar, mezenkimal hücrelere benzer şekilde, alkalik fosfataz, osteokalsin, osteopontin ve kemik sialoprotein seviyelerinde artış ile hızlı farklılaşma gösterirler (20).

BMP'lerin osteoblastlar ve periosteal hücreler üzerindeki etkileri, BMP'lerin hücresel seviyedeki etkisinin daha iyi anlaşılması için kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. RhBMP-2, kemik hücrelerinin farklılaşmasında önemli bir rol oynar ve miyoblastlar veya adipositler gibi diğer hücre türlerine farklılaşmasını engeller. Ayrıca, bu protein, kemik matriks proteinlerinin sentezinde ve DNA sentez aktivitesinde bir artışa neden olabilir (21).

Birçok BMP tipinin endokondral kemik oluşumunu başlatabildiğinden, kondroblastlar da bu proteinlerin doğal hedefleridir. Gerçekten de, birçok BMP'nin hücre çoğalmasında ve kondroblastların ve büyüme plakasının kondrositlerinin alkalik fosfataz sentezini ve aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. BMP'lerin etkilerinde kondrositlerin in vitro kültür koşulları da önemli bir rol oynamaktadır ve bu proteinlerin dokuya özgü uyarılarının olduğunu göstermektedir (23).

Sığır BMP'leri, doza bağlı bir şekilde NIH-3T3 fibroblastlarında DNA ve protein sentezinde ve ayrıca alkalik fosfataz aktivitesinde bir artışa neden olmuştur (24). Buna karşılık, rhBMP bu hücrelerde alkalik fosfatazda bir artışa neden olmadı. BMP-2, BALB/c-3T3, Swiss-3T3 ve 3T3-L1 fibroblastlarının adipositlere ve osteoblastlara farklılaşmasını desteklemiştir (20).

Genellikle, BMP'lerin hedef hücreleri osteoblast benzeri hücrelere farklılaşır ve alkalik fosfataz ve mineralize doku üretir. Öte yandan, yüksek düzeyde saflaştırılmış olgun tavşan osteoklast kültüründe BMP'lerin osteoklastik kemik-rezorbe etme aktivitesinin doğrudan etkisi incelenmiştir (25). BMP-2 ayrıca, sırasıyla organik ve inorganik kemik matrikslerinin parçalanması için anahtar enzimler olan katepsin K ve karbonik anhidraz 2 ile haberci RNA ekspresyonunu yükseltir.

SAFLAŞTIRILMIŞ VE REKOMBİNANT KEMİK MORFOJENETİK PROTEİNLERİ

Her büyüme faktöründe olduğu gibi, BMP'ler dokularda çok düşük dozlarda etki eder, nanogram veya mikrogram olarak bulunur. Ancak, birkaç mikrogram BMP izole etmek için kilogramlarca demineralize kemik matrisine ihtiyaç vardır (26). BMP'lerin izolasyonu, farklı yöntemler kullanılarak yapılabilir ve farklı BMP'ler, amino asit dizileri ile tanımlanabilir. BMP'lerin demineralize kemik matrisinden saflaştırılması için kullanılan dört yöntem şunlardır: 1) enzimatik sindirim, çünkü BMP'ler kollajenaza dirençlidir; 2) etilen glikol ekstraksiyonu, çünkü BMP molekülü hidrofobik yapıdadır; 3) 6 M üre artı 0,5 M CaCl₂, çünkü BMP'ler diğer kollajen olmayan proteinlerden kaotropik çözücüler içinde ayrıştırılabilir; 4) konkanavalin A afinite kromatografisi, çünkü BMP'lerin yapısında bulunan karbonhidratlar nedeniyle hidrofobik yapıdadırlar.

