Sveučilište u Splitu
Medicinski fakultet

Eduard Rod, prim. dr. med., spec. ortoped, uža specijalizacija iz traumatologije lokomotornog sustava

OPTIMIZACIJA GENSKE (*EX VIVO*) TERAPIJE KOŠTANIM MORFOGENETSKIM PROTEINOM-2 U REKONSTRUKCIJI PREDNJE UKRIŽENE SVEZE KOLJENA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Alan Ivković, prim. dr. med., spec. ortoped

Split, 2019.

Rad je izrađen na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u Specijalnoj bolnici „Sveta Katarina“ u Zaboku te Kliničkoj bolnici „Sveti Duh“ u Zagrebu.

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Alan Ivković, prim. dr. med., spec. ortoped

ZAHVALE

Velik broj ljudi zaslužan je za izradu ove doktorske disertacije i svima se zahvaljujem od srca!

Posebne zahvale:

- izv. prof. dr. sc. Alanu Ivkoviću, prim. dr. med., spec. ortopedu, mom mentoru, na vremenu i strpljivosti

- izv. prof. dr. sc. Ingi Marijanović za savjete vezane uz molekularnu biologiju

- dr. sc. Maji Antunović i dr. sc. Igoru Matiću za pomoć u laboratoriju

- prof. dr. sc. Draganu Primorcu, dr. med. spec. pedijatru, forenzičaru, genetičaru, na pruženoj mogućnosti i potpori

Doktorsku disertaciju posvećujem:

- svojoj djeci Franki i Lovri zbog kojih sve ima smisla

- majci Mirjani za sve što mi je pružila

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. Problem koštano-tetivnog cijeljenja prednje ukrižene sveze 1

1.2. Mogućnosti poboljšanja koštano-tetivnog cijeljenja 7

1.3. Okoštavanje, koštano cijeljenje i koštana pregradnja 10

1.3.1. Upalni citokini 15

1.3.2. Koštani morfogenetski proteini 16

1.3.3. Metaloproteinaze i čimbenici angiogeneze 19

1.4. Regenerativna medicina u ortopediji 19

1.6. Genska terapija u regenerativnoj medicini 25

1.7. Virusni vektori 28

1.7.1. Adenovirusi u genskoj terapiji 29

1.7.2. Geni izvjestitelji 32

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 34

3. MATERIJALI I METODE 35

3.1. Uzorci 35

3.2. Vektori 35

3.2.1. Umnažanje i pročišćavanje replikacijski defektnih adenovirusa u kulturi stanica 36

3.2.2. Određivanje koncentracije i infektivnosti adenovirusnih čestica 38

3.3. Transdukcija mišićnog tkiva 39

3.3.1. Određivanje optimalnog broja adenovirusnih čestica za transdukciju mišićnog tkiva pomoću luciferase 39

3.3.2. Određivanje optimalnog vremena kontakta mišićnog tkiva i adenovirusnih čestica pomoću luciferase 41

3.3.3. Određivanje utjecaja iona lantana i kalcija na poboljšanje transdukcije mišićnog tkiva 43

3.3.4. Izolacija i određivanje ukupnih staničnih proteina 45

3.3.5. Određivanje aktivnosti luciferase 45

3.3.6. Primjena optimiziranog protokola za transdukciju mišićnog tkiva s Ad.BMP2 46

3.3.7. Izolacija RNA iz mišićnog tkiva i određivanje njene koncentracije 48

3.3.8. Određivanje razine izraženosti gena metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (*real-time* PCR) 49

3.3.9. Određivanje količine otpuštenog proteina BMP2 u mediju pomoću ELISA 50

3.3.10. Histološko bojenje uzoraka hematoksilin-eozinom 51

3.3.11. Imunohistokemijska detekcija kolagena tipa I (COL-I) 52
3.4. Statistički postupci 53
4. REZULTATI 54
4.1. Određivanje optimalne doze Ad.Luc-a potrebne za transdukciju humanog mišićnog tkiva 54
4.2. Određivanje optimalnog trajanja kontakta Ad.Luc-a i humanog mišićnog tkiva 55
4.3. Utvrđivanje utjecaja pozitivnih iona lantana i kalcija na transdukciju humanog mišićnog tkiva s Ad.Luc-om 56
4.4. Primjena optimiziranog protokola transdukcije koristeći Ad.BMP2 u svrhu poboljšanja osteodiferencijacije humanog mišićnog tkiva 57
4.4.1. Analiza otpuštanja BMP2 pomoću ELISA 57
4.4.2. Analiza genske izraženosti markera osteogeneze pomoću PCR-a 58
4.4.3. Histološko bojenje mišićnih uzoraka hematoksilin-eozinom 61
4.4.4. Utvrđivanje prisustva COL-I u transduciranim mišićima imunihistokemijskim bojenjem 62
5. RASPRAVA 64
6. ZAKLJUČAK 72
7. SAŽETAK 73
8. SUMMARY 75
9. POPIS LITERATURE 76
10. ŽIVOTOPIS 103

POPIS OZNAKA I KRATICA

ACL	prednja ukrižena sveza (eng., *anterior cruciate ligament*)
Ad.BMP2	adenovirusni vektor koji eksprimira gen za koštani morfogeni protein -2 (eng., *adenoviral vector encoding bone morphogenetic protein-2 (Ad.BMP2)*)
Ad.Luc	adenovirusni vektor koji eksprimira gen za luciferazu (eng., *adenoviral vector encoding firefly luciferase reporter gene (AdLuc)*)
ALP	alkalna fosfataza (eng., *alkaline phosphatase*)
ANOVA	test jednosmjerne analize varijance (eng., *one-way analysis of variance*)
bFGF	bazični čimbenik rasta fibroblasta (eng., *basic fibroblast growth factor*)
BMP	koštani morfogenetski protein (eng., *bone morphogenic protein*)
BMP2	koštani morfogenetski protein 2 (eng., *bone morphogenic protein-2*)
BMU	temeljna višestanična jedinica (eng., *basic multicelluar unit*)
BSP	koštani sijaloprotein (eng., *bone sialoprotein*)
Ca	kalcij
CAR	koksakivirus-adenovirus receptor (eng., *coxsakievirus-adenovirus receptor*)
CD34	eng., *Hematopoietic progenitor cell antigen* CD34
cDNA	komplementarna deoskiribonukleinska kiselina (eng., *Deoxyribonucleic acid*)
CFU-F	fibroblast koji formira kolonije (eng., *colony forming unit-fibroblast*)
CMV	citomegalo virus
COL-I	kolagen tip I
Col1A1	kolegen tipa I alfa 1 (eng., *collagen type 1alpha 1*)
CTGL	čimbenik rasta tetivnog tkiva (eng., *connective tissue growth factor*)

