

Koštani morfogogenetski proteini u modelu posterolateralne spinalne fuzije kunića - pregled dosadašnjih spoznaja



Vladimir Farkaš* i Lovorka Grgurević

Sažetak

Bol u slabinskom dijelu kralježnice je važan javnozdravstveni problem u cijelom svijetu. Kirurško liječenje uključuje spinalnu fuziju kao operativnu tehniku kojoj je cilj izazvati sraštanje dva susjedna kralježka i postići njihovu imobilizaciju, u cilju sprječavanja pojave boli. Kako bi se postiglo sraštanje, u spinalnim fuzijama se koristi nekoliko osteoinduktivnih materijala koji potiču stvaranje nove kosti između kralježaka. Najčešće korišteni materijal je autograft. Uporaba autografta sa sobom nosi i razne komplikacije te je postotak neuspjelih spinalnih fuzija relativno visok. Kako bi se postigao manji morbiditet i veća uspješnost spinalnih fuzija, na animalnim modelima su testirani razni materijali i molekule koji bi mogli zamijeniti trenutno korištene materijale i unaprijediti standardnu tehniku spinalne fuzije. Jedan od najperspektivnijih kandidata

uključuje koštane morfogogenetske proteine (BMP). Od svih koštanih morfogogenetskih proteina, BMP2 i BMP7 su najčešće korišteni u animalnim modelima spinalne fuzije. Posljednjih godina, u prektličkim i kliničkim ispitivanjima se počeo koristiti i BMP6. U sklopu istraživanja potencijala koštanih morfogogenetskih proteina kao alternative autograftu, provedena su mnoga istraživanja koja uključuju „proof of concept“ korak, pokuse učinkovitosti i sigurnosti, testiranje raznih nosača za BMP molekule te pokuse koji uključuju najčešće komplikacije. Ovaj rad donosi pregled dosadašnje uporabe koštanih morfogogenetskih proteina u modelu posterolateralne spinalne fuzije kunića.

Ključne riječi: koštani morfogogenetski proteini, posterolateralna spinalna fuzija, kunić, animalni model

Uvod

Bol u slabinskom dijelu kralježnice je vrlo čest simptom koji se javlja u svim zemljama svijeta, neovisno o razvijenosti i u ljudi svih dobnih kategorija

(Hartvigsen i sur., 2018.). Ovaj mišićno-koštani problem ima izuzetno visoku prevalenciju i ponovljivost. Tako će 84 % ljudi barem jednom u životu iskusiti bol

Dr. sc. Vladimir FARKAŠ*, dr. med. vet., asistent, (dopisni autor, e-mail: vfarkas@irb.hr), Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Lovorka GRGUREVIĆ, dr. med., izvanredna profesorica, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

u slabinskom dijelu kralježnice, dok će 55 % ljudi iskusiti najmanje deset epizoda pojave simptoma kroz životni vijek (Donelson i sur., 2012.).

Posljednjih desetljeća, povećava se broj operativnih zahvata kao terapije boli slabinskog dijela kralježnice, a operacijske tehnike postaju sve složenije (Deyo i sur., 2010.). Zbog napretka u kirurškoj tehnici, laminektomiju, kao nekada najčešće izvođenu tehniku, postupno zamjenjuje spinalna fuzija zbog manjeg rizika od nestabilnosti i deformacije kralješka nakon operacije (Bae i sur., 2013.). Spinalna fuzija je operacijska tehnika kojom se postiže srašćavanje dvaju susjednih kralješaka. Kako bi srašćavanje bilo što uspješnije, u tehnikama spinalne fuzije se koriste osteoinduktivni materijali koji između njih potiču stvaranje nove kosti. Najčešće korišteni materijal je autologna kost koja se u ovoj vrsti operacija uzima iz područja zdjelčnih kostiju (koštani autograft). Iako spinalna fuzija, u odnosu na laminektomiju, predstavlja unaprijeđenje kirurškog liječenja boli u slabinskom dijelu leđa, postotak razvijanja pseudoartroze, odnosno nesrastanja segmenata kralježnice je vrlo visok (oko 30 %) (Sandhu i Khan, 2002., Valdes i sur., 2007.), a uspjeh revizijskih operacija je razmjerno nizak (Farrar i sur., 2001.).

Nedostatci standardnih tehnika stvorili su potrebu za razvojem novih nosača i materijala koji bi na najbolji mogući način mogli zamijeniti autograft i na taj način pospješiti stabilizaciju kralježničkih segmenata s manjim morbiditetom i većim postotkom uspješnosti.

Posljednja se dva desetljeća istražuju koštani morfogenetski proteini (BMP) kao osteoinduktivne molekule u stvaranju novog koštanog tkiva na mjestima gdje ono nedostaje ili ga je potrebno dodatno stvoriti u cilju stabilizacije koštanih segmenata. Kako istraživanje novih

materijala i metoda u medicini često podrazumijeva korištenje animalnih modela u pretkliničkim ispitivanjima, ovaj rad daje kratki prikaz dosadašnje uporabe koštanih morfogenetskih proteina u modelu posterolateralne spinalne fuzije u kunića kao jednom od najčešće korištenih animalnih modela spinalne fuzije.

Spinalna fuzija

Spinalna fuzija je zajednički naziv koji objedinjava veliki broj operativnih tehnika u području kralježnice kojima je cilj spajanje (fuzija) dva susjedna kralješka u svrhu prevencije pojave boli. Operacijsku tehniku spinalne fuzije u svrhu liječenja boli u slabinskom dijelu leđa prvi je opisao Chandler (1929.). Kombinirano, tehnike spinalne fuzije su najčešće izvođene operacije u području kralježnice, i samo u SAD-u, godišnje ih se naporavi oko 450 000 (Resnick, 2007.). Od svih tehnika spinalne fuzije, posterolateralna spinalna fuzija (PLF) je najizvođenija.

Kako bi fuzija kralježaka bila što čvršća i trajnija, koriste se osteogeni materijali kojima se pokušava inducirati stvaranje nove kosti između kralježaka. Najčešće korišteni osteogeni materijal u spinalnim fuzijama je autologna kost- autograft (Gupta i sur., 2015.). Autograft ima izvrsna osteoinduktivna, osteokonduktivna i osteogenetska svojstva i često ga se naziva zlatnim standardom, pri čemu, novi materijali u istraživanjima moraju pokazati superiornost nad autograftom kako bi bili razmatrani za daljnju uporabu. Međutim, autograft ima i mnoge nedostatke koji ga sprječavaju da bude idealan izvor nove kosti. Osim velikog postotka nesrastanja u zahvatima koji uključuju korištenje samo autografta kao nadomjesnog materijala, samo prikupljanje autografta, u preko 25% slučajeva, prouzroči komplikacije koje uključuju: infekcije, lom crijevne

kosti, abdominalne hernije, gubitak krvi, produžen ostanak u bolnici te povećanu postoperativnu bol (Younger i Chapman, 1989., Fernyhough i sur., 1992., Banwart i sur., 1995.). Pored navedenoga količina autografta dobivena tijekom operativnog zahvata nije adekvatna.

Uporabom alografta kao alternativnog materijala, izbjegavaju se komplikacije vezane uz prikupljanje kosti od pacijenta, no povećava se rizik za pojavu učestalosti infekcija te reakcija odbacivanja, a uz sve to, i osteoinduktivna svojstva alografta nisu na razini autografta (Resnick i sur., 2005., Agarwal i sur., 2009.).

Koštani morfogenetski proteini (BMP)

Navedene komplikacije, u kombinaciji s visokom učestalošću nesrastanja, navele su istraživače da pokušaju naći alternative materijale da bi unaprijedili postojeće metode. To je uključivalo i istraživanja koštanih morfogenetskih proteina (BMP) te aspirata koštane srži (BMA) koji su pokazivali obećavajuća svojstva. S vremenom, uslijed „head-to-head“ studija kojima je dokazana superiornost BMP molekula nad BMA molekulama u animalnim modelima, BMP molekule su postale najistraživaniji kandidati za uporabu u regeneraciji koštanog tkiva, pa tako i u spinalnim fuzijama (Kraiwattanapong i sur., 2005., Einhorn i Gerstenfeld, 2014.).

