

AKTYWNOŚĆ MAKROFAGÓW I ZMIANY DYSTRYBUCJI I KONCENTRACJI BIAŁEK MORFOGENETYCZNYCH KOŚCI (BMP-4) ORAZ KOLAGENU TYPU II W SĄSIEDZTWIE WSZCZEPÓW BIOAKTYWNEGO SZKŁA SZ2. DONIESIENIE WSTĘPNE.

NIEDZIELSKI K.*, KOKTYSZ R.**, BANDURKA W.***,
WOŹNIAK J.****, ŁĄCZKA M.*****,
CHOLEWA KOWALSKA K.*****, MENASZEK E.*****

*KLINIKA ORTOPEDII I TRAUMATOLOGII INSTYTUTU „CZMP” W
ŁODZI,

*ZAKŁAD ORTOPEDII I TRAUMATOLOGII DZIECĘCEJ,
UNIwersytet Medyczny w Łodzi

**ZAKŁAD PATOMORFOLOGII CSK MON WIM W WARSZAWIE

***ODDZIAŁ ORTOPEDII NZOZ „MEDAB” ŁÓDŹ

****ODDZIAŁ ORTOPEDII SZPITALA MIEJSKIEGO IM. JONSCHERA W
ŁODZI

*****KATEDRA TECHNOLOGII SZKŁA I POWŁOK AMORFICZNYCH
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA W KRAKOWIE

*****ZAKŁAD CYTOBIOLOGII I HISTOCHEMII,

COLLEGIUM MEDICUM UJ W KRAKOWIE

[*Inżynieria Biomateriałów*, 58-60,(2006),227-230]

Wstęp

W ostatnich latach dowiedziano, że procesy proliferacji i ewentualnie przebudowy kostnej w miejscach uszkodzenia kości i/lub w sąsiedztwie wszczepów lub przeszczepów zależą od bardzo licznych czynników regulacyjnych, wśród których najważniejszymi są [1, 2, 3, 4] cytokiny i czynniki wzrostu (fibroblastyczne - FGF, płytkowe - PDGF, insulinopodobne - IGF, transformujące - TGF α , TGF β oraz modelujące kość - BMP). Białka te wydzielane są nie tylko przez osteocyty, osteoblasty, komórki chrząstki i fibrocyty, ale także przez krążące komórki takie jak limfocyty i granulocyty oraz znajdujące się w proliferujących tkankach makrofagi. Istnieje wiele dowodów na to, że prawidłowe gojenie się kości zależy od ścisłego współdziałania komórek wchodzących w skład kości oraz komórek odpowiadzi zapalnej, w której pośredniczą interleukiny, cytokiny, metaloproteinazy oraz liczne proteiny i enzymy wewnątrz i zewnątrzkomórkowe.

Białka BMP jak dotychczas są jedynymi, które wykazują zdolność indukowania kostnienia chrzęstnego *in vivo*. Wysokie stężenia TGF zwiększają wprawdzie włóknienie i syntezę kolagenu (szczególnie kolagenu typu II) w miejscu uszkodzenia, ale nie wpływają na tworzenie się tkanki kostnej *de novo*, zdolność tę posiadają jedynie rekombinowane formy BMP2 i BMP4 [5]. W miejscach tworzenia się kości obserwuje się zwiększoną obecność obu tych białek na powierzchni komórek osteoblastycznych [6].

Celem podjętych badań jest ocena i porównanie zmian składu komórkowego granicy pomiędzy wszczepionym materiałem bioaktywnym Sz2 i wszczepionymi ziarnami nieaktywnej biologicznie krzemionki a otaczającą tkanką oraz wpływu tych zmian na procesy wypełniania ubytków tkanką kostną.

