

Maciej Tarnowski, Aleksander L. Sieroń

## WRODZONA ŁAMLIWOŚĆ KOŚCI – ETIOLOGIA, CHARAKTERYSTYKA, METODY LECZENIA DZISIAJ I W PRZYSZŁOŚCI

Z Katedry Biologii Ogólnej, Molekularnej i Genetyki  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Wrodzona łamliwość kości (*osteogenesis imperfecta* – OI) jest genetycznie uwarunkowaną dysplazją kostną o silnie zróżnicowanym obrazie klinicznym, od postaci łagodnych, przez pośrednie do ciężkich, a nawet letalnych. Najcięższa postać choroby – typ II – przebiega ze znacznym stopniem deformacji kostnych, będącymi skutkiem złamań kośćca w okresie życia wewnątrzmacicznego, i bardzo nasiloną kruchością kości, co jest przyczyną złamań na skutek minimalnych urazów lub zabiegów pielęgnacyjnych. Dzieci z tą postacią choroby z reguły giną w pierwszych dniach lub tygodniach życia w wyniku niewydolności oddechowo-kръżeniowej, będącej konsekwencją deformacji kostnych. Dotychczas nie opracowano metody skutecznej terapii przyczynowej. Aktualnie stosowane leczenie objawowe (zabiegi ortopedyczne, bisfosfoniany) ma ograniczoną skuteczność. Potencjalną metodą terapeutyczną jest przeszczepienie komórek mezenchymalnych, które po zróżnicowaniu w komórki kościotwórcze mogą podjąć prawidłową funkcję syntezy tkanki kostnej. W pracy omówiono zarówno stan obecny, jak i perspektywy leczenia OI. [Wiad Lek 2008; 61(4–6): 166–172]

**Słowa kluczowe:** wrodzona łamliwość kości (OI), komórki macierzyste, terapia genowa.

### Etiologia

Wrodzona łamliwość kości (*osteogenesis imperfecta* – OI) to choroba uwarunkowana genetycznie, o częstości występowania 1/10 000 [1]. Schorzenie charakteryzuje się nieprawidłowościami w budowie kości, ich łatwą łamliwością, a także zaburzeniami słuchu i nieprawidłowościami w rozwoju uzębienia [2]. Główną przyczyną OI są mutacje w obydwu genach kolagenu typu I [3,4]. Do mutacji tych zalicza się substytucje, insercje lub delecje, które mogą powodować zmianę sensu kodu lub kodon nonsensowy. Zmiany te najczęściej skutkują zamianą glicyny na inny aminokwas [4]. Najczęściej wykrywanymi mutacjami w OI są mutacje punktowe w egzonach kodujących odcinki łańcucha kolagenu odpowiedzialne za jego centralną, trójhelikalną domenę [4]. Zamiana guaniny (g) w kodonie glicyny (ggN) na inną zasadę powoduje powstanie kodonu innego aminokwasu, np. seryny, cysteiny, alaniny, waliny, kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, argininy lub tryptofanu. Zamiana glicyny na którykolwiek z wymienionych aminokwasów skutkuje klinicznym fenotypem OI [4]. Najczęściej wykrywane i opisywane substytucje to zamiany glicyny na serynę, a najrzadziej na tryptofan [3].

Innym typem mutacji, która prowadzi do OI o ciężkim obrazie klinicznym, jest mutacja typu STOP, powodująca przedwczesne zakończenie biosyntezy łańcucha kolagenowego [5]. Kolagen kodowany przez zmutowany gen ma złe właściwości fizykochemiczne, które są przyczyną nieprawidłowości w tkankach, narządach i tych strukturach, w których głównym składnikiem budulcowym macierzy pozakomórkowej jest to białko [1]. Dotychczas nie udało się jednak powiązać miejsca występowania mutacji z określonym fenotypem klinicz-

nym OI. Istnieje kilka możliwych wytłumaczeń tego zjawiska. Pierwsze z nich zakłada, że potrójna helisa cząsteczki kolagenu składa się z obszarów o różnych funkcjach i odmiennych właściwościach struktury. Obszary te mają różną zdolność do akumulowania mutacji, a także różny udział w utrzymaniu stabilności całej cząsteczki [1,6]. Drugie mówi, że mogą występować różnice w wewnątrzkomórkowych skutkach wywoływanych przez poszczególne mutacje. W związku z tym różny jest wpływ mutacji na syntezę kolagenu oraz funkcjonowanie zależnych od niego osteoblastów w kościach [7]. Trzecie zakłada, że poza mutacjami genowymi na fenotyp mogą wpływać inne czynniki, zarówno genetyczne, jak i epigenetyczne, np. dieta i środowisko [1].

