

# Związek między ekspresją genu dla BMP-4 a kostnieniem pozaszkieletowym oraz ich wpływ na funkcję stawu biodrowego po całkowitej bezcementowej alloplastyce

## Correlations Between BMP-4 Gene Expression, Heterotopic Ossification and Function after Uncemented Total Hip Replacement

Adam Kwapisz<sup>1(A,B,D,E,F,G)</sup>, Piotr Kozłowski<sup>1(A,B,D,E,F,G)</sup>, Janusz Szemraj<sup>2(B,D,E,F)</sup>,  
Marek Synder<sup>1(B,D,E,F)</sup>, Marcin Sibiński<sup>1(A,B,C,D,E,F)</sup>

<sup>1</sup> Klinika Ortopedii i Ortopedii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego, Łódź

<sup>2</sup> Zakład Biochemii Medycznej

<sup>1</sup> Department of Orthopaedics and Paediatric Orthopaedics, Medical University in Łódź

<sup>2</sup> Division of Medical Biochemistry

### STRESZCZENIE

**Wstęp.** Kostnienie pozaszkieletowe jest nieprawidłowym, nienowotworowym rozwojem beleczkowej kości w obrębie tkanki miękkiej. Białka morfogenetyczne kości są jednym z czynników mogących prowadzić do powstania kostnienia pozaszkieletowego. Celem pracy jest ocena związku między ekspresją genu BMP-4 a występowaniem kostnienia pozaszkieletowego oraz wpływ powyższych czynników na wyniki bezcementowej alloplastyki stawu biodrowego.

**Material i metody.** Grupę badaną stanowiło sześćdziesięciu czterech pacjentów, którzy zostali poddani jednostonnemu zabiegowi bezcementowej alloplastyki stawu biodrowego. Średni wiek w grupie badanej wynosił 52,3 lata. Średni czas obserwacji wyniósł 56,74 miesiąca. Podczas ostatniej wizyty kontrolnej pobrano 1 ml krwi obwodowej, a następnie za pomocą metody RC-PCR oznaczono poziom ekspresji genu BMP-4. Wykonano wówczas także kontrolne zdjęcie RTG i badanie kliniczne.

**Wyniki.** Stwierdzono silną statystyczną zależność między wielkością kostnienia pozaszkieletowego mierzoną za pomocą skali Brookera i poziomami ekspresji genu BMP-4 ( $\rho=0,946$  i  $p<0,0001$ ). Jednocześnie nie zaobserwowano związku między funkcjonalnością stawu wg skali Harrisa, a wartościami skali Brookera ( $\rho=-0,188$ ,  $p=0,3$ ) oraz pomiędzy skalą Harrisa i poziomami ekspresji genu BMP-4 ( $\rho=0,1$ ,  $p=0,6$ ).

**Wnioski.** 1. Poziom ekspresji BMP-4 silnie koreluje z wielkością kostnienia pozaszkieletowego, co może wskazywać na jego rolę w etiologii tego schodzenia. 2. Nadmierna ekspresja BMP-4 może przyczynić się do powstawania kostnienia pozaszkieletowego po alloplastyce stawu biodrowego.

**Słowa kluczowe:** kostnienie pozaszkieletowe, całkowita alloplastyka BMP, czynność, PCR

### SUMMARY

**Background.** Heterotopic ossification (HO) is the abnormal, non-neoplastic presence of lamellar bone in soft tissue. Bone morphogenetic proteins (BMP) are among factors that may lead to HO. The purpose of the study was to evaluate correlations between BMP-4 gene expression and HO and the influence of those factors on outcomes of cementless total hip replacement (THR).

**Patients and methods.** A series of sixty-four (64) patients were enrolled. The patients were at a mean age of 52.3 years and all of them had undergone unilateral THR. Mean duration of follow-up was 56.74 months. At the last follow-up visit, 1 ml blood samples were collected and BMP-4 gene expression was measured by the RT-PCR technique. Hip radiographs were also obtained and a clinical examination was performed during that visit.

**Results.** A strong statistical correlation was observed between HO grades according to Brooker's scale and BMP-4 expression levels ( $\rho=0.946$ ,  $p<0.0001$ ), while there was no correlation between clinical outcomes according to the Harris Hip Score (HHS) and Brooker's grades ( $\rho=-0.188$ ,  $p=0.3$ ) as well as between Harris hip scores and BMP-4 expression levels ( $\rho=0.1$ ,  $p=0.6$ ).

**Conclusions.** 1. BMP-4 expression strongly correlates with HO as measured by Brooker's scale and may play a role in the aetiology of this condition. 2. The over-expression of BMP-4 may exert a certain influence on ectopic bone formation after total hip arthroplasty.

**Key words:** heterotopic ossification, total hip arthroplasty, bone morphogenetic protein, function, PCR

## WSTĘP

Kostnienie pozaszkieletowe (HO) jest nieprawidłowym, nienowotworowym rozwojem beleczkowej kości w obrębie tkanki miękkiej [1-3]. Opisane zostało po raz pierwszy przez Dejerene'a i Ceillier'a jako 'paraosteopatia' u pacjentów z pourazową paraplegią [4]. Myositis ossificans, okołostawowe kostnienie czy też osteoma neurogenes to tylko kilka z terminów używanych w piśmiennictwie do opisu tego zjawiska. HO może powstać w każdej tkance miękkiej, jednakże najczęściej zlokalizowane jest w pobliżu takich stawów jak łokciowy, skokowy, kolanowy czy biodrowy.