Materiał i metodyka

Biceramika Sz2 oraz krzemionka SiO₂ były wyproduk-

THE ACTIVITY OF MACROPHAGES, AND BONE MORPHOGENETIC PROTEINS (BMP-4) AND COLLAGEN TYPE II CHANGES OF DISTRIBUTION AND CONCENTRATION IN NEIGHBOURHOOD OF BIOACTIVE SZ2 GLASS IMPLANTS. PRELIMINARY STUDIES

NIEDZIELSKI K.*, KOKTYSZ R.**, BANDURKA W.***,
WOŹNIAK J.****, ŁĄCZKA M.*****,
CHOLEWA KOWALSKA K.*****, MENASZEK E.*****

*KLINIKA ORTOPEDII I TRAUMATOLOGII INSTYTUTU „CZMP” W
ŁODZI,

*ZAKŁAD ORTOPEDII I TRAUMATOLOGII DZIECĘCEJ,
UNIwersytet Medyczny w Łodzi

**ZAKŁAD PATOMORFOLOGII CSK MON WIM W WARSZAWIE

***ODDZIAŁ ORTOPEDII NZOZ „MEDAB” ŁÓDŹ

****ODDZIAŁ ORTOPEDII SZPITALA MIEJSKIEGO IM. JONSCHERA W
ŁODZI

*****KATEDRA TECHNOLOGII SZKŁA I POWŁOK AMORFICZNYCH
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA W KRAKOWIE

*****ZAKŁAD CYTOBIOLOGII I HISTOCHEMII,

COLLEGIUM MEDICUM UJ W KRAKOWIE

[*Engineering of Biomaterials*, 58-60,(2006),227-230]

Introduction

It was proven lately that proliferation and possible bone restructure processes taking place in bone damage places and/or in neighbourhood of implants or transplants depend on numerous regulation factors, the most important of which include [1, 2, 3, 4]: cytokines and growth factors (fibroblastic - FGF, platelet-derived - PDGF, insulin-like - IGF, transforming - TGF α , TGF β and bone modelling - BMP). The proteins are excreted not only by osteocytes, osteoblasts, cartilage cells and fibrocytes but also by circulating cells, such as lymphocytes and granulocytes and also macrophages present in proliferating tissues. There are numerous evidences that proper bone healing depends on close cooperation between bone building cells and cells of inflammatory response, and the cooperation is mediated by interleukins, cytokines, metaloproteinases and numerous intra- and extracellular proteins and enzymes.

BMP proteins are so far the only ones that show capacity of chondral ossification *in vivo*. Although high TGF concentrations increase fibrosis and collagen synthesis (especially collagen type II) in the place of damage but they do not influence creation osseous tissue *de novo*. Only recombinated forms of BMP2 and BMP4 possess this capacity [5]. Increase presence of both of those proteins on surface of osteoblastic cells is observed in places where bone is formed [6].

The aim of this study is assessment and comparison of cellular composition of the interface between implanted bioactive material Sz2 and implanted granules of biologically inactive silica and the surrounding tissue, and influence of those changes on process of defect filling with osseous tissue.

Materials and methods

Bioceramics Sz2 and silica SiO₂ used as control were

wane metodą zol-żel w Katedrze Szkła i Ceramiki Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Technika operacyjna i metodyka została opisana uprzednio [7].

We wstępnym etapie badań morfologicznych wycinki kostne pobrane z obszaru wszczepu materiału bioceramicznego Sz2 i wszczepu krzemionki SiO₂ zatapiało wg standardowej metodyki do bloczków parafinowych, z których następnie wykonywano skrawki o grubości od 4 do 6 μm, barwione hematoksyliną i eozyną. Na podstawie wyników oceny mikroskopowej tych preparatów kwalifikowano wycinki do dalszych badań immunohistochemicznych. Ostatecznie do badania otrzymano preparaty pochodzące z trzech okresów obserwacyjnych – w 3., 7. i 21. dobie. Badania immunohistochemiczne przeprowadzono z użyciem monoklonalnych przeciwciał mysich skierowanych przeciw antygenom króliczym (producenci: NovoCastra, R&D, SeroTec). Obecność odczynów ujawniano zestawem wizualizacyjnym ABC NovoCastra z przeciwciałem wtórnym przeciw globulinom mysim, co zapobiegało powstawaniu odczynów krzyżowych. We wstępnym etapie badań, będącym przedmiotem tego doniesienia, skoncentrowano się na badaniu obecności kolagenu II, białka morfogenetycznego kości (BMP-4) i obecności makrofagów (CD 68).