### Aspekty kliniczne oraz klasyfikacja wrodzonej łamliwości kości

Sillence i wsp. [2] zaprezentowali w 1979 r. klasyfikację wrodzonej łamliwości kości, która zależnie od objawów klinicznych, sposobu dziedziczenia, obrazu radiograficznego i cech biochemicznych wyróżnia 4 podstawowe typy OI (tab. I). Typ I to najczęstsza (około 60% przypadków) i najłagodniejsza forma choroby. Charakteryzuje się osłabieniem mięśni, ścięgien oraz zwiększoną podatnością na złamania kości (głównie kości długich oraz małych kości dłoni i stóp), skrzywieniem kręgosłupa, a także utratą słuchu. W przypadku łagodniejszej postaci choroby liczba złamań ogranicza się do kilku, w cięższej postaci liczba ta może przekroczyć 50. Zwykle złamania goją się prawidłowo, chociaż u około 15% pojawiają się deformacje. Częstość złamań zmniejsza się w wieku dorosłym, ale po przekroczeniu 60 roku życia znowu rośnie [3]. Wzrost pacjentów z OI typu I jest

Tabela I. Klasyfikacja typów wrodzonej łamliwości kości (OI) według Sillence'a [2]

Typ kliniczny OI	Dziedziczenie
<p>Typ I</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– występuje najczęściej</li> <li>– postać klinicznie łagodna</li> <li>– niewielka liczba złamań</li> <li>– niebieska twardówka</li> <li>– niedosłuch przewodzeniowy u młodocianych lub w wieku dojrzałym</li> <li>– późne wystąpienie pierwszych złamań</li> <li>– wiotkość więzadeł</li> <li>– zniekształcenia kostne niezależne od złamań (wykrzywianie kończyn dolnych, koślawość kolan, szpotawość śródstopia, kyfoskolioza u dorosłych)</li> <li>– rzadko zaawansowana osteoporoza</li> <li>– niski wzrost</li> <li>– spontaniczna poprawa w okresie dojrzewania</li> </ul>	autosomalne dominujące
<p>Typ II</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– zgon w okresie płodowym lub krótko po urodzeniu, rozpoznawany na podstawie charakterystycznych zmian w badaniu radiologicznym</li> </ul>	autosomalne recesywne lub nowa mutacja autosomalna dominująca
<p>Typ III</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– bardzo częste złamania, pojawiają się zawsze w pierwszym roku życia</li> <li>– postępująca osteopenia, pogłębiające się deformacje kośćca</li> <li>– niebieskie twardówki z tendencją do jaśnienia</li> <li>– nie stwierdza się zaburzeń słuchu</li> <li>– znaczny niedobór wzrostu</li> </ul>	autosomalne recesywne
<p>Typ IV</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– znaczna indywidualna zmienność przebiegu choroby dotycząca częstości złamań, wieku wystąpienia pierwszych objawów, nasilenia deformacji kostnych niezależnych od złamań</li> <li>– twardówka normalna lub niebieska przy urodzeniu z tendencją do jaśnienia</li> <li>– rzadko niedosłuch przewodzeniowy</li> <li>– niskorosłość u większości chorych</li> </ul>	autosomalne dominujące ze zmienną penetracją genu

prawidłowy lub nieznacznie mniejszy. Ta forma OI nie wpływa zasadniczo na długość życia pacjentów.

Typ II to najcięższa postać schorzenia. Cechami charakterystycznymi są miękkie kości sklepienia czaszki, trójkątna twarz, wąska klatka piersiowa i krótkie, zdeformowane kończyny. Złamania kości występują w trakcie życia płodowego lub krótko po urodzeniu, co zwykle prowadzi do poważnych komplikacji krążeniowo-oddechowych i zgonu. Długość życia osób z typem II choroby nie przekracza roku [8].

Typy III i IV wrodzonej łamliwości kości mają obraz kliniczny zbliżony do typu I, ale choroba ma cięższy przebieg. W przypadku typu I występuje ilościowe upośledzenie produkcji kolagenu, natomiast typy III i IV charakteryzuje przede wszystkim nieprawidłowa budowa jego monomerów. Typ III, który stanowi około 20% wszystkich przypadków OI, jest stosunkowo łatwo rozpoznawalny. Złamania występujące w tym typie przed narodzeniem powodują poważne deformacje kości długich i kręgosłupa [9]. Liczne złamania i pęknięcia kręgów prowadzą do zaburzeń w rozwoju kręgosłupa, a także do silnego bólu. Szczególnie niebezpieczne są zmiany i urazy dotyczące kręgów szyjnych C1 i C2 [10]. Wyraźne są także zmiany w obrębie twarzoczaszki oraz duże osłabienie siły mięśniowej. W 80% przypadków

OI typu III występuje poważny niedorozwój uzębienia. Długość i jakość życia pacjentów jest ściśle związana z przebiegiem choroby, a największa śmiertelność występuje przed 10 rokiem życia [11].

Typ IV choroby, w klasyfikacji Sillence'a, cechuje się największym zróżnicowaniem klinicznym i obejmuje wszystkie przypadki, które nie odpowiadają typom I, II lub III. Różnorodność fenotypów klinicznych w tej grupie może świadczyć o genetycznej heterogenności schorzenia. Dlatego nowsze opracowania [12,13,14] wyróżniają 7 typów wrodzonej łamliwości kości, gdzie typy I–IV są ściśle związane z mutacjami w genach kolagenu I (*COL1A1* lub *COL1A2*) i zgodne z klasyfikacją Sillence'a, natomiast typy V–VII reprezentują postaci choroby uwarunkowane mutacjami w innych genach lub o nieznanej etiologii (tab. II).

