NIH Public Access
Author Manuscript
Expert Opin Orphan Drugs. Author manuscript; available in PMC 2014 August 01.

Published in final edited form as:
Expert Opin Orphan Drugs. ; 1(8): 637–649. doi:10.1517/21678707.2013.825208.

From mysteries to medicines: drug development for fibrodysplasia ossificans progressive

Frederick S. Kaplan, M.D.[1,2,4], **Robert J. Pignolo, M.D., Ph.D.**[1,2,4], and **Eileen M. Shore, Ph.D.**[1,3,4]

[1]Department of Orthopaedic Surgery, The Perelman School of Medicine at The University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104

[2]Department of Medicine, The Perelman School of Medicine at The University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104

[3]Department of Genetics, The Perelman School of Medicine at The University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104

[4]The Center for Research In FOP and Related Disorders; The Perelman School of Medicine at The University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104

Abstract

Introduction: Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) is the most disabling disorder of skeletal metamorphosis in humans and leads to the formation of a second skeleton of heterotopic bone. Presently, there is no effective treatment.

Areas covered: In this review, the authors discuss heterozygous activating mutations in Activin receptor A, type I/ Activin-like kinase 2 (ACVR1/ALK2), a bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor that are the genetic cause of FOP and reveal a promising pharmacologic target in the BMP signaling pathway. Despite these germline mutations, episodic disease activation is induced by soft tissue injury and resultant inflammatory triggers that are dependent on responding progenitor cells and a tissue microenvironment that supports heterotopic ossification.

Expert opinion: Here we review opportunities and challenges for the development of effective therapeutics for FOP. There are many potential approaches that may eventually be used to harness FOP. The long-term treatment of FOP is likely to involve not one, but several concomitant approaches that acknowledge molecular mechanisms involved in the induction and progression of the disease.

Keywords

Bone morphogenetic protein receptors; Fibrodysplasia ossificans progressiva; Heterotopic endochondral ossification; Skeletal metamorphosis

Correspondence to: Frederick S. Kaplan, M.D. Isaac & Rose Nassau Professor of Orthopaedic Molecular Medicine The Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania C/o The Department of Orthopaedic Surgery Hospital of the University of Pennsylvania Silverstein 2 3400 Spruce Street Philadelphia, PA 19104 Telephone: 215-349-8726 Fax: 215-349-5298 frederick.kaplan@uphs.upenn.edu.

Declaration of interests
The authors have no further competing interests to declare.

NIH-PA Author Manuscript
NIH-PA Author Manuscript
NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

1. THE CLINICAL BACKGROUND OF FOP

1.1 The Natural History of FOP

Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP; MIM #135100) is the most catastrophic disorder of skeletal metamorphosis in humans and leads to the formation of a second skeleton of heterotopic bone [1-4]. Two invariant clinical features define classic FOP - congenital malformations of the great toes and progressive heterotopic endochondral ossification (HEO) [1-4]. Individuals with FOP appear normal at birth except for characteristic malformations of the great toes which are present in all classically affected individuals. During the first decade of life, episodic soft tissue swellings (or flare-ups) arise, usually in the neck or back. While some flare-ups regress spontaneously, most undergo pathological metamorphosis into mature heterotopic bone. Ribbons, sheets, and plates of heterotopic bone replace skeletal muscles and connective tissues through HEO and lead to an armament-like encasement of bone with permanent immobility [1-4]. Minor trauma such as intramuscular immunizations, mandibular blocks for dental work, muscle fatigue, blunt muscle trauma from bumps, bruises, falls, or influenza-like viral illnesses can trigger new flare-ups of FOP leading to progressive HEO [5-8].

Heterotopic ossification in FOP progresses in characteristic anatomic and temporal patterns, typically occurring first in the dorsal, axial, cranial, and proximal regions of the body and later in the ventral, appendicular, caudal, and distal regions [9, 10]. Several skeletal muscles including the diaphragm, tongue, and extra-ocular muscles, as well as cardiac and smooth muscle, are spared from HEO [1-4].

Bone formation in FOP is episodic, but disability is cumulative [10]. Most patients are confined to a wheelchair or are immobilized in a standing position by the third decade of life, and require lifelong assistance to perform activities of daily living [9, 10]. Severe weight loss may result following ankylosis of the jaw. Pneumonia or right-sided heart failure may complicate rigid fixation of the chest wall [11, 12]. The median survival age is 40 years; death often results from complications of thoracic insufficiency syndrome [13].

1.2 Radiographic Features of FOP

While malformation of the great toes is characteristic of FOP, other developmental anomalies are frequently observed. Characteristic anomalies of the cervical spine have been well-described [14], as well as scoliosis [15]. Other skeletal anomalies associated with FOP include malformed thumbs, short broad femoral necks, dysplasia of the hips, proximal medial tibial osteochondromas, and asymmetric ankylosis of the costo-vertebral joints [2, 16-18]. While plain radiographs are sufficient for following progression of the disease [17-19], changes have been described on magnetic resonance imaging at different stages of lesional progression [20]. Interestingly, fractures heal robustly in FOP patients [21].

1.3 The Histopathology of FOP

The histopathology of FOP lesions has been well-described [22-25]. Early FOP lesions contain intense mononuclear and perivascular infiltrates. Subsequent migration of

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

mononuclear inflammatory cells into affected muscle precedes widespread death of skeletal muscle [24, 26].

Following a rapid and destructive inflammatory stage, there is an intense angiogenic, fibroproliferative phase, histologically indistinguishable from aggressive juvenile fibromatosis, but replete with BMP2/4 expression in lesional cells [27]. Fibroproliferative tissue undergoes a predictable metamorphosis to bone through HEO (Figure 1). The resultant new ossicle of heterotopic bone is histologically normal and contains marrow elements [22, 24, 28].

Mast cells have been identified at every histological stage of FOP lesion formation. During the fibroproliferative stage, mast cells are found at a higher density than in any other inflammatory myopathy [29]. Recent studies suggest that neuroinflammatory signals also play an important role in the pathophysiology of the disease [30, 31].

Inflammatory cells of hematopoietic origin are associated with the induction of heterotopic ossification [28] and contribute to vasculogenesis in the late osteogenic stage [32], while multipotent Tie2+ stem-like cells of vascular, perivascular, or muscle interstitium origin contribute to the fibroproliferative, chondrogenic and osteogenic stages of heterotopic ossification [33-35].

The innate immune system is involved in the induction of FOP flare-ups [6, 28, 36]. Recent studies in mouse models of FOP strongly support the role of the innate immune system in inducing heterotopic ossification [37-41].

1.4 Biomarkers in FOP

Disease-specific and stage-specific biomarkers for FOP are lacking. Routine biochemical evaluations of bone mineral metabolism are normal, although the erythrocyte sedimentation rate (ESR) and serum alkaline phosphatase activity may be increased, especially during early and late disease flare-ups, respectively [42]. Urinary basic fibroblast growth factor levels may be elevated during disease flare-ups, coinciding with the angiogenic phase of early fibroproliferative lesions [43]. Circulating osteogenic cells also herald early heterotopic bone formation, but remain a research tool [32].

1.5 Diagnosis and Misdiagnosis of FOP

FOP is commonly misdiagnosed as aggressive juvenile fibromatosis, lymphedema, or soft tissue sarcoma [44]. Clinicians often fail to associate the rapidly developing soft tissue swellings that appear on the head, neck, and upper back with the malformed great toes. The misdiagnosis of FOP approaches 90 per cent of affected individuals worldwide [44]. Children often undergo unnecessary and harmful diagnostic biopsies that exacerbate the progression of the condition [44]. The definitive diagnosis of FOP can be made by simple clinical evaluation that associates rapidly appearing soft tissue lesions with malformations of the great toes [2, 3, 19]. Genetic confirmation can follow [45].

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

1.6 Epidemiology and Genetics of FOP

FOP is rare with a worldwide prevalence of approximately one in two million individuals. There is no ethnic, racial, gender, or geographic predisposition [46]. Most cases arise as a result of a spontaneous new mutation. A paternal age effect has been reported [47]. When observed, genetic transmission is autosomal dominant and can be inherited from either mothers or fathers [46, 48]. Maternal mosaicism may exist [49]. Fewer than ten small multigenerational families are known worldwide [46]. Phenotypic heterogeneity is observed [49].

Both genetic and environmental factors affect the phenotype of FOP. A study of three pairs of monozygotic twins with FOP found that within each pair, congenital toe malformations were identical. However, postnatal heterotopic ossification varied greatly depending on life history and environmental exposure to viral illnesses and to soft tissue trauma. Genetic determinants strongly influence disease phenotype during prenatal development while environmental factors strongly influence postnatal progression of heterotopic ossification [50].

Definitive genetic testing of FOP is available and can confirm a diagnosis of FOP prior to the appearance of heterotopic ossification. Clinical suspicion of FOP can lead to early clinical diagnosis, confirmatory diagnostic genetic testing (if appropriate), and the avoidance of harmful diagnostic and treatment procedures [45]. Clinicians should be cognizant of the early diagnostic signs of FOP which are congenital malformation of the great toes and episodic soft tissue swelling even before the appearance of heterotopic ossification [2, 3, 45]. This awareness should prompt genetic consultation and testing (if appropriate) and the institution of assiduous precautions to prevent injury and iatrogenic harm [45].

1.7 Current Symptomatic Treatment of FOP

There is no established medical treatment for FOP [3]. Medical management is currently supportive [51]. High dose glucocorticoids have a limited use in the management of the early inflammatory flare-ups [51]. The disorder’ s rarity, variability, and fluctuating clinical course pose substantial uncertainties when evaluating experimental therapies [52]. Bone marrow transplantation is ineffective, since even a normal immune system may trigger FOP flare-ups in a genetically susceptible chimeric host [28].

Removal of FOP lesions is often followed by recurrence. Surgical release of joint contractures has been unsuccessful and risks new, trauma-induced HEO. Spinal bracing is ineffective and surgical intervention is associated with numerous complications [15]. Dental therapy should preclude mandibular blocks and stretching of the jaw [51]. Guidelines for the administration of anesthetics are available [51]. While physical therapy to maintain joint mobility may be harmful by provoking or exacerbating lesions, occupational therapy is often helpful [51]. Intramuscular injections should be avoided. Prevention of falls, influenza, recurrent pulmonary infections, and complications of restricted chest wall disease is vital [51]. Hearing can be affected and audiology evaluations are encouraged, especially during childhood [53].

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

2. THE BASIC SCIENCE BACKGROUND OF FOP

The discovery of the genetic cause of FOP in 2006 immediately identified ACVR1/ALK2 as druggable target and led to investigations of initiating triggers, progenitor cells, and microenvironmental factors that are critical for disease activation and progression [54-56]. Most importantly, the identification of the FOP gene enabled the development of high-fidelity knock-in mouse models of classic FOP that are essential for pre-clinical drug testing [39, 40].

2.1 FOP & the BMP Signaling Pathway

The classic FOP phenotype of great toe malformations and progressive HEO suggested that the primary molecular pathology might involve the bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway [57]. A number of seminal studies provided evidence of profound dysregulation of the BMP signaling pathway in cells from FOP patients [24, 25, 27, 58-65].

2.2 The FOP Gene

Functional signaling studies and positional cloning identified the gene encoding activin receptor A, type I/activin-like kinase 2 (ACVR1/ALK2), a BMP type I receptor, as the FOP gene [54]. A recurrent heterozygous missense mutation in the glycine-serine (GS) activation domain (c.617G>A;R206H) was identified in all classically affected individuals with sporadic or familial FOP and comprises approximately 97 percent of all known FOP patients worldwide [18, 54]. Recently, additional mutations have been identified in the GS domain and kinase domain of ACVR1 in individuals with atypical forms of FOP, which are approximately three percent of all known FOP patients worldwide [18, 66-74].

2.3 Structural and Functional Consequences of the FOP Mutation

Protein homology modeling of the mutated ACVR1/ALK2 receptor predicts destabilization of the GS activation and/or Smad binding domain as the underlying cause of the ectopic chondrogenesis, osteogenesis, and joint fusions seen in FOP [54, 75-77]. Crystallographic and biochemical analysis of ACVR1/ALK2 has led to a more detailed understanding of inter- and intramolecular interactions of the mutant receptor. Evidence supports that the FOP mutation leads to allosteric destabilization of an inactive receptor conformation and the resultant loss of autoinhibition that occurs in all FOP genotypes [63, 76-81].

2.4 Animal Models of FOP

High-fidelity mouse models of FOP are necessary for pre-clinical testing. Presently, there are five mouse models of HEO associated with BMP signaling: implantation of native or recombinant BMP protein into skeletal muscle [82, 83], viral-mediated expression of BMP2 in skeletal muscle [84], transgenic over-expression of BMP4 expression under the control of a nerve specific promoter [37], a constitutively active ACVR1 mutation that does not exist in any known FOP patient but can induce heterotopic bone formation [85], and a knock-in animal model of classic FOP [39, 40]. Conventional knock-in mice [39, 40], however, cause lethality in a high percentage of chimeras, thus conditional strategies are necessary.