Wyniki obserwacji po 3 dobach od dokonania wszczepu

W tej grupie obserwacji nie stwierdzano zasadniczych różnic w składzie komórkowym nacieku zapalnego, mniej lub bardziej nasilonym krwiakom towarzyszyły odczyny zapalne granulocytarne i limfocytarne z pojawieniem się utkania typowej młodej tkanki ziarninowej. Metodami immunohistochemicznymi wykazano w sąsiedztwie biomateriału Sz2 zwiększoną w stosunku do krzemionki SiO₂ koncentrację białka BMP4 i nieco obfitsze występowanie kolagenu typu II. Zarówno w grupie Sz2, jak i w grupie z wszczepionym SiO₂ stwierdzono nieliczne rozproszone wokół tych materiałów komórki tuczne. Liczba makrofagów, zmienna w różnych polach widzenia, nie wykazała we wstępnej ocenie znamienych różnic pomiędzy badanymi materiałami. W dalszych etapach oceny przeprowadzone zostaną badania składu komórkowego nacieku zapalnego – w szczególności identyfikacja limfocytów wchodzących w skład nacieku. W wybranych przypadkach, w których stwierdzono w sąsiedztwie wszczepionego materiału obecność włókien mięśniowych, zastosowano barwienie immunohistochemiczne na obecność dystrofiny 1, 2 i 3. Badanie to wykazało, że w sąsiedztwie obu wszczepionych materiałów dochodzi do zaniku włókien mięśniowych, które to zjawisko należy raczej wiązać z powstałymi podczas zabiegu operacyjnego uszkodzeniami nerwów i samych włókien mięśniowych, aniżeli ze swoistym działaniem zastosowanych do wszczepu materiałów.

Wyniki obserwacji po 7 dobach

W tej grupie zwierząt obserwowano dalsze organizowanie się ziarniny z pomnożeniem włókien kolagenowych (ze znacznym udziałem kolagenu typu II) – przy czym ekspresja kolagenu była znacznie wyraźniejsza w grupie z wszczepionym materiałem Sz2, aniżeli z wszczepionym zwykłym szkłem. Ponadto zaobserwowano ogniska proliferacji chrzęstnej wokół ziaren wszczepów, przy czym i w tym przypadku nasilenie zmian proliferacyjnych było znacznie większe w przypadku bioszklą Sz2, aniżeli w przypadku „czystej” krzemionki. Ogniska tkanki łącznej i obszary proliferacji chrzęstnych wykazywały znaczącą ekspresję BMP-4, której nasilenie odpowiadało nasileniu procesów tworzenia chrząstki. Ogniska wapnienia chrząstki były wyraźniejsze

produced with sol-gel technique in the Dept. of Glass Technology and Amorphous Coatings AGH - University of Science and Technology in Cracow. Operative technique and methods was described previously [7].

Study was performed in follow-up periods 3, 7 and 21 days after the date of surgical preparation of bone defect sized 0.2 cm x 0.04 cm x 0.04 cm. In all rabbits a defect in radial bone of forearm of both front legs was performed. A defect in right arm was filled with bioglass Sz2, and in left one with silica SiO₂ in form of granules with grain size from 315 μm to 800 μm. A permission from the Committee of Bioethics no. LB190 was obtained for the study. After the end of the experiment the rabbits were sacrificed and collected bone sections with implant were transferred for histopathological study.

At the preliminary stage of morphological study bone sections collected from bioceramic material Sz2 implantation area and SiO₂ silica implants were embeded according to standard methods in paraffin blocks. Then 4 to 6 μm-thick specimens stained with hematoxyline and eosine were made. Basin on results of microscopic assessment of those specimen sections were qualified for further immunohistochemical tests. Finally specimen originating from three follow-up periods – in 3rd, 7th, and 21st day – were obtained for study. Immunohistochemical tests were performed with use of mice monoclonal antibodies directed against rabbit antigens (producers: NovoCastra, R&D, SeroTec). Presence of reactions was revealed with ABC visualization set by NovoCastra with secondary antibody against mice globulins which prevented creation of cross-reactions. In the preliminary stage of the study described in this communication presence of collagen II, Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP-4) and macrophages (CD 68) was the main issue.