#### Modele zwierzęce wrodzonej łamliwości kości

Modele zwierzęce OI są bardzo ważne dla badań prowadzonych nad tym schorzeniem. Umożliwiają przeprowadzanie szeregu obserwacji i pomiarów różnych parametrów biologicznych organizmu, a także, co jest szczególnie istotne, są obiektem przedklinicznych prób leczenia OI. Nieprawidłowe procesy kostnienia obserwuje się u wielu gatunków zwierząt, np. u bydła, psowatych

Tabela II. Charakterystyka typów V–VII wrodzonej łamliwości kości (OI) według zmodyfikowanej klasyfikacji OI [12,13,14]

Typ kliniczny OI	Dziedziczenie
Typ V – przerastanie kostniny w miejscu złamania – zwapnienie błony międzykostnej pomiędzy kośćmi przedramienia	autosomalne dominujące
Typ VI – objawy zbliżone do typu IV – brak mutacji w genach kodujących kolagen typu I	autosomalne dominujące
Typ VII – osteopenia – niebieska twardówka – częste deformacje i złamania we wczesnym okresie życia	autosomalne recesywne

i naczelnym. Jednak w przypadku wymienionych zwierząt objawy kliniczne i biochemiczne nie odpowiadają objawom tego schorzenia u ludzi [15]. Lepszymi modelami zwierzęcymi OI są natomiast gryzonie, szczególnie myszy. Pierwszym mysim modelem zwierzęcym OI, który został uznany za realistyczny model choroby, był mysz *Mov-13*. Mysiom tym zablokowano transkrypcję genu *Colla1* przez wprowadzenie do pierwszego egzonu tego genu DNA wirusa małpiej białaczki Moloneya. Linia genetyczna *Mov-13* wykazuje cechy charakterystyczne dla ludzkiej OI typu I w formie heterozygotycznej, w formie homozygotycznej jest letalna, podobnie jak typ II OI u ludzi [16]. Wyniki badań nad formą homozygotyczną ujawniły ważną rolę kolagenu typu I w rozwoju zarodkowym, zwłaszcza przy tworzeniu układu krwionośnego [17].

Z czasem otrzymano inne linie myszy transgenicznym, u których wprowadzono mutacje 859Gly-Cys [18], 349Gly-Cys [19] lub zastąpiono gen *Colla1* tzw. minigenem pozbawionym 41 eksonów [20]. Każda z tych linii reprezentowała odmienne postacie OI, od łagodnych do letalnych. Modelem szczególnie godnym uwagi jest linia mysia z mutacją 349Gly-Cys [19], oznaczona jako *BrtlIV*. Odzwierciedla ona dokładnie kontekst genetyczny mutacji. Myszy z opisaną mutacją dokładnie naśladują różne odmiany OI i fenotypowo odpowiadają ludzkiej postaci choroby. Badania *Chipmana* i wsp. [21] ujawniły, iż u myszy naturalnie pojawiają się mutacje w genie *Colla2* i zwierzęta te wykazują cechy OI typu III. Szczep myszy, u których naturalnie występuje OI, nazwano *oim* (*osteogenesis imperfecta mouse model*) [21]. W tym przypadku mamy do czynienia z delecją guaniny 3983 powodującą przesunięcie ramki odczytu, co prowadzi do syntezy niekolagenowego polipeptydu i przez to uniemożliwia jego wbudowanie do struktury potrójnej helisy. U myszy *oim* wykazano obecność włókien kolagenowych o znacznie obniżonej wytrzymałości na naprężenia [22]. U zwierząt wystąpiły także zmiany w budowie tkanki kostnej, polegające na zaburzeniach składu mineralnego i nieprawidłowej strukturze kości [23], ponadto doszło u nich do zauważalnych zmian w budowie ściany aorty [24].

### Leczenie chorych na wrodzoną łamliwość kości

#### Zabiegi chirurgiczne i leczenie farmakologiczne

Obecnie leczenie OI jest głównie objawowe i obejmuje odpowiednie procedury ortopedyczne, takie jak chirurgiczna korekcja deformacji szkieletu i rehabilitacja. Celem tych zabiegów jest przeciwdziałanie częstym złamaniom, prowadzącym do znacznych deformacji kości, oraz utrzymanie optymalnego funkcjonowania pacjenta [25]. W ostatnich latach coraz częściej wskazuje się także na dobry efekt leczenia antyresorpcyjnego z zastosowaniem bisfosfonianów, wiążących się z kryształami hydroksyapatytu i spowalniających resorpcję kości przez osteoklasty. Działanie wewnątrzkomórkowe tej grupy leków polega na blokowaniu syntazy farnazylopirofosforanowej, co w rezultacie prowadzi do apoptozy osteoklastów [26]. Efektem jest zwiększenie gęstości mineralnej kości oraz grubości części korowej, a w związku z tym zmniejszenie częstości złamań nawet o 60% [27].

Terapia bisfosfonianami ma jednak niepożądane działanie uboczne, polegające na zahamowaniu obrotu masy kostnej oraz na gorszej przebudowie tkanki kostnej związanej z zaburzeniami gojenia się mikrouszkodzeń i złamań. Ponadto bardzo trudno oszacować właściwą dawkę podawanego leku oraz czas działania, ponieważ nawet po zaprzestaniu kuracji znaczne ilości leku mogą magazynować się w kościach, z czym wiążą się również trudne do określenia odległe skutki stosowania bisfosfonianów u dzieci. Dlatego stosowanie takiej terapii proponuje się tylko w ciężkich przypadkach, w których dochodzi do poważnych deformacji kości kończyn lub kręgosłupa [28]. Zastosowanie kliniczne znalazły dotąd 3 bisfosfoniany: *alendronian* [29], *pamidronian* [30] oraz *neridronian* [31]. Obecnie, gdy próby terapii genowej są na etapie przedklinicznym, poza interwencjami ortopedycznymi, terapia farmakologiczna jest jedynym dostępnym sposobem leczenia OI.