BMP'lerin saflaştırılması oldukça zor ve verimleri düşüktür, ancak imkansız değildir. Bu işlem için en az 100 kg yıkanmış taze kortikal kemik gereklidir. BMP'lerin moleküler ağırlıkları 15 ila 30 kDa arasında değişir ve kısmi saflaştırılması her bir kg taze kemik için 57 mg BMP havuzu sağlar. Belirli bir doğal BMP'nin izolasyonu, dokudaki miktarına bağlı olarak çok az miktarda BMP verir. BMP'lerin saflaştırılması sürecinin zorluğundan kaynaklanan az miktarda BMP, bu proteinlerin klonlanması ve ekspresyonu için moleküler biyoloji tekniklerinin kullanımına neden olmuştur.

BMP'leri kodlayan ilk genlerin moleküler klonlanması 1980'lerin sonunda gerçekleşmiş ve BMP ailesinin 30'dan fazla üyesi tanımlanmıştır (27). Farklı BMP'lerin incelenmesi, ifade modellerinin ve biyolojik fonksiyonlarının iskelet gelişimi ile sınırlı olmadığını ortaya koydu. Hücre proliferasyonu ve farklılaşması, apoptoz, iskelet dahil olmak üzere çeşitli organların morfogenez ve organogenez gibi diğer fonksiyonlar tanımlanmıştır.

Bazı laboratuvarlar, implantasyon bölgesinde kırıkta veya kemik oluşumunu tetikleyen izole edilmiş biyoaktif proteinlere sahiptir, ancak bu proteinlerin verimleri düşüktür ve saflaştırma süreci oldukça zahmetlidir (28). Ek olarak, allojenik donör kemiğinden köken almaları nedeniyle ortaya çıkan potansiyel risk klinik uygulamalarını azaltmıştır (29). Farklı BMP'ler için cDNA'lar tanımlanmış ve klonlanmıştır. Bu cDNA'ların dizileri, BMP-1 hariç, bu proteinlerin TGF- β ailesinin üyeleri olduğunu göstermiştir (30). BMP kodlayan genlerin moleküler klonlama işlemi ve TGF- β akrabaları olarak tanımlanması, bu proteinlerle ilişkilmesine ve ekspresyon ile fonksiyonel çalışmaların yapılmasına olanak sağlamıştır.

BMP-2 ve BMP-7'nin osteoindüktif özellikleri göz önüne alındığında, bu rekombinant proteinleri heterolog bakteriyel, memeli ve bakulovirüs kullanarak üretmek ve saflaştırmak amacıyla uygun transdüksiyon vektörlerine klonlamak için bu moleküllerin insan cDNA karşılıklarını izole etmeye başlandı. Elde edilen rekombinant proteinler, osteoblast farklılaşma sürecinin yeni potansiyel düzenleyicilerini tanımlamak ve karakterize etmek, kemik oluşumunda yer alan moleküller mekanizmaları daha iyi anlamak ve yeni terapötik içgörüler (ilaç tasarımı ve gen tedavisi) kazanmak için kör cDNA klonlama stratejilerinde kullanılmaktadır.

Rekombinant BMP'lerin osteoindüktif özellikleri, saflaştırılmış BMP'lere kıyasla azalır ve BMP'lerin genetik mühendisliği teknikleriyle karakterizasyonunu gerektirir. Bessho ve ark. (31), saflaştırılmış ve rekombinant sığır BMP'nin etkilerini ayrıntılı olarak analiz etmişlerdir. Ca²⁺ içeriği ve radyografik yöntemler kullanarak yapılan analizler sonucunda, sığır BMP kullanıldığında, sıçan kasında ektopik olarak oluşan kemik dokusunun olgunlaşmasının 10 kat daha fazla olduğunu gözlemlədiler.