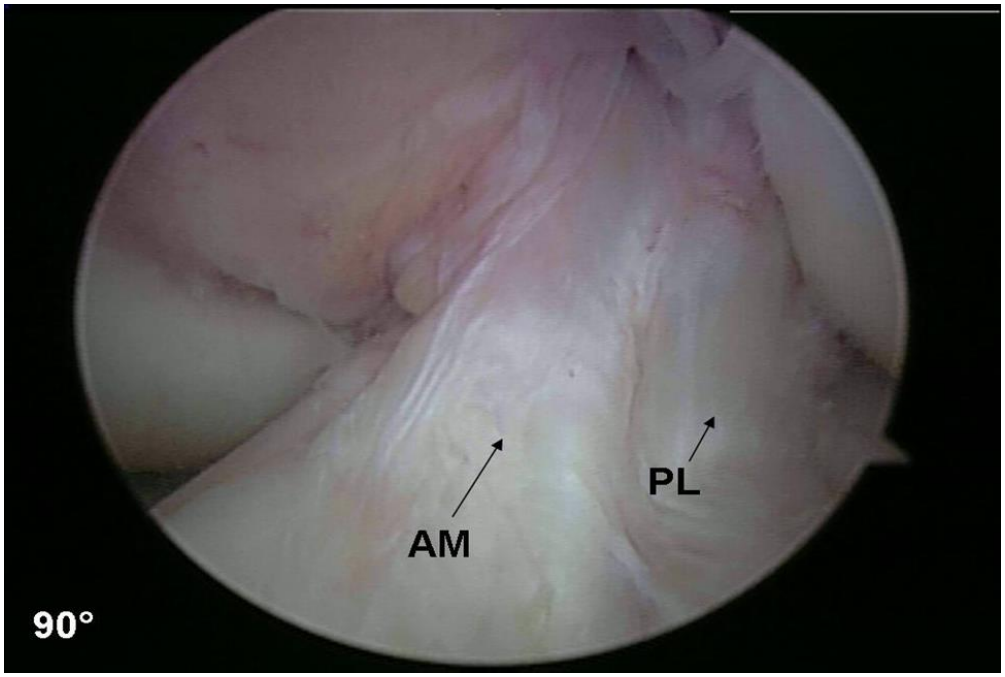
DEPC	dietil-pirokarbonat
DMEM	Dulbeccov medificirani esencijalni medij (eng., *Dullbecco´s Modified Esential Medium*)
DMP-1	dentin matriks protein 1
DNA	deoskiribonukleinska kiselina (eng., *Deoxyribonucleic acid*)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (eng., *ethylenediaminetetraacetic acid*)
ELISA	enzim vezujući imunosorbent test (eng., *Enzyme-linked immunosorbent assay*)
FBS	fetalni goveđi serum (eng., *Fetal Bovine Serum*)
FIZ	fibrozna interzona, tj. granulacijsko tkivo u području koštano-tetivnog cijeljenja
GAPDH	gliceraldehid 3-fosfat „domaćinski“ gen (eng., *housekeepinggene gliceraldehid-3-fosfat*)
GDF	faktor rasta i diferencijacije (eng., *Growth differentiation factor*)
GFP	zeleno fluorescentni protein (eng., *green fluerescent protein*)
HEK 293	humane embrionalne stanice 293 (eng., *Human embryonic kidney cells 293*)
HGP	eng., *Human Genome Project*
IL-1	interleukin 1
IL-11	interleukin 11
IL-18	interleukin 18
IL-6	interleukin 6
ISCT	Udruženje za staničnu terapiju (eng., *International Society for Cellular Terapy*)
La	lantan
MAPK	mitogen aktivirajuća protein kinaza (eng., *mitogen-activated protein kinase*)

MIF	Mullerov inhibirajući čimbenik (eng., Müllerian-inhibiting factor)
MSC	mezemhimske matične stanice (eng., *mesenchymal stem cells*)
OA	degenerativna bolest zgloba, tj. osteoarthritis
Osx	osteoblast specifični transkripcijski faktor Osterix
PBS	fosfatni pufer (eng., *Phosphate-buffered saline*)
PDGFRα	eng., *Platelet-derived growth factor receptor alpha*
PFU	plak formirajuća jedinica (eng., *plague forming unit*)
PRP	plazma bogata tromcocitima (eng., *platelet rich plasma*)
qPCR	kvantitativni PCR
RFP	crveno fluoresentni protein (eng., *red fluerescent protein*)
RNA	ribonukleinska kiselina (eng., *Ribonucleic acid*)
RUNX2	eng., *runt related transcription factor 2*
SIP	eng., *Smad interecting protein*
TDSCs	tetivne mezenhimske stanice (eng., *tendon-derived stem cells*)
TGF-β	transformirajući čimbenik rasta β (eng., *transforming growth factor beta*)
TNF-α	tumor nekrotizirajući čimbenik α (eng., *tumor necrosis factor α*)
VEGF	krvožilni endotelijalni čimbenik rasta (eng., *vascular endothelial growth factor*)
αMEM	α modifikacija minimalnog esencijalnog medija (eng., *Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modificatio)*

1. **UVOD**

1.1. Problem koštano-tetivnog cijeljenja prednje ukrižene sveze

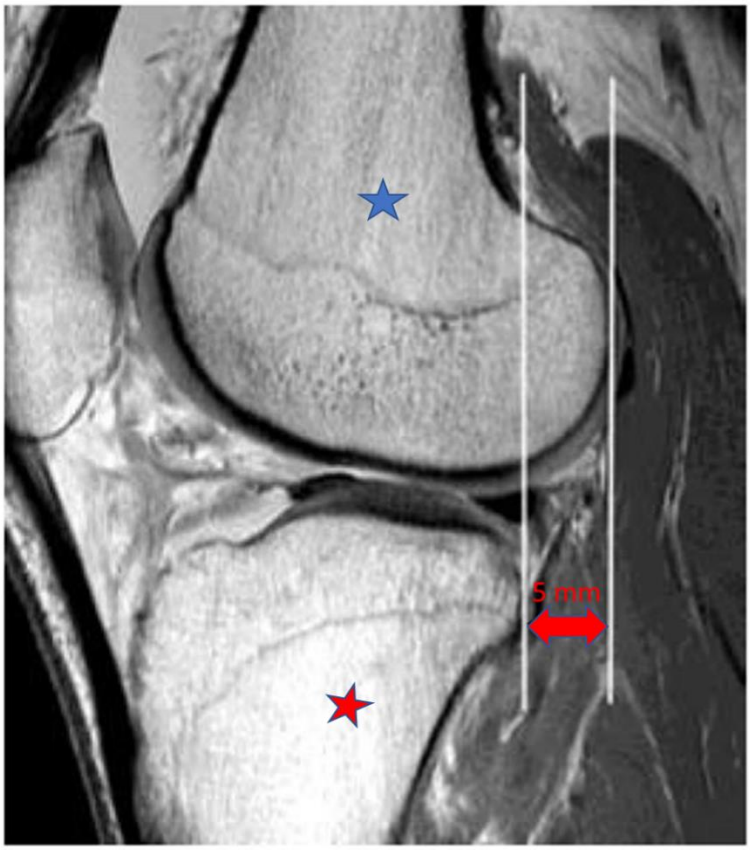
Prednja ukrižena sveza (eng., *anterior cruciate ligament – ACL*) jedna je od četiriju najvećih sveza u koljenu. Osigurava kontakt između natkoljenične i potkoljenične kosti, stabilnost koljenskog zgloba i ograničava rotacije prilikom kretnji. Djeluje kao primarni stabilizator koljena za sprječavanje prekomjerne prednje translacije potkoljenice i sekundarni stabilizator koljena za sprječavanje prekomjerne rotacije potkoljenice prilikom valgus i varus stresa koljena. Sastavljena je od dva snopa, anteromedijalnog i posterolateralnog (1), koji unutar zgloba djelomično rotiraju jedan oko drugoga (Slika 1.).



Slika 1. Artroskopski prikaz oba snopa prednje ukrižene sveze pri 90° fleksije koljena. AM označava anteromedijalni snop, a PL posterolateralni snop. Preuzeto (uz dozvolu) iz Specijalne bolnice „Sveta Katarina“, Zabok.