Terapia komórkowa z wykorzystaniem komórek macierzystych i mezenchymalnych komórek macierzystych

Mezenchymalne komórki macierzyste (*mesenchymal stem cells* – MSC) to niehematopoetyczne komórki

macierzyste, które występują w różnych tkankach pochodzenia mezodermalnego, takich jak szpik kostny, wątroba, mięśnie [32,33]. Zdecydowanie najbogatszym źródłem komórek mezenchymalnych jest szpik kostny. Komórki mezenchymalne szpiku znane są także jako stromalne komórki szpikowe (*marrow stromal cells*) lub jako jednostki fibroblastyczne tworzące kolonie (*colony-forming units fibroblastic*). Mogą one dawać początek różnym rodzajom tkanek, np. kościom, chrząstce, tkance tłuszczowej, mięśniom, ścięgnom [32,34] (ryc. 1). Mimo licznych badań do dzisiaj nie określono ostatecznie fenotypu MSC. Oznaczono jednak wiele cech, które są pomocne dla wzbogacania frakcji tych komórek w komórki mezenchymalne. Zalicza się do nich brak lub niskie stężenie takich markerów, jak CD34<sup>neg/low</sup> i CD45<sup>neg</sup>, oraz obecność markerów: Thy-1 (CD90), CD59 (Sca-1), CD106 (VCAM), integryna  $\beta$ -1 CD29/CD49, a także CD10, CD13 i receptorów dla PDGF, EGF, NGF i IGF-1 [35]. Zdolność różnicowania się MSC do komórek kości, chrząstki i tkanki tłuszczowej jest ważnym kryterium wskazującym na obecność komórek mezenchymalnych w badanej próbce [35]. W chorobach układu kostnego, takich jak OI, komórki mezenchymalne wydają się idealnymi kandydatami do terapii genowej lub komórkowej.

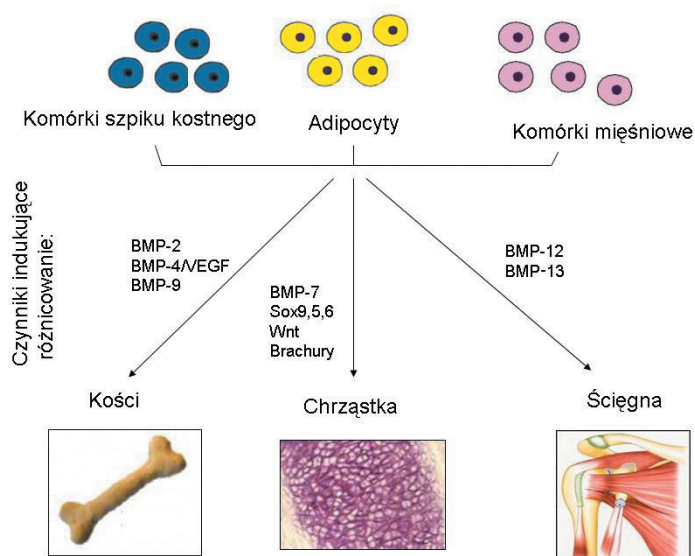
Od drugiej połowy lat 90. ubiegłego stulecia przeprowadzono liczne badania *in vivo* nad możliwościami terapii komórkowej chorób kości, różnicowania komórek mezenchymalnych do osteoblastów, a także wykorzystania komórek mezenchymalnych jako nośników genów. Mezenchymalne komórki macierzyste mogą być poddawane różnym modyfikacjom genetycznym, takim jak transdukcja wektorami wirusowymi lub niewirusowymi

niosącymi gen terapeutyczny lub cDNA kodujący odpowiednie białko [37]. Biorąc pod uwagę fakt, że MSC mogą być izolowane z różnych tkanek oraz hodowane *ex vivo*, możliwe jest przeprowadzenie wielu prób terapii komórkowej w przypadku licznych schorzeń lub urazów. W medycynie regeneracyjnej próby z wykorzystaniem MSC dowiodły ich użyteczności w odbudowywaniu uszkodzonej tkanki kostnej [38,39].

Mając na uwadze aspekt regeneracyjny terapii komórkowej, szczególnie godne uwagi wydaje się zastosowanie komórek mezenchymalnych transdukowanych genem *BMP-2*. Wspomniany gen koduje białko morfogenetyczne kości *BMP-2* (*bone morphogenetic protein 2*) z nadrodziny TGF- $\beta$ , które jest czynnikiem indukującym m.in. różnicowanie komórek macierzystych do osteoblastów (ryc. 1). Komórki zmodyfikowane tym genem nie tylko pobudzają komórki gospodarza, ale także pobudzają się wzajemnie na drodze autokrynej do różnicowania w osteoblasty [40]. Dzięki zastosowaniu odpowiednich czynników różnicujących, takich jak wspomniane już *BMP-2*, możliwe jest uzyskanie osteoblastów nie tylko z komórek mezenchymalnych znajdujących się w szpiku. Opublikowane ostatnio wyniki badań dowiodły, że MSC z tkanki mięśniowej i tłuszczowej również mogą stanowić źródło prekursorów komórek kości [41] (ryc. 1).