Farklı BMP'lerdeki tutarsızlıkların açıklanması için birkaç hipotez önerilmiş ve bunlar test edilmiştir. Sığır BMP'nin rekombinant ve saflaştırılmış formunda amino asit dizisinde farklılıklar rapor edilmiştir. Ayrıca, bu proteinlerin kemik onarımında birbirleriyle koordineli olarak çalıştığı öne sürülmüştür, bu da onarımın daha da kolaylaştırılması için aynı anda birkaç rekombinant BMP'ye ihtiyaç duyulduğunu vurgulamaktadır. Kollajen türevli materyallerin BMP taşıyıcıları olarak mükemmel adaylar olduğu ve defekte taşımak için kullanılabileceği de gözlemlenmiştir (31).

OSTEOJENİK PROTEİN-1/KEMİK MORFOJENETİK PROTEİN-7

1990'ların başlarında, OP-1 veya BMP-7 klonlandı. OP-1 geni, sığır BMP ile zenginleştirilmiş müstahzarların polipeptit zincirine dayalı bir konsensüs probu kullanılarak plasenta, hipokampus ve osteosarkoma cDNA kitaplıklarında keşfedildi. OP-1 kondrosit proliferasyonunu teşvik eder ve kondrojenik farklılaşmayı tetikleyebilir. Ancak, yalnızca embriyogenez sırasında ifade edilen OP-2 (BMP-8) bulunmaktadır. OP-1, BMP-2 ile 6 gibi, disülfid bağları ile stabilize edilmiş bir homodimerik glikoproteindir ve moleküler ağırlığı 32 ila 36 kDa arasında değişir. Başlangıçta sığır kemik matriksinden saflaştırılan OP-1'in amino asit dizisi, BMP-2'ninkine yaklaşık %60 benzerdir.

İnsan hücrelerinde üretilen rekombinant OP-1'in, sığır OP-1'in yüksek düzeyde saflaştırılmış preparasyonlarına benzer bir şekilde in vitro kemik oluşumunu tetikleyebildiği gösterilmiştir (22). Tedavinin ilk aşamalarında OP-1, yoğun bir kondrojenik yanıt ortaya çıkarır ve tedavi süresince osteoblastik bir yanıtı uyandır.

OP-1'in biyolojik etkilerine ilişkin araştırmalar, özellikle osteogenez potansiyeli açısından yapılmıştır. OP-1'in hücre proliferasyonunu, kolajen sentezini ve osteoblast farklılaşmasını uyardığı gösterilmiştir. Hayvan modellerinde yapılan alışmalar, OP-1'in segmental osteoperiosteal defektlerde endokondral kemikleşmeyi tetikleyebileceğini göstermiştir (32).

Amerika Birleşik Devletleri FDA, son zamanlarda OP-1'in spinal füzyon tedavisi için kullanımını onaylayarak ortopedik ve diş ameliyatlarında kullanımını vurgulamıştır (33).

KLİNİK UYGULAMALAR

PubMed'de yapılan aramalarda, "kemik morfojenetik proteini" yazıldığında 3 binin üzerinde sonuç çıkmaktadır, ancak insanlarda klinik araştırmaların sayısı sınırlıdır. Bilimsel kanıtın en güçlü şekli, meta-analiz ve randomize kontrollü çalışmalardan elde edilir. Sistematik incelemeler, tedavilerin yan etkileri ve yararları hakkındaki çalışmaları bir araya getirir. Bu incelemeler, doğru veri kaynaklarından elde edilen ve belirli bir soruya odaklanan yüksek kaliteli makalelere dayanır. Sistematik incelemeler, önyargıyı önlemek veya en aza indirmek için çok faydalıdır. Meta-analiz, farklı çalışmaların sonuçlarının nicel olarak birleştirilmesiyle bir tedavinin beklenen etkisine ilişkin bir tahmin verir (34).