Kod ispruženog (ekstendiranog) koljena prednji dio anteromedijalnog snopa ograničava daljnje ispružanje zbog sudara s krovom interkondilarne jame. Pri savijanju (fleksiji) koljena oba snopa rotiraju jedan oko drugog tako da je posterolateralni snop ispod anteromedijalnog. Radi se relativno čvrstoj svezi. Sila koju ACL može izdržati iznosi 2160 N uz mogućnost istezanja od 20%. Prilikom pasivnih pokreta koljena sila na ACL iznosi 100 N, 400 N pri hodanju pa sve do 1700 N pri naporu (2). Ozljede ACL-a obuhvaćaju velik postotak svih ozljeda koljenskog zgloba. Rezultat su rotacijskih ili hiperekstenzijskih trauma. Učestalost ozljeda ACL-a je 30 slučajeva godišnje na 100 000 stanovnika. Samo u Sjedinjenim Američkim Državama godišnje bilježi se 200 000 novih slučajeva puknuća prednje ukrižene sveze (3). Ozljede se najčešće događaju prilikom sportske aktivnosti i ponajprije pogađaju mlađu, radnu i aktivnu populaciju. Predisponirajući čimbenici za ozljedu ACL-a uključuju neuromišićne i biomehaničke abnormalnosti (4), mutaciju gena za stvaranje kolagena (5), utjecaj ženskih spolnih hormona (6), prirođenu hipermobilnost zglobova (7) i utjecaj individualne specifičnosti građe koljena (8).

Za razliku od izvanzglobnih ligamenata (medijalne i lateralne kolateralne sveze), prednja ukrižena sveza pokazuje malu sposobnost spontanog cijeljenja (9). Tijekom ozljede ACL-a dolazi i do pucanja tanke sinovijalne ovojnice koja je okružuje. Međusobno miješanje krvi i sinovijalne tekućine rezultira usporenim i minimalnim stvaranjem hematoma na mjestu puknuća, a time dovodi do sprječavanja nakupljanja čimbenika odgovornih za cijeljenje (10). Usprkos unutarzglobnom krvarenju koje nastaje nakon puknuća ACL-a, u području puknuća ne dolazi do nastanka fibrinskog ugruška, tj. učvršćivanja trombocitnog ugruška pomoću fibrinskih vlakana te daljnjeg cijeljenja. Objašnjenje je da cirkulirajući unutarzglobni plazmin razgrađuje fibrinski ugrušak. U slučaju ozljede zglobova, uz prisutno unutarzglobno krvarenje, stvaranje plazmina, od strane sinovijalne ovojnice, pojačano je pod utjecajem urokinaze plazminogen aktivatora. Klinička prednost tog mehanizma je sprječavanje stvaranja ožiljaka unutar zgloba, a time i ograničenja pokreta. Nažalost, mana je nemogućnost primarnog cijeljenja puknuća unutarzglobnih ligamenata poput ACL-a (11). Utječući na kinematiku i na stabilnost koljenskog zgloba, puknuće ACL-a, osim medicinskog, ima i važno socio-ekonomsko značenje. Neliječeno puknuće ACL-a čini koljenski zglob nestabilnim uslijed prednjeg pomaka potkoljenične kosti (Slika 2.), a to smanjuje mogućnost tjelesne aktivnosti, povećava rizik od novih ozljeda te ubrzava razvoj degenerativnih promjena, odnosno osteoartritisa (OA) koljena (12).



Slika 2. Prednji pomak potkoljenične kosti u odnosu na bedrenu kost unutar koljenskog zgloba.

Plava zvjezdica označava bedrenu kost, crvena zvjezdica potkoljeničnu kost, a crvena strelica pomak. Pomak od 5 mm nastao je uslijed nedostatka ACL-a; prikazan je magnetskom rezonancom. Preuzeto (uz dozvolu) iz Specijalne bolnice „Sveta Katarina“, Zabok.

Liječenje puknuća ACL-a u mlađih osoba uglavnom je operacijsko. Tijekom jedne godine samo u SAD-u izvrši se preko 100 000 operacijskih rekonstrukcija ACL-a. Prvi opis operacijskog liječenja ACL-a datira još iz 1900. godine kada je Battle prvi put izvijestio o rekonstrukciji ACL-a učinjenoj dvije godine ranije ne navodeći podrobnije samu tehniku operacije (13). Razvojem operacijske tehnike i tehnologije, operacije postaju sve manje invazivne i sve više anatomske. Danas prevladavaju dvije minimalno invazivne operacijske metode. Čitava operacija izvodi se artroskopski pri čemu se koljeno ne otvara, već se operacijski zahvat izvrši kroz nekoliko malih rezova pomoću specijalne, 4,5 mm široke,

kamere (tzv. artroskopa). Tijek operacije prati se na zaslonu. Obje tehnike kao presadak koriste tkivo samog pacijenta (tzv. autologno tkivo) u svrhu rekonstrukcije ligamenta. Kod prve tehnike koristi se srednja trećina patelarnog ligamenta, a kod druge tetive natkoljenih mišića (u pravilu mišići gracilisa i semitendinozusa). Po pripremi i izmjeri promjera presatka pristupa se bušenju koštanih tunela u bedrenoj i potkoljeničnoj kosti na mjestima pripoja puknute prednje ukrižene sveze. Bez obzira koja se operacijska metoda koristi potrebno je uvođenje i učvršćivanje presatka kroz ranije probušene tunele u potkoljeničnoj i natkoljeničnoj kosti.

Prirodno mjesto kojim se tetive i ligamenti hvataju na kost nazivamo entezom. Radi se o visoko specijaliziranom području koje prenosi stres između kosti i ligamenta. Opisana su dva različita tipa hvatišta: indirektna (fibrozna) i direktna (fibrohrskavična) (14). Razlika je u prisustvu hrskavičnog tkiva unutar samog hvatišta, odnosno, insercije.

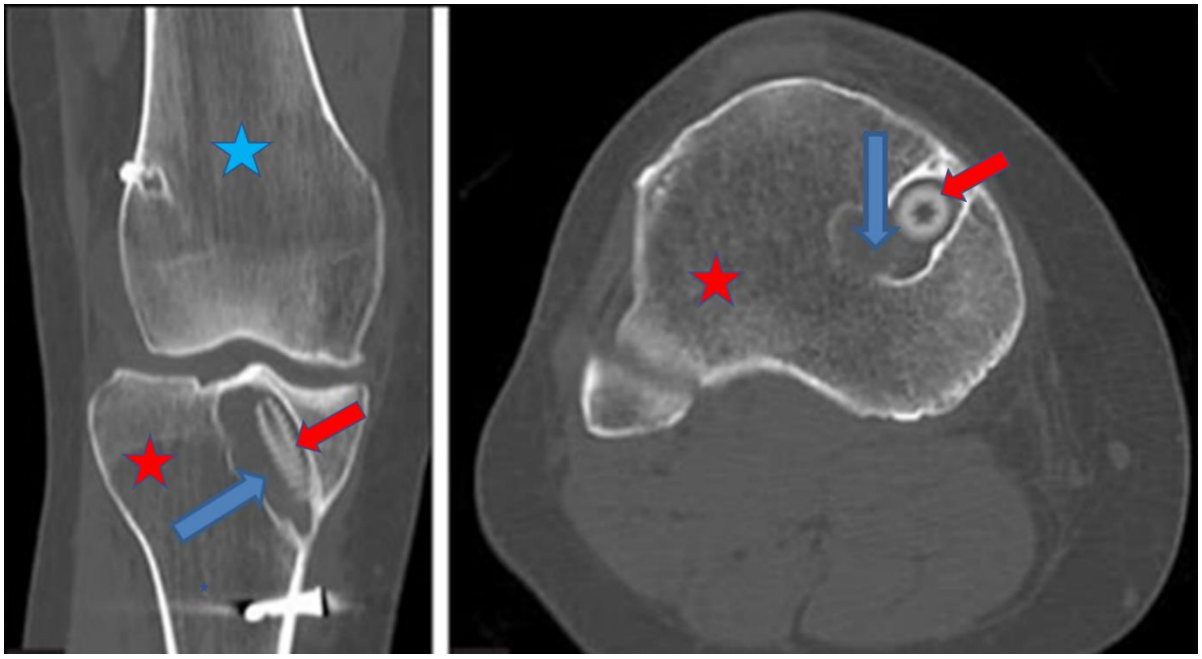
ACL se pripaja direktnim hvatištem i sadrži četiri histološki različite zone: 1) ligament, 2) nekalcificiranu fibrohrskavicu, 3) kalcificiranu fibrohrskavicu i 4) kost (15).