Etiologia kostnienia pozaszkieletowego pozostaje nieznaną, podnosi się jednak brak uwarunkowania genetycznego oraz możliwość wywołania tego zjawiska przez urazy, zabiegi operacyjne, oparzenia, krwawienie podpajęczynówkowe oraz znieczulenie nadoponowe [2,5-7]. Uznawane jest ono za bezobjawowe, jednakże może także powodować dolegliwości bólowe i ograniczać ruchomość stawów jakiegoś odcinka. Opisuje się, iż kostnienie pozaszkieletowe może mieć poprzez to wpływ na wynik alloplastyk stawów w tym stawu biodrowego [2,5,8-11]. W piśmiennictwie występowanie HO określa się na 5 do 90% operowanych przypadków [7,12].

Kostnienie pozaszkieletowe powstaje w wyniku nieprawidłowego różnicowania się komórek pluripotencjalnych w tkankach miękkich [5,13,14]. Podłoże tych procesów nadal zostało niewyjaśnione [2,7,15]. Odkryto wiele czynników stymulujących powyższe procesy, jednocześnie opisano istnienie nielicznych inhibitorów, takich jak przykładowo cząsteczki Noggin i Gremlin [7,16].

Urist i wsp. opisał białko morfogenetyczne kości (BMP) jako jeden z czynników mogących prowadzić do powstania HO [17], jego zwiększona ekspresja może powodować nieprawidłowy rozrost ektopowej kości [5,7,16,18-20]. Badania nad fibrodysplazją ossificans progressiva, zespołem chorobowym charakteryzującym się występowaniem HO, wykazały, że jedyną cząsteczką o zwiększonej aktywności było BMP-4 [5,16,19,21]. Kostnienie pozaszkieletowe występuje także w innych syndromach genetycznych, takich jak osteodystrofia Albright'a czy heteroplasia ossea progressiva [2,5,22].

Celem pracy jest ocena związku między ekspresją genu BMP-4 a występowaniem kostnienia pozaszkieletowego oraz wpływ powyższych czynników na wyniki bezcementowej alloplastyki stawu biodrowego.

## BACKGROUND

Heterotopic ossification (HO) is the abnormal, non-neoplastic presence of lamellar bone in soft tissue [1-3]. It was originally described by Dejerene and Ceillier as 'paraosteopathy' in patients with traumatic paraplegia [4]. Myositis ossificans, periarticular new bone formation and neurogenic osteoma are just a few terms by which this disorder is referred to in medical literature. HO may be present in any type of soft tissue but is mostly found in joints, such as the elbow, ankle, knee or hip joint [5].

Although the aetiology of HO remains unclear, it has no genetic background and can be triggered by trauma, surgery, burns, subarachnoid haemorrhage and even epidural anaesthesia [2,5,6,7]. HO is reported to be, in most cases, asymptomatic; however, it may cause pain and decrease the range of motion (ROM) in the affected joint. Ectopic bone formation may also significantly influence the outcome of total joint replacement procedures, such as hip arthroplasty [2, 5,8-11]. Estimates of the incidence of the problem have varied from 5 to 90% [7,12].

The pathogenesis of HO is described as inappropriate differentiation of pluripotent cells in soft tissues [5,13,14]. The origin of this process and the source of these cells remain uncertain [2,7,15]. There are many factors known to support this process, but few inhibitors, for example, Noggin and Gremlin [7,16].

Urist et al. postulated that bone morphogenetic proteins (BMP) are among the factors which may lead to HO [17] and that their over-expression may cause abnormal bone formation [5,7,16,18,19,20]. Studies on fibrodysplasia ossificans progressiva, which is characterised by skeletal muscle ossification, have revealed BMP-4 to be the only up-regulated factor [5,16,19,21]. There are also other, genetic syndromes associated with ectopic ossification, including Albright's osteodystrophy and heteroplasia ossea progressiva [2,5,22].

The purpose of this study was to evaluate correlations between BMP-4 gene expression and HO and the influence of those factors on outcomes of cementless total hip arthroplasty (THA).

## MATERIAŁ I METODY

Z bazy danych pacjentów Kliniki wyszukano 205 historii chorób pacjentów, u których z powodu zaawansowanej choroby zwyrodnieniowej wykonano bezcementową jednostronną alloplastykę stawu biodrowego. Zabiegi miały miejsce w latach 1999-2002. Wszyscy pacjenci zostali listownie zaproszeni na badanie kontrolne do naszego ośrodka. Na badanie zgłosiły się 64 osoby (36 kobiet, 28 mężczyzn). Alloplastyka prawego stawu biodrowego wykonana została u 33 osób, lewego 31 osób. Średni wiek badanych pacjentów w dniu operacji wyniósł 52,3 lata (zakres 41-61 lat). Wszyscy pacjenci podpisali formularz świadomej zgody, a następnie zostały zebrane dane do dalszej analizy. Wywiad dotyczył przebytych i aktualnych chorób, zabiegów operacyjnych oraz przyjmowanych leków. Wszyscy pacjenci z terapią hormonalną i chorobami metabolicznymi byli wykluczeni z dalszego toku postępowania. Wszystkie zabiegi zostały wykonane przez tego samego operatora, w tym samym szpitalu, przy użyciu tego samego implantu (Bicontact/Screwcup, B-Brown, Niemcy). Zastosowano przednio-boczne dojście Bauera we wszystkich przypadkach. U wszystkich pacjentów zastosowano znieczulenie podpajęczynówkowe. Pacjenci następnie byli poddani wizytom kontrolnym w Poradni Przyklinicznej. Czas obserwacji wahał się między 46 a 72 miesiące, przy czym średnia wyniosła 56,74, a mediana 57 miesięcy.