Terapia komórkowa wrodzonej łamliwości kości

Celem terapii komórkowej jest zminimalizowanie problemu, jaki stanowi dominująco negatywny charakter mutacji OI. Zakłada ona dostarczenie komórek, które mogą przekształcić się w osteoblasty lub są zdolne zastąpić osteoblasty biorcy z mutacją w genach kolagenu



Ryc. 1. Komórki macierzyste z różnych tkanek dorosłego organizmu i ich różnicowanie. Komórki ASC (*adult stem cells*) można już oczyszczać (np. ze szpiku kostnego, tkanki tłuszczowej lub mięśni) i mogą być różnicowane do różnych typów tkanek mających zastosowanie w inżynierii i terapii układu szkieletowego (zmienione według *Gafni* i wsp. [36]).

prawidłowymi komórkami macierzystymi dawcy [35]. Osteoblasty różnicują się z komórek mezenchymalnych szpiku kostnego, nie podlegają podziałom i mają ograniczony czas życia [42]. Natomiast komórki przeszczepiane to komórki macierzyste, które są odnawialnym źródłem osteoblastów i dlatego mogą zapewnić długotrwały efekt terapeutyczny. Ponadto przeszczepione prawidłowe komórki cechują się znacznie większą przeżywalnością niż komórki biorcy, gdyż wytwarzają prawidłową macierz pozakomórkową [43].

Dobre wyniki badań wykonanych na zwierzętach skłoniły grupę *Horowitza* do przeprowadzenia kilku prób terapeutycznych za pomocą komórek macierzystych u dzieci chorych na OI [44,45,46]. W pierwszej próbie badacze udowodnili dodatni potencjał terapeutyczny pełnego szpiku u leczonych dzieci. Próba ta polegała na alogenicznym przeszczepie szpiku kostnego (HLA-identycznego) u 3 dzieci chorych na OI. U biorców komórek szpikowych nastąpiło zwiększenie gęstości kości oraz polepszenie innych parametrów medycznych [44]. Po 36 miesiącach wzrost pacjentów uległ jednak zahamowaniu, a kości zwiększały jedynie swoją gęstość [44]. W następnej próbie zmieniono strategię i tym samym pacjentom podano izolowane komórki mezenchymalne bez towarzyszącej przeszczepowi szpiku chemioterapii. Alogeniczne komórki macierzyste osiedliły się w kościach, zrębie szpiku kostnego oraz w skórze. Poprawa stanu zdrowia była znacznie większa i bardziej długotrwała [45]. Mimo że komórki mezenchymalne dawcy stanowiły jedynie około 1% komórek, stan kliniczny pacjentów uległ widocznej poprawie [46]. Dokładny mechanizm tego procesu nadal pozostaje niewyjaśniony.

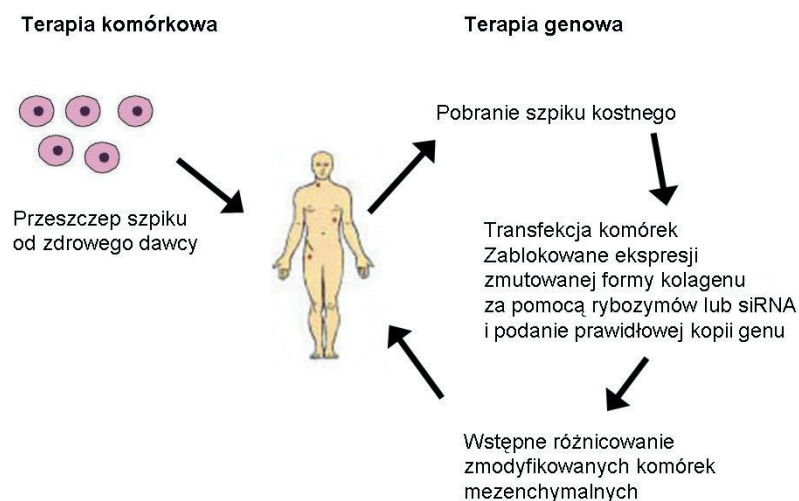
W innym cyklu badań przeprowadzonych w 1999 r. podjęto się przeszczepu MSC in utero pacjentowi z ciężką postacią OI. Komórki mezenchymalne w liczbie

$6,5 \times 10^6$  wyizolowano z zarodkowej wątroby ludzkiej i podano przez żyłę pępowinową do płodu w 32 tygodniu ciąży. Po urodzeniu w organizmie noworodka wykryto 0,3% komórek, a mineralizacja poprawiła się z 48% w 3 miesiącu życia do 76% w 22 miesiącu, w porównaniu ze zdrowymi rówieśnikami [44].