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

Clearly, the most useful mouse model for FOP would be a knock-in model of classic FOP. This is particularly important in order to answer a myriad of clinically-relevant questions for examining drug treatment strategies: Is the drug effective once a flare-up occurs? Can the drug be stopped without a rebound effect? What is the proper window for treating an FOP flare-up? What is the correct dosage and duration for treating an FOP flare-up? Is the medication effective for spontaneous as well as trauma-induced flare-ups? What are the potential short and long-term side-effects of FOP treatment in the context of the classic mutation? Until such questions are answered, effective clinical trials cannot safely be designed. Presently, with the newer animal models, these questions can and are being addressed.

3. APPROACHES AND OPPORTUNITIES FOR THE TREATMENT OF FOP

Definitive treatments and cures are not yet available for FOP, and there is a critical unmet need for such development. The discovery of the FOP gene and emerging insights into its mechanisms of action reveal at least four approaches to the treatment and/or prevention of FOP:

1. Blocking activity of the mutant receptor (ACVR1/ALK2) that causes increased BMP pathway signaling (through four possible strategies which include: monoclonal antibodies, signal transduction inhibitors (STIs), inhibitory RNA, and secreted antagonists).
2. Inhibiting triggers of FOP flare-ups.
3. Directing FOP stem cells to an alternate tissue fate other than cartilage or bone.
4. Blocking the body’ s response to microenvironmental signals that promote the formation of FOP lesions.

3.1 Approach 1: Blocking activity of the mutant receptor (ACVR1/ALK2) that causes increased BMP pathway signaling. (Four possible strategies include: monoclonal antibodies, signal transduction inhibitors (STIs), inhibitory RNA, and secreted antagonists.)

The discovery of the FOP gene identified ACVR1/ALK2 as a pharmacologic target for the treatment of FOP [54, 55]. Therapeutic strategies for inhibiting BMP signaling in FOP include inhibitory RNA technology to knock-down the mutant allele, blocking monoclonal antibodies directed against ACVR1/ALK2, orally administered small molecule signal transduction inhibitors (STIs) of ACVR1/ALK2, and secreted antagonists for BMP signaling.

3.1.1 Signal Transduction Inhibitor (STI strategy)—STIs are important molecular tools for studying BMP signaling in FOP, and have the potential to be developed into powerful therapeutic drugs for FOP [41, 86]. Several years ago, Dorsomorphin (Compound C) was identified in a screen for STIs that perturb BMP-regulated embryonic pattern formation in zebrafish [87]. Dorsomorphin and its derivatives (including LDN193189) inhibit all type I BMP receptors (ALK2, ALK3, and ALK6), and block downstream BMP-signaling [86]. However, a safe and effective STI for FOP must preferentially inhibit

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

ACVR1/ALK2 (the FOP gene) over ALK3 and ALK6, rather than completely blocking all BMP signaling, and must not affect other critical cellular receptors. Such highly-selective STIs are being developed [88, 89]. STIs designed to specifically block ACVR1/ALK2 must have specificity, efficacy, minimal or absent resistance, acceptable safety profiles, and be shown to lack toxic rebound effects before they can enter clinical trials for FOP.

Further extensive testing in animal models of classic FOP will be necessary to more completely evaluate potential efficacy, safety, dosage, duration, timing, treatment window and rebound issues.

3.1.2 Monoclonal Antibody Strategy—Although the mutated ACVR1/ALK2 receptor in FOP demonstrates leaky BMP signaling, it also exhibits ligand responsiveness and thus the opportunity for developing blocking antibodies to ACVR1/ALK2 in the prevention and treatment of FOP. The opportunities to develop monoclonal antibodies that are specific for ACVR1/ALK2 make this approach particularly appealing. Work is presently underway in this area of therapeutics.

3.1.3 Small Inhibitory RNA (a cellular RNA strategy)—A novel proof-of-principal approach using siRNA to specifically block the mutant FOP allele has been described. In two recent studies, the authors generated specific inhibitory RNA duplexes capable of suppressing the expression of the mutant copy of the gene in connective tissue progenitor cells from FOP patients and importantly show that this approach decreased the elevated BMP signaling in FOP cells to levels observed in control cells [72, 90]. The cells used in one of the studies were adult stem (or progenitor) cells obtained directly from deciduous teeth of FOP patients and thus preserve the exact stoichiometry of mutated and normal ACVR1/ALK2 receptors found in all classically affected FOP patients worldwide [90].

While this approach provides proof-of-principle for the use of allele-specific inhibition of ACVR1/ALK2 in the treatment of FOP, the *in vivo* utility of this approach must be confirmed in mouse models of classic FOP. Additionally, other hurdles impair human application at the present time, most notably safe delivery of the small RNA duplexes to cells in the human body.

3.2 Approach #2: Blocking Inflammatory Triggers

Several mouse models of heterotopic ossification strongly support roles for inflammation in triggering FOP flare-ups and heterotopic ossification [28, 30, 33, 37, 38, 41]. In one study, local muscle inflammation was sufficient to induce heterotopic ossification in a transgenic mouse model in which BMP4 was over-expressed at the neuromuscular junction [37]. In a related study, the activity of circulating monocytes and tissue macrophages was inhibited pharmacologically and genetically and found to substantially abrogate heterotopic ossification [38]. In another *in vivo* study, the activation of inflammatory pathways in a constitutively active ACVR1/ALK2 mouse model led to heterotopic ossification at sites of inflammation, whereas activation of the mutant ACVR1/ALK2 gene alone did not [41]. Together, these findings strongly support that an inflammatory microenvironment enables heterotopic ossification in the setting of dysregulated BMP signaling.

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

In FOP and related common disorders of acquired heterotopic ossification, sensory nerves regulate the innate immune system and amplify the formation of heterotopic bone [30, 31]. Substance P (SP), an 11 amino acid neurotransmitter and potent neuroinflammatory protein, plays a key role in this metamorphosis, and provides a critical link between the sensory branch of the nervous system and the innate immune system in the induction and amplification of heterotopic ossification [30, 31].

TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) cationic channel receptors are located on the sensory nerve endings in muscle and other soft connective tissue and are stimulated by soft tissue injury. Heterotopic ossification is induced when the signal reaches the dorsal root ganglia and triggers sensory neurons to release SP which is transported to nerve ending in the injured muscle where it binds to SP receptors (NK1R) on tissue mast cells. Once bound to the mast cells, SP triggers the release of inflammation-inducing and edema-causing chemicals that intensify the innate inflammatory response and amplify the heterotopic ossification [30, 31].

Experiments in mice show that blocking any major signaling hub in the sensory pathway - the TRPV1 ion channel, the dorsal root ganglion cells, the preprotachykinin (PPTA) gene that encodes SP, the neurokinin (NK1R) 1 receptor for SP, the tissue mast cells that express NK1R, or the c-kit gene (required for mast cell development) – profoundly abrogates heterotopic ossification [31].

3.3 Approach #3: Blocking Responding Connective Tissue Progenitor Cells

Retinoids, used for the treatment of acne, are known to cause skeletal birth defects because they interfere with the formation of the cartilaginous scaffold on which the embryonic skeleton is built [91]. The idea of using retinoids to treat FOP flare-ups was simple, and elegant: if retinoids caused birth defects by disrupting the formation of the cartilaginous scaffold of the normal skeleton, perhaps they might retard the formation of HEO in FOP [91].

In the mid-1980s, a clinical trial of isotretinoin (13-cis-retinoic acid; accutane) was conducted for the prevention of FOP flare-ups [91]. Although the outcome of the clinical trial was equivocal, the idea of using a retinoid to prevent or treat FOP flare-ups was far ahead of its time. Over the past 30 years, nuclear retinoid receptors have been discovered, and specific agonists that possess far greater specificity than isotretinoin have been developed.

A novel approach to inhibit heterotopic ossification, not prior to induction, but rather, after the commencement of building a second skeleton has been reported [92]. In their landmark study, Shimono et al. show that the early chondrogenic stage of the pre-osseous scaffold is exquisitely sensitive to the inhibitory effects of retinoic acid receptor gamma (RARγ). By using compounds that specifically activate the RARγ receptor, the authors critically targeted the pre-cartilage and cartilage cells that follow from the inflammatory start signals and that are used as the scaffold to form mature heterotopic bone. In their mouse experiments, the authors employ a comprehensive approach using implanted stem cells, BMP induction of HEO, and a conditional transgenic mouse that forms FOP-like HEO and show that RARγ

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

agonists potently inhibit HEO. Remarkably, when the RARγ agonists are stopped, no significant rebound effect occurs, indicating that the RARγ agonist effect may be irreversible [92].

Importantly, the authors showed that this class of compounds is effective in inhibiting HEO in animal models during a wide treatment window that includes the pre-cartilage mesenchymal stem cell phase, up to, but not including, the bone formation phase [92, 93]. These findings suggest that the successful inhibition of HEO in patients may be possible even after the clinically elusive induction phase has occurred. Most remarkably, the authors showed that this class of compounds may actually redirect cell fate decisions in mesenchymal stem cells to a non-bone lineage, an observation with wide-reaching implications for skeletal oncology, vascular biology, and tissue engineering [92, 93]. Taken together, the authors identified a potent, orally available class of compounds that can prevent HEO in animal models by inhibiting the cartilage scaffold, and by diverting stem cells to a more benign soft tissue fate while avoiding the rebound phenomena seen in other classes of experimental medications. The authors showed that the RARγ agonists potently and irreversibly down-regulate BMP signaling by promoting the degradation of phosphorylated BMP-pathway specific Smads [92, 93].

The beauty of this approach is that it does not broadly target the BMP signaling pathway in many tissues in the body, but instead targets a specific pathological process of tissue development (cartilaginous scaffold formation) that requires the BMP signaling pathway to cause disabling disease (Figure 2). Thus, it has the desired features of targeting the molecular basis for FOP in the very cells that form HEO, hopefully with minimal collateral damage [92, 93].

3.4 Approach #4: Altering the Physiologic Response to Conducive Microenvironments that Promote Heterotopic Ossification

Generation of a hypoxic microenvironment in skeletal muscle has recently been shown to be a critical step in the formation of heterotopic bone in a mouse model [94]. To better understand the physiological implications of hypoxia in the context of the FOP mutation, we tested the hypothesis that a hypoxic microenvironment enhances signaling through the mutant ACVR1/ALK2 receptor and demonstrated that BMP signaling was both enhanced and prolonged in the presence of the canonical ACVR1/ALK2 (R206H) mutation under hypoxic conditions compared to normoxic conditions [56]. Ongoing work supports a role for hypoxia in BMP-induced heterotopic ossification. Preliminary studies indicate that blocking the response to hypoxia abrogates the resultant HEO.

4. CONCLUSION

Flare-ups of FOP are sporadic and unpredictable, and there is great individual variability in the rate of disease progression. Several large studies on the natural history of FOP have confirmed that it is impossible to predict the initiation, duration, or severity of an FOP flare-up, although characteristic anatomic patterning has been described [9, 10]. The rarity of FOP and the unpredictable nature of the condition make it extremely difficult to assess any therapeutic intervention, a fact recognized as early as 1918 by Julius Rosenstirn [52]:

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

> " The disease was attacked with all sorts of remedies and alternatives for faulty metabolism; every one of them with more or less marked success observed solely by its original author but pronounced a complete failure by every other follower. In many cases, the symptoms of the disease disappear often spontaneously, so the therapeutic effect (of any treatment) should not be unreservedly endorsed."

These words ring true today as they did when they were written nearly a century ago. FOP's extreme rarity, variable severity, and fluctuating clinical course pose daunting uncertainties in developing and evaluating experimental therapies.

The FOP gene mutation in ACVR1/ALK2 creates a new form of this BMP receptor that when triggered by tissue injury unleashes a cascade of events that transforms muscle, tendon, ligament, fascia, and aponeuroses into a second skeleton of heterotopic bone through a metamorphosis that first destroys the normal tissue and then builds a second skeleton [56, 65].

There are many potential approaches that may eventually be used to harness FOP. The long-term treatment of FOP is likely to involve not one, but several concomitant approaches that acknowledge molecular mechanisms involved in the induction and progression of the disease. The challenge is controlling the renegade bone formation so that skeleton is made only where and when it is wanted and needed [95].

5. EXPERT OPINION

5.1 Need for Natural History Studies in FOP

In order to advance the lessons learned from ongoing animal studies into the design of meaningful clinical trials for FOP, it is first necessary to have a comprehensive and contemporary understanding of the natural history of FOP. Detailed knowledge of how flare-ups behave and progress in the context of present symptomatic management is essential before meaningful clinical trials can be designed.

Several historical studies on the natural history of FOP confirmed the extreme difficulty in predicting the onset, duration, or severity of flare-ups, although characteristic anatomic patterns of disease progression have been described [9, 10]. However, the data are more than twenty years old, come from an era when there were no more than 45 patient-members of the International FOP Association (IFOPA) [96] and from a time when the symptomatic treatment of FOP was very different than it is now.

Today, there are nearly twenty times the numbers of known individuals with FOP worldwide. Importantly, a larger percentage of the world's population of FOP patients routinely uses powerful steroidal and non-steroidal anti-inflammatory medications to quell the symptoms of acute flare-ups. Intervention can change outcome, and yesterday's data may not be reliable to predict tomorrow's therapy.

Recent reports from academia, international regulatory agencies, small biotech companies and large pharmaceutical corporations emphasize that the most common cause for failure of clinical trials in rare diseases is not a lack of appropriate molecular targets or a lack of

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

potentially useful drugs, but a lack of comprehensive knowledge of the natural history of the disease.