U slučaju rekonstrukcije prednje ukrižene sveze, idealni presadak trebao bi posjedovati mikroskopsku strukturu i biomehaničke karakteristike, što sličnije prirodnoj svezi.

Međutim, uvođenjem tetive kroz koštane tunele, tijekom rekonstrukcije prednje ukrižene sveze, stvaraju se dvije situacije koje odudaraju od prirodnih odnosa. Prva je ta da tetiva zamjenjuje ligament te mora proći proces ligamentizacije, tj. postati strukturom i funkcijom što sličnija prednjoj ukriženoj svezi. Druga je ta da umjesto prirodnog pripoja tetive na površini kosti očekujemo da tetivni presadak zacijeli u umjetno stvorenim koštanim tunelima, a kako bi to bilo moguće, potrebno je postići stabilnost presatka unutar koštanih tunela. Tijekom operacije, nakon uvođenja presatka, mehanički ga stabiliziramo pomoću različitih ortopedskih implantata. Takvi implantati omogućuju mehaničku stabilizaciju te osiguravaju koštano-tetivno cijeljenje i stvaranje biološke stabilnosti. Stvaranje biološke stabilnosti, tj. koštano-tetivno cijeljenje, zahtijeva vremenski period od nekoliko mjeseci. Implantati su u većini slučajeva bioresorptivni te biološka stabilnost postepeno nadomješta mehaničku. Proces koštano-tetivnog cijeljenja započinje stvaranjem fibrozne interzone (FIZ) u području između tetive i kosti. FIZ je granulacijsko tkivo bogato krvnim žilama i stanicama, a građeno je od kratkih neorganiziranih kolagenskih vlakana. Susjedna kost se intenzivno pregrađuje i djelomično resorbira uz zamjensko apozicijsko stvaranje spongiozne (spužvaste) kosti. Unutar početnih 12 tjedana, u početku neorganizirano vezivno tkivo FIZ-a, usmjerava se

poprečno. Novonastali poprečni kolagenski mostovi povezuju tetivu i kost. Izvanstanična tvar FIZ-a okoštava te kost urasta u vanjski dio tetive. Uspostavljanjem kontinuiteta kolagenskih vlakana između tetive i kosti (nalik na Sharpeyjeva vlakna), uspostavlja se tetivno-koštani spoj (16-20). Potrebno je naglasiti da koštano-tetivno cijeljenje nije isto u svim područjima. Područje tunela udaljeno od zgloba sklonije je stvaranju indirektnih hvatišta, a područje bliže zglobu direktnih (21).

Ranije opisani proces koštano-tetivnog cijeljenja, nažalost, relativno često bude usporen i nepotpun te završava djelomičnim rastapanjem okolne kosti uz proširenje koštanih tunela (eng., *tunnel widening*) (Slika 3.).



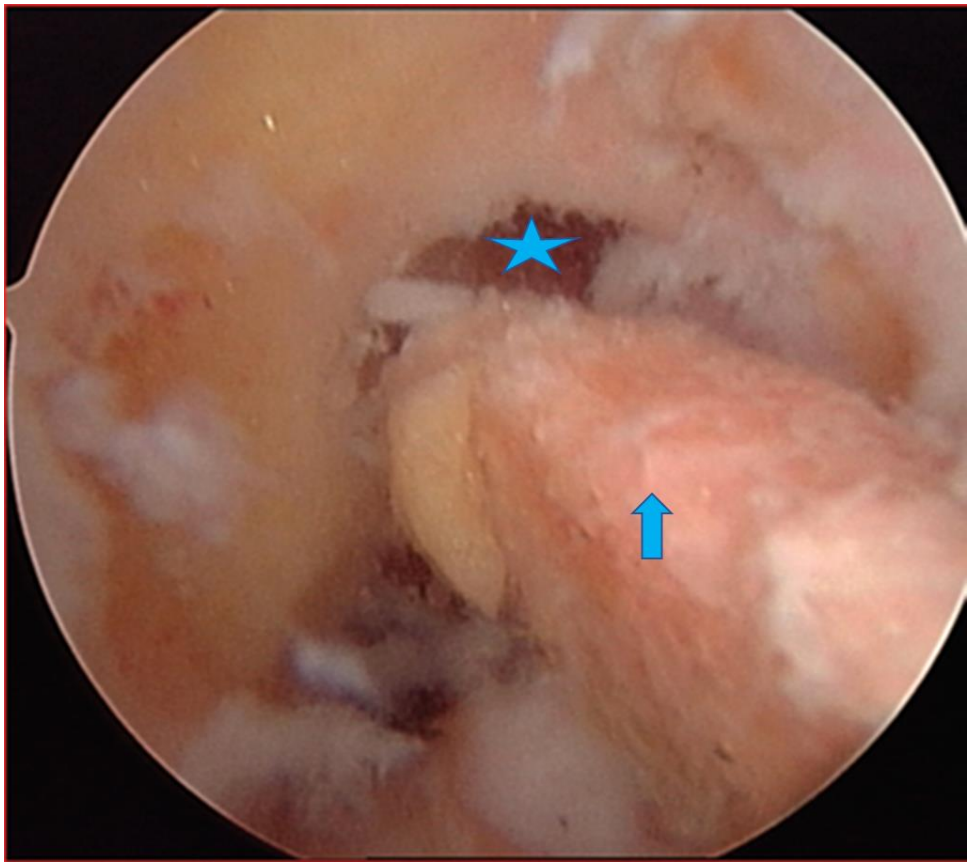
Slika 3. Proširenja koštanih tunela prikazano kompjuteriziranom tomografijom.

Plava strelica označava područje proširenja koštanog tunela, a crvena strelica označava resorptivni vijak u potkoljeničnoj kosti (označeno crvenom zvijezdicom). Plava zvjezdica označava bedrenu kost. Preuzeto (uz dozvolu) iz Specijalne bolnice „Sveta Katarina“, Zabok.