Wszystkie osoby poddano badaniu fizykalnemu z określeniem zakresu ruchomości operowanego stawu przy użyciu standardowego goniometru. Następnie przeprowadzono ocenę przy użyciu skali Harrisa. W skali tej wartości kątowne przeliczane są na punkty, obiektywizuje to ocenę funkcjonalności operowanego stawu biodrowego. Maksimum punktów wynosi 100,5 [23].

Każdy z pacjentów miał także wykonany radiogram w projekcji przednio-tylnej operowanego stawu. Następnie przy użyciu skali Brookera dokonano oceny występowania ewentualnego kostnienia pozaszkieletowego. Klasyfikacja ta wyróżnia pięć stopni, przy czym 0 oznacza brak skostnień, a stopień IV kompletną ankylozę stawu.

Kolejnym krokiem było pobranie próbki pełnej krwi obwodowej od każdego z pacjentów celem izolacji leukocytów i ocenie poziomu mRNA przy użyciu techniki rt-PCR. Pełny komórkowy RNA został ekstrahowany przy użyciu odczynnika Trizol (Invitrogen, USA), użyto protokołu jednofazowego oczyszczania [24]. Grudki RNA zostały rozpuszczone w wodzie, a ich stężenie i czystość została oceniona za pomocą spektrofotometrii, przy wartościach 260 i 280

## MATERIAL AND METHODS

205 records of patients were extracted from our clinical database. The patients had been treated for severe primary osteoarthritis of the hip and operated on by one surgeon (PK). They underwent cementless unilateral total hip replacement (THR) between 1999 and 2002. An invitation for a follow-up visit was sent to all of the patients. Sixty-four of them (36 females and 28 males) attended the visit. In this group, the right hip had been operated on in 33 and the left one in 31 cases. The average age of the patients in our study group at the time of surgery was 52.3 years (range: 41-61 years). All the patients signed an informed consent form and then data were collected for further analyses. Medical history was obtained, including information about past and present medical conditions, surgery and medications. All patients on hormonal therapy and those with a history of metabolic disease were excluded from the study. All operations were performed by the same orthopaedic surgeon, at the same hospital and with the use of the same implant type (Bicontact/Screwcup, B-Brown, Germany). The anterolateral Bauer approach was used in all cases. All procedures were performed under spinal epidural anaesthesia. Patients were instructed to come back for follow-up visits at our outpatient clinic. The follow-up period ranged from 46 to 72 months, with a mean of 56.74 months and a median of 57 months.

All patients underwent a physical examination with ROM assessment using a standard goniometer. The results of the examination were then evaluated according to the Harris Hip Score (HHS), in which the range of motion is converted into numerical values to provide an objective evaluation of the function of the operated hip. The maximum score was 100.5, corresponding to a full range of motion in the hip joint [23].

Plain AP radiographs of the operated hips were also taken in all patients during the follow-up visits, including the last visit. Ectopic bone formation was evaluated in the radiographs according to Brooker's scale. This classification identifies five grades of HO, from 0 (no signs of HO) to IV (complete ankylosis of a joint) [9].

The next element of patient evaluation was collecting a sample of peripheral full blood from each patient to isolate leucocytes and determine mRNA levels by the rt-PCR technique. Total cellular RNA was extracted by the Trizol reagent method (Invitrogen, USA), using a single-step purification protocol [24]. RNA pellets were dissolved in water, and their concentrations and purity were determined by spec-

nm. Wartość względna swoistego mRNA (mRNAs) została określona poprzez zastosowanie techniki rtPCR. Poliadenylowane RNA zostało wyizolowane przy użyciu zestawu Oligotex (Qiagen, Chatsworth, CA, USA). Użyto 50ng poli (A) RNA dla uzyskania pierwszej nici cDNA w systemie SuperScript II RNase Transcriptase (Invitrogen Life technologies, USA), zgodnie z instrukcją producenta zastosowano primery olido (dT) 12-18. Uzyskane cDNA zostało zamplifikowane przy użyciu 5' TACCTGAGACGGGAAGAAA 3' i 5' CAAGACTGAAGCCGGTAAAG 3'5', specyficznego dla mRNA ludzkiego BMP-4. W tych samych próbkach wykonano amplifikację mRNA  $\beta$ aktyny przy użyciu primerów 5' GTGGGCGCCCCAGGCACCA3' i 5' CTCCTTAATGTCACGCACGATTC3' oraz użyto jej jako wewnętrzna kontrola ilościowa PCR. Dla wykonania rt-PCR, t211 bp, produkty finalne, specyficzne dla BMP-4 zostały oddzielone poprzez elektroforezę w 7% żelu poliakrylamidowym z buforem TAE, przy użyciu markera 100bp DNA Ladder genetic (Promega). Paski zostały następnie uwidocznione światłem UV, a uzyskane wyniki sfotografowane i zanalizowane przy użyciu LKB Ultrascan XL Enhanced Laser Densitometer.