For FOP, comprehensive, contemporary knowledge of the natural history of flare-ups is of paramount importance in the design of any clinical trial. Mechanisms of drug action, safety profiles, off-target side effects, and interactions with other drugs need to be understood in the context of spontaneous and trauma-induced FOP flare-ups and in the context of real world experience across every geographic, ethnic, and cultural boundary. Such comprehensive knowledge of the natural history of FOP flare-ups becomes even more important when one contemplates the clinical complexity of FOP – the progressive developmental stages and evolving time course of each lesion, the various anatomic sites involved in the disease process, the variable clinical course of flare-ups even in the same individual, and the range of individual responses to symptomatic measures over time. Add to that the spectrum of diverse regional and cultural approaches and constraints to symptomatic management of flare-ups, the ultra-rare nature of FOP, the incredibly small number of patients worldwide, and the clinical imperative of knowing with certainty if a new pharmaceutical compound might be effective when contemporary placebo control groups might not be possible or feasible in a clinical trial. Considering the overwhelming cost and risk involved, most pharmaceutical companies simply will not embark on clinical trials unless there are adequate data on the natural history of FOP on which to base a judgment outcome.

A comprehensive, worldwide survey of FOP flare-ups was launched in December 2012 and will be vital for designing a wide range of clinical trials that are likely to emerge in the years to come.

5.2 Need for Biomarkers in FOP

Biomarkers are urgently needed for successful clinical trials in FOP:

1. To measure and monitor the variability and progression of FOP lesions in each individual and between individuals.
2. To measure and monitor the stages of disease activity during and between flare-ups.
3. 3. To measure and monitor each individual’ s response to the drug being studied.

Unlike in cancer, where disease biomarkers may be the same or similar throughout the course of the disease, biomarkers will likely vary in FOP, based upon the stage of the disease and the phase of the flare-up. For example, biomarkers for the earliest inflammatory phase of an FOP flare-up may be very different from those in the later phases of HEO.

It will be important to identify and monitor stage-specific biomarkers during FOP flare-ups to assess the efficacy of new medications. For example, some medications may work on one phase of a flare-up but not another. Thus entering a patient into a clinical trial in an inappropriate phase of a flare-up would be detrimental and would skew the results of any clinical trial.

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

Without such biomarkers, it would be difficult to know if a drug being studied might potentially be useful, but not quite reach optimal timing, dosage, or potency. Thus, disease-specific, stage-specific, and drug-specific biomarkers will be helpful in assessing the results of any clinical trial.

5.3 Clinical Trial Design in FOP

There are three scenarios for potential clinical trials in FOP each with its own implication for design and implementation. The first is the short-term treatment of acute flare-ups. The second is the long-term prevention of acute flare-ups. The third is the surgical removal of heterotopic bone and the liberation of joints presently ankylosed with heterotopic bone.

Different medications may lend themselves to different clinical trial designs. For example, drugs targeted to acute flare-ups would have to be useful once a flare-up is identified by the patient. A drug that might be used to treat acute flare-ups would have to first be shown to be effective after a spontaneous or trauma-induced flare-up has begun in a conditional knock-in mouse model of classic FOP.

Any drug targeted to prevent acute flare-ups would need to have an acceptably benign long-term safety profile. If the medication would have to be stopped for any reason, concern about rebound flare-ups would prevail. Because it is impossible to predict when a flare-up will occur, it will be necessary to study drugs over long periods of time to determine if they can alter the natural history of the disease and the survival rate of joint mobility over time.

Finally, any potential drug that is used for surgical removal of heterotopic bone would first have to be proven to be safe and effective in a prevention scenario in FOP patients, without any rebound flare-ups once the drug was discontinued. The life-threatening risk of general anesthesia will likely preclude this as a preliminary approach to testing new drugs in FOP. Nevertheless, this approach holds much appeal once a drug has been validated as a treatment or prevention of spontaneous flare-ups in a non-surgical setting.

The design of clinical trials for FOP must take into consideration not only these three scenarios, but whether or not any potential drug has pre-clinical effectiveness, dosage and safety profile that might allow it to be used in such a clinical setting.

5.4 Hurdles to Drug Development for FOP

The hurdles to drug development for FOP can be divided into five categories: Disease-related, drug-related, investigator-industry-related, regulatory-related, and support-group-related (Table 1).

Disease-related hurdles to drug development for FOP include the rarity of the condition, the variability of disease progression, the physiological similarity of heterotopic bone to normal skeletal bone, the variable stages of disease progression, the lack of target specificity (the ACVR1/ALK2 receptor and several other receptors are remarkably similar), the lack of sufficient natural history, and the paucity of disease, stage- and drug-specific biomarkers.

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

Drug-related hurdles to drug development for FOP include drug specificity issues, toxicity, pharmacokinetics, solubility, metabolism, and delivery issues. Each of these is specific to the various therapeutic categories under study and development.

Investigator-industry related hurdles to drug development for FOP include competing financial interests, competing academic interests, and biotechnology and pharmaceutical company proprietary issues.

Regulatory-related hurdles to drug development for FOP include meeting investigational review board criteria, and requirements from regulatory agencies including FDA, and other international regulatory bodies.

Support group-related hurdles to drug development for FOP include funding-related issues, harmonized international disease registry issues, and fragmented international patient group efforts. This latter issue is particularly important and requires that the international FOP community speak with one voice and one intention when it comes to clinical trials.

Acknowledgments

This work was supported in part by the International Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) Association, The Center for Research in FOP & Related Disorders, the Ian Cali Endowment for FOP Research, The Whitney Weldon Endowment for FOP Research, The Isaac & Rose Nassau Professorship of Orthopaedic Molecular Medicine (to FSK), The Cali-Weldon Professorship for FOP Research (to EMS), and by grants from the Rita Allen Foundation, and the US National Institutes of Health (NIH R01 AR04196).

Annotated References

1• . Connor JM, Evans DA. Fibrodysplasia ossificans progressiva. The clinical features and natural history of 34 patients. J Bone Joint Surg Br. 1982; 64:76–83. Superb general review of FOP clinical features. [PubMed: 7068725]

2• . Kaplan FS, Glaser DL, Shore EM, et al. The phenotype of fibrodysplasia ossificans progressiva. Clin Rev Bone & Miner Metab. 2005; 3:183–188. A thorough review of the clinical features of FOP.

3• . Kaplan FS, LeMerrer M, Glaser DL, et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2008; 22:191–205. A succinct clinical review of FOP. [PubMed: 18328989]

4. Shore EM, Kaplan FS. Inherited human diseases of heterotopic bone formation. Nat Rev Rheumatol. 2010; 6:518–527. A seminal review of genetic disorders of heterotopic ossification. [PubMed: 20703219]

5. Glaser DL, Rocke DM, Kaplan FS. Catastrophic falls in patients who have fibrodysplasia ossificans progressiva. Clin Orthop Rel Res. 1998; 346:110–116.

6• . Lanchoney TF, Cohen RB, Rocke DM, et al. Permanent heterotopic ossification at the injection site after diphtheria-tetanus-pertussis immunizations in children who have fibrodysplasia ossificans progressiva. J Pediatr. 1995; 126:762–764. A classic study describing iatrogenic harm in FOP from intramuscular immunizations. [PubMed: 7752003]

7• . Luchetti W, Cohen RB, Hahn GV, et al. Severe restriction in jaw movement after routine injection of local anesthetic in patients who have progressiva. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1996; 81:21–25. Routine mandibular blocks cause ankylosis of the jaw in FOP. [PubMed: 8850477]

8. Scarlett RF, Rocke DM, Kantanie S, et al. Influenza-like viral illnesses and flare-ups of fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). Clin Orthop Rel Res. 2004; 423:275–279. Viral illnesses can cause FOP flare-ups.

NIH-PA Author Manuscript NIH-PA Author Manuscript NIH-PA Author Manuscript

9• . Cohen RB, Hahn GV, Tabas JA, et al. The natural history of heterotopic ossification in patients who have fibrodysplasia ossificans progressiva. A study of 44 patients. J Bone Joint Surg Am. 1993; 75:215–219. Thorough review of the natural history of FOP.

10• . Rocke DM, Zasloff M, Peeper J, et al. Age and joint-specific risk of initial heterotopic ossification in patients who have fibrodysplasia ossificans progressiva. Clin Orthop. 1994; 301:243–248. Age-related survival curves for FOP joint involvement. [PubMed: 8156682]

11. Kaplan FS, Glaser DL. Thoracic insufficiency syndrome in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. Clin Rev Bone & Miner Metab. 2005; 3:213–216.

12• . Kussmaul WG, Esmail AN, Sagar Y, et al. Pulmonary and cardiac function in advanced fibrodysplasia ossificans progressiva. Clin Orthop. 1998; 346:104–109. The importance of baseline pulmonary function studies in FOP. [PubMed: 9577416]

13• . Kaplan FS, Zasloff MA, Kitterman JA, et al. Early mortality and cardiorespiratory failure in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. J Bone Joint Surg Am. 2010; 92:686–691. Comprehensive mortality data in FOP. [PubMed: 20194327]

14• . Schaffer AA, Kaplan FS, Tracy MR, et al. Developmental anomalies of the cervical spine in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva are distinctly different from those in patients with Klippel-Feil syndrome. Spine. 2005; 30:1379–1385. A comprehensive analysis of cervical spine malformations in FOP. [PubMed: 15959366]

15. Shah PB, Zasloff MA, Drummond D. Kaplan FS. Spinal deformity in patients who have fibrodysplasia ossificans progressiva. J Bone Joint Surg Am. 1994; 76:1442–1450. [PubMed: 7929490]

16• . Deirmengian GK, Hebela NM, O' Connell M, et al. Proximal tibial osteochondromas in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. J Bone Joint Surg Am. 2008; 90:366–374. Important description of a key developmental feature of FOP. [PubMed: 18245597]

17• . Kaplan FS, Strear CM, Zasloff MA. Radiographic and scintigraphic features of modeling and remodeling in the heterotopic skeleton of patients who have fibrodysplasia ossificans progressiva. Clin Orthop. 1994; 304:238–247. The first comprehensive report of radiographic findings in FOP. [PubMed: 8020223]

18• . Kaplan FS, Xu M, Seemann P, et al. Classic and atypical fibrodysplasia ossificans progressiva phenotypes are caused by mutations in the bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor ACVR1. Hum Mutat. 2009; 30:379–390. A seminal description of classic and variant mutations of ACVR1/ALK2 in FOP. [PubMed: 19085907]

19• . Mahboubi S, Glaser DL, Shore EM, Kaplan FS. Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). Pediatr Radiol. 2001; 31:307–314. Comprehensive radiographic analysis of FOP. [PubMed: 11379597]

20. Shirkhoda A, Armin A-R, Bis KG, et al. MR imaging of myositis ossificans: Variable patterns at different stages. J Magn Reson Imaging. 1995; 65:287–292. [PubMed: 7633105]

21. Einhorn TA, Kaplan FS. Traumatic fractures of heterotopic bone in patients who have fibrodysplasia ossificans progressiva. Clin Orthop. 1994; 308:173–177. [PubMed: 7955679]

22• . Kaplan FS, Tabas JA, Gannon FH, et al. The histopathology of fibrodysplasia ossificans progressiva: An endochondral process. J Bone Joint Surg (Am). 1993; 75:220–230. The first comprehensive description of the endochondral nature of FOP lesions. [PubMed: 7678595]

23. Pignolo RJ, Suda, RK, Kaplan FS. The fibrodysplasia ossificans progressiva lesion. Clin Rev Bone Miner Metab. 2005; 3:195–200.