Za otkriće BMP molekula, ključno je bilo otkriće da demineralizirani koštani matriks (DBM) inducira stvaranje ektopične kosti i hrskavice *in vivo* (Urist, 1965.). Iz toga je proizašlo da se u koštanom matriksu nalaze bioaktivne molekule odgovorne za stvaranje novog koštanog tkiva. Kako je u kombinaciji s tripsinom ta reakcija izostala pretpostavilo se da se radi o proteinskoj molekuli (Katagiri i Watabe, 2016.). Iako još uvijek tada nepoznat, faktor je nakon tog pokusa nazvan koštani morfogenetski

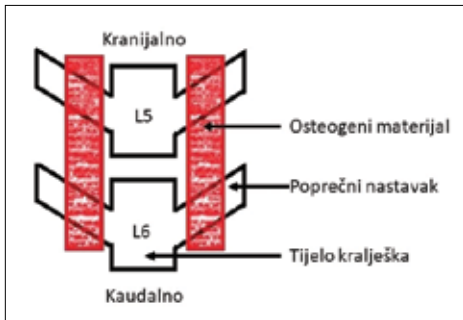
protein (BMP). Identifikacija proteina je potvrđena njegovom izolacijom iz goveđe kosti (Wang i sur., 1988.).

BMP molekule svrstane su u nad obitelj transformirajućeg čimbenika rase beta (TGF β) i aktivno sudjeluju u razvoju skeleta (razvoj ekstremiteta i kostiju lubanje, osifikacija prsne kosti itd.), mišićnog sustava, očiju, bubrega, srca i krvožilnog sustava, i razvoju tumora (Ducy i Karsenty, 2000., Borovečki i sur., 2004., Alexander i sur., 2013.). Iz samog naziva „koštani morfogenetski proteini“ je lako zaključiti da su BMP sposobni inducirati stvaranje nove ektopične kosti (Xiao i sur., 2007.). Od preko 30 do sada opisanih BMP molekula, za otprilike 14 molekula postoje dokazana osteoinduktivna svojstva *in vivo* ili *in vitro* (Riley i sur., 1996., Katagiri i Watabe, 2016.). Dokazano je da BMP2, BMP4, BMP6, BMP7 i BMP9 imaju svojstva formiranja nove kosti *in vivo*, dok BMP14 (GDF-5) dokazano inducira stvaranje hrskavice i tetivi sličnog tkiva *in vivo* (Wozney i sur., 1988., Celeste i sur., 1990., Sampath i sur., 1992., Wolfman i sur., 1997., Vukičević i sur., 2014.).

BMP molekule su za pretklinička i klinička istraživanja, dostupne iz tri izvora: 1) ekstrakcija iz ljudskog ili životinjskog koštanog matriksa, 2) proizvodnja rekombinantnog humanog proteina (rhBMP) i 3) genska terapija (Subach i sur., 2001.). Najčešće korišteni oblike je rekombinantni humani protein.

Model posterolateralne spinalne fuzije u kunića

Animalni modeli spinalne fuzije se koriste kako bi se potvrdili i provjerili učinkovitost i sigurnost pokusnih materijala i metoda (Sandu i Khan, 2002., Gregurić Gračner i sur., 2019.). Od početka 20-tog stoljeća, kada je Albee (1913.) koristio psa kao prvi animalni model spinalne fuzije, do današnjeg dana su u pretklinička istraživanja uključene i



Slika 1. Anatomska lokalizacija osteogenih implantata u modelu PLF u kunića.

druge životinjske vrste te su razvijeni i unaprijeđeni novi animalni modeli u cilju istraživanja spinalne fuzije. Odbir animalnog modela često predstavlja kompromis. S jedne strane su animalni modeli s boljom podudarnošću s ljudskom anatomijom, fiziologijom i biomehanikom, ali sa sobom nose druge poteškoće poput etičkih normi, visoke cijene izvedivosti i smještaja itd. (npr. primati) dok su s druge strane modeli koji imaju druge prednosti, poput lakše manipulacije i održavanja, niske cijene smještaja i hranjenja te, manjih etičkih problema (npr. glodavci). Kunić je kao pokusna životinja zadovoljio veliki broj navedenih uvjeta navedenog kompromisa i s vremenom je postao najučestalije primjenjivani animalni model korišten u pretkliničkim istraživanjima spinalne fuzije.

Trenutni PLF model kunića je uspostavio Boden i sur. (1995.) i od tada je PLF postala najčešće korištena tehnika na kuniću kao modelu za spinalnu kirurgiju (Schimandle i sur., 1995., Morone i Boden, 1998., Drespe i sur., 2005.). Model se može raditi na više razina, ali najčešće podrazumijeva indukciju fuzije u slabinskom dijelu kralježnice na razini L5-L6. Tehnika uključuje medijani kožni rez u području od L4 do L7 slabinskog kralješka. Nakon otvaranja kože, paramedijano se otvara fascija i tupo se ispreparira prostor između *m. multifidus* i *m. longissimus thoracis* kako bi se prikazali

poprečni nastavci kralježaka L5 i L6 te njihova intratransverzalna membrana. Prije ugradnje osteogenih materijala, dorzalne površine poprečnih nastavaka se dekorticiraju (ukloni se kortikalna kost i izloži koštana srž) kirurškom bušilicom. Osteogeni pripravci se zatim postavljaju između poprečnih nastavaka, paraspinalno (Slika 1), i rana se zašije po slojevima.

Dvije glavne odlike tog modela su: imitiranje humane PLF operativne tehnike te postotak nesrastanja kralježaka koji je vrlo sličan s učestalosti pojavljivanja u ljudi (Virk i sur., 2016.). Druge tehnike spinalne fuzije, poput anteriorne cervikalne, torakalne i lumbalne su opisane u kunića, ali samo sporadično (Taguchi, 1984., Lindholm i sur., 1988., Tho i Krishnamoorthy, 1996., Karaismailoglu i sur., 2002.).

Riordan i sur. (2013.) su objavili opsežnu meta-analizu o pouzdanosti Bodenovog modela PLF u kunića, analizirajući 56 publikacija u razdoblju od 1995. do 2011., koje uključuju 733 kunića. Stavljajući u korelaciju uspješnost fuzije i neke karakteristike kunića, donijeli su nekoliko zaključaka koji su bitni za uspješnu provedbu PLF modela u kunića: 1) uspješnost fuzije je veća u ženki nego u mužjaka, ali razlika nije statistički značajna, 2) nema statistički značajne razlike u uspješnosti fuzije kod kunića koji su naučili na ljudsku manipulaciju i u onih koji nisu naučili na manipulaciju, 3) pronađena je značajna razlika između mase životinje i uspješnosti spinalne fuzije u smislu da su životinje mase manje od 3 kg pokazivale manju uspješnost fuzije, 4) nema statistički značajne razlike u uspješnosti fuzije između soja New Zeland White i Japanese White i 5) iako nije bilo statistički značajne razlike između raznih starosnih skupina, preporuča se korištenje životinja starijih od 6 mjeseci.

Kao nadogradnju PLF modela u kunića, Grauer i sur. (2004.) su razvili

model spinalne pseudoartroze u kunića. Taj model je logičan nastavak PLF modela jer, kao što je ranije navedeno, postotak razvijanja pseudoartroze nakon spinalne fuzije je visok i adekvatan animalni model je bio potreban za istraživanje te česte komplikacije. Model pseudoartroze se temelji na dobro poznatom inhibitornom učinku nikotina na uspješnost spinalne fuzije (Silcox, 1995.). U tom modelu, životinje su podvrgnute standardnoj PLF tehnici (Boden i sur., 1995.), a u svrhu povećanja izgleda za razvojem pseudoartroze, potkožnom osmotskom pumpom se životinjama kontinuirano sistemski distribuirao nikotin.