Mehanizmi kojim nastaju proširenja tunela nisu sasvim razjašnjeni. Možemo ih podijeliti na mehaničke i biološke. Mogući mehanički uzroci proširenja tunela su: 1) manji pomaci

između presatka i tunela, 2) nepravilan prijenos opterećenja na presadak, 3) loša učvršćivanja presatka, 4) nepravilan položaj tunela i 5) previše agresivna rehabilitacija (22-25). Kao biološki uzroci navode se: 1) citokinima posredovana nespecifična upalna reakcija, 2) imunološki odgovor na strano tijelo i 3) smrt stanica prouzročena povišenjem temperature zbog bušenja kosti ili toksičnim produktima (etilen, oksid, metal, itd.) (26).

Problem proširenja tunela sam po sebi ne utječe na stabilnost koljena. On postaje važan prilikom ponovnog oštećenja rekonstruiranog ACL-a. Puknuće presatka zahtijeva u većini slučajeva ponovnu rekonstrukciju. Reoperacija nakon ozljede rekonstruiranog ACL-a, tehnički je značajno teža u odnosu na prvu operaciju. Cilj je novi presadak postaviti u anatomski položaj u kojem sada postoje veća ili manja koštana oštećenja. Proširenje koštanog kanala kompromitira položaj novog presatka te otežava učvršćivanje i cijeljenje. Mjerenje položaja i širine femoralnog i tibijalnog koštanog tunela sastavni su dio prijeoperacijskog plana revizije ACL-a. Širina presatka anatomski je ograničena. U slučaju proširenja koštanih tunela iznad 16 mm, a što je dvostruka prosječna širina koštanih tunela tijekom primarne rekonstrukcije ACL-a, potrebna je operacija u dva akta (27). U prvom aktu odstrani se raniji učvršćujući materijal, „očiste“ tuneli unutar kosti kroz koje je prolazio presadak te se tuneli ispune autolognom spongioznom kosti (Slika 4.). Nakon nekoliko mjeseci, a po inkorporaciji koštanih presadaka, pristupa se reviziji ACL-a.



Slika 4. Prikaz artroskopskog umetanja autologne kosti u koštani tunel tijekom prvog akta revizije puknuća prednje ukrižene sveze.

Strelica označuje autolognu kost, a zvjezdica koštani tunel u medijalnom kondilu bedrene kosti. Preuzeto (uz dozvolu) iz Specijalne bolnice „Sveta Katarina“, Zabok.

1.2. Mogućnosti poboljšanja koštano-tetivnog cijeljenja

Ideja da oštećeno tkivo mišićno-koštanog sustava obnovimo prirodnim procesima cijeljenja, umjesto da ga se operacijski zamijeni, potaknula je i primjenu različitih strategija regenerativne medicine i tkivnog inženjeringa u ortopediji (28, 29). Cilj primjene metoda regenerativne medicine i tkivnog inženjeringa jest poticanje i pojačavanje prirodnih mehanizama cijeljenja. S konačnim ciljem poboljšanja čvrstoće područja tetivno-koštanog spoja unutar koštanog tunela te sprječavanja proširenja koštanih tunela, odnosno poboljšanja koštano-tetivnog cijeljenja, istraživane su različite biološke regenerativne strategije.

Regenerativna medicina počiva na međudjelovanju stanica i bioloških stimulansa te nosača koji ih drže na istom mjestu. Strategije poboljšanja koštano-tetivnog cijeljenja baziraju se na istim principima, a mogli bi ih podijeliti u 7 različitih strategija: 1) dodatak čimbenika rasta, 2) korištenje biomaterijala, 3) korištenje progenitornih stanica, 4) primjena genske terapije, 5) korištenje autolognog tkiva, 6) biofizički utjecaji na mjesto cijeljenja te 7) farmakološki pripravci (30).

Wen i suradnici istraživali su na odraslim zečevima osteokonduktivno (proces u kojem transplantat služi samo kao nosač za odlaganje novonastale kosti) i resorptivno svojstvo kalcij-fosfatnog cementa primijenjenog u području koštano-tetivnog cijeljenja nakon rekonstrukcije ACL-a. Studija je pokazala povećanje čvrstoće u području koštano-tetivnog spoja unutar tunela, 6 i 12 tjedana nakon operacijskog zahvata (31). Mayer i suradnici istraživali su utjecaj mikroporoznih beta trikalcijfosfatnih umetaka na čvrstoću u području koštano-tetivnog spoja nakon rekonstrukcije ACL-a u goveda. Rezultati istraživanja pokazali su usporedivu čvrstoću, tzv. *press fit* tehnike učvršćivanja koštano-tetivnog presatka (presadak je nešto veći od koštanog tunela) uz dodatak mikroporoznih beta trikalcij fosfatnih umetaka u odnosu na učvršćivanje metalnim implantatom (32). Lui i suradnici istraživali su na štakorima utjecaj primjene tetivnih mezenhimskih stanica (eng., *tendon-derived stem cells (TDSCs)*) i čimbenika rasta tetivnog tkiva (eng., *connective tissue growth factor – CTGL*) na osteointegraciju i remodeliranje ACL presatka te utvrdili poboljšano rano cijeljenje unutar 6 tjedana (33). Nekoliko istraživanja bilo je usmjereno na utjecaj plazme bogate trombocitima (eng., *platelet rich plasma – PRP*), na pregradnju i osteointegraciju presatka. Rezultati su ukazali na sigurnost primjene te na moguće poboljšanje cijeljenja, ali bez značajnih kratkotrajnih funkcionalnih rezultata (34-37).

Chen i suradnici istraživali su na ljudima utjecaj omatanja presatka ACL-a pokosnicom u svrhu poboljšanja tetivno-koštanog cijeljenja. Unutrašnji sloj pokosnice bogat je multipotentnim mesodermalnim stanicama. Rezultati istraživanja pokazali su poboljšanje tetivno-koštanog cijeljenja te smanjenje proširenja koštanih tunela u odnosu na kontrolnu skupinu (38).

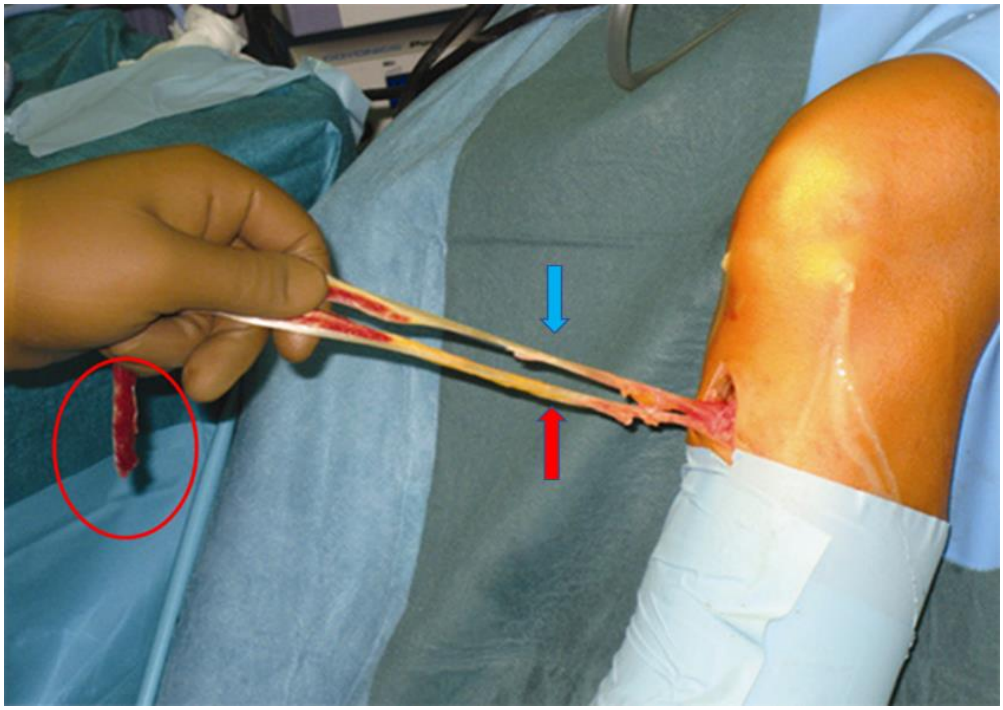
Dong i suradnici na zečevima su istraživali utjecaj primjene mezenhimskih stanica iz koštane srži (eng., *bone marrow-derived mesenchymal stem cells*) transduciranih koštanim morfogenetskim proteinom 2 (eng., *bone morphognic protein -2 – i BMP2*) na koštano-tetivno cijeljenje. Rezultati istraživanja ukazali su na poboljšanje biomehaničkih svojstava