Observation results in 3 days after implantation

In studied group there were no significant differences found in cellular composition of inflammatory infiltration. Less or more intensified haematomas were accompanied by granulocyte and lymphocyte inflammatory reactions with occurrence of typical network of young granulation tissue. In neighbourhood of biomaterial Sz2 larger concentration of BMP-4 and slightly more abundant presence of collagen type II in comparison to silica SiO₂ were found with immunohistochemical methods. Both in Sz2 group and in the group with implanted SiO₂ several mast cells scattered around the materials were found. Upon preliminary assessment the number of macrophages, variable in different visual fields, did not show significant differences between the studied materials. On further assessment stages cellular composition of inflammatory infiltration will be studied and especially identification of lymphocytes present in the infiltration will be performed. In selected cases where presence of muscle fibres was found in neighbourhood of the implanted material immunohistochemical staining was performed to detect dystrophin 1, 2 and 3. The test revealed that in neighbourhood of both implanted materials the dystrophy of muscular fibres is occurred. This phenomenon should be rather connected with injuries of nerves and muscular fibres themselves happened during surgery than with specific action of materials used for implants.

Observation results after 7 days

In this group of animals further organisation of granular tissue and proliferation of collagen fibres (with significant participation of collagen type II) were observed - and expression of collagen was much more clear in the group

w przypadku bioceramiki Sz2, niż w przypadku szkła biologicznie nieaktywnego. Podobnie jak w poprzedniej grupie stwierdzano w sąsiedztwie wszczepionych materiałów pojedyncze rozproszone komórki tłuszczne i liczne, często leżące w skupiskach, makrofagi. Nasilenie odczynu makrofagowego było znacznie większe w 7 dobie obserwacji wokół drobin szkła, aniżeli wokół drobin bioceramiki Sz2. W przypadku szkła stwierdzano ponadto pojedyncze komórki olbrzymie typu około ciała obcego. W dotychczas przebadanych wycinkach pochodzących z grupy Sz2 takich komórek nie stwierdzano.

Wyniki obserwacji po 21 dniach

W wycinkach pochodzących z obserwacji po 3 tygodniach od daty zabiegu, stwierdzano wokół drobin obu materiałów zmiany odczynowe o różnym nasileniu – od niewielkiego włóknienia z niezbyt nasilonym odczynem zapalnym monocytarnym z domieszką makrofagów, aż do rozległych odczynów zbudowanych z wiotkiej tkanki łącznej z licznymi makrofagami i niewielką ilością komórek wielojądrowych typu około ciała obcego. Jak już wspomniano wcześniej, odczyn olbrzymiokomórkowe i makrofagowe przeważały w przypadkach z wszczepionym szkłem, podczas gdy proliferacje chrzęstne i proliferacje tkanki łącznej bogatej w BMP-4 i kolagen typu II, układające się głównie na obwodzie ognisk proliferującej tkanki chrzęstnej, dominowały w przypadkach ze wszczepem biomateriału Sz2. W przypadku biomateriału zaobserwowano także rozległe proliferacje beleczek kostnych z mniejszą aktywnością makrofagów i niemal brakiem komórek tłuszcznych.

Wnioski

Przeprowadzone badania histopatologiczne i immunohistochemiczne pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. W pierwszych fazach wlgania się wszczepu materiału bioceramicznego (3 i 7 doba po zabiegu) jego właściwości biologiczne powodują zwiększenie koncentracji BMP-4 i obfitszą syntezę kolagenu typu II, przy jednoczesnym zmniejszeniu odczynów typu alergicznego (zmniejszenie liczby komórek tłuszcznych i niewielka aktywność makrofagów). Skład komórkowy nacieku zapalnego oceniany jedynie metodami histologicznymi nie wykazuje zasadniczych różnic pomiędzy obydwoma materiałami.
2. W 21 dobie po zabiegu zarysowuje się wyraźniejsze zróżnicowanie odczynów biologicznych – wokół szkła SiO₂ pojawiają się odczyny olbrzymiokomórkowe typu około ciała obcego, aktywność makrofagów i komórek tłuszcznych jest nadal wysoka, a drobin szkła otoczone są tkanką łączną uboższą w kolagen typu II i wykazującą znacznie mniejszą ekspresję BMP-4. Proliferacje chrząstki częściowo ulegającej kostnieniu są znacznie obfitsze w sąsiedztwie biomateriału aniżeli szkła SiO₂.