Uporaba koštanih morfogenetskih proteina u modelu posterolateralne spinalne fuzije kunića

Kako bi neki materijal ili biološki spoj bio razmatran kao alternativa postojećim osteoinduktivnim materijalima, mora proći tzv. „proof of concept“ korak, u kojem se mora dokazati njegova osteoinduktivnost (Sandhu i Khan, 2002.). Nakon inicijalnog opisa osteoinduktivnosti BMP molekula, zbog kojeg su i otkriveni (Urist, 1965.), proveden je veliki broj istraživanja koja su potvrdila osteoinduktivnost koštanih morfogenetskih proteina, a posebno BMP2 i BMP7. Osim BMP2 i BMP7, posljednjih godina i je BMP6 postao predmet pretkliničkih i kliničkih istraživanja.

BMP2 je jedan od najranijih i najistraživanijih BMP molekula u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima (Jeong i sur., 2005.). Kao takav, predstavlja i najistraživaniji BMP u PLF modelu kunića. BMP7 je koštani morfogenetski protein s jakim osteoinduktivnim karakteristikama i njegov učinak na formiranje nove kosti je dokazan na mnogim animalnim modelima (Cook

i Rueger, 1996., Blokhuis i sur., 2002.). BMP7 je poznat i kao osteogeni protein-1 (OP-1) i dugo vremena, uz BMP2 je bio jedini BMP razvijen za komercijalnu uporabu (Tushar i sur., 2002.). Slično kao i rhBMP2, rhBMP7 je korišten u modelima spinalne fuzije u kunića, ali ipak ne toliko intenzivno.

BMP6 ima puno izraženiji osteogeni potencijal nego BMP2 i BMP7 (Grgurević i sur., 2007.), a možda najvažnija karakteristika BMP6 je otpornost na nogin, jedan od najbitnijih antagonista BMP-a (Song i sur., 2010.). Do sada, ne postoji publikacija koja opisuje uporabu rhBMP6 u modelu PLF kunića, na način da je egzogeni rhBMP6 ugrađen u na željeno mjesto fuzije putem nosača. U dvije, od ukupno tri relevantne publikacije vezane za uporabu rhBMP6 u PLF modelu kunića, BMP6 je dostavljen genskom terapijom (Laurent i sur., 2004., Sun i sur., 2005.) dok u trećoj publikaciji nije ugrađen sam rhBMP6 nego osteoprogenitorne stanice stimulirane s rhBMP6 (Valdes i sur., 2007.).

Kao dio istraživanja uporabe BMP-a u PLF modelu kunića, provedeni su pokusi učinkovitosti i sigurnosti, pokusi testiranja nosača te pokusi učinkovitosti BMP-a u modelima komplikacija spinalnih fuzija poput pseudoartroze, inhibitornog učinka doksorubicina ili infekcije sa *Staphylococcus aureus*. Dokazana osteoinduktivnost ne znači nužno da će istraživani materijal ili biološki spoj izazvati direktnu formaciju nove kosti potrebne za postizanje uspješne spinalne fuzije. Kao dokaz učinkovitosti i sigurnost, koriste se specifični modeli spinalne fuzije.

Prvu značajnu publikacija o uporabi rhBMP2 u PLF modelu u kunića proveli su Schimandle i sur. (1995.). U istraživanju je bilo uključeno 56 kunića koji su bili podvrgnuti PLF operativnom zahvatu u kojem je lokalno ugrađen rhBMP2 ili autograft u cilju potvrde učinkovitost rhBMP2 kao moguće zamjene za

autograft uz paralelno testiranje novih nosača za rhBMP2. Svi kunići kojima je ugrađen rhBMP2 postigli su stabilnu i solidnu fuziju, dok je u grupi s autograftom postotak uspješne fuzije bio oko 42%. Potvrđena je uloga kolagenog nosača za rhBMP2 u postizanju stabilne i uspješne fuzije.

Učinkovitost rhBMP2 u kolagenoj spužvici omotanoj oko kolagen-keramičke spužve u odnosu na kolagen-hidroksiapatit spužvu kombiniranu s hepariniziranom koštanom srži testirali su Kraiwattanapong i sur. (2005.). U pokusu su korištena 24 kunića podijeljena u dvije navedene grupe. Rezultati su pokazali da je rhBMP2 u kolagenoj spužvici kao nosaču omotan oko kolagen-keramičke spužve proizveo konzistentne fuzije dok se kolagen-hidroksiapatit spužva kombinirana s heparizirano koštanom srži pokazala neučinkovitom kao potencijalna alternativa graft materijalima.

Holliger i sur. (1996.) su koristili mikro-CT analizu u tumačenju biomehaničke superiornosti spinalne fuzije dobivene uporabom rhBMP2 nad onom dobivenom korištenjem samo autografta. Rezultati su pokazali da korištenje rhBMP2 rezultira većim volumenom novostvorene kosti, uz veću minimalnu kontaktnu površinu novostvorene kosti s poprečnim nastavcima uz već dobro uspostavljen proces koštane pregradnje što nije bio slučaj kod korištenja samo autografta kao graft materijala.

Jedan od prvih pokusa učinkovitosti i sigurnosti rhBMP7 u PLF modelu kunića napravili su Grauer i sur. (2001.). Kako bi usporedili učinkovitost rhBMP7 u odnosu na autograft, usporedili su tri grupe: 1) samo autograft, 2) samo nosač i 3) nosač + rhBMP7. Pet tjedana nakon operacije, grupa kojoj je ugrađen samo autograft pokazala je novostvoreno hrskavično vezivno tkivo, grupa s rhBMP7 novoformiranu kost dok grupa kojoj je ugrađen samo nosač nije dovela

do formiranja novog koštanog tkiva. rhBMP7 je tada procijenjen kao pogodna zamjena za autograft čija uporaba rezultira solidnom fuzijom poprečnih nastavaka u kunića nakon vremenskog perioda od 5 tjedana.

Jenis i sur. (2002.) testirali su primjenu rhBMP7 u posterolateralnoj spinalnoj fuziji kunića sa i bez instrumentacije kako bi potvrdili njenu značajnost u navedenom modelu. Rezultati su pokazali da prilikom korištenja rhBMP7 nastaje solidna fuzija, bez obzira jesu li segmenti kralježnice fiksirani instrumentacijom ili ne, a sama uporaba fiksacije tek neznatno potiče osteoinduktivni učinak rhBMP7 i to samo u ranoj fazi koštane formacije dok dugoročno fiksacija instrumentacijom ne čini nikakvu razliku.

Tushar i sur. (2002.) su objavili opsežno poglavlje o procjeni učinkovitosti rhBMP7 u modelu spinalne fuzije u kunića. Kao dio poglavlja, opisano je i istraživanje koje je uključivalo 10 kunića s hipotezom da rhBMP7 može biti uporabljen samostalno kao zamjena za autograft. Zaključili su da je kvaliteta fuzije postignuta samo s rhBMP7 bolja nego one kod korištenja samo autografta i da je postotak uspješnosti postizanja fuzije usporediv s ranije opisanim postotcima postignutim s rhBMP2. Nadalje, primijetili su da je novo koštano tkivo indicirano primjenom rhBMP7 pretežito remodelirajuća kost koja je zrelija nego ona inducirana autograftom, upućujući na to da se fuzija odvija brže i da prati sve elemente koštanog metabolizma prilikom korištenja rhBMP7 nego autografta.