İlk alışmalar, BMP'lerin (rhBMP-2) lokal alveoler çıkıntının korunması veya büyütülmesi (54) veya maksiller sinüs tabanının büyütülmesi (53) gibi alanlarda etkisini analiz eden klinik deneylerdi. Ancak, çalışmaların büyük çoğunluğu spinal füzyonla ilgiliydi ve BMP'lerin yararı konusunda hemfikirdi. Burkus ve ark. (43) ok sayıda klinik çalışmanın entegre bir analizini yürüttüler ve rhBMP-2 ile tedavi edilen deneklerin ameliyat süresi, kan kaybı, hastanede kalış süresi, tekrar ameliyat oranı, medyan işe dönüş süresi ve füzyon ile ilgili istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara sahip olduğu sonucuna vardılar. Emilebilir bir kollajen süngere uygulanan 1,5 mg/mL rhBMP-2'nin güvenliği ve etkinliği, açık tibia kırığı olan 450 hastanın tedavisinde gösterilmiştir. Hızlandırılmış kırık ve yara iyileşmesi ve daha düşük enfeksiyon oranı ile ikincil müdahalelerin sıklığını ve prosedürlerin genel invazivliğini azaltma açısından standart bakıma kıyasla önemli ölçüde üstün sonuçlar gözlemlendi.

Diş hekimliğinde, BMP'ler periodontal hastalık nedeniyle kaybedilen kemik dokusunun rejenerasyonu, implantların yerleştirilmesi için kemik hacminde artış, maksiller sinüs büyütme ve restoratif-endodontik prosedürlerde test edilmiştir.

Maksiller sinüs büyütme amacıyla yapılan hayvan alışmaları, BMP'lerin etkinliğini değerlendirmek için yapılmıştır. Bu alışmalar, insanlarda yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında benzer sonuçlar göstermektedir, ancak tatmin edici

sonuçlar elde edilememiştir. Köpeklerde yapılan deneylerde, rhBMP-2 ile birlikte kolajen köpük taşıyıcısı kullanılarak 3 taraflı kemik içi defektlerde kemik oluşum hızında artış gözlemlenmiştir. Bir klinik çalışmada, OP-1'in 1 g kollajen taşıyıcıda 2,5 mg kullanımını sonucu, sinüs taban yükseltme operasyonundan sonraki 6 ay içinde insan maksiller sinüsünde kemik oluşumunu potansiyel olarak başlattığı görülmüştür. Ancak, bu malzemenin tam davranışı öngörülememektedir.

Barboza ve ekibi, BMP'leri kullanarak implantların yerleştirilmesinden önce kemik krest yüksekliğini arttırmaya yardımcı olmuştur. Ancak, Salata ve meslektaşları, BMP'lerin implant diş hekimliğinde kullanımına ilişkin 379 bilimsel raporun bir meta-analizini yapmış ve implant yerleştirmeden önce alıcı kemik yatağının iyileştirilmesine yönelik klinik protokollerin yeterli sayıda çalışmaya sahip olmadığı sonucuna varmıştır.

Giannobile ve ark. (57), tip 3 furkasyon kusurlarına sahip köpeklerde implante edilen rhBMP-7 ile etkilenen köklerin ankilozu gibi hiçbir yan etki belirtisi göstermeden umut verici sonuçlar elde etmiştir. Ancak daha sonra yapılan bir sistemik incelemede (42), bu araştırmacıların mevcut raporların çoğunun düşük kaliteli kanıtlara sahip olduğunu ve çoğunun vaka çalışmaları veya kontrolsüz vaka serilerinden oluştuğunu tespit ettikleri belirtilmiştir. Yeterli veri olmadığı için bir meta-analiz yapılamamıştır ve BMP'lerin klinik öncesi ve ilk klinik verileri umut verici olsa da, uzun vadeli sonuçlar için kesin sonuçlara varmak için yetersiz olduğu sonucuna varılmıştır.