### Terapia genowa wrodzonej łamliwości kości

Obiecującą metodą leczenia przyczynowego OI wydaje się terapia genowa. Dominująco negatywny charakter większości mutacji punktowych w OI wskazuje, że szczególnie korzystne może być zastąpienie uszkodzonego odcinka genu odcinkiem prawidłowym lub zablokowanie syntezy wadliwego kolagenu [47,48]. Nieprawidłowe łańcuchy kolagenu są produkowane w komórkach i wbudowywane z prawidłowymi łańcuchami do struktury potrójnej helisy cząsteczki kolagenu. W wyniku takiej kombinacji potrójna helisa traci swoje właściwości fizykochemiczne. Zablokowanie syntezy wadliwego białka polega na przyłączeniu nukleotydów antysensownych lub siRNA do odpowiadającego im mRNA. Z racji obecności sekwencji wysoce powtarzalnych w genach kolagenowych trudno zaprojektować specyficzne oligonukleotydy blokujące translację [49]. Zastosowanie najnowszej technologii wykorzystującej rybozomy oraz selektywne trawienie cząsteczek RNA kodujących łańcuchy kolagenu zdecydowanie poprawiło wydajność terapii antysensownej w innych schorzeniach genetycznych [50]. Skuteczność tej technologii w leczeniu OI wymaga jednak sprawdzenia w odrębnych badaniach.

Pobranie komórek macierzystych oraz przeprowadzenie terapii genowej ex vivo pozwala uniknąć napromienienia, chemioterapii oraz innych procedur



Ryc. 2. Porównanie dwóch strategii terapeutycznych: 1) terapia komórkowa, polegająca na przeszczepie komórek macierzystych od odpowiedniego dawcy; 2) terapia genowa ex vivo, polegająca na autologicznym przeszczepie komórek macierzystych od organizmu chorego oraz na genetycznej kompensacji zmutowanego DNA w komórkach biorcy.

uszkodzających szpik kostny, które zwykle wykonuje się przed transplantacją alogeniczną [51]. Obecnie większość badań prowadzonych nad terapią genową OI zakłada modyfikację komórek macierzystych poza organizmem dawcy, a następnie podawanie ich z powrotem pacjentowi. Wśród komórek macierzystych dorosłego organizmu szczególnie korzystne wydaje się zastosowanie w terapii genowej komórek pobranych ze szpiku kostnego, w którym oprócz komórek krwiotwórczych znajdują się komórki mezenchymalne.

W doświadczeniu przeprowadzonym przez Chamberlaina i wsp. [52] pobrano komórki macierzyste ze szpiku kostnego 2 pacjentów cierpiących na OI. To pierwsza i jak na razie jedyna próba terapii genowej OI wykonana na macierzystych komórkach ludzkich. W obydwu przypadkach występowała punktowa mutacja powodująca zamianę seryny na glicynę. W opisywanej pracy jako wektora użyto wirusa towarzyszącego adenowirusom (*adeno-associated virus* – AAV), który uszkodził i zablokował egzon 1 zmutowanego genu *COL1A1* [52]. W 39–90% klonów komórek powstałych po transdukcji wirusowej doszło do zablokowania zmutowanego allelu i w związku z tym braku syntezy wadliwego kolagenu [52]. Ponadto po wszczepieniu tych komórek do organizmu myszy utrzymały one zdolność różnicowania się

w kierunku osteoblastów i tworzenia struktur kostnych. Wyniki pracy Chamberlaina wskazują na potencjalne możliwości terapii genowej w leczeniu OI [52].

### Podsumowanie

Nietrudno dostrzec ciągły rozwój metod leczniczych OI. W najbliższej przyszłości zastosowanie powinno znaleźć połączenie dwóch głównych nurtów terapeutycznych: terapii komórkowej i terapii genowej. Wykorzystanie siRNA lub przeprowadzenie ukierunkowanej mutagenyzy *in vivo* na komórkach mezenchymalnych pacjenta wydaje się idealnym sposobem leczenia OI (ryc. 2). Niestety genetyczna i kliniczna różnorodność choroby, rozmiar genów kodujących łańcuchy kolagenu oraz mała dostępność autologicznych komórek macierzystych stanowią poważne wyzwania dla naukowców. Poczerniający wydaje się fakt, iż aktualnie uczeni dysponują szerokim asortymentem wektorów mogących wprowadzać DNA do komórki (liposomy, wirusy, elektroporacja), wydajnymi metodami hodowli komórek macierzystych oraz modelami zwierzęcymi tego schorzenia. Wraz z rozwojem najnowszych technik biologii molekularnej i genetyki należy się spodziewać coraz to nowszych sposobów leczenia OI, czy też łagodzenia jej skutków.