Do analizy statystycznej posłużono się współczynnikiem korelacji Spearmana (Statistica; Statsoft Inc. SN AXAP911E504325AR-K). Jest to test nieparametryczny, oceniający korelację między dwoma zmiennymi, z których chociaż jedna zmienna jest nieliniowa.

Badania uzyskały pozytywną opinię Komisji Bioetycznej, uchwała nr RNN/14/ 05/KB.

## WYNIKI

Zgodnie ze skalą Brooker'a 22 stawy biodrowe (34%) zostały zaklasyfikowane jako stopień 0, 19 (30%) jako I, 8 (12%) jako II stopień natomiast 12 stawów (19%) otrzymało stopień III. Zupełna ankyloza została zaobserwowana u 3 pacjentów tj. 5% badanych przypadków.

Średnia wartość ekspresji kształtowała się na poziomie 1,97, zakres między 0,451 do 6,62 (mediana 1,75). Związek z czasem obserwacji okazał się słaby i nieistotny statystycznie;  $\rho=0,124$ ,  $p=0,412$ . Średnia wartość ekspresji genu dla stopnia 0 skali Brookera wyniosła 0,72 (zakres 0,5 do 0,9), st. I – 1,6 (zakres 1,2 do 2,1), st. II – 2,1 (zakres 1,9 -2,5), st. III – 3,3 (zakres 2,3 do 4,9), dla st. IV wg Brookera średnia wyniosła 4,7, a zakres od 3,5 do 6,6. Stwierdzono silny pozytywny związek pomiędzy poziomem ekspresji genu BMP-4, a stopniem kostnienia pozaszkieletowego ( $\rho=0,946$  i  $p<0,0001$ ). Dla obu operowanych stron korelacja była niemalże wprost

trophotometry at 260 and 280 nm. The relative amount of specific messenger RNAs (mRNAs) was quantified by the rt-PCR technique. Polyadenylated RNA was isolated using an Oligotex kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA). An amount of 50 ng poly(A) RNA was used for the first strand cDNA synthesis with the SuperScript II RNase Transcriptase System (Invitrogen Life technologies, USA), using oligo (dT) 12-18 primers, following the manufacturer's instructions. The resulting cDNA was amplified using 5' TACCTGAGACGGGAAGAAA 3' and 5' CAAGACTGAAGCCGGTAAAG 3' 5', specific for the mRNA of human BMP-4. In the same samples,  $\beta$ -actin mRNA was amplified with 5' GTGGGCGCCCCAGGCACCA3' and 5' CTCCTTAATGTCACGCACGATTC3' primers and used as an intrinsic control of mRNA quantity in PCR amplification. For rt-PCR of t211 bp, the final products specific for BMP-4 were separated by electrophoresis in 7% polyacrylamide gels in a TAE buffer, using a 100 bp DNA Ladder genetic size marker (Promega). The bands were visualized by UV light and the results were photographed and analyzed densitometrically using an LKB Ultrascan XL Enhanced Laser Densitometer.

For statistical analysis, the Spearman's rank correlation test (Statistica; Statsoft Inc. SN AXAP911E-504325AR-K) was employed. It is a non-parametric test which evaluates correlations between two variables in which at least one parameter is not linear.

The study was approved by the Bioethical Commission at our institution (RNN/14/05/KB) before it was launched.

## RESULTS

According to the Brooker scale, 22 hip joints (34%) were classified as Brooker's grade 0; 19 hips (30%) as grade I; 8 hips (12%) as grade II and 12 hips (19%) as grade III. Total ankylosis was observed in 3 patients (5%).

The mean expression of BMP-4 genes was 1.97 (range: 0.451-6.62, median 1.75). Its correlation with the duration of follow-up was poor and non-significant;  $\rho=0.124$ ,  $p=0.412$ . Mean BMP-4 gene expression was 0.72 (range: 0.5-0.9) for Brooker class 0, 1.6 (range: 1.2-2.1) for Brooker I, 2.1 (range: 1.9-2.5) for Brooker II, 3.3 (range: 2.3-4.9) for Brooker III, and 4.7 (range: 3.5-6.6) for Brooker IV. A strong positive correlation was found between the expression of BMP-4 genes and the stage of ectopic bone formation ( $\rho=0.946$  and  $p<0.0001$ ). The correlation was close to being directly proportional for both sides on the body, with  $\rho$  values of 0.790 and 0.755 for the left and right side, respectively. Thus, higher

proporcjonalna;  $\rho = 0,790$  dla lewego i  $0.755$  dla prawego stawu biodrowego. Im większy poziom ekspresji genu dla BMP-4 tym na radiogramach obserwowany jest wyższy stopień kostnienia pozaszkieletowego.