24• . Glaser DL, Economides AN, Wang L, et al. In vivo somatic cell gene transfer or an engineered noggin mutein prevents BMP4-induced heterotopic ossification. J Bone Joint Surg Am. 2003; 85:2332–2342. Proof-of-concept of Noggin gene therapy in BMP-induced heterotopic ossification and a thorough description of BMP-associated HEO. [PubMed: 14668502]

25• . Hegyi L, Gannon FH, Glaser DL, et al. Stromal cells of fibrodysplasia ossificans progressiva lesions express smooth muscle lineage markers and the osteogenic transcription factor Runx2/Cbfa-1: clues to a vascular origin of heterotopic ossification. J Pathol. 2003; 201:141–148. This paper highlights the importance of vascular cell involvement in early FOP lesions. [PubMed: 12950027]

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

26• . Gannon FH, Valentine BA, Shore EM, et al. Acute lymphocytic infiltration in an extremely early lesion of fibrodysplasia ossificans progressiva. Clin Orthop. 1998; 346:19–25. The first description of lymphocytic involvement in early FOP lesions. [PubMed: 9577406]

27• . Gannon F, Kaplan FS, Olmsted E, et al. Differential immunostaining with bone morphogenetic protein (BMP) 2/4 in early fibromatous lesions of fibrodysplasia ossificans progressiva and aggressive juvenile fibromatosis. Hum Pathol. 1997; 28:339–343. Early FOP lesions have active BMP signaling. [PubMed: 9042799]

28• . Kaplan FS, Glaser DL, Shore EM, et al. Hematopoietic stem-cell contribution to ectopic skeletogenesis. J. Bone Joint Surg Am. 2007; 89:347–357. Bone marrow transplantation does not cure FOP and even a normal immune system can trigger FOP flare-ups in a genetically susceptible host. [PubMed: 17272450]

29• . Gannon FH, Glaser D, Caron R, et al. Mast cell involvement in fibrodysplasia ossificans progressiva. Hum Pathol. 2001; 32:842–848. Description of an important feature of FOP lesions. [PubMed: 11521229]

30. Kan L, Lounev VY, Pignolo RJ, et al. Substance P signaling mediates BMP dependent heterotopic ossification. J Cell Biochem. 2011; 112:2759–2772. [PubMed: 21748788]

31• . Salisbury E, Rodenberg E, Sonnet C, et al. Sensory nerve induced inflammation contributes to heterotopic ossification. J Cell Biochem. 2011; 112:2748–2758. The importance of neuro-inflammatory triggers in FOP lesion formation. [PubMed: 21678472]

32. Suda RK, Billings PC, Egan KP, et al. Circulating osteogenic precursor cells in heterotopic bone formation. Stem Cells. 2009; 27:2209–2219. [PubMed: 19522009]

33• . Lounev V, Ramachandran R, Wosczyna MN, et al. Identification of progenitor cells that contribute to heterotopic skeletogenesis. J Bone Joint Surg Am. 2009; 91:652–663. Progenitor cells of FOP lesions are endogenous to the tissue rather than hematopoietic in origin and express Tie2+ [PubMed: 19255227]

34• . Medici D, Shore EM, Lounev VY, et al. Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-cell like cells. Nat Med. 2010; 12:1400–1406. Are new progenitor cells created by the FOP mutation? [PubMed: 21102460]

35. Wosczyna MN, Biswas AA, Cogswell CA, Goldhamer DJ. Multipotent progenitors resident in skeletal muscle interstitium exhibit robust BMP-dependent osteogenic activity and mediate heterotopic ossification. J Bone Miner Res. 2012; 27:1004–1017. [PubMed: 22307978]

36• . Kaplan FS, Shore EM, Gupta R, et al. Immunological features of fibrodysplasia ossificans progressiva and the dysregulated BMP4 pathway. Clin Rev Bone Miner Metab. 2005; 3:189–193. The first evidence for immunological dysregulation in FOP flare-ups.

37. Kan L, Hu M, Gomes WA, Kessler JA. Transgenic mice overexpressing BMP4 develop a fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP)-like phenotype. Am J Pathol. 2004; 165:1107–1115. [PubMed: 15466378]

38. Kan L, Liu Y, McGuire TL, et al. Dysregulation of local stem/progenitor cells as a common cellular mechanism for heterotopic ossification. Stem Cells. 2009; 27:150–156. [PubMed: 18832590]

39• . Chakkalakal SA, Zhang D, Culbert AL, Convente MR, et al. An Acvr1 R206H knock-in mouse has fibrodysplasia ossificans progressiva. J Bone Miner Res. 2012; 27:1746–1756. First i proof that the classic FOP mutation causes FOP. [PubMed: 22508565]

40• . Kaplan FS, Chakkalakal SA, Shore EM. Fibrodysplasia ossificans progressiva: mechanisms and models of skeletal metamorphosis. Dis Model Mech. 2012; 5:756–762. A thorough review of animal models for FOP. [PubMed: 23115204]

41. Yu PB, Deng, DY, Lai CS, et al. BMP type I receptor inhibition reduces heterotopic ossification. Nat Med. 2008; 14:1363–1369. An STI inhibits HEO in a mouse model of FOP. [PubMed: 19029982]

42• . Lutwak L. Myositis ossificans progressiva: mineral, metabolic, and radioactive calcium studies of the effects of hormones. Am J Med. 1964; 37:269–293. An attempt at finding biomarkers for FOP. [PubMed: 14206759]

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

43• . Kaplan F, Sawyer J, Connors S, et al. Urinary basic fibroblast growth factor: a biochemical marker for preosseous fibroproliferative lesions in patients with FOP. Clin Orthop. 1998; 346:59–65. The first report of a biomarker for early FOP flare-ups. [PubMed: 9577411]

44• . Kitterman JA, Kantanie S, Rocke DM, Kaplan FS. Iatrogenic harm caused by diagnostic errors in fibrodysplasia ossificans progressiva. Pediatrics. 2005; 116:654–661. A seminal study of catastrophic misdiagnosis of FOP.

45• . Kaplan FS, Xu M, Glaser DL, et al. Early diagnosis of fibrodysplasia ossificans progressiva. Pediatrics. 2008; 121:e1295–1300. FOP can be diagnosed before HEO appears. [PubMed: 18450872]

46. Shore EM, Feldman GJ, Xu M, Kaplan FS. The genetics of fibrodysplasia ossificans progressiva. Clin Rev Bone & Miner Metab. 2005; 3:201–204. An excellent review of the genetics of FOP.

47• . Rogers JG, Chase GA. Paternal age effect in fibrodysplasia ossificans progressiva. J Med Genet. 1979; 16:147–148. FOP is more common from older fathers. [PubMed: 287808]

48• . Kaplan FS, McCluskey W, Hahn G, et al. Genetic transmission of fibrodysplasia ossificans progressiva. Report of a family. J Bone Joint Surg (Am). 1993; 75:1214–1220. The first report of a multigenerational family with classic FOP.

49. Janoff HB, Muenke M, Johnson LO, et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva in two half-sisters. Evidence for maternal mosaicism. Am J Med Genet. 1996; 61:320–324.

50• . Hebela N, Shore EM, Kaplan FS. Three pairs of monozygotic twins with fibrodysplasia ossificans progressiva: the role of environment in the progression of heterotopic ossification. Clin Rev Bone & Miner Metab. 2005; 3:205–208. Importance of environmental factors in the progression of FOP lesions.

51• . Kaplan FS, Shore EM, Pignolo RJ. The medical management of fibrodysplasia ossificans progressiva: current treatment considerations. Clin Proc Intl Consort FOP. 2011; 4:1–100. A comprehensive set of guidelines to the contemporary medical management of FOP. www.ifopa.org

52• . Rosenstirn JA. A contribution to the study of myositis ossificans progressiva. Ann Surg. 1918; 68:485–520. 591-637. One of the finest and earliest reviews of FOP, patient-by-patient. [PubMed: 17864014]

53• . Levy CE, Lash AT, Janoff HB, Kaplan FS. Conductive hearing loss in individuals with fibrodysplasia ossificans progressiva. Am J Audiol. 1999; 8:29–33. An important analysis of hearing impairment in FOP. [PubMed: 10499116]

54**. Shore EM, Xu M, Feldman GJ, et al. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. Nature Genetics. 2006; 38:525–527. The discovery of the FOP gene. [PubMed: 16642017]

55. Kaplan FS, Glaser DL, Pignolo RJ, Shore EM. A new era of fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP): a druggable target for the second skeleton. Expert Opinion on Biol Ther. 2007; 7:705–712.

56• . Kaplan FS, Lounev V, Wang H, et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva: a blueprint for the metamorphosis. Ann NY Acad Sci. 2011; 1237:5–10. The FOP mutation is the architect, not the builder of FOP. [PubMed: 22082359]

57• . Kaplan F, Tabas JA, Zasloff MA. Fibrodysplasia ossificans progressiva: A clue from the fly? Calcif Tissue Int. 1990; 47:117–125. The seminal hypothesis of BMP dysregulation in FOP. [PubMed: 2117991]

58• . Shafritz AB, Shore EM, Gannon FH, et al. Dysregulation of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) gene expression in fibrodysplasia ossificans progressiva. N Engl J Med. 1996; 335:555–561. The first description of dysregulation of the BMP pathway in FOP cells. [PubMed: 8678932]

59. Ahn J, Serrano de La Peña L, Shore EM, Kaplan FS. Paresis of a bone morphogenetic protein antagonist response in a genetic disorder of heterotopic skeletogenesis. J Bone Joint Surg Am. 2003; 85:667–674. [PubMed: 12672843]

60. Serrano de la Peña L, Billings PC, Fiori JL, et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP), a disorder of ectopic osteogenesis, misregulates cell surface expression and trafficking of BMPRIA. J Bone Miner Res. 2005; 20:1168–1176. [PubMed: 15940369]

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

61. Fiori JL, Billings PC, Serrano de la Peña L, et al. Dysregulation of the BMP-p38 MAPK signaling pathway in cells from patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). J Bone Miner Res. 2006; 21:902–909. [PubMed: 16753021]

62. Billings PC, Fiori JL, Bentwood JL, et al. Dysregulated BMP signaling and enhanced osteogenic differentiation of connective tissue progenitor cells from patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). J Bone Miner Res. 2008; 23:305–313. [PubMed: 17967130]

63• . Shen Q, Little SC, Xu M, et al. The fibrodysplasia ossificans progressiva R206H ACVR1 mutation activates BMP-independent chondrogenesis and zebrafish embryo ventralization. J Clin Invest. 2009; 119:3462–3472. An important study describing the mechanism of action of the mutant BMP receptor. [PubMed: 19855136]

64. Fukuda T, Kohda M, Kanomata K, et al. Constitutively activated ALK2 and increased SMAD1/5 cooperatively induce bone morphogenetic protein signaling in fibrodysplasia ossificans progressiva. J Biol Chem. 2009; 284:7149–7156. [PubMed: 18684712]

65• . Kaplan FS, Pignolo RJ, Shore EM. The FOP metamorphogene encodes a novel type I receptor that dysregulates BMP signaling. Cytokine Growth Factor Reviews. 2009; 20:399–407. A comprehensive review of the global dysregulation of BMP signaling from the FOP gene. [PubMed: 19896889]

66. Bocciardi R, Bordo D, Di Duca M, et al. Mutational analysis of the ACVR1 gene in Italian patients affected with fibrodysplasia ossificans progressiva: confirmations and advancements. Eur J Hum Genet. 2009; 3:311–318. [PubMed: 18830232]

67. Carvalho DR, Navarro MMM, Martins B, et al. Mutational screening of ACVR1 gene in Brazilian fibrodysplasia ossificans progressiva patients. Clin Genet. 2010; 77:171–176. [PubMed: 19796185]

68. Furuya H, Ikezoe K, Wang LX, et al. A unique case of fibrodysplasia ossificans progressiva with an ACVR1 mutation, G356D, other than the common mutation (R206H). Amer J Med Genet Pt. A. 2008; 146A(4):459–463.

69. Gregson CL, Hollingworth P, Williams M, et al. A novel ACVR1 mutation in the glycine/serine-rich domain found in the most benign case of a fibrodysplasia ossificans progressiva variant reported to date. Bone. 2011; 48:654–658. [PubMed: 21044902]

70. Petrie KA, Lee WH, Bullock AN, et al. Novel mutations in ACVR1 result in atypical features in two fibrodysplasia ossificans progressiva patients. Plos One. 2009; 4(3):e5005. [PubMed: 19330033]

71. Ratbi I, Borcciadi R, Regragui A, et al. Rarely occurring mutation of ACVR1 gene in Moroccan patient with fibrodysplasia ossificans progressiva. Clin Rheum. 2010; 1:119–121.

72• . Takahashi M, Katagiri T, Furuya H, Hohjoh H. Disease-causing allele-specific silencing against the ALK2 mutants, *R206H* and *G356D*, in fibrodysplasia ossificans progressiva. Gene Ther. 2012; 19:781–785. A novel proof-of-concept approach to allele-specific knockdown of the FOP mutation using RNAi. [PubMed: 22130450]

73. Whyte MP, Wenkert D, Demertzis J, et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva: Middle-age onset of heterotopic ossification from a unique missense mutation (c.974G>C, p.G325A) in ACVR1. J Bone Miner Res. 2011; 27:729–737. [PubMed: 22131272]

74. Fukuda T, Kanomata K, Nojima J, et al. A unique mutation of ALK2, G356D, found in a patient with fibrodysplasia ossificans progressiva is a moderately activated BMP type I receptor. Biochem Biophys Res Commun. 2008; 377:905–909. [PubMed: 18952055]

75• . Zhang D, Schwarz EM, Rosier RN, et al. ALK2 functions as a BMP type I receptor and induces Indian hedgehog in chondrocytes during skeletal development. J Bone Miner Res. 2003; 9:1593–1604. First description of the importance of ALK2 as a BMP type I receptor in skeletal development. [PubMed: 12968668]

76. Groppe JC, Shore EM, Kaplan FS. Functional modeling of the ACVR1 (R206H) mutation in FOP. Clin Orthop Rel Res. 2007; 462:87–92.