### Piśmiennictwo

[1] Byers PH. Osteogenesis imperfecta. W: Connective tissue and its heritable disorders. 1<sup>st</sup> ed. Red. Royce PM, Steinmann B. Wiley-Liss, Inc. New York 1993; 317–351. [2] Silience DO, Senn A, Danks DM. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *J Med Genet* 1979; 16: 101–116. [3] Roughley PJ, Rauch F, Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta – clinical and molecular diversity. *Eur Cell Mater* 2003; 5: 41–47. [4] Byers PH, Wallis GA, Willing MC. Osteogenesis imperfecta: translation of mutation to phenotype. *J Med Genet* 1991; 28: 433–442. [5] Willing MC, Deschenes SP, Scott DA, Byers PH, Slayton RL, Pitts SH, Arikat H, Roberts EJ. Osteogenesis imperfecta type I: molecular heterogeneity for COL1A1 null alleles of type I collagen. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 638–647. [6] Stepiewski A, Ito H, Rucker E, Brittingham RJ, Alabyeva T, Gandhi M, Ko FK, Birk DE, Jimenez SA, Fertala A. Position of single amino acid substitutions in the collagen triple helix determines their effect on structure of collagen fibrils. *J Struct Biol* 2004; 148: 326–337. [7] Jones SJ, Glorieux FH, Travers R, Boyde A. The microscopic structure of bone in normal children and patients with osteogenesis imperfecta: a survey using backscattered electron imaging. *Calcif Tissue Int* 1999; 64: 8–17. [8] Byers PH, Tsipouras P, Bonadio JF, Starman BJ, Schwartz RC. Perinatal lethal osteogenesis imperfecta (OI type II): a biochemically heterogeneous disorder usually due to new mutations in the genes for the type I collagen. *Am J Hum Genet* 1988; 42: 237–248. [9] Cole WG, Dalgleish R. Perinatal lethal osteogenesis imperfecta. *J Med Genet* 1995; 32: 284–289. [10] Charnas LR, Marini JC. Communicating hydrocephalus, basilar invagination, and other neurologic features in osteogenesis imperfecta. *Neurology* 1993; 43: 2603–2608.

[11] Paterson CR, Ogston SA, Henry RM. Life expectancy in osteogenesis imperfecta. *BMJ* 1996; 312: 51. [12] Ward LM, Rauch F, Travers R, Chabot G, Azouz EM, Lalic L, Roughley PJ, Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta type VII: an autosomal recessive form of brittle bone disease. *Bone* 2002; 31: 12–18. [13] Glorieux FH, Rauch F, Plotkin H, Ward L, Travers R, Roughley P, Lalic L, Glorieux DF, Fassier F, Bishop NJ. Type V osteogenesis imperfecta: a new form of brittle bone disease. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 1650–1658. [14] Glorieux FH, Ward LM, Rauch F, Lalic L, Roughley PJ, Travers R. Type VI osteogenesis imperfecta: a form of brittle bone disease with a mineralization defect. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 30–38. [15] Shapiro JR, McBride DJ Jr, Fedarko NS. OIM and related animal models of osteogenesis imperfecta. *Connect Tissue Res* 1995; 31: 265–268. [16] Stacey A, Bateman J, Choi T, Mascara T, Cole W, Jaenisch R. Perinatal lethal osteogenesis imperfecta in transgenic mice bearing an engineered mutant pro-alpha 1(I) collagen gene. *Nature* 1988; 332: 131–136. [17] Lohler J, Timpl R, Jaenisch R. Embryonic lethal mutation in mouse collagen I gene causes rupture of blood vessels and is associated with erythropoietic and mesenchymal cell death. *Cell* 1984; 38: 597–607. [18] Bonadio J, Saunders TL, Tsai E, Goldstein SA, Morris-Wiman J, Brinkley L, Dolan DF, Altschuler RA, Hawkins JE Jr, Bateman JF i wsp. Transgenic mouse model of the mild dominant form of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7145–7149. [19] Forlino A, Porter FD, Lee EJ, Westphal H, Marini JC. Use of the Cre/lox recombination system to develop a non-lethal knock-in murine model for Osteogenesis imperfecta with an alpha 1(I) G349C substitution. Variability in phenotype in Brl1V mice. *J Biol Chem* 1999; 274: 37923–37931. [20] Killian JS, Olsen AS, Kontusaari S, Sokolov B, Prockop DJ. Transgenic mice that express a mini-gene version of the human gene for type I procollagen (COL1A1) develop a phenotype resembling a lethal form of osteogenesis imperfecta. *J Biol Chem* 1991; 266: 23373–23379.

[21] Chipman SD, Sweet HO, McBride DJ Jr, Davissom MT, Marks SC Jr, Shuldiner AR, Wenstrup RJ, Rowe DW, Shapiro JR. Defective pro alpha 2(I) collagen synthesis in a recessive mutation in mice: a model of human osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1701–1705. [22] Misof K, Landis WJ, Klaushofer K, Fratzl P. Collagen from the osteogenesis imperfecta mouse model (oim) shows reduced resistance against tensile stress. *J Clin Invest* 1997; 100: 40–45. [23] Fratzl P, Paris O, Klaushofer K, Landis WJ. Bone mineralization in an osteogenesis imperfecta mouse model studied by small-angle x-ray scattering. *J Clin Invest* 1996; 97: 396–402. [24] Pfeiffer BJ, Franklin CL, Hsieh FH, Bank RA, Phillips CL. Alpha 2(I) collagen deficient oim mice have altered biomechanical integrity, collagen content, and collagen crosslinking of their thoracic aorta. *Matrix Biol* 2005; 24: 451–458. [25] Cinman N. Osteogenesis imperfecta. A life not so fragile. *Lancet* 2001; 358 Suppl. 46. [26] Glorieux F, Bishop NJ, Plotkin H, Chabot G, Lanoue G, Travers R. Cyclic administration of pamidronate in children with severe osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med* 1998; 339: 947–952. [27] Rauch F, Travers R, Plotkin H, Glorieux FH. The effects of intravenous pamidronate on the bone tissue of children and adolescents with osteogenesis imperfecta. *J Clin Invest* 2002; 110: 1293–1299. [28] Rauch F, Glorieux FH. Treatment of children with osteogenesis imperfecta. *Curr Osteoporos Rep* 2006; 4: 159–164. [29] Madenci E, Yilmaz K, Yilmaz M, Coskun Y. Alendronate treatment

in osteogenesis imperfecta. *J Clin Rheumatol* 2006; 12: 53–56. [30] Land C, Rauch F, Travers R, Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta type VI in childhood and adolescence: effects of cyclical intravenous pamidronate treatment. *Bone* 2007; 40: 638–644.