Przeprowadzone badanie fizykalne oparte było na skali Harrisa, na tej podstawie uzyskano średnią wartość punktową dla badanych stawów na poziomie 96,8 punktów dla strony prawej i 95,16 dla lewej. Średni całkowity wynik wyniósł 96 pkt i wahał się między 82,5 a 100,5 pkt. Uwzględniając podział badanych stawów w zależności od stopnia kostnienia szkieletowego uzyskano dla stopnia 0 wg Brookera średni wynik na poziomie 96,5 pkt (zakres 82,5 do 100,5). Dla stopnia I uzyskano wartość średnią 95,5 pkt (82,5 do 100,5), dla st. II 92,1 (zakres 76,5 do 100,5), dla stopnia III 96,3 (zakres 85,5 do 100,5). U pacjentów ze stwierdzoną ankylozą uzyskano średnią wartość skali Harrisa 96,5 pkt z zakresem od 94,5 do 100,5. Nie stwierdzono związku między pomiarami według skali Harrisa a stopniem kostnienia pozaszkieletowego mierzonym według skali Brookera ( $\rho = -0,188$ ,  $p = 0,3$ ). Nie stwierdzono również silnej i statystycznie istotnej korelacji dla żadnej z grup wg skali Brookera

Ocena związku między funkcjonalnością stawu mierzoną za pomocą skali Harrisa a poziomami ekspresji genu BMP-4 nie wykazała istotnej statystycznej relacji ( $\rho = 0,1$ ,  $p = 0,6$ ).

Sprawdzono również wpływ czasu obserwacji na stopień kostnienia pozaszkieletowego i wyniki pomiarów według skali Harrisa. Dla powyższych parametrów nie wykazano istotnego statystycznie związku, dla poziomu ekspresji BMP-4  $\rho$  wyniosło 0,124, wartość  $p = 0,4$ , natomiast dla skali Harrisa  $\rho = 0,133$ , a  $p = 0,4621$ .

## DYSKUSJA

Wśród etiologii kostnienia pozaszkieletowego wyróżnia się urazy czaszkowo-mózgowe, oparzenia, zabiegi operacyjne, w tym alloplastyki stawów [2,5-7, 11,13,25]. Według Balboniego i wsp. zmiany te mogą być zapoczątkowane przez stymulacje wewnątrzchrzęstnej osteogenezy [5], procesu podlegającego regulacji przez między innymi takie czynniki jak tkankowe czynniki wzrostowe, interleukiny czy białka morfogenetyczne kości [3,5,18]. Komórki osteoprogenitorowe zostały wyizolowane w tkankach mysz poddanych urazom, jednakże nie poznano mechanizmów prowadzących do zaistnienia powyższych procesów [26]. W naszym badaniu wykazano, że poziom kostnienia pozaszkieletowego koreluje z ekspresją genów BMP-4 w krwi obwodowej. Już wcze-

BMP-4 expression was related to a higher HO grade demonstrated on the radiographs.

Our physical examination was based on the Harris Hip Score and yielded mean scores of 96.8 for the right hip joint and 95.16 for the left one. The mean total score was 96, with a range of 82.5-100.5. HHS values were also calculated for each Brooker's grade. Thus, the mean score was 96.5 (range: 82.5-100.5) for Brooker's class 0, 95.5 (range: 82.5-100.5) for grade I, 92.1 (range: 76.5-100.5) for grade II and 96.3 (range: 85.5-100.5) for grade III. Only 3 left hip joints with total ankylosis were identified with a mean HHS of 96.5 (range: 94.5-100.5). No correlation was found between HHS and Brooker grades ( $\rho = -0.188$ ,  $p = 0.3$ ). There was also no strong and significant correlation for each of Brooker's grades.

No statistically significant correlation was identified between hip function (HHS) and BMP-4 expression ( $\rho = 0.1$ ,  $p = 0.6$ ).

It was also tested if the follow-up had any influence on the grade of heterotopic ossification and on the HHS results. The correlation between BMP-4 expression levels and the duration of follow-up was not found to be statistically significant ( $\rho = 0.124$ ,  $p = 0.4$ ). The same was observed for the correlation between the duration of follow-up and HHS values ( $\rho = 0.133$ ,  $p = 0.4621$ ).

## DISCUSSION

The aetiology of heterotopic ossification can be traced to trauma to the central nervous system, burns and surgical procedures, including total hip arthroplasty [2,5-7,11,13,25]. Following Balboni et al., ectopic bone formation may be triggered by stimulation of endochondral osteogenesis [5], a process regulated by a number of factors, including tissue growth factors, interleukins and bone morphogenetic proteins [3,5,18]. Osteoprogenitor cells have been identified in tissues of traumatized mice; however, no signalling mechanisms have been identified that lead to this particular pathway [26]. Our study found a correlation between the level of ectopic bone formation and the expression of BMP-4 genes in peripheral blood. It was previously reported that the addition of