Laurent i sur. (2004.) su istraživali mogućnost indukcije spinalne fuzije u kunića putem perkutane aplikacije adenovirusnog vektora koji nosi gen za kodiranje BMP6 (Ad-BMP6). U pokus je bilo uključeno 5 kunića. Kunićima je perkutano apliciran Ad-BMP6 s jedne strane i Ad- β -galaktozidaza

kontralateralno kako bi služila kao interna kontrola. Životinje su žrtvovane 14 tjedana nakon zahvata. Rezultati su pokazali da se anatomske precizna spinalna fuzija može postići perkutanom aplikacijom genske terapije.

Sun i sur. (2005.) su koristili svježi aspirat koštane srži transduciran s adenovirusnim vektorom za BMP2, BMP6 ili BMP9 kako bi ustanovili mogu li tim postupkom postići uspješnu i reproducibilnu fuziju. Nakon 4 tjedna, u svim grupama s virusnim vektorima koji ispoljavaju BMP molekule je postignuta solidna fuzija dok u kontrolnoj grupi nije bilo naznaka stvaranja nove kosti.

Uporaba rhBMP6 bez genske terapije je provedena u samo jednom istraživanju (Valdes i sur., 2007.). Oni su koristili osteoprogenitorne stanice stimulirane s rhBMP6 (rhBMP6 stOPC) kako bi unaprijedili postotak uspješnosti spinalne fuzije u kunića. Korištene rhBMP6 stOPC su dobili kultivacijom aspirata autologne koštane srži na izvanstaničnom matriksu koji sadrži rhBMP6, a koji je dobiven iz genetički modificiranih mišjih stanica C3H10T1/2. Pokusom je bilo obuhvaćeno 69 kunića podijeljenih u 5 grupa: grupama 1) i 2) je ugrađen autograft s 30M, odnosno 60M rhBMP6 stOPC u guanidin ekstrahiranom demineraliziranom koštanom matriksu (gDBM), grupi 3) samo autograft, grupi 4) samo gDBM, dok je grupi 5) rađena samo dekortikacija. Rezultati su pokazali znatno bolje postotke uspješne fuzije u grupama kojima je ugrađen rhBMP-6 stOPC nego u ostalim grupama što je dovelo do zaključka pozitivnog učinka korištenja rhBMP-6 stOPC u modelu spinalne fuzije u kunića i da je kultivacija osteoprogenitornih stanica dobivenih iz koštane srži na izvanstaničnom matriksu koji sadrži rhBMP6 moguća i izvediva. Naravno, takva procedura pripreme nije jednostavna te zahtijeva stanovito vrijeme izvedivosti.

Testiranje nosača

Koštani morfogenetski proteini trebaju za ostvarivanje svog učinka odgovarajući nosač kako bi se njihova osteogena svojstva ostvarila (Takaoka i sur., 1988.). Najčešće korišteni nosači se mogu smjestiti u četiri skupine: organski polimeri, neorganski materijali, sintetički biorazgradivi polimeri i kompozitni materijali (Haidar i sur., 2009.). Iako su testiranja provedena na velikom broju nosača, ne postoji jednoznačan odgovor koji bi nosač bio najprikladniji. Dapače, iako je po rezultatima nekih istraživanja inferiornija od drugih nosača (Kim i Valentini, 2002., Arosarena i Collins, 2005.), kolagena goveđa spužvica i dalje predstavlja jedan od najčešćih nosača za rhBMP molekule i odobreni je nosač za primjenu u ljudi (James i sur., 2016.). Kao dio istraživanja primjene BMP molekula u modelu PLF kunića, istraživana su svojstva mnogih nosača.

Kako bi usporedili učinkovitost dva različita nosača za rhBMP2, Minamide i sur. (2001.) su koristili 54 kunića podijeljenih u 5 grupa: 1) grupa kojoj je ugrađen samo autograft, 2) grupa kojoj je ugrađena samo sinterirana goveđa kost (True Bone Ceramics – TBC), 3) grupa kojoj je ugrađen TBC premazan kolagenom tipa I infiltriranim s rhBMP-2, 4) grupa kojoj je ugrađen samo kolagen tipa I i 5) grupa kojoj je ugrađen kolagen infiltriran s rhBMP-2. Rezultati su pokazali da je brzina i kvaliteta novonastale fuzije bila najbolja u skupini u kojoj je nosač bio TBC + rhBMP2.

Suh i sur. (2002.) su testirali dva meka materijala kao potencijalne nosače za rhBMP2. Jedna grupa je dobila 5:95 bifazični keramički fosfat impregniran s kolagenom spužvicom natopljenom s rhBMP2. Druga grupa je dobila 60:40 hidroksiapatit-trikalcij fosfat granule kao nosač rhBMP2. Grupa koja je koristila 5:95 bifazični keramički fosfat razvila je fuziju u svih životinja, a biomehanička

svojstva fuzije su bila bolja nego u grupe kojoj je ugrađen 60:40 hidroksiapatit-trikalcij fosfat.

Louis-Ugbo i sur. (2002.) su opisivali retencijsku kinetiku rhBMP2 dostavljenog putem bifazičnog kalcij fosfata (BCP) i kompozita koji sadrži apsorbirajuću kolagenu spužvicu (BCP/ACS). Kako bi odredili *in vivo* retenciju, rhBMP2 je obilježen radioaktivnim jodom (I^{125}). Korištenje navedenih nosača rezultiralo je detektabilnim razinama rhBMP2 na mjestu ugradnje i preko tjedan dana nakon ugradnje, ali razlika između srednjih vremena kod BCP (10,2 dana) i BCP/ACS (7,6 dana) nosača nije bila statistički značajna.

Minamide i sur. (2004.) su istraživali biomehaničku učinkovitost nosača za rhBMP2 u kunića. Uspoređivali su tri biomaterijala s različitom strukturom i biomehaničkim svojstvima: alfa-trikalcij fosfatni cement, TBC presvučen s kolagenom tipa I i kolagenu spužvicu. Zaključili su da su za postizanje brze i uspješne fuzije i alfa-trikalcij fosfatni cement i TBC premazan s kolagenom tipa I bolji nego korištenje same kolagene spužvice, koje su inače najčešći tip nosača.

Erickson i sur. (2008.) su istraživali sistemsku distribuciju i farmakokinetiku lokalno ugrađenog rhBMP7 u kolagenu kao nosaču. Srednje vrijeme zadržavanja (engl. *mean residence time*, MRT) za rhBMP7 je bilo 10,4 +/- 2,7 dana. Ti su rezultati vrlo slični s onima opisanima za rhBMP2 (Louis-Ugbo i sur., 2002.).

Yao i sur. (2008.) su istraživali učinkovitost netopive želatine (engl. *insoluble bone gelatin*, ISBG) kao nosača za rhBMP7 u modelu spinalne fuzije u kunića na 35 kunića. Životinje su, ovisno o ugrađenoj napravi, bile podijeljene u 4 grupe: 1) autograft, 2) samo ISBG, 3) rhBMP7 i 4) ISBG + rhBMP7. Grupa kojoj je ugrađen ISBG + rhBMP7 razvila je fuziju u 100% životinja, dok su ostale značajno manje: autograft (43 %), ISBG (25 %) i rhBMP-7 (29 %). ISBG je kao nosač

sposoban unaprijediti formiranje nove kosti inducirane uporabom rhBMP7.

Lee i sur. (2011.) su u svom istraživanju koristili dva različita nosača za rhBMP2 s ciljem utvrđivanja može li postupno otpuštanje rhBMP2 utjecati na kvalitetu fuzije. Kao nosač za postupno otpuštanje rhBMP2, koristili su heparin-konjugirane (engl. *poly-lactide-co-glycolide*, PLGA) nanočestice, a iste PLGA nanočestice uklopljene u fibrin koristili su kao kratko-otpuštajući nosač. Rezultatima su došli do zaključka da je korištenje postupno otpuštajućeg nosača dalo bolje rezultate nego korištenje brzo-otpuštajućeg nosača, ali u usporedbi s autolognim koštanim presatkom, korištenje postupno-otpuštajućeg nosača je rezultiralo fuzijom lošije kvalitete.