77• . Chaikaud A, Alfano I, Kerr G, et al. Structure of the bone morphogenetic protein receptor ALK2 and implications for fibrodysplasia ossificans progressiva. J Biol Chem. 2012; 287:36990–36998. Crystal structure of ALK2 and implications for development of more specific signal transduction inhibitors. [PubMed: 22977237]

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

78. Groppe JC, Wu J, Shore EM, Kaplan FS. In vitro analysis of the dysregulated R206H ALK2 Kinase-FKBP12 interaction associated with heterotopic ossification in FOP. Cells Tissues Organs. 2011; 194:291–295. [PubMed: 21525719]

79. van Dinther M, Visser N, de Gorter DJ, et al. ALK2 R206H mutation linked to fibrodysplasia ossificans progressiva confers constitutive activity to the BMP type I receptor and sensitizes mesenchymal cells to BMP-induced osteoblasts differentiation and bone formation. J Bone Miner Res. 2010; 25:1208–1215. [PubMed: 19929436]

80. Song GA, Kim HJ, Woo KM, et al. Molecular consequences of the ACVR1 (R206H) mutation of fibrodysplasia ossificans progressiva. J Biol Chem. 2010; 285:22542–22553. [PubMed: 20463014]

81• . Nussinov R, Tsai C-J. Allostery in disease and drug discovery. Cell. 2013; 153:293–305. [PubMed: 23582321]

82**. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science. 1965; 150:893–899. The classic description of bone morphogenetic proteins. [PubMed: 5319761]

83**. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science. 1988; 242:1528–1534. The classic description of cloning the BMP genes. [PubMed: 3201241]

84. Gugala Z, Olmsted-Davis EA, Gannon FH, et al. Osteoinduction by ex vivo adenovirus-mediated BMP2 delivery is independent of cell type. Gene Ther. 2003; 10:1289–1296. [PubMed: 12883525]

85. Fukuda T, Scott G, Komatsu Y, et al. Generation of a mouse with conditionally activated signaling through the BMP receptor, ALK2. Genesis. 2006; 44:159–167. [PubMed: 16604518]

86• . Hong CC, Yu PB. Applications of small molecule BMP inhibitors in physiology and disease. Cytokine Growth Factor Reviews. 2009; 20:409–418. An excellent review article on STIs for BMP type I receptors. [PubMed: 19914855]

87. Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, et al. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. Nat Chem Biol. 2008; 4:33–41. [PubMed: 18026094]

88• . Engers DW, Frist AY, Lindsley CW, et al. Synthesis and structure relationships of a novel and selective bone morphogenetic protein receptor (BMP) inhibitor derived from the pyrazolo [1.5-alpha]pyrimidine scaffold of Dorsomorphin: The discovery of ML347 as an ALK2 versus ALK3 selective MLPCN probe. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2013 DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.113. Important development of more specific ALK2 inhibitors.

89• . Mohedas AH, Xing X, Armstrong KA, et al. Development of an ALK-biased BM type I kinase inhibitor. ACS Chem Biol. Apr 02.2013 DOI: 10.1021/cb300655w. The development of a more specific ALK2 inhibitor.

90• . Kaplan J, Kaplan FS, Shore EM. Restoration of normal BMP signaling levels and osteogenic differentiation in FOP mesenchymal progenitor cells by mutant allele-specific targeting. Gene Ther. 2011; 19:786–790. A novel proof-of-concept approach to allele-specific knockdown of the FOP mutation using RNAi. [PubMed: 22011642]

91• . Zasloff MA, Rocke DM, Crofford LJ, et al. Treatment of patients who have fibrodysplasia ossificans progressiva with isotretinoin. Clin Orthop. 1998; 346:121–129. Retinoic acid derivatives are rational choices for inhibiting HEO. [PubMed: 9577419]

92. Shimono K, Tung W-e, Macolino C, et al. Potent inhibition of heterotopic ossification by nuclear retinoic acid receptor-g agonists. Nat Med. 2011; 17:454–460. A seminal study describing the efficacy and mechanism of action of RARg agonists in the inhibition of HEO. [PubMed: 21460849]

93• . Kaplan FS, Shore EM. Derailing heterotopic ossification and RARing to go. Nat Med. 2011; 17:420–421. A detailed rationale for the use of RAR-gamma agonists in early FOP flare-ups. [PubMed: 21475232]

94. Olmsted-Davis E, Gannon FH, Ozen M, et al. Hypoxic adipocytes pattern early heterotopic bone formation. Am J Pathol. 2007; 170:620–32. [PubMed: 17255330]

95• . Maeder T. A Few Hundred People Turned to Bone. The Atlantic Monthly. 1998; 281:81–89. A wonderful, human account of the FOP community and the origins of the International FOP Association (IFOPA).

96. IFOPA website. www.ifopa.orgwww.ifopa.org

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

6. Article Highlights

- FOP is a rare genetic disorder of episodic and progressive heterotopic endochondral ossification for which there is presently no effective treatment or prevention.
- Heterozygous activating mutations in Activin receptor IA/Activin-like kinase-2 (ACVR/ALK2), a bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor, are the genetic cause of FOP and reveal a promising pharmacologic target in the BMP signaling pathway.
- Possible strategies for treating FOP will be based on one or more of the following approaches:
    - **a.** Blocking activity of the mutant receptor (ACVR1/ALK2) that causes increased BMP pathway signaling (through four possible strategies which include: monoclonal antibodies, signal transduction inhibitors (STIs), inhibitory RNA, and secreted antagonists).
    - **b.** Inhibiting triggers of FOP flare-ups.
    - **c.** Directing FOP HEO progenitor cells to an alternate tissue fate other than cartilage or bone.
    - **d.** Blocking the cellular response to microenvironmental signals that promote the formation of FOP lesions.
- Pre-clinical testing in FOP should be conducted in conditional knock-in animal models of classic FOP.
- Comprehensive natural history and biomarker studies are helpful for designing meaningful clinical trials in FOP

NIH-PA Author Manuscript
NIH-PA Author Manuscript
NIH-PA Author Manuscript

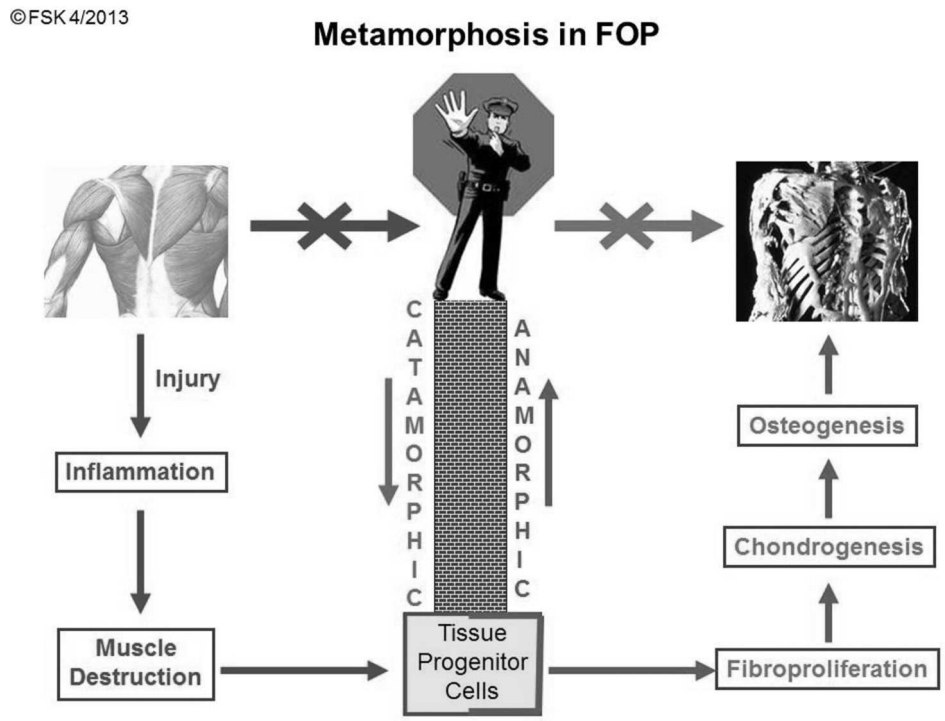


Fig. 1. Schematic Diagram of Skeletal Metamorphosis in FOP

In FOP, muscle cells do not become bone cells. Rather, skeletal muscle tissue is transformed into heterotopic bone through a process of skeletal metamorphosis [4, 56, 65]. The process of HEO in FOP involves two major phases - a catamorphic phase (tissue destruction; left column) followed by an anamorphic phase (tissue formation; right column) of transient fibroproliferative and cartilaginous scaffolds, and their replacement with mature heterotopic bone. The activation of tissue progenitor cells that contribute to the formation of heterotopic bone rather than reparative tissue is central to the process of skeletal metamorphosis [33, 34].

NIH-PA Author Manuscript
NIH-PA Author Manuscript
NIH-PA Author Manuscript

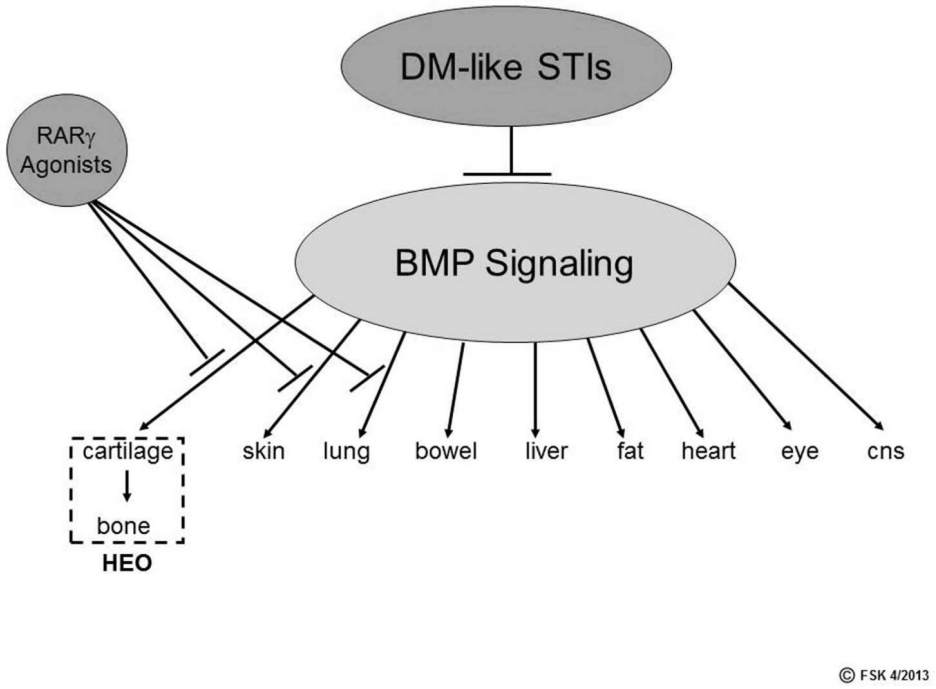


Fig. 2. Action of DM-like STIs vs. RARγ Agonists in BMP Signaling

Dorsomorphin (DM)-like STIs inhibit BMP signaling by effectively blocking the kinase domain of multiple BMP type I receptors (ALK2, ALK3, and ALK6). BMP signaling plays a critical role in the formation and maintenance of many organ systems including, but not limited to the skeleton, skin, lung, bowel, liver, fat, heart, eye, and CNS. The therapeutic efficacy of DM-like STIs will depend largely on their ability to selectively block ALK2 signaling that drives HEO at doses that do not impair BMP signaling through ALK 3 and ALK6. RARγ agonists inhibit BMP signaling downstream of BMP type I receptors in cartilage, skin, and both normotopic as well as ectopic chondrogenesis. The therapeutic efficacy of RARγ agonists in FOP will depend largely on their ability to selectively block ectopic chondrogenesis at tolerable doses.

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

HURDLE	Disease-Related	Drug-Related	Investigator-Industry Related	Regulatory-Related	Support-Group Related
Rare	X				
Symmetry of Physiologic & Pathologic Targets	X				
Lack of Sufficient Natural History	X		X		X
Lack of Disease, Stage, & Drug-Specific Biomarkers	X	X	X		X
Lack of Relevant Animal Models	X		X		
Drug Specificity	X	X			
Drug Toxicity	X	X			
Drug Pharmacokinetics & Solubility		X			
Drug Delivery	X	X			
Competing Financial Interests			X		
Competing Academic Interests			X		
Secrecy of Labs/Biotechs/Pharma (Fragmented Effort)			X		
IRB Hurdles				X	
FDA Hurdles				X	
Market Profitability			X		
Patent Interests			X		
Lack of Funding	X		X		X
Lack of International Patient Support	X				X

АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР

ТОМ XXXIV

ВЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ—ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ

МОСКВА·МЕДИЦИНА·1988

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. Б. СПИРИЧЕВ (зам. редактора), И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. А. ТУТЕЛЬЯН

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)
БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)
ЧАСХИНА Т. С. (Москва)
ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
ТЯХЕПЫЛЬД Л. Я. (Тарту)
УТЕВСКИЙ А. М. (Харьков)
ШАПОТ В. С. (Москва)
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ЯСЛАЙТИС А. А. (Вильнюс)

БИБЛИОТЕКА
Ин-та Биол. и Медиц. Химии
АМН СССР

УДК 616-018.2-055.5/.7+617.577-007.61-008.6]-085.217.24-07:616.633.747-074

Н. Н. Прозоровская, С. В. Глиняная, Л. П. Геращенко, С. С. Рудаков, В. Г. Солониченко, А. А. Дельвиг

ВЛИЯНИЕ ТЕРАПИИ β-АДРЕНОБЛОКАТОРОМ И КОМПЛЕКСОМ ВИТАМИНОВ НА ПОКАЗАТЕЛИ ЭКСКРЕЦИИ ОКСИПРОЛИНА ПРИ НЕКОТОРЫХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЯХ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

При некоторых наследственных болезнях соединительной ткани часто отмечаются поражения сердечно-сосудистой системы и легких. Так, к самым тяжелым проявлениям синдрома Марфана относятся расширение корня аорты с развитием недостаточности аортального клапана и аортальной регургитации крови, расслаивающая аневризма аорты, пролапс митрального клапана. При синдроме Элерса—Данлоса (СЭД), особенно IV, экхимозного типа, нередки неукротимые кровотечения, нередки и спонтанные разрывы кишечника, спонтанные пневмотораксы.