Podziękowania

Praca została wykonana w ramach projektu UM w Łodzi Nr Tematu 502-11-262

with Sz2 material implanted than in the group with plain glass implanted. Moreover, foci of cartilage proliferation around implant granules were observed. Also in this case the intensity of proliferative changes was much bigger in the case of Sz2 bio-glass than in the case of "pure" silica. Connective tissue foci and areas of cartilage proliferation showed significant BMP-4 expression, and its intensity corresponded to intensity of cartilage formation processes. Cartilage calcification areas were more clear in the case of Sz2 bioceramics than they were in the case of biologically inactive glass. Similarly to the previous group single mast cells scattered in neighbourhood of implanted materials and numerous, usually clustered macrophages were found. The intensity of macrophage reaction was much higher on 7th day of observation around particles of glass than it was around particles of Sz2 bioceramic material. In the case of glass single foreign body giant cells were found. In sections collected from the Sz2 group studied so far no such cells were found.

Observation results after 21 days

In specimens collected in three weeks after the surgery around particles of both materials reaction changes of various intensity were found - from a small fibrosis with not very intensive monocyte reaction and admixture of macrophages, to extensive reactions built of flaccid connective tissue with numerous macrophages and small number of foreign body multinuclear giant cells. As it was indicated earlier, giant cell and macrophage reactions prevailed in the case of implanted SiO₂ glass. Cartilage and connective tissue proliferation rich with BMP-4 and collagen type II located mainly in peripheral part of proliferating cartilage were predominant in the cases with Sz2 biomaterial implant. In the case of the bioglass also extensive proliferations of osseous trabecula, lower activity of macrophages, and lack of mast cells were observed.

Conclusions

Performed histopathological and immunohistochemical tests enable us to formulate the following preliminary conclusions:

1. During first stages of the bioceramic material implants healing (in 3rd and 7th day after surgery) its biological features cause increase of BMP-4 concentration and more abundant synthesis of collagen type II, with simultaneous decrease of allergic-type reactions (decrease in mast cells number and small activity of macrophages). Cellular composition of the inflammatory infiltration assessed only with histological methods does not exhibit significant differences between both materials.
2. On 21st day after surgery more clear differences between biological reactions occur – around SiO₂ glass there are giant cell reactions of foreign body type, activity of macrophages and mast cells is still high, and particles of glass are surrounded with connective tissue poor in collagen type II and with much lower BMP-4 expression. Proliferations of cartilage undergoing partial ossification are much more abundant in neighbourhood of the biomaterial Sz2 compared to SiO₂ glass.

Acknowledgements

This investigations are financial supported by UM project No: 502-11-262



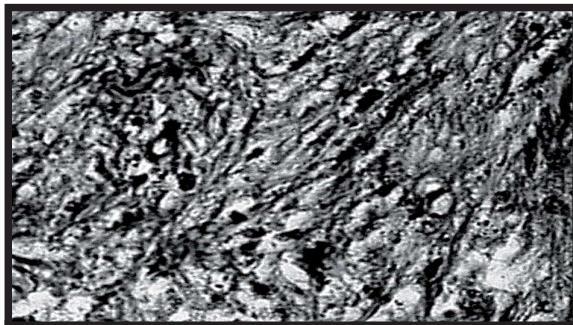
RYS.1. Ekspresja BMP-4 w osteoblastach i osteocytach (zaznaczone strzałkami). Dodatnią ekspresję stwierdza się zarówno w osteoblastach na powierzchni beleczek kostnych (OC) jak i w osteocytach systemów Haversa (BK). Zdjęcie z 7 doby obserwacji, zwierzę z wszczepionym biomateriałem Sz2.