śniej opisywano, iż dodanie BMP do mięśni szkieletowych może powodować rozwój nieprawidłowej tkanki kostnej [18]. Udowodniono również, że zachwianie równowagi między cząsteczkami BMP, a ich inhibitorami, takim jak Gremlin i Noggin może również spowodować powstanie takich zmian [7,14,16]. Zgodnie z Hanallah i wsp., podanie Noggin może spowodować zatrzymanie heterotopowego kościotworzenia poprzez inhibicję BMP-4 w modelach zwierzęcych [7]. BMP-4 może również wpływać na formowanie się kości u królików, co wykazał Jiang i wsp. [20]. Dodać należy, że BMP-4 jest określany czynnikiem wzrostu o podwyższonej aktywności w przypadku fibrodysplasia ossificans progresiva [16,19,21]. Kim i wsp. dowiedli, że razem z beta-kateniną, osteopontyną, osteonektyną i osteokalcyną, BMP-4 może wpływać na powstanie idiopatycznej kalcyfikacji i ossyfikacji skóry [27]. Kan i wsp. wykazał, że substancja P znacznie podwyższa swój poziom we wczesnym etapie uszkodzenia tkanek u pacjentów z nabytym kostnieniem pozaszkieletowym, co potencjalnie może być związane z błędnym kołem neuroinfekcji (neuroinflammatory amplification circuit), zależnym od BMP-4 [26]. Jackson i wsp. określili istnienie innych interakcji w uszkodzonych mięśniach. Zidentyfikowali inne potencjalne drogi pobudzenia zależne od BMP-1 i TGF  $\beta$  [28].

Występowanie HO jest określane jako 5-30% przypadków, istnieją także badania wskazujące na obecność tego zjawiska u 15 do 90% pacjentów poddanych alloplastyce stawów biodrowych [7,9]. W naszym badaniu kostnienie pozaszkieletowe stwierdziliśmy na podstawie radiogramów u 66% pacjentów. Opisuje się, iż zupełna ankyloza stawu może dotyczyć nawet 10% przypadków, jednakże w naszym badaniu wystąpiła ona jedynie u 3 z 64 badanych stawów biodrowych [7,9]. Nie wykazaliśmy także żadnego związku między czasem minionym od zabiegu a wielkością kostnienia pozaszkieletowego.

Zgodnie z pracą Balboniego i wsp. w większości przypadków kostnienie pozaszkieletowe jest bezobjawowe [5]. Istnieją jednakże opisy innych autorów świadczące o tym, że HO może być odpowiedzialne za zmniejszoną satysfakcję z wyniku przebytej alloplastyki. Pacjenci po przebyciu THR oraz stwierdzonym kostnieniem pozaszkieletowym podają wynik dobry zabiegu w mniej niż 30% przypadków [6,10]. Niektóre badania wykazują znaczne pogorszenie zakresu ruchomości u pacjentów z kostnieniem pozaszkieletowym, ze szczególnym naciskiem na ruch zgięcia w danym stawie [10]. Inne badania wykazują, iż jedynie w przypadku stopnia III i IV skali Brookera upośledzona jest funkcja stawu [6,9,11,15]. W naszym badaniu użyliśmy HHS do oceny

BMPs to skeletal muscle could result in the development of abnormal bony tissue [18]. It is also known that a disturbance of the balance between BMPs and their inhibitors, such as Gremlin and Noggin, may also induce this process [7,14,16]. According to Hanallah et al., administration of Noggin can halt HO by inhibiting BMP-4, at least in animal models [7]. BMP-4 may also induce bone formation in rabbits, as shown by Jiang et al. [20]. BMP-4 is considered a growth factor, with elevated levels in fibrodysplasia ossificans progresiva [16,19,21]. Also, Kim et al. proved that BMP-4, together with beta-catenin, osteopontin, osteonectin and osteocalcin, may be involved in idiopathic cutaneous calcification and ossification [27]. Kan et al. found that Substance P levels were dramatically increased in early tissue damage in patients with acquired HO, potentially reflecting a BMP-dependent neuro-inflammatory amplification circuit for HO lesions [26]. Jackson et al. identified other cell and tissue-level interactions in injured muscles. They identified other potential up-regulation pathways related to BMP-1 and TGF  $\beta$  [28].

Heterotopic ossification is diagnosed in 5-30% patients, but certain studies have demonstrated its presence in 15-90% of post-THR patients [7,9]. In our study, HO was diagnosed in radiographs of 66% of the operated patients. Total joint ankylosis may occur even in 10% of affected cases [7,9]. However, in our study, only 3 ankylotic patients were found, against the total of 64 examined hips. We also did not find any correlation between HO grade and the duration of follow-up.

According to Balboni et al., HO is, in most cases, asymptomatic, while other authors claim HO to be responsible for lower-than-expected patient satisfaction after THA [5]. Less than 30% of patients with a hip prosthesis and HO assess their surgical outcome as good [6,10]. Some studies show a significantly decreased ROM in patients with HO, especially with regard to hip joint flexion [10], while other reports indicate that only grades III and IV may affect joint function [6,9,11,15]. Our study used the Harris Hip Score to assess joint function, with ROM values converted into scores. No correlation was identified between Harris Hip Scale scores and Brooker's grades of HO or between HHS and BMP-4 expression. A small decrease was observed in left hip HHS scores only for grade II, but it was not statistically significant. Although some authors claim that HO may induce total ankylosis and significantly reduce ROM [5,16,25], no significant changes in HHS scores were observed in our group, even in grade IV joints. Similar findings were noted by Eimstedt et al. in 1985 [25]. Koczy et al. found that this complication is