Оперативные вмешательства, например при синдроме Марфана, осложняются расслаивающей аневризмой аорты, что часто приводит к летальному исходу [9, 14]. У больных с синдромом Марфана, марфаноподобными синдромами и СЭД довольно часто встречаются врожденные деформации грудной клетки (ВДГК), в частности воронкообразная ВДГК, которая оказывает негативное влияние на функцию сердца; она может прогрессировать и поэтому требует хирургической коррекции. Однако выполнение торакопластики таким больным сопряжено со значительными трудностями по изложенным выше причинам.

Помимо хирургических способов профилактики и лечения недостаточности аортальных клапанов и расслаивающей аневризмы аорты, известны попытки терапевтической профилактики путем назначения β-адреноблокаторов для снижения частоты и силы сердечных сокращений, что способствует уменьшению давления крови на стенку аорты [13, 14, 17]. Однако наблюдения в процессе профилактического лечения пропранололом за 25 больными с синдромом Марфана в среднем на протяжении около 5 лет дали основание авторам [17] признать неэффективность применения этого препарата в целях предупреждения развития аневризм аорты.

Нами был предложен и апробирован модифицированный способ профилактики и терапии сердечно-сосудистых осложнений, предназначенный для предоперационной подготовки больных с СЭД, синдромом Марфана и марфаноподобными синдромами к торакопластике по поводу ВДГК. Модификация заключалась, во-первых, в назначении курса β-адреноблокатора на вполне определенный срок — 2,5 мес и, во-вторых, в одновременном назначении на этот же срок комплекса витаминов: рибофлавина (B_2), пиридоксина (B_6) и аскорбиновой кислоты. В доступной литературе нам не удалось найти ссылок на проведение предоперационной подготовки такого типа.

Известно, что СЭД, синдром Марфана и марфаноподобные синдромы относятся к наследственным заболеваниям, в основе которых лежат дефекты формирования соединительной ткани, а именно — нарушения структуры и (или) метаболизма коллагена и эластина [1]. Все названные выше препараты на том или ином уровне оказывают влияние на количество и качество образующихся в стенках аорты коллагеновых и эластиновых фибрилл.

В настоящей статье приведены результаты исследования влияния терапии β-адреноблокатором и комплексом витаминов на показатели экскреции оксипролина с мочой у 16 больных, которые наряду с клиническими методами обследования были использованы для оценки эффективности данного лечения.

Методика

Обследовано 16 детей в возрасте 5—14 лет: 7 детей с синдромом Марфана и 4 ребенка с марфаноподобными синдромами, имеющих ВДГК I—II степени; 4 ребенка с СЭД, из которых 1 — с СЭД экхимозного типа без ВДГК и 3 — с СЭД других типов и ВДГК I—II сте-

пени; 1 ребенок с синдромом Ларсена и ВДГК III степени.

Каждому больному был назначен 2,5-месячный курс β-адреноблокатора (обзидан) по 0,001 г/кг в сутки и следующих витаминов: рибофлавина (B_2) — 0,0004 г/кг; пиридоксина (B_6) — 0,01 г/кг и аскорбиновой кислоты — 0,01 г/кг в сутки.

Для контроля лечения использовали клинический и биохимический методы обследования. При клиническом методе обследования непосредственно перед началом лечения и после его окончания проводили эхокардиографическое исследование для определения ширины корня аорты, характера и степени пролапса сердечных клапанов и уровня аортальной регургитации крови. При биохимическом методе обследования в динамике в моче больных определяли содержание общего оксипролина в расчете на креатинин (ОП/КР, в ммоль/моль) и связанного оксипролина в пептидах с мол. массой более 700—1000 Д. С этой целью порцию утренней мочи (50 мл), собранной после соблюдения в предшествующие сутки ограничивающей диеты, фракционировали на колонке (70×5 см) с сефадексом G-10 [2]. Оксипролин, определенный с использованием кислотного гидролиза в материале первых двух пиков: фракция 1 (Ф1) — пептиды с мол. массой более 700—1000 Д и фракция 2 (Ф2) — менее 700 Д, в сумме составлял общий оксипролин, который пересчитывали на креатинин и вычисляли относительное содержание оксипролина Ф1 в процентах от общего оксипролина с учетом свободного [2].

В качестве реактивов использовали сефадекс G-10 ("Pharmacia", Швеция), хлорамин Т и парадиметиламинобензальдегид ("Sigma", США); оксипролин ("Reanal", ВНР); остальные реактивы — отечественного производства аналитической степени чистоты квалификации ос. ч.

При статистическом анализе для сравнения показателей экскреции оксипролина до и после лечения применяли метод сопряженных пар [4].

Результаты

1. Синдром Марфана и марфаноподобные синдромы. Результаты исследований в динамике содержания в моче общего оксипролина — ОП/КР и показателя Ф1 представлены на рис. 1.

По исходному уровню общего оксипролина больных с синдромом Марфана и марфаноподобными синдромами можно разделить на две группы: группа А — показатель ОП/КР ниже нормы и группа Б — ОП/КР выше нормы (см. рис. 1). Показатель Ф1 у больных обеих групп был ниже нормы (см. рис. 1). У 5 больных группы А в процессе лечения наблюдали постепенное увеличение содержания общего оксипролина практически до диапазона нормы к концу лечения и нормализацию показателя Ф1 уже через 6 нед после начала лечения. У всех больных

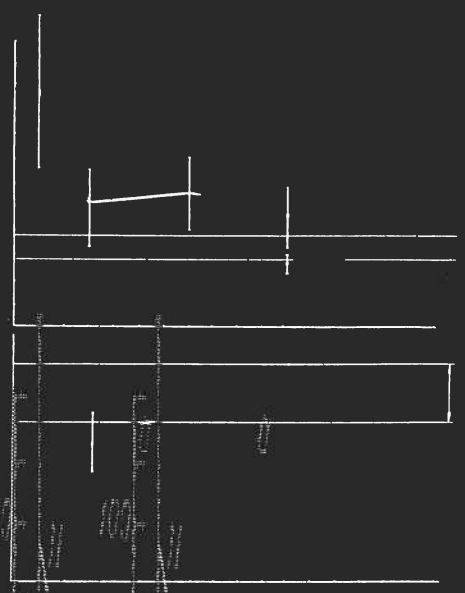


Рис. 1. Изменение экскреции оксипролиина у больных с синдромом Марфана и марфаноподобными синдромами при комплексном лечении (обзидан + витамины).

По оси абсцисс — продолжительность лечения (в нед), после лечения (в мес). *а* — изменение содержания общего оксипролина в пересчете на креатинин (ОП/КР, в ммоль/моль); *б* — изменение относительного содержания (в %) пептидосвязанного оксипролиина — Ф1. *I* — группа А, *II* — группа Б. Каждая точка — *M*±σ. N—95% доверительный интервал нормы для возрастного диапазона 5—14 лет [2].

этой группы после лечения отмечено уменьшение диаметра корня аорты в среднем на 18±5% (*M*±стандартное отклонение), у 4 — снижение пролапса митрального клапана, у одной больной — полное исчезновение. У 4 больных выполнена торакопластика, имплантация магнитной пластинки в загрудинное пространство с последующим вытяжением грудины тракционным аппаратом [3]. В ходе операции и в послеоперационном периоде осложнений не было. Получена архитектурная конфигурация грудной клетки. Через 7,5 лет после торакопластики показатели экскреции оксипролина практически оставались в пределах нормы. У одной больной с ВДГК I степени, которой торакопластику не выполняли, положительный эффект лечения был устойчив на протяжении 9,5 мес после окончания лечения как с клинической точки зрения, так и по показателям экскреции оксипролина с мочой.

У 6 больных группы Б уже в первые 2 нед лечения наблюдали резкое снижение показателя ОП/КР, далее отмечали тенденцию к постепенной его нор-

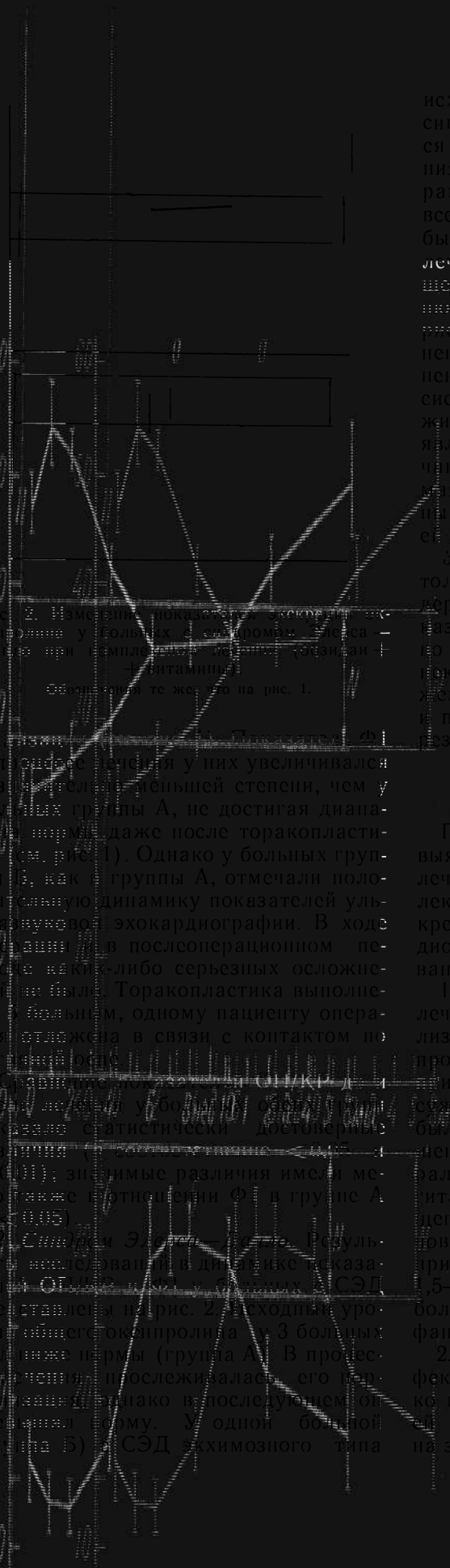


Рис. 2. Изменение показателя экскреции оксипролина у больных с синдромом Марфана — Дагна при комплексном лечении (обозначения те же, что на рис. 1.

исходный высокий уровень общего оксипролина в процессе лечения снижался до нормы, но после окончания лечения снова возрастал (см. рис. 2). Характер изменения показателя Ф1 у всех больных (группа А+группа Б) был сходным: нормализация во время лечения в период 6—10 нед и возвращение практически к исходному уровню после окончания лечения (см. рис. 2). Торакопластика была выполнена 2 больным без каких-либо осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы. У всех больных с СЭД положительный клинический эффект проявлялся только в период лечения, начиная с 6-й недели. Имела место прямая корреляция между положительным эффектом лечения и нормализацией показателя Ф1.

3. Синдром Ларсена. Обследован только один больной, у которого ни содержание общего оксипролина, ни показатель Ф1 в ходе лечения существенно не изменялись, претерпевая лишь некоторые колебания. Не было обнаружено каких-либо заметных изменений и после торакопластики. Графически результаты не представлены.

Обсуждение

Полученные результаты позволили выявить 3 варианта воздействия курса лечения β-адреноблокатором и комплексом витаминов на показатели экскреции оксипролина с мочой и эхокардиографические показатели у обследованных больных.

1. Стойкий положительный эффект лечения с полной или частичной нормализацией показателей экскреции оксипролина и эхокардиографическими признаками уплотнения стенки аорты, сужение ее просвета (если исходно он был расширен) на 0,5—1,5 см, уменьшение или исчезновение пролапса митрального клапана и аортальной регургитации крови на фоне улучшения общего состояния больных в виде исчезновения жалоб со стороны сердца и прибавки массы тела в среднем на 1,5—2 кг. Данный эффект получен у больных с синдромом Марфана и марфаноподобными синдромами.

2. Временный положительный эффект, наблюдаемый практически только в процессе лечения с нормализацией показателей экскреции оксипролина за 6—10 нед лечения и такой же не-

стойкой картиной клинического улучшения без столь заметных, как в первом случае, положительных сдвигов эхокардиографических данных у больных с синдромом Элерса—Данло.

3. Отсутствие какого-либо эффекта у больного с синдромом Ларсена.

Следует подчеркнуть, что ни у одного из больных, получавших курс лечения, не было каких-либо осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы в связи с торакопластикой по поводу ВДГК.

Каждое из использованных веществ (обзидан, аскорбиновая кислота, витамины B_2 и B_6) обладает прямой или косвенной корригирующей способностью в отношении отдельных компонентов сложной системы метаболизма коллагена. Так, установлено, что блокада β-адренергических рецепторов клеток, продуцирующих коллаген, приводит к снижению внутриклеточного уровня цАМФ, который прямо коррелирует со скоростью внутриклеточного распада вновь синтезированного коллагена [5]. Таким образом, можно повысить продукцию коллагена, преимущественно типа III, путем модулирования уровня его внутриклеточной деградации с помощью β-адреноблокатора [19].