FIG.1. BMP-4 expression in osteoblasts and osteocytes (marked with arrows). Positive expression is found both in osteoblasts on surface of osseous trabecula (OC) and in Havers systems (BK). Photograph taken on 7th day of observation, animal with implanted Sz2 biomaterial.



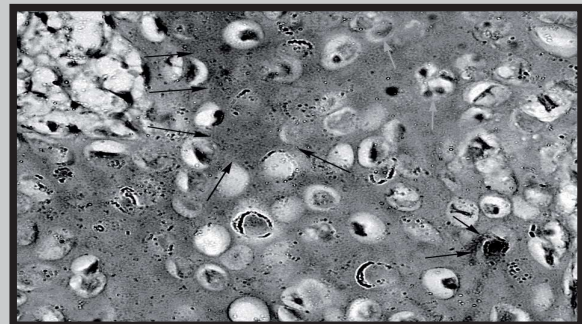
RYS.2. Ekspresja antygenu CD68 (makrofagi) – skupisko makrofagów (MCC) o wyraźnej ekspresji CD68 w sąsiedztwie blaszki kostnej pozostawionej podczas operacji. Przypadek z wszczepionym szkłem nieaktywnym biologicznie, 7 doba obserwacji.

FIG. 2. Antigen CD68 expression (macrophages) – cluster of macrophages (MCC) with clear CD68 expression in neighbourhood of the osseous trabecula left during surgery. Case with implanted biologically inactive glass, 7th day of observation.



RYS.3. Fragment tkanki łącznej włóknistej z sąsiedztwa wszczepu biomateriału Sz2. Bardzo silna ekspresja kolagenu typu II. Odczyn rozlany obejmujący niemal całą powierzchnię obszaru. Obserwacja po 7 dobach.

FIG.3. Fragment of connective tissue collected from the neighbourhood of Sz2 biomaterial implant. Very strong expression of collagen type II. Extensive reaction covering almost the whole area. Observation after 7 days.



RYS.4. Obszar proliferującej w sąsiedztwie biomateriału Sz2 chrząstki. Duża aktywność proliferacyjna (strzałki jaśniejsze) i ekspresja BMP-4 w podścielisku i części komórek (oznaczona strzałkami ciemniejszymi).

FIG.4. Area of cartilage proliferating in neighbourhood of Sz2 biomaterial. Large proliferative activity (lighter arrows) and BMP-4 expression within stroma and part of cells (marked with darker arrows).

Piśmiennictwo

- [1] Goldring MB & Goldring SR: Skeletal tissue response to cytokines. *Clin. Orthop.*, 258, (1990), 245 - 278.
- [2] Canalis E, Centrella M & McCarthy T: Effects of fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *J. Clin. Invest.*, 81, (1988), 1572-1580.
- [3] Price JS & Russell RGG: Bone remodelling: regulation by systemic and local factors. In *Bone biology and skeletal disorders in poultry*, ed. CC Whitehead, (1992) pp. 39-61. Carfax, Abingdon, UK.
- [4] Martin TJ, Ng KW & Suda T: Bone cell physiology. *Endocr. Metab. Clin. North. Am.*, 18(1989), 833- 859.

References

- [5] Bentz H, Armstrong R & Seyedin SM: Cartilage induction and differentiation: The role of bone derived cartilage inducing factor (CIF-A). In *Developmental diseases of cartilage and bone matrix*, ed. T Thornhill, (1987), pp. 137. New York: Alan R. Liss.
- [6] Paralkar VM, Hammonds GG & Reddi AH (1991): Identification and characterisation of cellular binding proteins (receptors) for recombinant bone morphogenetic protein 2B, an initiator of the bone differentiation cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3397-3401.
- [7] Kryspin Niedzielski.: Właściwości biologiczne i przydatność bioceramiki nowej generacji Sz2 w zabiegach rekonstrukcyjnych kości. Badania doświadczalne. Rozprawa habilitacyjna. Uniwersytet Medyczny w Łodzi 2004.