presatka u koštanom tunelu. Histološke promjene obuhvaćale su: povećanje broja okomitih kolagenskih vlakana između kosti i tetive, proliferaciju stanica nalik hondrocitima te proliferaciju vezivno-hrskavičnog tkiva (39).

Ključ uspješnosti regenerativne medicine leži u međudjelovanju progenitornih stanica, bioloških signala i okruženja gdje se nalaze (40). Sposobnost nediferenciranih mezenhimskih matičnih stanica (eng., *mesenchymal stem cells – MSC*) da se u odgovarajućim uvjetima uz odgovarajuće biološke signale diferenciraju, prometnula ih je u najčešće korištene progenitorne stanice regenerativne medicine (41). Kao izvor MSC-a korištena su različita tkiva (42-44). Nakon primarne izolacije iz koštane srži (45), MSC su kasnije uspješno izolirane iz različitih fetalnih tkiva, kao i iz tkiva odraslih osoba. Dokazano je da MSC različitih ljudskih tkiva imaju sposobnost osteoindukcije. Ta tkiva uključuju: trabekularnu kost (46), masno tkivo (47), mišićno tkivo (48), kožu (49), pokosnicu (48), sinovijalnu membranu (50), mliječne zube (51), pupčanu vrpcu (52), placentu (53) i amnijsku tekućinu (54).

Proučavanjem nastanka heterotopičkih mišićnih okoštavanja (55), kao i bolesti progresivne okoštavajuće fibrodisplazije (56), otkrivena je značajna sposobnost stvaranja kosti od strane ljudskih mišića. Mišićno tkivo sadrži različite populacije progenitornih stanica: satelitske stanice, ne-satelitske mezenhimske stanice i perivaskularne stanice. Glavnu ulogu u stvaranju kosti imaju ne-satelitske mezenhimske stanice i perivaskularne stanice (57).

Tijekom rekonstrukcije ACL-a, a prilikom obrade tetiva za presadak, na mišićnom kraju uvijek zaostaje dio mišićnog tkiva koji se uobičajeno odstranjuje i baca (Slika 5.). U skladu s principima regenerativne medicine, mišićni kraj presatka mogao bi se sačuvati i iskoristiti kao izvor progenitornih stanica (58).



Slika 5. Zaostalo mišićno tkivo na tetivama mišića *gracilisa* i *semitendinosusa* koje se tijekom pripreme presatka za rekonstrukciju prednje ukrižene sveze rutinski odstranjuje i baca.

Crvenom elipsom zaokruženo je zaostalo mišićno tkivo, plavom strelicom označena je tetiva mišića *gracilisa*, a crvenom, tetiva mišića *semiteninosusa*. Preuzeto (uz dozvolu) iz: Specijalne bolnice „Sveta Katarina“, Zabok.

1.3. Okoštavanje, koštano cijeljenje i koštana pregradnja

Okoštavanje, tj. osifikacija je proces stvaranja koštanog tkiva koji počinje u drugom mjesecu embrionalnog razvoja, a uključuje dva dominantna načina okoštavanja: 1. endohondralno i 2. intramembransko (59). Endohondralno okoštavanje je okoštavanje uglavnom dugih i kratkih kosti koje se odvija na osnovi njihovih hrskavičnih modela postupnom zamjenom hrskavičnoga tkiva koštanim (60). Intrarmembransko okoštavanje je uglavnom okoštavanje pločastih kosti (kosti lica, kosti lubanje i ključne kosti) koje se odvija na membranskoj osnovi diferencijacijom osteoblasta iz mezenhimnih stanica i odlaganjem koštanoga matriksa (61). Tijekom intramembranskog okoštavanja, grupa mezenhimalnih stanica pod utjecajem lokalnih faktora rasta formira buduće osifikacijske centre u dobro vaskulariziranom području embrionalnog vezivnog tkiva, a gdje postepeno diferenciraju u preosteoblaste, iz kojih

nastaju zreli osteoblasti. Na oba načina najprije nastaje primarno (nezrelo) koštano tkivo koje se ubrzo zamjenjuje sekundarnim, zrelim ili lameliranim koštanim tkivom.

Enhondralnim okoštavanjem nastaje velik broj dugih i kratkih kostiju skeleta. Proces započinje u drugom mjesecu embrionalnog razvoja i traje do 25 godine života. Obrazac po kojem će se razviti kostur reguliran je brojim molekulskim mehanizmima koji još nisu dovoljno razjašnjeni, a podrazumijeva određivanje položaja, broja, veličine i oblika pojedinih elemenata skeleta. Pod utjecajem lokalnih faktora rasta, embrionalne mezenhimske stanice migriraju u područje predodređeno za nastanak kosti gdje formiraju prehrskavične kondenzacije (62). Stvaranje prehrskavične kondenzacije slijedi diferencijacija mezenhimskih stanica u prehondroblaste, a nakon toga u hondroblaste. Hondroblasti izlučuju izvanstanični matriks koji ih s vremenom okružuje u tzv. lakune. Smješteni unutar lakuna, hondroblasti postaju hondrociti koji nastavljaju proliferirati neko vrijeme i tako proizvode hrskavicu (62). Tijekom definiranja hrskavičnog oblika, kosti hondrociti prolaze stadije marginalne proliferacije, centalne maturacije, hipertrofije i apoptoze. Hrskavični model obavijen je perihondrijem, tj. ovojnicom od gustog, formiranog vezivnog tkiva koje sastoji se od dva sloja. Vanjski, fibrozni sloj sastavljen je pretežno od vlakana, a unutarnji, kambijski sloj izgrađen je pretežno od vezivnih stanica. Područje u dijafizi gdje započinje okoštavanje unutar hrskavičnog modela zove se primarno središte okoštavanja. Proces započinje invazijom perihondrija, koji okružuje hrskavičnu osnovu, krvnim žilama i razvitkom periosta. Krvne žile iz periosta invadiraju hrskavicu pod utjecajem vaskularnog endotelnog faktora rasta (eng. *vascular endothelial growth factor* (VEGF)) iz hipertrofičnih hondrocita te dolazi do naseljavanja osteoblasta i osteoklasta uz stvaranje nove kosti (63). Okoštavanje se širi prema krajevima kostiju. Pojavljuju se sekundarni centri okoštavanja u epifizama dugih kostiju te između njih i proširenog primarnog centra okoštavanja ostaje hrskavična zona koja se naziva ploča rasta. Ploča rasta duge kosti odgovorna je za postnatalni longitudinalni rast kostiju (64). Kada koštano tkivo u području sekundarnih centara okoštavanja u potpunosti ispuni epifizu, hrskavica ostaje na samo dva mjesta: a) zglobna hrskavica koja traje cijeli život i b) epifizna hrskavica ili ploča rasta koja odgovara za rast kostiju u duljinu do završetka rasta. Širenje primarnog središta okoštavanja prati i širenje periostalnog koštanog ovratnika (periostalno, tj. dezmogeno okoštavanje), koji također raste prema epifizama (65). Novostvorena kost stvara tunele oko krvnih žila, a nove se koštane lamele dodaju koštanom tkivu uzrokujući rast kosti u širinu. Paralelno s procesom okoštavanja propada hijalina hrskavica: hondrociti epifizne hrskavice proliferiraju (na epifiznoj strani ploče), a