BMP'ler, mineralize bir bariyerin oluşumunu tetiklemeleri açısından, pulpa kapama prosedürlerinde on yılı aşkın bir süredir test edilmiştir (58). Jepsen ve ark. (59) rekombinant BMP-7 kullanarak mini domuzlarda kaplama ajanı olarak tedavi uygulamış ve tedavi edilen grup ile Ca(OH)₂ ile tedavi edilen grup arasında daha kalın bir dentin bariyeri oluşumunu saptamıştır. Ren ve ark. (60), köpeklerin pulpalarında (azı dişleri ve küçük azı dişleri) fibrin ile ilişkili rekombinant BMP-2'yi kaplama maddesi olarak test etmiş ve bir hafta sonra bir dentin bariyeri oluşumunu gözlemlenmiştir. Bu sonuç, Ca ile tedavi edilen kontrol grubundan daha iyi bir sonuç elde edilmiştir. Ancak, bu çalışmaların genellikle hayvan çalışmaları olduğunu ve BMP'lerin insanlarda kullanımını için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğunu unutmamak önemlidir.

SONUÇ

BMP sinyal yolu yolaklarının hücresel ve moleküler temeli hakkındaki bilgi ve uygun taşıyıcıların geliştirilmesi, tıpta büyük bir devrimi teşvik edecek ve rejeneratif süreçlerin yara iyileşmesi süreçlerine üstünlük sağlayabileceği düşünülmektedir. Ancak, BMP'lerin tıp ve diş kliniklerinde etkili bir şekilde kullanılabilmesi için iyi tasarlanmış kör ve randomize klinik çalışmaların gerekliliği açıktır.

KAYNAKLAR

1. Urist MR (1965). Bone: Formation by autoinduction. *Science*, 150: 893-899.
2. Urist MR, Nogami H & Mikulski A (1976). A bone morphogenetic polypeptide. *Calcified Tissue Research*, 21 (Suppl): 81-87.
3. Bessho K, Tanaka N, Matsumoto J et al. (1991). Human dentin-matrix-derived bone morphogenetic protein. *Journal of Dental Research*, 70: 171-175.
4. Urist MR, Grant TT, Lindholm TS et al. (1979). Induction of new-bone formation in the host bed by human bone-tumor transplants in athymic nude mice. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 61: 1207-1216.
5. Constam DB & Robertson EJ (1999). Regulation of bone morphogenetic protein activity by prodomains and proprotein convertases. *Journal of Cell Biology*, 144: 139-149.
6. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ et al. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 242: 1528-1534.
7. Spinella-Jaegle S, Roman-Roman S, Faucheu C et al. (2001). Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta1 on osteoblast differentiation. *Bone*, 29: 323-330.
8. Griffith DL, Keck PC, Sampath TK et al. (1996). Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 93: 878-883.
9. Tabas JA, Zasloff M, Wasmuth JJ et al. (1991). Bone morphogenetic protein: chromosomal localization of human genes for BMP1, BMP2A, and BMP3. *Genomics*, 9: 283-289.
10. Pacicca DM, Patel N, Lee C et al. (2003). Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. *Bone*, 33: 889-898.
11. Sakou T (1998). Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone*, 22: 591-603.
12. Israel DI, Nove J, Kerns KM et al. (1996). Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity *in vitro* and *in vivo* *Growth Factors*, 13: 291-300.
13. Gropppe J, Greenwald J, Wiater E et al. (2002). Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein noggin. *Nature*, 420: 636-642.
14. Bahamonde ME & Lyons KM (2001). BMP3: to be or not to be a BMP. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 83-A (Suppl 1): S56-S62.
15. Urist MR, Nilsson OS, Hudak R et al. (1985). Immunologic evidence of a bone morphogenetic protein in the milieu interieur. *Annales de Biologie Clinique*, 43: 755-766.
16. Johnson EE, Urist MR, Schmalzried TP et al. (1989). Autogeneic cancellous bone grafts in extensive segmental ulnar defects in dogs. Effects of xenogeneic bovine bone morphogenetic protein without and with interposition of soft tissues and interruption of blood supply. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 243: 254-265.
17. Nilsson OS, Urist MR, Dawson EG et al. (1986). Bone repair induced by bone morphogenetic protein in ulnar defects in dogs. *Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 68: 635-642.
18. Nilsson OS & Urist MR (1991). Immune inhibition of repair of canine skull trephine defects implanted with partially purified bovine morphogenetic protein. *International Orthopaedics*, 15: 257-263.
19. Carrington JL, Chen P, Yanagishita M et al. (1991). Osteogenin (bone morphogenetic protein-3) stimulates cartilage formation by chick limb bud cells *in vitro* *Developmental Biology*, 146: 406-415.
20. Wang EA, Israel DI, Kelly S et al. (1993). Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Factors*, 9: 57-71.
21. Chen TL, Bates RL, Dudley A et al. (1991). Bone morphogenetic protein-2b stimulation of growth and osteogenic phenotypes in rat osteoblast-like cells: comparison with TGF-beta 1. *Journal of Bone and Mineral Research*, 6: 1387-1393.

22. Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV et al. (1992). Recombinant human osteogenic protein-1 (HOP-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* *Journal of Biological Chemistry*, 267: 20352-20362.
23. Chen P, Vukicevic S, Sampath TK et al. (1993). Bovine articular chondrocytes do not undergo hypertrophy when cultured in the presence of serum and osteogenic protein-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 197: 1253-1259.
24. Vukicevic S, Latin V, Chen P et al. (1994). Localization of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) during human embryonic development: high affinity binding to basement membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 198: 693-700.
25. Kaneko H, Arakawa T, Mano H et al. (2000). Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone*, 27: 479-486.
26. Gao T, Lindholm TS, Marttinen A et al. (1996). Composites of bone morphogenetic protein (BMP) and type IV collagen, coral-derived coral hydroxyapatite, and tricalcium phosphate ceramics. *International Orthopaedics*, 20: 321-325.
27. Reddi AH (1997). Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 8: 11-20.
28. Wang EA, Rosen V, Cordes P et al. (1988). Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 85: 9484-9488.
29. Kirker-Head CA (2000). Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 43: 65-92.
30. Hofbauer LC & Heufelder AE (1996). Updating the metalloprotease nomenclature: bone morphogenetic protein 1 identified as procollagen C proteinase. *European Journal of Endocrinology*, 135: 35-36.
31. Bessho K, Kusumoto K, Fujimura K et al. (1999). Comparison of recombinant and purified human bone morphogenetic protein. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 37: 2-5.
32. Sampath TK, Rashka KE, Doctor JS et al. (1993). *Drosophila* transforming growth factor beta superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 90: 6004-6008.
33. Vaccaro AR, Patel T, Fischgrund J et al. (2003). A pilot safety and efficacy study of OP-1 putty (RhBMP-7) as an adjunct to iliac crest autograft in posterolateral lumbar fusions. *European Spine Journal*, 12: 495-500.
34. Sacks HS, Berrier J, Reitman D et al. (1987). Meta-analyses of randomized controlled trials. *New England Journal of Medicine*, 316: 450-455.
35. Haid Jr RW, Branch Jr CL, Alexander JT et al. (2004). Posterior lumbar interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein type 2 with cylindrical interbody cages. *Spine Journal*, 4: 527-538.
36. Kuklo TR, Rosner MK & Polly Jr DW (2004). Computerized tomography evaluation of a resorbable implant after transforaminal lumbar interbody fusion. *Neurosurgical Focus*, 16: E10.
37. Lanman TH & Hopkins TJ (2004). Lumbar interbody fusion after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 added to poly(L-lactide-co-D,L-lactide) bioresorbable implants. *Neurosurgical Focus*, 16: E9.
38. Mummaneni PV, Pan J, Haid RW et al. (2004). 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. Invited submission from the Joint Section Meeting on Disorders of the Spine and Peripheral Nerves, March 2004. *Journal of Neurosurgery. Spine*, 1: 19-23.
39. Baskin DS, Ryan P, Sonntag V et al. (2003). A prospective, randomized, controlled cervical fusion study using recombinant human bone morphogenetic protein-2 with the CORNERTONE-SR allograft ring and the ATLANTIS anterior cervical plate. *Spine*, 28: 1219-1225.
40. Burkus JK, Dorchak JD & Sanders DL (2003). Radiographic assessment of interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein type 2. *Spine*, 28: 372-377.
41. Jung RE, Glauser R, Scharer P et al. (2003). Effect of RhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. *Clinical Oral Implants Research*, 14: 556-568.