Koo i sur. (2012., 2013.) su istraživali učinkovitost heparin-konjugirani fibrin (engl. *heparin-conjugated fibrin*, HCF) sustava kao nosača koji bi postupno otpuštao rhBMP2 u spinalnim fuzijama. U prvoj studiji (Koo i sur., 2012.), 15 kunića je bilo podijeljeno u tri grupe. Prvoj skupini je ugrađena samo kolagena spužvica, drugoj skupini kolagena spužvica (brzo otpuštajući nosač) + 50 µg rhBMP2 dok je trećoj skupini ugrađen HCF (postupno otpuštanje) s 50 µg rhBMP2. Postotak i kvaliteta postignute fuzije su bili značajno veći u skupini sa sporo otpuštajućim HCF nosačem nego u prve dvije grupe. Korištenje HCF nosača i sporo otpuštanje rhBMP2 može pridonijeti kvaliteti spinalne fuzije.

U drugoj studiji (Koo i sur., 2013.) korištene su male količine rhBMP2. Petnaest kunića je bilo podijeljeno u tri grupe. Prvoj skupini je ugrađena samo kolagena spužvica, drugoj skupini kolagena spužvica + 10 µg rhBMP2 dok je trećoj skupini ugrađen HCF s 10 µg rhBMP2. Rezultati su bili drugačiji nego u prethodnoj studiji. Dok u prvoj i trećoj skupini nije postignuta niti jedna uspješna fuzija, u drugoj skupini su sve životinje razvile solidnu fuziju. Zaključak je bio da

HCF sustav postupnog otpuštanja nije učinkovit s malim dozama rhBMP2 u modelu spinalne fuzije u kunića.

S ciljem pojednostavljivanja postupka aplikacije rhBMP2, Shiels i sur. (2017.) su testirali na kompresiju otporni, polimer/keramički kompozitni nosač niske viskoznosti (LV) koji se može injicirati lokalno na mjesto primjene u modelu spinalne fuzije kunića. U toj pilot studiji korištene su 3 životinje po skupini. U jednoj skupini LV nosač je nadograđen s hidrolitički razgradivim bioaktivnim staklom (BG) dok je u drugoj skupini nadograđen sa stanično-razgradivim 85 % β -trikalcij fosfatom/15 % hidroksiapatitom (CM). Rezultati su pokazali da je LV kao nosač otpustio 55 % rhBMP2 kroz period od 2 tjedna. Solidne fuzije su postignute u svih životinja obje grupe.

Model pseudoartroze

Kako je pseudoartroza najčešća komplikacija posterolateralne spinalne fuzije, koja prilikom korištenja autografa doseže prevalenciju do 30 %, dio istraživanja je bio usmjeren i na testiranje učinkovitost BMP molekula u prevladavanju inhibitornih učinaka nikotina na uspješnost spinalne fuzije, ali i na učinkovitost BMP molekula u revizijskim operacijama.

Patel i sur. (2001.) su testirali djelotvornost rhBMP7 na inhibitorni učinak nikotina u modelu spinalne fuzije. Spinalna fuzija je napravljena na 18 kunića podijeljenih u dvije grupe kojima je ugrađen autograft, odnosno rhBMP7. Sve su životinje bile izložene sistemskoj primjeni nikotina. Nakon 5 tjedana, rezultati su pokazali da je u skupini kojoj je ugrađen samo autograft 25 % kunića razvilo solidnu fuziju, dok je u skupini s rhBMP7 spinalnu fuziju bila potpuna u svih životinja. Time je potvrđen inhibitorni učinak rhBMP7 na djelovanje nikotina u modelu spinalne fuzije u kunića.

Grauer i sur. (2004.) su također koristili ranije opisani model pseudoartroze kako bi istražili sposobnost rhBMP7 reduciranja njezine pojavnosti prouzročenu nikotinom. Pet tjedana nakon zahvata, 94 % kunića je razvilo pseudoartrozu nakon čega su svi bili ponovo dekortikirani i zatim podijeljeni po grupama: 1) kontrolna grupa, 2) autograft i 3) rhBMP7. Nakon 10 tjedana, u kontrolnoj grupi, izloženoj samo ponovnoj dekortikaciji, 10 % pseudoartroza je razvila fuziju. U skupini kojoj je nakon ponovne dekortikacije ugrađen autograft, 42 % pseudoartroza je razvilo fuziju, a u skupini kojoj je nakon ponovne dekortikacije ugrađen rhBMP7, 75 % pseudoartroza je razvilo solidnu fuziju. Rezultati su pokazali djelotvornost rhBMP7 da u revizijskim operacijama inducira stvaranje solidne fuzije.

Sličan učinak testiran je i uporabom rhBMP2 (Lawrence i sur., 2007.). Studijom su bila obuhvaćena 72 kunića koji su podvrgnuti posterolateralnoj spinalnoj fuziji i kojima je ugrađen autologni koštani presadak. Nakon 5 tjedana, revizijske operacije su napravljene, a životinje su podijeljene u četiri grupe: 1) kontrola, 2) autograft, 3) rhBMP2 s kolagenskom spužvicom kao nosačem i 4) rhBMP2 s matriksom otpornim na pritisak. Rezultati su pokazali da je korištenje rhBMP2 u obje grupe dovelo do značajno većeg postotka potpunog srašavanja nego u grupama kojima nije ugrađen rhBMP2.

Opisana su i druga stanja koja mogu imati inhibitorni učinak na spinalnu fuziju, kao npr. korištenje citotoksičnog lijeka doksorubicina ili pak infekcija sa *Staphylococcus aureus*, manji broj istraživača se posvetio i istraživanju učinkovitosti BMP molekula u tim okolnostima.

Singh i sur. (2007.) su u svojoj studiji istražili utjecaj rhBMP2 na sprječavanje inhibitornog učinka doksorubicina u modelu spinalne fuzije u kunića. Sve

životinje su bile podvrgnute zahvatu spinalne fuzije i sve su bile tretirane doksorubicinom, a zatim su podijeljene u dvije grupe gdje je jednoj skupini revizijska operacija rađena uz ugradnju samo alografta dok je drugoj skupini ugrađivan rhBMP2. Zaključak studije je da doksorubicin smanjuje postotak uspješne spinalne fuzije za 25%, dok se uporabom rhBMP2 u revizijskim zahvatima u potpunosti nadvladava taj inhibitorni učinak i postotak uspješnih fuzija je 100%.

Miller i sur. (2009.) su procjenjivali sigurnost i učinkovitost rhBMP2 i autografa u modelu posterolateralne spinalne fuzije u kunića uz aplikaciju *Staphylococcus aureus* ili sterilne fiziološke otopine. U sterilnim fuzijama 4/5 autoloških koštanih presađaka i 13/13 životinja kojima je ugrađen rhBMP2 je stvorilo solidnu fuziju. U inficiranim fuzijama niti jedna od 12 životinja kojima je ugrađen samo koštani autološki presađak nije razvila solidnu fuziju, dok je 3/12 životinja s ugrađenim rhBMP2 stvorilo solidnu fuziju. Prijavljeno je i ugibanje 4 kunića u grupi kojoj je ugrađen autograf dok u grupi kojoj je ugrađen rhBMP2 nije uginula niti jedna životinja. Iako dobiveni rezultati nisu statistički značajni, autori su zaključili da je trend podataka blizu značajnome i da rezultati pokazuju da se rhBMP2 može koristiti u kontaminiranoj okolini.