istovremeno propadaju na dijafiznoj strani ploče. Na ostacima hrskavice osteoblasti odlažu koštanu međustaničnu tvar. Prvobitno nastalu kost zovemo primarna (nezrela, vlaknasta, fibrozna) kost, a karakterizira je nepravilan raspored kolagenih vlakana i veći broj osteocita (65). Nepravilan raspored kolagenih vlakana povećava fleksibilnost, ali ujedno i smanjuje čvrstoću, tj. mehaničku stabilnost kosti. Fibrozna ili nezrela kost nastaje kada se kost ubrzano stvara tijekom razvoja, ali i u nekih stanja koja potiču stvaranje kosti (npr. frakturni kalus, fibrozna displazija, hiperparatireoidizam). Normalno, primarnu kost u odrasloj dobi nalazimo u području tzv. koštanih šavova. Tijekom odrastanja primarnu kost zamjenjuje sekundarna (zrela, lamelarna) koja ima kolagena vlakna poredana u lamele orijentirane ovisno o smjeru mahaničkog opterećenja. Takva kost je čvršća, ali smanjene savitljivosti u odnosu na nezrelu primarnu kost (65).

Gledano biomehanički kost je specifičan materijal s jedinstvenom sposobnošću samoobnavljanja. Tijekom preopterećenja, ukoliko sila prevlada mehaničku čvrstoću kosti, dolazi do prijeloma, nakon čega slijedi koštano cijeljenje i uspostava prvobitne funkcije kosti. Samo koštano cijeljenje složen je fiziološki proces koji podrazumijeva usklađeno djelovanje većeg broja stanica i njihovih prekursora. Za razliku od mnogih drugih tkiva koja cijele ožiljkom, kost cijeli potpunom obnovom jednakovrijednog koštanog tkiva (lat. *restitutio ad integrum*). Koštano cijeljenje možemo podijeliti na: 1. primarno (direktno, angiogeno) i 2. sekundarno. Kojim će putem krenuti cijeljenje, ovisi o mirovanju koštanih ulomaka (66).

Primarno koštano cijeljenje moguće je samo u prisutnosti savršene apozicije (prilijeganja) frakturnih ulomaka i rigidne fiksacije (apsolutnog mirovanja) unutar prijelomne pukotine. Na mjestu kontakta koštanih ulomaka dolazi do prodiranja Haversovih kanala duž longitudinalne osi kosti. Nove krvne žile i osteoblasti deponiraju osteoid unutar prijelomne pukotine tijekom prvih osam dana fiksacije bez prethodne resorpcije osteoklastima. Lamelarna kost koja se tu stvara, usmjerena je pod pravim kutom na longitudinalnu os kosti, a aksijalno orijentirani osteoni premošćuju novostvoreni osteoid tijekom remodeliranja. Rast sekundarnih osteona započinje otprilike nakon četiri tjedna po završetku "čišćenja" nekrotičnog tkiva nastalog na mjestu prijeloma (66).

Sekundarno koštano cijeljenje, tj. cijeljenje posredovano stvaranjem kalusa, prirodno je cijeljenje prijeloma, a uključuje reakciju kosti, periosta i okolnoga mekog tkiva uz dominantan utjecaj periosta (periostealno cijeljenje). U području periosta, osteoprogenitorne i nediferencirane mezinhimalne stanice pokreću proces intrarmembranoznog i endohondralnog

okoštavanja stvaranjem kalusa. Kost stvorenu intrarmebranoznim okoštavanjem nalazimo u perifernom dijelu prijeloma s razvojem tzv. tvrdog kalusa, dok kost stvorenu endohondralnim okoštavanjem, nalazimo unutar prijelomne pukotine (66).

Kost je dinamičko tkivo u stalnoj mijeni. U zreloj životnoj dobi dominantan proces koji to omogućava jest koštana pregradnja (eng., *bone remodeling*). Koštana pregradnja predstavlja fiziološki proces razgradnje i ponovnog odlaganja koštanog matriksa radi obnove koštane strukture i funkcijske prilagodbe mehaničkom opterećenju zdrave kosti. Koštana pregradnja uključuje kontinuirano odstranjene manjih dijelova stare kosti, zamjenu iste novostvorenom izvanstaničnom tvari te konačno stvaranje novog koštanog tkiva mineralizacijom novostvorenog matriksa. Normalna pregradnja kosti neophodna je za cijeljenje prijeloma, prilagodbu kosti na mehaničko opterećenje te homeostazu kalcija u organizmu (67).

Mjesta pregradnje nasumično su razmještena unutar kosti, ali i usmjerena na područja koja zahtijevaju regeneriranje oštećene kosti (68). Četiri osnovne vrste koštanih stanica su: osteoblasti, osteoklasti, osteociti i pokrovne stanice. Međusobno udružene, one čine temeljne višestanične jedinice (engl., *basic multicelluar unit – BMU*). Uravnoteženo međudjelovanje četiri osnovne vrste koštanih stanica ključno je za uspješnu koštanu pregradnju i održavanje integriteta kosti.

Osteoblasti su stanice kuboidnog oblika, lokalizirane su uzduž koštanih površina, čine 4% do 6% stanica prisutnih unutar kosti, stvaraju organsku koštanu izvanstaničnu tvar i pomažu u mineralizaciji (69,70). To su stanice mezenhimskog podrijetla, a razvijaju se iz multipotentnih zametnih stanica koštane srži. Razvoj osteoblasta zahtijeva izraženost specifičnih gena, slijedeći vremenski programirane korake, uključujući koštane morfogenetske proteine i članove WNT signalnog puta (71). Izraženost transkripcijskog čimbenika *RUNX*2 (eng., *Runt related transcription factor 2*) smatra se ključnom za diferencijaciju osteoblasta (72) te ujedno pojačava izraženost uz osteoblast povezanih gena: kolagen tip 1 alfa 1 (eng., *collagen type I alpha1 – Col1A1*), alkalnu fosfatazu (eng., *alkaline phosphatase – ALP*), koštanog sijaloproteina (eng., *bone sialoprotein – BSP*) i osteokalcina (eng., *osteocalcin OCN*) (73).

Jednom kad se stvori dovoljno progenitora osteoblasta koji pokazuju izraženost *RUNX2,* transkripcijskog čimbenika *DLX5* (engl., *distal-less homeobox 5 gene*) i ColIA1, započinje faza proliferacije osteoblasta. U toj fazi progenitori osteoblasta iskazuju aktivnost ALP-a i smatramo ih preosteoblastima (74). Tranzicija preosteoblasta u zrele osteoblaste

okarakterizirana je pojačanom izraženosti osteoblast specifičnog transkripcijskog faktora Osterix (Osx) te ujedno i lučenjem matriks koštanih proteina - osteokalcina, koštanog sijaloproteina i kolagena tip I (75).