Аскорбиновая кислота увеличивает синтез коллагена, стимулируя проколлагеновую мРНК [20]. Не изменяя соотношение типов коллагена, высокие дозы аскорбиновой кислоты повышают соотношение коллаген—эластин в стенке аорты, увеличивая ее механическую прочность [10]. Аскорбат способствует также нормализации гидроксилирования остатков лизина и пролина под действием соответствующих диоксигеназ [6]. Оксипролин ответствен за формирование стабильной при температуре тела человека тройной спирали коллагеновой молекулы, а остаток оксилизина участвует в образовании поперечных связей в коллагеновых и эластиновых фибриллах [18].

Причинами сниженного образования поперечных связей (обнаруженного при синдроме Марфана и марфаноподобных синдромах), ведущего к изменению структуры коллагеновых и эластиновых фибрилл и их метаболизма, может быть уменьшение активности лизилоксидазы, осуществляющей окислительное дезаминирование ε-аминогруппы лизина или оксилизина, или накопление в организме метаболитов, например гомоцистеина, блокирующих альдегидные группы аллизина и оксилизина и таким образом препятствующих процессу образования поперечных связей между соседними молекулами коллагена или тропоэластина в соответствующих фибриллах. Механизм положительного терапевтического эффекта пиридоксина не установлен. Однако имеющиеся в настоящее время данные позволяют предполагать, что пиридоксаль-5′-фосфат либо активирует лизилоксидазу, являясь кофактором этого фермента [7, 8], либо снижает концентрацию гомоцистеина, активируя пиридоксальзависимый фермент цистотионинсинтетазу [16, 21]. Поскольку пиридоксаль-5′-фосфат образуется в организме из пиридоксина (витамин B_6) под действием пиридоксин-4-оксигеназы, использующей в свою очередь в качестве кофактора производное рибофлавина (витамин B_2) — флавинадениннуклеотид (ФАД), то экзогенное введение в организм больного пиридоксина и рибофлавина обеспечивает образование активной формы витамина B_6 — пиридоксаль-5′-фосфата [11].

Несмотря на то что каждое из названных выше веществ обладает прямой или косвенной корригирующей способностью в отношении синтеза коллагена и эластина, ни одно из них при индивидуальном применении не может привести к нормализации метаболизма коллагена, поскольку у больных с синдромом Марфана, марфаноподобными синдромами, синдромом Элерса—Данло разных типов нарушения метаболизма могут включать генерализованную недостаточность синтеза коллагена в целом, недостаточность коллагена определенного типа, дефект на уровне ферментов его модификации и распада или же синтез дефектного коллагена, обусловленный структурной мутацией в коллагеновом гене. В такой ситуации индивидуальное применение одного из названных препаратов может оказать даже негативное влияние. Например, назначение одного только β-адреноблокатора приводит к относительному увеличению продукции коллагена, однако, если это дефектный коллаген, происходит увеличение его продукции, что может иметь негативные клинические последствия. Так, при профилактическом лечении пропранололом у нескольких больных

с синдромом Марфана на фоне лечения наблюдалось развитие аневризмы аорты с летальным исходом [17].

Таким образом, по-видимому, только при комплексном применении названных препаратов достигается полная или частичная количественная и качественная коррекция образования коллагеновых и, очевидно, эластиновых фибрилл.

У всех обследованных больных, за исключением одного больного с синдромом Ларсена, исходно был снижен показатель Ф1, ассоциируемый со вновь синтезируемым коллагеном. Его снижение в сочетании со сниженным общим содержанием оксипролина может свидетельствовать о недостаточности синтеза коллагена в целом, а в сочетании с повышенным общим уровнем оксипролина — о синтезе дефектного коллагена, который подвержен активной внутриклеточной деградации [12, 18]. В процессе лечения прослеживались увеличение показателя Ф1, а также нормализация общего содержания оксипролина (см. рис. 1 и 2). На основании только данных наблюдений трудно решить, идет ли речь об абсолютном увеличении синтеза коллагена, или же мы имеем дело с устойчивостью синтезируемых коллагеновых молекул к действию коллагенолитических ферментов, приобретенной в результате структурной коррекции под влиянием назначенных препаратов; а может быть, имеет место одновременно и то и другое. Однако, судя по полученным результатам, предлагаемое комплексное лечение может быть назначено в качестве предоперационной подготовки больных с синдромом Марфана, марфаноподобными синдромами и синдромом Элерса—Данло к торакопластике по поводу ВДГК.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Дельвиг Л. Л.* // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 2. — С. 2—14.
2. *Прозоровская Н. Н., Глиняная С. В., Дельвиг Л. Л.* // Там же. — № 6. — С. 84—86.
3. *Рудаков С. С., Солониченко В. Г.* // Магнито-хирургическая коррекция воронкообразной деформации грудной клетки. — М., 1986. — С. 123—138.
4. *Урбах В. Ю.* Биометрические методы. — М., 1964. — С. 155—157.
5. *Berg R. A., Moss J., Baum B. J., Crystal R. G.* // J. clin. Invest. — 1981. — Vol. 67. — P. 1457—1462.
6. *Berg R. A., Steinmann B., Rennard S. I., Crystal R. G.* // Arch. Biochem. — 1983. — Vol. 226. — P. 681—686.
7. *Bird T. A., Levene C. I.* // Biochem. J. — 1983. — Vol. 210. — P. 633—638.
8. *Bird T. A., Levene C. I.* // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1982. — Vol. 108. — P. 1172—1180.
9. *Dolan F., Sisko F., Riley E. M.* // Anesthesiology. — 1980. — Vol. 52. — P. 266—269.
10. *Faris B., Ferrera R., Toselli P., Numba J.* et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1984. — Vol. 797. — P. 71—75.
11. *Fujii K., Kajiwara T., Kurosu H.* // FEBS Lett. — 1979. — Vol. 97. — P. 193—195.
12. *Geesin J., Murad I., Pinnel Sh. R.* // Biochim biophys. Acta. — 1986. — Vol. 886. - P. 272—274.
13. *Halpern B. L., Char F., Murdoch J. L.* et al. // John Hopk. med. J. — 1971. — Vol. 129. — P. 123—129.
14. Inherited Disease and Anaesthesia / Ed. F. Ellis. — Amsterdam, 1981.
15. *Lind J., Hoynck van Papendrenchl H. P.* // Europ. J. Obstet. Gynec. — 1984. — Vol. 18. — P. 161—168.
16. *Myers B. A., Dubick M. A., Reynolds R. D.* et al. // Biochem. J. — 1985. — Vol. 229. — P. 153—160.
17. *Ose L., McKusick V. A.* // Birth Defects: Orig. Article Ser. — 1977. — Vol. 13, N 3C. — P. 163—169.
18. *Pinnel S. R.* // Yale J. Biol. Med. — 1985. — Vol. 58. — P. 553—559.
19. *Steinmann D. U., Abe Sh., Narlin G. R.* // Collagen Relat. Res. — 1982. — Vol. 2. — P. 553—559.
20. *Tajima S Pinnel S. R.* // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1982. — Vol. 106. - P. 632—637.
21. *Williamson P. R., Kittler J. M., Thanassi J. W., Kagan H. M.* // Biochem. J. — 1986. — Vol. 235. — P. 597—605.

Поступила 15.05.87

EFFECT OF THERAPY INVOLVING A BETA-ADRENOBLOCATOR AND COMPLEX OF VITAMINS ON PATTERNS OF HYDROXYPROLINE EXCRETION IN SOME HEREDITARY DISEASES OF CONNECTIVE TISSUE

N. N. Prozorovskaya, S. V. Glinyanaya, L. P. Geraschenko, S. S. Rudakov, V. G. Solonichenko, A. A. Del'vig

Institute of Medical Enzymology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Excretion of hydroxyproline with urine was studied in 16 children (5-14 years old) with Marphan-Like syndrome and Marphan, Ehlers-Danlos and Larson syndromes after therapy involving propranolol and a complex of vitamins (ascorbic acid, riboflavin and pyridoxine) and recommended on the basis of echocardiographic analyses. The therapeutic course appears to cause quantitative and qualitative correction of collagen and apparently of elastin fibrilles development. Depending on initial patterns of hydroxyproline excretion and the syndrome form the correction could be complete or partial, while positive effect of the

treatment was stable or provisional. The data obtained suggest that the complex treatment developed might be applied as a preoperative therapy of the patients with Marphan-like syndrome as well as with syndromes of Marphan and Ehlers-Dunlos before thoracoplastics caused by hereditary chest deformation and by impairments of cardiovascular system.

УДК 616.248+616.5]-056.43-053.2-07:[616.155.32-008.931+616.155.32-008.93:577.123.3

А. А. Герасимов, М. И. Баканов, И. И. Балаболкин, Т. В. Бершова

КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ЛИЗОСОМНЫХ ФЕРМЕНТОВ И ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ ПРИ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ У ДЕТЕЙ

НИИ педиатрии АМН СССР, Москва

В развитии всех 4 типов аллергических реакций, свойственных патогенезу бронхиальной астмы, важную роль играет лизосомный аппарат клеток [16]. Лизосомы участвуют в катаболизме антигенов [15], образовании иммуноглобулинов, выделяют ферменты, вызывающие повреждение ткани, воспаление и гиперчувствительность [13]. Проницаемость мембран лизосом для ферментов регулируется циклическими нуклеотидами: высокий уровень цГМФ способствует лабилизации лизосомных мембран и усиливает выход кислых гидролаз в цитоплазму клетки, цАМФ, наоборот, стабилизирует мембраны лизосом [1].

Несомненна также роль лизосомных ферментов в легочном компоненте патогенеза дермореспираторного синдрома (ДРС), вероятно, сходном с бронхиальной астмой. Вместе с тем необходимо подчеркнуть, что ДРС представляет собой один из наиболее тяжелых вариантов аллергической патологии, сочетающий бронхиальную астму и атопический дерматит. Комплексное исследование активности лизосомных ферментов и уровня циклических нуклеотидов при данных аллергических заболеваниях имеет важное значение для раскрытия неясных сторон их патогенеза. Успешному решению этой задачи может способствовать обнаружение корреляционных связей между указанными биохимическими параметрами [2].

В настоящей работе впервые исследована корреляция между активностью β-галактозидазы, N-ацетил-β-D-галактозаминидазы и N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы лимфоцитов и полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПЯЛ) и содержанием цАМФ и цГМФ в этих клетках, выделенных из периферической крови детей, больных атопической бронхиальной астмой (АБА), и с ДРС.

Обследовано 29 детей с аллергическими заболеваниями, из них 20 страдали АБА и у 9 был ДРС. Возраст детей был от 5 до 15 лет. Большинство обследованных находились в межприступном периоде заболевания.

Методика

Выделение лимфоцитов и гранулоцитов проводили по методу [6] с небольшими модификациями. Венозную кровь брали в пробирки, содержащие гепарин (10 ЕД/мл), разбавляли 0,9 % хлоридом натрия в соотношении 1:1 и наслаивали на фиколл («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция), затем центрифугировали при 400 g в течение 40 мин при комнатной температуре. Отбирали верхний слой (плазму), слой лимфоцитов переносили в центрифужную пробирку, суспендировали в тройном объеме 0,9 % хлорида натрия, центрифугировали при 100 g в течение 10 мин, удаляли надосадок. Процедуру повторяли. Полученная конечная клеточная суспензия содержала 93—97 % лимфоцитов. К осадку (эритроциты с гранулоцитами) прибавляли 0,9 % хлорид натрия в количестве, равном первоначальному объему крови, добавляли 3 % раствор декстрана Т500 («Pharmacia Fine Chemicals») на 0,9 % хлориде натрия, оставляли на 30 мин при комнатной температуре для осаждения эритроцитов. Надосадочную жидкость отбирали и центрифугировали при 400 g 10 мин. Оставшиеся эритроциты удаляли, применяя двукратный гипотонический осмотический шок: к 0,5 мл суспензии клеток приливали 12 мл деионизованной воды, через 30 с восстанавливали изотоничность добавлением 4 мл 3,6 % хлорида натрия. Затем клетки дважды промывали 0,9 % хлоридом натрия и получали конечную суспензию, содержащую как минимум 95 % полиморфно-ядерных клеток.