Zaključna razmatranja

Uporaba koštanih morfogenetskih proteina u PLF modelu kunića u pravilu rezultira boljim osobinama i višim postotcima uspješnih fuzija u odnosu na uporabu samo autografa. Međutim, rezultati kliničkih ispitivanja pokazali su i neke nedostatke korištenja BMP2 i BMP7. Prijavljene su mnoge nuspojave, a većina od njih su pripisane korištenju velikih doza BMP molekula te reakcijama na komercijalne neautologne nosače. Unatoč

tome, BMP2 i BMP7 imaju izuzetna osteoinduktivna svojstva i zasigurno će još dugo vremena imati važnu ulogu u kirurškom liječenju fraktura, poticanju stvaranja nove kosti i u tehnikama spinalne fuzije. Početak korištenja BMP6, koji zbog svoje otpornosti na antagoniste omogućuje postizanje istih rezultata kao BMP2 i BMP7, ali uz primjenu manjih doza, predstavlja jedan od mogućih načina unaprijeđenja korištenja koštanih morfogenetskih proteina. Osim odabira BMP6, razmatranje korištenja autološkog nosača koji neće izazivati upalne i imunološke reakcije moglo bi pridonijeti povećanju uspješnosti spinalnih fuzija (Vukičević i sur., 2012., 2014.).

Literatura

1. AGARWAL, R., K. WILLIAMS, C. A. UMSCHIED and W. C. WELCH (2009): Osteoinductive bone graft substitutes for lumbar fusion: a systematic review Clinical article. J. Neurosurg. Spine 11, 729-740.
2. ALBEE, F. (1913): An experimental study of bone growth and the spinal bone transplant. JAMA 60, 1044.
3. ALEXANDER, S. P., H. E. BENSON, E. FACCENDA, A. J. PAWSON, J. L. SHARMAN, M. SPEDDING, J. A. PETERS, and A. J. HARMAR (2013): The Concise Guide to Pharmacology 2013/14: catalytic receptors. Br. J. Pharmacol. 170, 1676-1705.
4. AROSARENA, O. A. and W. L. COLLINS (2005): Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. Otolaryngol. Head Neck Surg. 132, 592-597.
5. BAE, H. W., S. S. RAJAEI and L. E. KANIM (2013): Nationwide trends in the surgical management of lumbar spinal stenosis. Spine (Phila Pa 1976) 38, 916-926.
6. BANWART, J. C., M. A. ASHER and R. S. HASSANEIN (1995): Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. Spine (Phila Pa 1976) 20, 1055-1060.
7. BLOKHUIS, T. J., P. PATKA, H. TH. M. HAARMAN and L. R. GILTAIP (2002): Osteogenic protein-1 (OP-1 r BMP-7) for stimulation of healing of closed fractures: evidence based medicine and pre-clinical experience. In: Vukičević, S., K. T. Sampath: Bone Morphogenetic Proteins From Laboratory to Clinical Practice. Springer Basel AG (145-155).
8. BODEN, S. D., J. H. SCHIMANDL and W. C. HUTTON (1995): The use of an osteoinductive

- growth factor for lumbar spinal fusion. Part II: study of dose, carrier, and species. *Spine* 20, 2633-2644.
9. BOROVIČKI, F., P. SIMIĆ, L. GRGUREVIĆ and S. VUKIČEVIĆ (2004): The role of bone morphogenic proteins in developing and adult kidney. In: S. Vukičević, K. T. Sampath: *Bone Morphogenetic Proteins: Regeneration of Bone and Beyond*. Birkhauser Verlag, Basel-Boston-Berlin (213-245).
 10. CELESTE, A. J., J. A. IANNAZZI, R. C. TAYLOR, R. M. HEWICK, V. ROSEN, E. A. WANG and J. M. WOZNEY (1990): Identification of transforming growth factor b family members present in boneinductive protein purified from bovine bone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 9843-9847.
 11. CHANDLER, F. A. (1929): Spinal fusion operations in the treatment of low back and sciatic pain. *JAMA* 93, 1447.
 12. COOK, S. D. and D. C. RUEGER (1996): Osteogenic protein-1: biology and applications. *Clin. Orthop.* 324, 29-38.
 13. DEYO, R. A., S. K. MIRZA, B. I. MARTIN, W. KREUTER, D. C. GOODMAN and J. G. JARVIK (2010): Trends, major medical complications, and charges associated with surgery for lumbar spinal stenosis in older adults. *JAMA* 303, 1259-1265.
 14. DONELSON, R., G. McINTOSH and H. HALL (2012): Is it time to rethink the typical course of low back pain? *PM R* 4, 394-401.
 15. DRESPE, I. H., G. K. POLZHOFFER, A. S. TURNER and J. N. GRAUER (2005): Animal models for spinal fusion. *Spine J* 5, 209-216.
 16. DUCY, P. and G. KARSENTY (2000): The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int.* 57, 2207-2214.
 17. EINHORN, T. A. and L. C. GERSTENFELD (2014): Fracture healing: mechanisms and interventions *Nat. Rev. Rheumatol.* 11, 45-54.
 18. ERICKSON, B. P., A. R. PIERCE, A. K. SIMPSON, J. NASH and J. N. GRAUER (2008): 125I-labeled OP-1 is locally retained in a rabbit lumbar fusion model. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 466, 210-215.
 19. FARRAR, J. T., J. P. YOUNG, L. LAMOREAUX, J. L. WERTH and R. M. POOLE (2001): Clinical importance of changes in chronic pain intensity measured on an 11 point numerical pain rating scale. *Pain* 94, 149-158.
 20. FERNYHOUGH, J. C., J. J. SCHIMANDLE, M. C. WEIGEL, C. C. EDWARDS and A. M. LEVINE (1992): Chronic donor site pain complicating bone graft harvesting from the posterior iliac crest for spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976)* 17, 1474-1480.
 21. GRAUER, J. N., T. PATEL, J. ERULKAR, N. TROIANO, M. PANJABI and G. FRIEDLAENDER (2001): Evaluation of OP-1 as a graft substitute for intertransverse process lumbar fusion. *Spine (Phila Pa.)* 26, 127-133.
 22. GRAUER, J. N., A. R. VACCARO, M. KATO, B. K. KWON, J. M. BEINER, T. C. PATEL, A. S. HILIBRAND, K. CHIBA and T. J. ALBERT (2004): Development of a New Zealand white rabbit model of spinal pseudarthrosis repair and evaluation of the potential role of OP-1 to overcome pseudarthrosis. *Spine (Phila Pa 1976)* 29, 1405-1412.
 23. GREGURIĆ GRACNER, G., N. LONČARIĆ, J. BUBIĆ ŠPOLJAR, A. DOVČ, K. FUŠ, D. GRACNER and Ž. PAVIČIĆ (2019): 3R Principle for the welfare protection of animals used for scientific purposes - yesterday, today, tomorrow. *Vet. stn.* 50, 63-73. (In Croatian).
 24. GRGUREVIĆ, L., B. MAČEK, I. ERJAVEC, M. MANN and S. VUKIČEVIĆ (2007): Urine release of systemically administered bone morphogenetic protein hybrid molecule. *J. Nephrol.* 20, 311-319.
 25. GUPTA, A., N. KUKKAR, K. SHARIF, B. J. MAIN, C. E. ALBERS and S. F. EL-AMIN (2015): Bone graft substitutes for spine fusion: A brief review. *World J. Orthop.* 6, 449-456.
 26. HAIDAR, Z. S., R. C. HAMDY and M. TABRIZIAN (2009): Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part B: delivery systems for BMPs in orthopaedic and craniofacial tissue engineering. *Biotechnol. Lett.* 31, 1825-1835.
 27. HARTVIGSEN, J., M. J. HANCOCK, A. KONGSTED, Q. LOUW, M. L. FERREIRA, S. GENEVAY and A. WOOLF (2018): What low back pain is and why we need to pay attention. *Lancet* 391, 2356-2367.
 28. HOLLIGER, E. H., R. H. TRAWICK, S. D. BODEN and W. C. HUTTON (1996): Morphology of the lumbar intertransverse process fusion mass in the rabbit model: a comparison between two bone graft materials--rhBMP-2 and autograft. *J. Spinal. Disord.* 9, 125-128.
 29. JAMES, A. W., G. LACHAUD, J. SHEN, G. ASATRIAN, V. NGUYEN, B. XINLI ZHANG, K. TING and C. SOO (2016): A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng. Part B Rev.* 22, 284-297.
 30. JENIS, L. G., D. WHEELER, S. J. PARAZIN and R. J. CONNOLLY (2002): The effect of osteogenic protein-1 in instrumented and noninstrumented posterolateral fusion in rabbits. *Spine J* 2, 173-178.
 31. JEONG, J. K., H. S. SANDHU and J. FARMER (2005): Bone Morphogenic Proteins: Applications in Spinal Surgery. *HSSJ* 1, 110-117.
 32. KARAISSMAILOGLU, T. N., Y. TOMAK and A. ANDAC (2002): Comparison of autograft, coralline graft, and xenograft in promoting posterior spinal fusion. *Acta Orthop. Traumatol. Turc.* 36, 147-154.
 33. KATAGIRI, T. and T. WATABE (2016): Bone Morphogenetic Proteins *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 8 (6):a021899.
 34. KIM, H. D. and R. F. VALENTINI (2002): Retention and activity of BMP-2 in hyaluronic acid-based scaffolds in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* 59, 573-584.