[31] Antoniazzi F, Zamboni G, Lauriola S, Donadi L, Adami S, Tato L. Early bisphosphonate treatment in infants with severe osteogenesis imperfecta. *J Pediatr* 2006; 149: 174–179. [32] Tarnowski M, Sieron AL. Adult stem cells and their ability to differentiate. *Med Sci Monit* 2006; 12: 154–163. [33] Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001; 98: 2396–2402. [34] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143–147. [35] Fibbe WE. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann Rheum Dis* 2002; 61(Suppl 2): 29–31. [36] Gafni Y, Turgeman G, Liebergal M, Pelled G, Gazit Z, Gazit D. Stem cells as vehicles for orthopedic gene therapy. *Gene Ther* 2004; 11: 417–426. [37] Chuah MK, Van Damme A, Zwinnen H, Goovaerts I, Vanslembrouck V, Collen D, Vandendriessche T. Long-term persistence of human bone marrow stromal cells transduced with factor VIII-retroviral vectors and transient production of therapeutic levels of human factor VIII in nonmyeloablated immunodeficient mice. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 729–738. [38] Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, Nomura T, Okuma M, Nishimura K, Nakai T, Ando K, Hotta T. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen® gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration. *Biomaterials* 2003; 24: 3531–3541. [39] Lane JM, Yasko AW, Tomin E, Cole BJ, Waller S, Browne M, Turek T, Gross J. Bone marrow and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in osseous repair. *Clin Orthop Relat Res* 1999; 361: 216–227. [40] Gazit D, Turgeman G, Kelley P, Wang E, Jalenak M, Zilberman Y, Moutsatsos I. Engineered pluripotent mesenchymal cells integrate and differentiate in regenerating bone: a novel cell-mediated gene therapy. *J Gene Med* 1999; 1: 121–133.

[41] Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 2005; 54: 132–141. [42] Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 1995; 17: 77–83. [43] Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4857–4861. [44] Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999; 5: 309–313. [45] Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, McCarville ME, Orchard PJ, Pyeritz RE, Brenner MK. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* 2001; 97: 1227–1231. [46] Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8932–8937. [47] Niyibizi C, Smith P, Mi Z, Robbins P, Evans C. Potential of gene therapy for treating osteogenesis imperfecta. *Clin Orthop Relat Res* 2000; 379 Suppl: 126–133. [48] Marini JC, Gerber NL. Osteogenesis imperfecta. Rehabilitation and prospects for gene therapy. *JAMA* 1997; 277: 746–750. [49] Wang Q, Marini JC. Antisense oligodeoxynucleotides selectively suppress expression of the mutant alpha 2(I) collagen allele in type IV osteogenesis imperfecta fibroblasts. A molecular approach to therapeutics of dominant negative disorders. *J Clin Invest* 1996; 97: 448–454. [50] Dawson PA, Marini JC. Hammerhead ribozymes selectively suppress mutant type I collagen mRNA in osteogenesis imperfecta fibroblasts. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 4013–4020.

[51] Millington-Ward S, Allers C, Tuohy G, Conget P, Allen D, McMahon HP, Kenna PF, Humphries P, Farrar GJ. Validation in mesenchymal progenitor cells of a mutation-independent ex vivo approach to gene therapy for osteogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2201–2206. [52] Chamberlain JR, Schwarze U, Wang PR, Hirata RK, Hankenson KD, Pace JM, Underwood RA, Song KM, Sussman M, Byers PH, Russell DW. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science* 2004; 303: 1198–1201.

Adres autorów: Aleksander L. Sieron, Katedra Biologii Ogólnej, Molekularnej i Genetyki SUM, ul. Medyków 18, 40-752 Katowice, tel. (0-32) 208 83 94, fax (0-32) 208 83 82, e-mail: alsieron@slam.katowice.pl

M. Tarnowski, A.L. Sieron

## OSTEOGENESIS IMPERFECTA – ETIOLOGY, CHARACTERISTICS, CURRENT AND FUTURE TREATMENT

### Summary

A congenital brittle bone disease, also named *osteogenesis imperfecta* (OI) is a genetic bone dysplasia with wide spectrum of clinical manifestations, from almost normal, through mild to severe phenotypes or even lethal. The most severe type of OI, type II, is characterized by significant bone deformations, resulting from frequent bone fractures occurring already in utero as well as after birth, due to bone fragility causing fractures even during regular newborn handling. Children with this type of OI die during first few weeks after birth due to poor circulatory/pulmonary conditions resulting from ribs and vertebral deformations. Currently, there is a lack of successful treatment and the therapy is restricted to applications of orthopedic equipment or administration of bisfosfonian, but both with limited success. The therapy of the future is cell therapy where the mesenchymal cells following transplantation undergo differentiation to bone marrow cells and take over the function of new and correct bone formation. In his review, both the current achievements as well as future perspectives are discussed.

**Key words:** brittle bone disease, *osteogenesis imperfecta* (OI), stem cells, gene therapy.