funkcjonalności stawu biodrowego przeliczając stopnie kątowe na punkty. Nie stwierdziliśmy związku między uzyskaną punktacją według HHS, a stopniem kostnienia pozaszkieletowego wg skali Brookera, a także między HHS i ekspresją genów dla BMP-4. Tylko dla stopnia II wg Brookera zauważono nieznacznie zmniejszone wartości pkt wg skali Harrisa, niemniej nie były one istotne statystycznie. Pomimo, iż część autorów dowodzi, że kostnienie pozaszkieletowe może doprowadzić do zupełnej ankylozy stawu, przez co znacznie ograniczyć zakres ruchomości [5,16,25]. Nie stwierdzono w naszym badaniu znacznych zmian w HHS nawet dla stopnia IV. Podobne obserwacje poczynił Eimstedt i wsp. w 1985 roku [25]. Koczy i wsp. zauważyli, że powikłanie to częściej występuje u pacjentów, którzy mieli wcześniejsze zabiegi operacyjne i brak profilaktyki lekami przeciwbólowymi i przeciwzapalnymi [29]. Zarzycka i wsp. wykazali skuteczność radioterapii w leczeniu tego powikłania [30].

Uważamy, że wpływ kostnienia pozaszkieletowego na funkcję operowanego stawu pozostaje nadal niejasny i kontrowersyjny. Zgodnie z powyższym sugerujemy, iż w ocenie wyniku alloplastyki stawu biodrowego mniejszy nacisk powinno się kłaść na ocenę wartości kątowych zakresu ruchu, a bardziej zwracać uwagę na indywidualną ocenę satysfakcji i ocenę funkcjonalną pacjenta.

Potwierdzamy, że poziom ekspresji genu BMP-4 silnie koreluje ze stopniem kostnienia pozaszkieletowego wg Brookera, co może dowodzić roli tego genu w etiologii kostnienia pozaszkieletowego. Wzrost ekspresji tego genu może mieć wpływ na kształtowanie się ektopowej tkanki kostnej po zabiegach alloplastyki, jednakże wymaga to dalszego potwierdzenia.

## WNIOSKI

1. Poziom ekspresji BMP-4 silnie koreluje z wielkością kostnienia pozaszkieletowego, co może wskazywać na jego rolę w etiologii tego schodzenia.
2. Nadmierna ekspresja BMP-4 może przyczynić się do powstawania kostnienia pozaszkieletowego po alloplastyce stawu biodrowego.

## PIŚMIENICTWO / REFERENCES

1. Ackerman LV. Extra-osseous localized non-neoplastic bone and cartilage formation (so-called myositis ossificans): clinical and pathological confusion with malignant neoplasms. *J Bone Joint Surg Am* 1958; 40: 279
2. Chauveau C, Devedjian JC, Blary MC, Delecourt C, Hardouin P, Jeanfils J, Broux O. Gene expression in human osteoblastic cells from normal and heterotopic ossification. *Exp Mol Pathol* 2004; 76: 37
3. Knelles D, Barthel T, Karrer A, Kraus U, Eulert J, Kölbl O. Prevention of heterotopic ossification after total hip replacement. A prospective, randomised study using acetylsalicylic acid, indomethacin and fractional or single-dose irradiation. *J Bone Joint Surg Br* 1997; 79: 596
4. Déjerine Y, Ceiller A. Para ostéoarthropathies des paraplégiques par lesion médullaire. *Rev Neurol* 1919; 32: 399
5. Balboni TA, Gobezie R, Mamon HJ. Heterotopic ossification: Pathophysiology, clinical features, and the role of radiotherapy for prophylaxis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 65: 1289

more common in hips that had previous surgeries and had no NSAID prophylaxis [29]. Zarzycka et al. demonstrated the value of radiotherapy in the prevention of heterotopic ossification [30].

In our opinion, the link between HO and function in the THR hip still remains unclear and controversial. Accordingly, we propose that ROM values should not be emphasised in the evaluation of THR outcomes and that more attention be paid to patient satisfaction and joint function.

We confirm that BMP-4 expression strongly correlates with HO grade measured by Brooker's scale and may play a role in the aetiology of this condition. Over-expression of BMP-4 may influence ectopic bone formation after total hip arthroplasty, but this assumption needs to be confirmed further studies.

## CONCLUSIONS

1. BMP-4 expression strongly correlates with HO as measured by Brooker's scale and may play a role in the aetiology of this condition.
2. The over-expression of BMP-4 may exert a certain influence on ectopic bone formation after total hip arthroplasty.