35. KOO, K. H., D. H. YEO, J. M. AHN, B. S. KIM, C. S. KIM and G. I. IM (2012): Lumbar posterolateral fusion using heparin-conjugated fibrin for sustained delivery of bone morphogenetic protein-2 in a rabbit model. *Artif. Organs* 36, 629-634.
36. KOO, K. H., J. M. LEE, J. M. AHN, B. S. KIM, W. G. LA, C. S. KIM and G. I. IM (2013): Controlled delivery of low-dose bone morphogenetic protein-2 using heparin-conjugated fibrin in the posterolateral lumbar fusion of rabbits. *Artif. Organs* 37, 487-494.
37. KRAIWATTANAPONG, C., S. D. BODEN, J. LOUIS-UGBO, E. ATTALLAH, B. BARNES and W. C. HUTTON (2005): Comparison of Healos/bone marrow to INFUSE(rhBMP-2/ACS) with a collagen-ceramic sponge bulking agent as graft substitutes for lumbar spine fusion. *Spine* 30, 1001-1007.
38. LAURENT, J. J., K. M. WEBB, E. J. BERES, K. MCGEE, J. LI, B. VAN RIETBERGEN and G. A. HELM (2004): The use of bone morphogenetic protein-6 gene therapy for percutaneous spinal fusion in rabbits. *J. Neurosurg.* Spine 1, 90-94.
39. LAWRENCE, J. P., W. WAKED, T. J. GILLON, A. P. WHITE, C. R. SPOCK, D. BISWAS, P. ROSENBERGER, N. TROIANO, T. J. ALBERT and J. N. GRAUER (2007): rhBMP-2 (ACS and CRM formulations) overcomes pseudarthrosis in a New Zealand white rabbit posterolateral fusion model. *Spine (Phila Pa 1976)* 32, 1206-1213.
40. LEE, J. W., S. LEE, S. H. LEE, H. S. YANG, G. IM, C. S. KIM, J. H. PARK and B. S. KIM (2011): Improved spinal fusion efficacy by long-term delivery of bone morphogenetic protein-2 in a rabbit model. *Acta Orthop.* 82, 756-760.
41. LINDHOLM, T. S., P. RAGNI and T. C. LINDHOLM (1988): Response of bone marrow stroma cells to demineralized cortical bone matrix in experimental spinal fusion in rabbits. *Clin. Orthop.* 230, 296-302.
42. LOUIS-UGBO, J., H. S. KIM, S. D. BODEN, M. T MAYR, R. C. LI, H. SEEHERMAN, D. D'AUGUSTA, C. BLAKE, A. JIAO and S. PECKHAM (2002): Retention of 125I-labeled recombinant human bone morphogenetic protein-2 by biphasic calcium phosphate or a composite sponge in a rabbit posterolateral spine arthrodesis model. *J. Orthop. Res.* 20, 1050-1059.
43. MILLER, C. P., A. K. SIMPSON, P. G. WHANG, B. P. ERICKSON, W. R. WAKED, J. P. LAWRENCE and J. N. GRAUER (2009): Effects of recombinant human bone morphogenetic protein 2 on surgical infections in a rabbit posterolateral lumbar fusion model. *Am. J. Orthop.* 38, 578-584.
44. MINAMIDE, A., M. KAWAKAMI, H. HASHIZUME, R. SAKATA and T. TAMAKI (2001): Evaluation of carriers of bone morphogenetic protein for spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976)* 26, 933-939.
45. MINAMIDE, A., M. KAWAKAMI, H. HASHIZUME, R. SAKATA, M. YOSHIDA and T. TAMAKI (2004): Experimental study of carriers of bone morphogenetic protein used for spinal fusion. *J. Orthop. Sci.* 9, 142-151.
46. MORONE, M. A. and S. D. BODEN (1998): Experimental posterolateral lumbar spinal fusion with a demineralized bone matrix gel. *Spine* 23, 159-167.
47. PATEL, T. C., J. S. ERULKAR, J. N. GRAUER, N. W. TROIANO, M. M. PANJABI and G. E. FRIEDLAENDER (2001): Osteogenic protein-1 overcomes the inhibitory effect of nicotine on posterolateral lumbar fusion. *Spine (Phila Pa 1976)* 26, 1656-1661.
48. RESNICK, D. K., T. F. CHOUDHRI, A. T. DAILEY, M. W. GROFF, L. KHOO and P. G. MATZ (2005): Guidelines for the performance of fusion procedures for degenerative disease of the lumbar spine. Part 16: bone graft extenders and substitutes. *J. Neurosurg.* Spine 2, 733-736.
49. RESNICK, D. K. (2007): Evidence-based spine surgery. *Spine (Phila Pa 1976)* 32, S15-19.
50. RILEY, E. H., J. M. LANE and M. R. URIST (1996): Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin. Orthop.* 324, 39-46.
51. RIORDAN, A. M., R. RANGARAJAN, J. W. BALTS, W. K. HSU and P. A. ANDERSON (2013): Reliability of the rabbit postero-lateral spinal fusion model: A meta-analysis. *J. Orthop. Res.* 31, 1261-1269.
52. SAMPATH, T. K., J. C. MALIAKAL, P. V. HAUSCHKA, W. K. JONES, H. SASAK, R. F. TUCKER, K. H. WHITE, J. E. COUGHLIN and M. M. TUCKER (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. *J. Biol. Chem.* 267, 20352-20362.
53. SANDHU, H. S. and S. N. KHAN (2002): Animal Models for Preclinical Assessment of Bone Morphogenetic Proteins in the Spine. *Spine* 27, 32-38.
54. SCHIMANDLE, J. H., S. D. BODEN and W. C. HUTTON (1995): Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Spine Res.* 20, 1326-1337.
55. SHIELS, S. M., A. D. TALLEY, M. A. P. McGOUGH, K. J. ZIENKIEWICZ, K. KALPAKCI, D. SHIMKO, S. A. GUELCHER and J. C. WENKE (2017): Injectable and compression-resistant lowviscosity polymer/ceramic composite carriers for rhBMP-2 in a rabbit model of posterolateral fusion: a pilot study. *J. Orthop. Surg.* Res. 12, 107.
56. SILCOX, O. H., T. OAFIARI, S. D. BODEN, J. H. SCHIMANDLE, W. C. HUTTON, and T. E. WHITESIDES (1995): The effect of nicotine on spinal fusions. *Spine* 20, 1549-1553.
57. SINGH, K., J. D. SMUCKER, J. L-UGBO, P. J. TORTOLANI, L. TSAI, Q. FEI, S. KUH,