В качестве флюорогенных субстратов при определении активности ферментов использованы: 4-метилумбеллиферил-β-D-галактопиранозид, 4-метилумбеллиферил-N-ацетил-β-D-галактозамид, 4-метилумбеллиферил-N-ацетил-β-D-глюкозаминид («Serva», ФРГ). Конечные концентрации субстратов в пробах соответст-

АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ

ТОМ 36

ВЫПУСК 4

ИЮЛЬ — АВГУСТ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. А. ТУТЕЛЬЯН (зам. редактора), А. И. АРЧАКОВ, И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ, Ю. В. БУКИН, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ, Е. А. СТРОЕВ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)
ПАСХИНА Т. С. (Москва)
ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1990

3. *Васильев А. В., Коновалова Л. С., Плецитый К. Д.* и др. // Бюл. экспер. биол.— 1988.— № 2.— С. 181—184.
4. *Васильев А. В., Коновалова Л. С., Плецитый К. Д.* и др. // Вопр. мед. химии.— 1989.— № 1.— С. 92—95.
5. *Плоткин В. Я., Жлоба А. А., Ходош Л. В.* // Проблемы клинической энзимологии.— М., 1989.— С. 114.
6. *Покровский А. А., Тутельян В. А.* Лизосомы.— М., 1976.
7. *Порядков Л. Ф.* // Теоретические и клинические аспекты науки о питании.— М., 1986.— С. 121—131.
8. *Порядков Л. Ф., Васильев А. В., Авреньева Л. И.* и др. // Нат. физиол.— 1983.— № 2.— С. 52—55.
9. *Тутельян В. А., Васильев А. В.* // Вопр. мед. химии.— 1987.— № 5.— С. 65—74.
10. *Baricos W. H., Zhou Y., Mason R. W., Barrett A. J.* // Biochem. J.— 1988.— Vol. 252.— P. 301—304.
11. *Hayase K., Hiramatsu J., Miwa S.* et al. // Nutr. Rep. int.— 1984.— Vol. 6.— P. 1323—1335.
12. *Wall E. J., Vreeling-Sindelarova H., Schellens J. P. M.* et al. // Cell Tissue Res.— 1986.— Vol. 243.— P. 641—648.

Поступила 05.10.89

PROTEOLYTIC ACTIVITY IN LYSOSOMES OF VARIOUS RAT TISSUES UNDER CONDITIONS OF COMPLETE PARENTERAL NUTRITION

A. V. Vasil'ev, N. S. Bregvadze, L. F. Poryadkov, V. A. Tutel'yan

Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Specific, total and nonsedimented activities of cathepsins A, B, C and D as well as of aryl sulfatases A and B, β-galactosidase, β-glucuronidase and N-acetyl-β-D-glucosaminidase were studied in liver, kidney and spleen tissues of rats under conditions of artificial intragastric and parenteral nutrition. Activity of cathepsins A and D in liver tissue as well as total activity of all the lysosomal hydrolases studied in spleen was distinctly increased in parenteral nutrition. These data suggest elevation in the functional activity of lysosomal apparatus under conditions of parenteral nutrition.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.712-007.24-053.2-07:616.5-008.939.629-02:[615.356:577.164.2

Т. А. Цветкова, Т. А. Горохова, А. А. Дельвиг

ВЛИЯНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА СИНТЕЗ КОЛЛАГЕНА ФИБРОБЛАСТАМИ ИЗ КОЖИ ДЕТЕЙ С ВОРОНКООБРАЗНОЙ ДЕФОРМАЦИЕЙ ГРУДНОЙ КЛЕТКИ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Одним из заболеваний, связанных с поражением соединительной ткани, является воронкообразная деформация грудной клетки (ВДГК), которая в разной степени выявляется у 0,6 % детей. ВДГК представляет собой различное по глубине и конфигурации западение грудины и передних отделов ребер и приводит к тяжелым нарушениям функций органов грудной полости [1, 2]. Нередко ВДГК развивается на фоне синдромов Элерса — Данло, Марфана и др. Определение экскреции с мочой продуктов деградации коллагена — свободного и пептидно-связанного оксипролина — выявило снижение содержания этих компонентов в моче больных с изолированной и синдромальной формами ВДКГ [3]. Это позволило предположить, что нарушение метаболизма коллагена в тканях больных является если не основной, то одной из причин развития ВДГК. Если ВДКГ является проявлением общего диспластического процесса, в основе которого лежит нарушение метаболизма коллагена, то следует ожидать, что фибробласты, выделенные из кожи больных, будут отличаться от фибробластов, выделенных из кожи здоровых детей, количественными и (или) качественными характеристиками синтеза и обмена коллагена. Для проверки этого предположения были определены продукция коллагена фибробластами у больных и здоровых детей и влияние на этот процесс аскорбиновой кислоты.

Методика. Для культивирования клеток использовали среду Игла, содержащую 10 % сыворотки крупного рогатого скота и 5 % сыворотки пуповинной крови новорожденных. Клетки рассеивали на чашках Петри (10—15 тыс. клеток на 1 $см^2$) и помещали в CO_2-инкубатор с подачей 5 % CO_2. Смену питательной среды проводили на 3-й день субкультивирования. На 5-й день, когда клетки достигали стационарной стадии роста, вводили аскорбиновую кислоту (50 мкг/мл). На следующий день осуществляли замену питательной среды на бессывороточную, вводили ^{14}С-пролин (2 мкКи/мл) и аскорбиновую кислоту (50 мкг/мл). Клетки помещали на сутки в CO_2-инкубатор. При исследовании синтеза коллагена в логарифмической стадии роста перевод клеток на бессывороточную среду и внесение ^{14}С-пролина проводили на 3-й день субкультивирования.

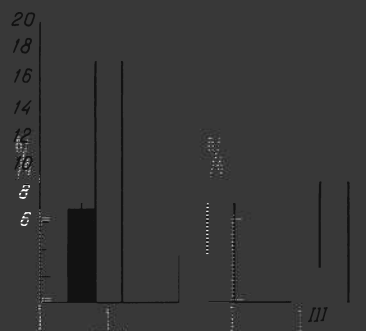
При исследовании синтеза коллагена культуральную среду сливали, клетки с чашек Петри снимали скребком и разрушали путем встряхивания в течение 30 с в 0,5 % растворе додецилсульфата натрия. Клетки объединяли со средой, прогревали 5 мин при 90 °С для инактивации протеаз и диализовали против 0,5 М уксусной кислоты. Отдиализованный материал подвергали гидролизу в запаянных ампулах в 6 н. соляной кислоте при 105 °С в течение 20 ч. Гидролизаты высушивали в вакууме над КОН и растворяли сухой остаток в 0,1 н. соляной кислоте. Для разделения аминокислот использовали колонку (0,9×30 см) с ионообменной смолой Aminex Q-150S. Элюцию осуществляли 0,2 М Na-цитратным буфером pH 3,2 со скоростью 1 мл/мин. Собирали фракции по 2 мл и определяли радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счетчике. Содержание коллагена в процентах рассчитывали по формуле:

$$\frac{\text{Оксипро имп/мин} \cdot 2 \cdot 100}{(\text{Про имп/мин} - \text{Оксипро имп/мин}) \cdot 5 + 2\ \text{Оксипро имп/мин}}.$$

Формула основана на том, что коллаген содержит почти равные количества пролина и оксипролина и что в коллагене содержится в 5 раз больше аминокислот (пролина и оксипролина), чем в неколлагеновых белках [11].

При определении степени гидроксилирования вновь синтезированного коллагена по соотношению ^{14}С-пролин/^{14}С-оксипролин клетки метили ^{14}С-пролином, как описано выше. Среду сливали, добавляли к ней в качестве ингибитора протеаз ЭДТА (конечная концентрация 10 мМ) и диализовали против 0,5 М уксусной кислоты 24 ч. Далее для разрушения неколлагеновых белков материал обрабатывали кристаллическим пепсином (300 мкг/мл; «Sigma») 6 ч при 22 °С. Коллаген осаждали добавлением NaCl (конечная концентрация 2 М), осадок отделяли центрифугированием, растворяли в 0,5 М уксусной кислоте и диализовали против того же раствора. Кислотный гидролиз и разделение оксипролина и пролина проводили, как описано ранее.

Результаты и обсуждение. Объектом исследования служили фибробласты из кожи детей, страдающих ВДГК. Биоптаты кожи были получены во время хирургической коррекции ВДГК. В качестве контроля использовали фибробласты из кожи здоровых детей того же возраста. Количество коллагена, синтезированного фибробластами в логарифмической и стационарной стадиях роста, представлено на рисунке. Полученные данные показывают, что продукция кол-



Относительный синтез коллагена в логарифмической (темные столбики) и стационарной (светлые столбики) стадиях роста кожных фибробластов у здоровых детей (*I*; n—4), детей с ВДГК (*II*; n=3) и синдромом Элерса — Данло (*III*, n=2). По оси ординат — содержание коллагена (в %).

лагена в фибробластах детей с изолированной формой ВДГК и синдромом Элерса — Данло значительно снижена по сравнению с нормой как в логарифмической, так и в стационарной стадии роста. Влияние аскорбиновой кислоты на синтез коллагена исследовали в условиях логарифмической стадии роста фибробластов (табл. 1). Если фибробласты здоровых детей увеличивали продукцию коллагена в ответ на добавление аскорбиновой кислоты в 3 раза, то фибробласты детей с ВДГК — только в 1,7—2 раза. В отсутствие аскорбиновой кислоты продукция коллагена фибробластами больных детей несколько ниже, чем в норме.

Аскорбиновая кислота наряду с ионами Fe^{+2} и O_2 является кофактором двух ферментов: пролил[КФ 1.14.11.2]- и лизил[КФ 1.14.11.4]гидроксилаз, катализирующих образование оксипролина и оксилизина в коллагене [5, 8, 9]. Эта реакция является одной из важных ступеней посттрансляционной модификации коллагена [6, 10]. Имеются данные об активации пролилгидроксилазы аскорбиновой кислотой. При исследовании фибробластов мышиного эмбриона наблюдали увеличение количества синтезированного коллагена в присутствии аскорбиновой кислоты в культуральной среде [4, 7].

Отмеченное нами снижение продукции коллагена фибробластами кожи больных детей не может быть объяснено недостаточным гидроксилированием остатков пролина в молекуле коллагена. Анализ выделенного из среды вновь синтезированного коллагена показал, что степень гидроксилирования коллагена в норме и при патологии практически одинакова (табл. 2).

Полученные нами данные показывают, что фибробласты, выделенные из кожи больных детей,

Таблица 1

Влияние аскорбиновой кислоты на синтез коллагена фибробластами кожи детей (логарифмическая стадия; $M \pm m$)

Штамм фибробластов	Синтезированный коллаген, %	
	без аскорбиновой кислоты	50 мкг/мл аскорбиновой кислоты
Норма (3)	2,5±0,36	6,8±0,52
ВДГК (2)	1,8±0,07	3,4±0,28
ВДГК+синдром Элерса — Данло (1)	1,6	4,1
Синдром Элерса — Данло (1)	0,67	1,3

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках указано число тестированных штаммов фибробластов.

Таблица 2

Степень гидроксилирования вновь синтезированного коллагена ($M \pm m$)

Штамм фибробластов	Пролин имп/мин / Оксипролин имп/мин
Норма (3)	1,19±0,21
ВДГК (2)	1,19±0,13
ВДГК+синдром Марфана (1)	0,99

продуцируют меньше коллагена, что подтверждает высказанное предположение об общем характере ВДГК, несмотря на то что диспластический процесс затрагивает хрящевую ткань. Можно предположить, что снижение продукции коллагена является одним из этиологических факторов этой дисплазии.

Полученные результаты позволяют использовать выделенные фибробласты в качестве модели для исследования молекулярных причин возникновения данной дисплазии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Исаков Ю. Ф., Долецкий С. Я.* Детская хирургия. 2-е изд.— М., 1978.
2. *Лазюк Г. И., Лурье И. В., Черствой Е. Д.* Наследственные синдромы множественных пороков развития.— М., 1983.
3. *Прозоровская Н. Н., Глиняная С. В., Рудаков С. С., Дельвиг А. А.* // Вопр. мед. химии.— 1987.— № 3.— С. 59—61.
4. *Berg R. A., Kao W. W., Prockop D. J.* // Biochim. biophys. Acta.— 1976.— Vol. 444.— P. 756—764.
5. *Berg R. A., Steinmann B., Ronnard S. I., Cristal R. G.* // Arch. Biochem.— 1983.— Vol. 226.— P. 681—686.
6. *Kivirikko K. I., Risteli L.* // Med. Biol.— 1976.— Vol. 54.— P. 159—186.
7. *Murad S., Sivarajah A., Pinnel S. R.* // J. invest. Derm.— 1980.— Vol. 75.— P. 404—407.
8. *Murad S., Tajima S., Johnson G. R.* // Ibid.— 1983.— Vol. 81.— P. 158—162.
9. *Peterkofski B.* // Arch. Biochem.— 1972.— Vol. 152.— P. 318—328.
10. *Prockop D. J., Kivirikko K. I., Tuderman L.* // Med. Progr.— 1977.— Vol. 301.— P. 13—23.
11. *Westner M., Krieg T., Horlein D., Glanville W.* // J. biol. Chem.— 1979.— Vol. 254.— P. 7016—7023.

Поступила 10.01.89

INFLUENCE OF ASCORBIC ACID ON COLLAGEN SYNTHESIS IN SKIN FIBROBLASTS OF CHILDREN WITH FUNNEL CHEST

T. A. Tsvetkova, T. A. Gorokhova, A. A. Delvig

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Relative synthesis of collagen was studied in skin fibroblasts of children with funnel chest and of corresponding age children (control) in presence of ascorbic acid. In presence of ascorbic acid the rate of collagen synthesis was 2-2.4-fold lower that in corresponding controls both in proliferating and stationary cultures. At the same time, relative synthesis of collagen was quite similar both in the patient and control fibroblasts in presence of ascorbic acid. Estimation of the ^{14}C-Hypro/^{14}C-Pro ratio in collagens isolated from cultural media showed that there was no difference in the hydroxylation rate of collagens in control and patient fibroblasts. These data suggest that funnel chest is one of the forms of systemic connective tissue diseases, which impaired mainly the cartilages.