6. van der Heide HJ, Spruit M, Slappendel R, Klooster N, van Limbeek J. Prophylaxis for heterotopic ossification after primary total hip arthroplasty. A cohort study between indomethacin and meloxicam. *Acta Orthop Belg* 2004; 70: 240
7. Hannallah D, Peng H, Young B, Usas A, Gearhart B, Huard J. Retroviral delivery of Noggin inhibits the formation of heterotopic ossification induced by BMP-4, demineralized bone matrix, and trauma in an animal model. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86: 80
8. Saudan M, Saudan P, Perneger T, Riand N, Keller A, Hoffmeyer P. Celecoxib versus ibuprofen in the prevention of heterotopic ossification following total hip replacement: a prospective randomised trial. *J Bone Joint Surg Br* 2007; 89: 155
9. Brooker AF, Bowerman JW, Robinson RA, Riley LH Jr. Ectopic ossification following total hip replacement. Incidence and a method of classification. *J Bone Joint Surg Am* 1973; 55: 1629
10. Pohl F, Seufert J, Tauscher A, Lehmann H, Springorum HW, Flentje M, Koelbl O. The influence of heterotopic ossification on functional status of hip joint following total hip arthroplasty. *Strahlenther Onkol* 2005; 181: 529
11. Grzegorzewski A, Kozłowski P, Synder M. Heterotopic ossification as a complication of total hip replacement. *Chir Narządow Ruchu Ortop Pol* 2000; 65: 255.
12. Persson PE, Sodemann B, Nilsson OS. Preventive effects of ibuprofen on periarticular heterotopic ossification after total hip arthroplasty. A randomized double-blind prospective study of treatment time. *Acta Orthop Scand* 1998; 69: 111
13. Sell S, Willms R, Jany R, Esenwein S, Gaissmaier C, Martini F, Bruhn G, Burkhardtsmaier F, Bamberg M, Küsswetter W. The suppression of heterotopic ossifications: radiation versus NSAID therapy—a prospective study. *J Arthroplasty* 1998; 13: 854
14. Kaplan FS, Glaser DL, Hebela N, Shore EM. Heterotopic ossification. *J Am Acad Orthop Surg* 2004; 12: 116
15. Kocic M, Lazovic M, Mitkovic M, Djokic B. Clinical significance of the heterotopic ossification after total hip arthroplasty. *Orthopedics* 2010; 33: 16
16. Glaser DL, Economides AN, Wang L, Liu X, Kimble RD, Fandl JP, Wilson JM, Stahl N, Kaplan FS, Shore EM. In vivo somatic cell gene transfer of an engineered Noggin mutein prevents BMP4-induced heterotopic ossification. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85: 2332
17. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965; 150: 893
18. Kotajima S, Kishimoto KN, Watanuki M, Hatori M, Kokubun S. Gene expression analysis of ectopic bone formation induced by electroporatic gene transfer of BMP4. *Ups J Med Sci* 2006; 111: 231
19. Shafritz AB, Shore EM, Gannon FH, Zasloff MA, Taub R, Muenke M, Kaplan FS. Overexpression of an osteogenic morphogen in fibrodysplasia ossificans progressiva. *N Engl J Med* 1996; 335: 555
20. Jiang XQ, Chen JG, Gittens S, Chen CJ, Zhang XL, Zhang ZY. The ectopic study of tissue-engineered bone with hBMP-4 gene modified bone marrow stromal cells in rabbits. *Chin Med J (Engl)* 2005; 118: 281
21. Feldman G, Li M, Martin S, Urbanek M, Urtizberea JA, Fardeau M, LeMerrer M, Connor JM, Triffitt J, Smith R, Muenke M, Kaplan FS, Shore EM. Fibrodysplasia ossificans progressiva, a heritable disorder of severe heterotopic ossification, maps to human chromosome 4q27-31. *Am J Hum Genet* 2000 Jan; 66: 128
22. Kaplan FS, Shore EM. Progressive osseous heteroplasia. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 2084
23. Harris WH. Traumatic arthritis of the hip after dislocation and acetabular fracture: treatment by mold arthroplasty. An end-result study using a new method of result evaluation. *J Bone Joint Surg Am* 1969; 51: 737
24. Chomczynski P, Sacchi N. Single – step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate – phenol – chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156
25. Elmstedt E, Lindholm TS, Nilsson OS, Törnkqvist H. Effect of ibuprofen on heterotopic ossification after hip replacement. *Acta Orthop Scand* 1985; 56: 25
26. Kan L, Lounev VY, Pignolo RJ, Duan L, Liu Y, Stock SR, McGuire TL, Lu B, Gerard NP, Shore EM, Kaplan FS, Kessler JA. Substance P signaling mediates BMP-dependent heterotopic ossification. *J Cell Biochem* 2011; 112: 2759
27. Kim SY, Choi HY, Myung KB, Choi YW. The expression of molecular mediators in the idiopathic cutaneous calcification and ossification. *J Cutan Pathol* 2008; 35: 826
28. Jackson WM, Aragon AB, Onodera J, Koehler SM, Ji Y, Bulken-Hoover JD, Vogler JA, Tuan RS, Nesti LJ. Cytokine expression in muscle following traumatic injury. *J Orthop Res* 2011; 29: 1613
29. Koczy B, Stołtny T, Swiderski M, Pyda M, Pajak J, Spindel J, Wawrzynek W, Miszczyk L, Kasperczyk S, Widuchowski J. Heterotopic ossification in patients with hip osteoarthritis below forty years old after total hip replacement. *Ortop Traumatol Rehabil* 2009; 11: 458.
30. Zarzycka M, Reszke J, Windorbska W, Ziółkowska E. Radiotherapy in the prevention of heterotopic ossification after arthroplasty. *Ortop Traumatol Rehabil* 2002; 4: 230.

---

Liczba słów/Word count: 5325

Tabele/Tables: 0

Ryciny/Figures: 0

Piśmiennictwo/References: 30

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Dr hab. med. Marcin Sibiński

Klinika Ortopedii i Ortopedii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
Łódź, 91-002, ul. Drewnowska 75, tel/fax: (42) 256-35-02, e-mail: sibi@poczta.onet.pl

Otrzymano / Received 02.11.2012 r.  
Zaakceptowano / Accepted 19.02.2013 r.