- M. RUMI, J. G. HELLER, S. D. BODEN and S. T. YOON (2007): rhBMP-2 enhancement of posterolateral spinal fusion in a rabbit model in the presence of concurrently administered doxorubicin. *Spine* 7, 326-331.
58. SONG, K., C. KRAUSE, S. SHI, M. PATTERSON, R. SUTO, L. GRGUREVIC, S. VUKICEVIC, M. VAN DINTHER, D. FALB, P. DIJKE and M. HICHAM ALAOU-ISMALI (2010): 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.* 285, 12169-12180.
59. SUBACH, B. R., R. W. HAID, G. E. RODTS and M. G. KAISER (2001): Bone morphogenetic protein in spinal fusion: overview and clinical update *Neurosurg. Focus* 10(4):A3.
60. SUH, D. Y., S. D. BODEN, J. LOUIS-UGBO, M. MAYR, H. MURAKAMI, H. S. KIM, A. MINAMIDE and W. C. HUTTON (2002): Delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 using a compression-resistant matrix in posterolateral spine fusion in the rabbit and in the non-human primate. *Spine (Phila Pa 1976)* 27, 353-360.
61. SUN, H. M., F. PHILLIPS, Q. KANG, G. S. STACY, P. STURM, A. TODD, P. BOLT, P. GUPTA, R. C. HAYDON and H. E. TONG-CHUAN (2005): Spinal fusion using bone marrow aspirate transduced with recombinant adenoviral vectors expressing BMP-2, BMP-6 and BMP-9. 51st Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society.
62. TAGUCHI, T. (1984): Experimental anterior interbody fusion of the cervical spine. Comparative study between autograft and Al₂O₃ ceramic implantation. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 58, 205-217.
63. TAKAOKA, K., H. NAKAHARA and H. YOSHIKAWA (1988): Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin. Orthop.* 234, 250-254.
64. THO, K. S. and S. KRISHNAMOORTHY (1996): Use of coral grafts in anterior interbody fusion of the rabbit spine. *Ann. Acad. Med. Singapore* 25, 824-827.
65. TUSHAR, CH. P., J. N. GRAUER and J. S. ERULKAR (2002): Evaluation of OP-1 in a rabbit model of lumbar fusions. In: *Bone Morphogenetic Proteins From Laboratory to Clinical Practice* (S. Vukicevic, K. T. Sampath, eds.) Springer Basel AG, pp. 207-222.
66. URIST, M. R. (1965): Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893-899.
67. VALDES, M., D. C. MOORE, M. PALUMBO, P. R. LUCAS, A. ROBERTSON, J. APPEL, M. G. EHRLICH and H. S. KEEPING (2007): rhBMP-6 stimulated osteoprogenitor cells enhance posterolateral spinal fusion in the New Zealand white rabbit. *Spine* 7, 318-325.
68. VIRK, S. S., D. COBLE, A. L. BERTONE, H. H. HUSSEIN and S. N. KHAN (2016): Experimental Design and Surgical Approach to Create a Spinal Fusion Model in a New Zealand White Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Invest. Surg.* 30, 226-234.
69. VUKIČEVIĆ, S., L. GRGUREVIĆ and H. OPPERMANN (2012): Whole blood derived coagulum device for treating bone defects. *US* 8197840.
70. VUKIČEVIĆ, S., H. OPPERMANN, D. VERBANAC, M. JANKOLIJA, I. POPEK, J. CURAK, J. BRKLJAČIĆ, M. PAUK, I. ERJAVEC, I. FRANCETIĆ, I. DUMIĆ-ČULE, M. JELIĆ, D. DURDEVIĆ, T. VLAHOVIĆ, R. NOVAK, V. KUFNER, T. BORDUKALO NIKŠIĆ, M. KOZLOVIĆ, Z. BANIĆ TOMIŠIĆ, J. BUBIĆ-ŠPOLJAR, I. BAŠTALIĆ, S. VIKIĆ-TOPIĆ, M. PERIĆ, M. PEĆINA and L. GRGUREVIĆ (2014): The clinical use of bone morphogenetic proteins revisited: a novel biocompatible carrier device OSTEOGROW for bone healing. *Int. Orthop.* 38, 635-647.
71. WANG, E. A., V. ROSEN, P. CORDES, R. M. HEWICK, M. J. KRIZ, D. P. LUXENBERG, B. S. SIBLEY and J. M. WOZNEY (1988): Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 9484-9488.
72. WOLFMAN, N. M., G. HATTERSLEY, K. COX, A. J. CELESTE, R. NELSON, N. YAMAJI, J. L. DUBE, E. DIBLASIO-SMITH, J. NOVE and J. J. SONG (1997): Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF- β gene family. *J. Clin. Invest.* 100, 321-330.
73. WOZNEY, J. M., V. ROSEN, A. J. CELESTE, L. M. MITSOCK, M. J. WHITTERS, R. W. KRIZ, R. M. HEWICK and E. A. WANG (1988): Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 242, 1528-1534.
74. XIAO, Y. T., L. X. XIANG and J. Z. SHAO (2007): Bone morphogenetic protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 550-553.
75. YAO, G., Y. QIAN, J. CHEN, Y. FAN, K. STOFFEL, F. YAO, J. XU and M. H. ZHENG (2008): Evaluation of insoluble bone gelatin as a carrier for enhancement of osteogenic protein-1-induced intertransverse process lumbar fusion in a rabbit model. *Spine (Phila Pa 1976)* 33, 1935-1942.
76. YOUNGER, E. M. and M. W. CHAPMAN (1989): Morbidity at bone graft donor sites. *J. Orthop. Trauma* 3, 192-195.

Bone morphogenetic proteins in a rabbit posterolateral spinal fusion model: an overview

Vladimir FARKAŠ, DVM, PhD, Assistant, Institute Ruđer Bošković, Zagreb, Croatia; Lovorka GRGUREVIĆ, DM, PhD, Associate Professor, School of Medicine University of Zagreb, Zagreb, Croatia

Lower back pain is an important public health issue worldwide. In recent decades, interventional spine procedures, including spinal fusion surgeries have become common lower back pain therapy, with a 40% increase in the number of spinal fusions performed between 1998 and 2004. Spinal fusion is the surgical technique of joining two vertebrae so that they heal into a single, solid bone. This is done to prevent movement and occurrence of the pain. In order to achieve solid spinal fusion, various osteoinductive materials that stimulate the formation of the new bone are used in the spinal fusion procedure. Autograft is the most preferred osteoinductive material for spine fusion surgeries. However, the use of autografts is often associated with certain limitations and morbidity. Despite all efforts to improve the spinal fusion technique, the reported non-union rate remains high. All these shortcomings of the standard techniques have urged the development of alternative materials and/or supplements for bone grafting, to enhance new bone formation

and facilitate more rapid and robust fusion, with lower morbidity and higher success. Recent efforts in the field have been focused on bone morphogenetic proteins (BMP). Of all the bone morphogenetic proteins, BMP2 and BMP7 are most commonly used in animal models of spinal fusion. Both BMP2 and BMP7 have strong osteoinductive properties and their effect on the formation of new bone has been proven in many animal models. In recent years, pre-clinical and clinical trials have also begun for the use of BMP6. As part of enhancing the potential of bone morphogenetic proteins as an alternative for bone grafting, many studies have been carried out involving a "proof of concept" step, feasibility and efficacy trials, testing of various BMP carriers, and complication experiments. This paper provides an overview of the current use of bone morphogenetic proteins in a rabbit model of posterolateral spinal fusion.

Key words: *bone morphogenic proteins; posterolateral spinal fusion; rabbit; animal model*