42. Giannobile WV & Somerman MJ (2003). Growth and amelogenin-like factors in periodontal wound healing. A systematic review. *Annals of Periodontology*, 8: 193-204.
43. Burkus JK, Heim SE, Gornet MF et al. (2003). Is INFUSE bone graft superior to autograft bone? An integrated analysis of clinical trials using the LT-CAGE lumbar tapered fusion device. *Journal of Spinal Disorders and Techniques*, 16: 113-122.
44. Burkus JK, Transfeldt EE, Kitchel SH et al. (2002). Clinical and radiographic outcomes of anterior lumbar interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Spine*, 27: 2396-2408.
45. Groeneveld EH & Burger EH (2000). Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *European Journal of Endocrinology*, 142: 9-21.
46. Salata LA, Franke-Stenport V & Rasmusson L (2002). Recent outcomes and perspectives of the application of bone morphogenetic proteins in implant dentistry. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 4: 27-32.
47. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD et al. (2001). Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 83-A (Suppl 1): S151-S158.
48. Cochran DL, Jones AA, Lilly LC et al. (2000). Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3-year results of a pilot study in humans. *Journal of Periodontology*, 71: 1241-1257.
49. Schedel H, Schneller A, Vogl T et al. (2000). Dynamic magnetic resonance tomography (MRI): a follow-up study after femur core decompression and instillation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (RhBMP-2) in avascular femur head necrosis. *Röntgenpraxis*, 53: 16-24.
50. van den Bergh JP, ten Bruggenkate CM, Groeneveld HH et al. (2000). Recombinant human bone morphogenetic protein-7 in maxillary sinus floor elevation surgery in 3 patients compared to autogenous bone grafts. A clinical pilot study. *Journal of Clinical Periodontology*, 27: 627-636.
51. Geesink RG, Hoefnagels NH & Bulstra SK (1999). Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. *Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 81: 710-718.
52. Boyne PJ, Marx RE, Nevins M et al. (1997). A feasibility study evaluating RhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, 17: 11-25.
53. Howell TH, Fiorellini J, Jones A et al. (1997). A feasibility study evaluating RhBMP-2/absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, 17: 124-139.
54. Choi SH, Kim CK, Cho KS et al. (2002). Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge (RhBMP-2/ACS) on healing in 3-wall intrabony defects in dogs. *Journal of Periodontology*, 73: 63-72.
55. Barboza EP, Duarte ME, Geolas L et al. (2000). Ridge augmentation following implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the dog. *Journal of Periodontology*, 71: 488-496.
56. Giannobile WV, Ryan S, Shih MS et al. (1998). Recombinant human osteogenic protein-1 (OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects. *Journal of Periodontology*, 69: 129-137.
57. Nakashima M (1994). Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4. *Journal of Dental Research*, 73: 1515-1522.
58. Jepsen S, Albers HK, Fleiner B et al. (1997). Recombinant human osteogenic protein-1 induces dentin formation: an experimental study in miniature swine. *Journal of Endodontics*, 23: 378-382.
59. Ren WH, Yang LJ & Dong SZ (1999). Induction of reparative dentin formation in dogs with combined recombinant human bone morphogenetic protein 2 and fibrin sealant. *Chinese Journal of Dental Research*, 2: 21-24.