Sinteza koštanog matriksa putem osteoblasta odvija se u dva glavna koraka. To su odlaganje koštane izvanstanične tvari i njena kasnija mineralizacija. Tijekom faze odlaganja koštane izvanstanične tvari, osteoblasti luče uglavnom kolagen tip I, nekolagene proteine (osteokalcin, osteonektin, koštani sijaloprotein i osteopontin) i proteoglikane koji zajedno čine koštanu organsku izvanstaničnu tvar. Faza mineralizacije je dobro orkestrirani proces tijekom kojeg se u organsku koštanu izvanstaničnu tvar odlažu kristali kalcijeva fosfata. Nakon što osteoblasti sazriju, slijedi njihova apoptoza ili oni postaju osteociti, odnosno pokrovne stanice (74). Osteoklasti su jedinstveni tip egzokrinih stanica koje imaju sposobnost razgraditi kost otapajući koštane minerale te enzimski razgrađujući proteine izvanstanične tvari (76). Osteociti su terminalno diferencirane stanice nastale iz osteoblasta, a djeluju kao senzori mehaničkih promjena unutar kosti na temelju kojih se regulira aktivnost osteoklasta i osteoblasta (77). Pokrovne stanice imaju specifičnu ulogu u povezivanju koštane resorpcije sa stvaranjem kosti (78) te mogućem mehaničkom definiranju područja koštane pregradnje (79).

Koštanu pregradnju možemo podijeliti u šest povezanih faza – mirovanje, aktivacija, resorpcija, reverzna faza, faza stvaranja te završna faza. U fazi mirovanja kost miruje. Još uvijek nisu poznati svi mehanizmi koji pokreću fazu aktivacije, a prvi opažaj je povlačenje pokrovnih stanica. Slijedi razgradnja endostealne membrane čime se otvara prostor osteoklastima. Ključni trenutak aktivacije jest pokretanje jednostaničnih monocitno-makrofagnih stanica iz cirkulacije (80). Njihovim stapanjem nastaju zreli osteoklasti s nekoliko desetaka staničnih jezgara. U fazi resorpcije koja traje oko 3 tjedna, osteoklasti se uz pomoć površinskih vezujućih integrinskih proteinskih receptora čvrsto prihvaćaju uz koštanu matricu stvarajući dobro zabrtvljeno područje (engl., *sealing zone*) u kojem površina osteoklasta postaje nalik četki (engl., *ruffled border*). Time je osteoklastu povećana mogućnost sekrecije enzima, ali i resorpcije razgrađenog sadržaja. Izlučeni enzimi razgrađuju kost (katepsin K, kisela fosfataza otporna na tartarat, metaloproteinaza 9 i želatinaza). Olakšanu mobilizaciju minerala u zabrtvljenom području omogućuje kiselost područja s pH oko 4,5 koji nastaje djelovanjem V-ATPa za protonske pumpe te koncentriranjem kloridnih iona na mjestu resorpcije. Nakon mobilizacije minerala unutar zabrtvljenog područja enzimi razgrađuju koštanu matricu. Resorptivna faza završava apoptozom osteoklasta nakon čega ostaju resorptivne udubine (Howshipove lakune, Haversovi kanali) ispunjene

mononuklearnim stanicama, uključujući monocite, osteocite oslobođene razgradnjom kosti i preosteoblaste.

Reverznom fazom započinje stvaranje kosti. Traje približno 3 do 4 mjeseca. Osteoblasti kao jedinstvene stanice koje imaju sposobnost izgradnje kosti pod kontrolom su čimbenika rasta/citokina i izraženosti specifičnih transkripcijskih faktora (81,82). One sintetiziraju novu organsku tvar i reguliraju mineralizaciju otpuštajući ekskrecijske vezikule. Uz kolagen tipa I mogu sintetizirati i različite nekolagene bjelančevine poput fosfoproteina, pirofosfata, koštanih Gla proteina (eng., *bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein*), osteokalcina, proteolipida i alkalne fosfataze. U završnoj fazi mineralizira se organska tvar uglavnom s kalcijevim hidroksiapatitom, potom oko 50% do 70% osteoblasta podlegnu apoptozi, a ostatak se transformira u osteocite ili pokrovne stanice.

Ravnoteža između stvaranja i razgradnje kosti je složen proces kontroliran lokalnim i sistemskim čimbenicima (83). Lokalni čimbenici uključuju autokrine i parakrine molekule. Općenito, te signalne molekule možemo podijeliti u tri grupe: 1) upalni citokini, 2) superobitelj transformirajućih čimbenika rasta β (TGFβ) i drugi čimbenici rasta te 3) metaloproteinaze i angiogeni čimbenici (84).

1.3.1. Upalni citokini

Upalni citokini kao što su interleukin-1 (IL-1), intereleukin 6 (IL-6), interleukin 11 (IL-11), interleukin 18 (IL-18) i tumor nekotizirajući čimbenik α (eng., *tumor necrosis factor α – TNF- α*) ključni su za pokretanje procesa regeneracije kosti (85). Proizvod su sekrecije makrofaga, upalnih stanica i stanica mezenhimalnog porijekla smještenih u periostu (86).

Reguliraju enhondralno stvaranje kosti i remodeliranje (87). TNF-α npr. privlači MSC, potiče indukciju apoptoze hiperofičnih hondrocita za vrijeme enhondrane osifikacije i započinje osteoklastičnu funkciju. Nedostatak TNF α usporava resorpciju mineralizirane hrskavice, usporava stvaranje enhondralne kosti i sprječava cijeljenje prijeloma kosti (86).

1.3.2. Koštani morfogenetski proteini

Istraživani su različiti čimbenici rasta kao biološki signali potrebni za stvaranje kosti. Idealan biološki podražaj uključen u osteogenezu bila bi bioaktivna molekula koja inducira osteogenezu, potiče staničnu proliferaciju i maturaciju, kao i sintezu izvanstanične tvari.

Koštani morfogenetski proteini (*eng. bone morphogenic proteins BMPs*) prve su bioaktivne molekule kojima je dokazana sposobnost poticanja diferencijacije progenitornih stanica u osteoblaste, tj. osteoinduktivni potencijal. Marshall Urist 1965. je godine pokazao da ekstrakt kosti, tj. demineralizirani koštani matriks može potaknuti nastanak ektopične kosti u mišićnom tkivu štakora te postavio hipotezu da u koštanom matriksu postoji bioaktivni čimbenik odgovoran za osteogenezu (88). Učinak tog bioaktivnog čimbenika mogao se poništiti tripsinom te je zaključeno da se radi o proteinu. Urist je aktivni sastojak takvog koštanog ekstrakta nazvao "*bone morphogenetic protein*" ili "*osteogenic protein*". Prva biokemijska istraživanja BMP-a učinjena su tek osamdesetih godina (89). A. H. Reddi je dokazao njihovu veliku osteoinduktivnu sposobnost te omogućio kliničku primjenu u ortopedskoj kirurgiji, stomatologiji, plastičnoj i rekonstruktivnoj kirurgiji (90).

BMP molekule su članovi velike nadobitelji transformirajućeg čimbenika rasta beta (engl. *transforming growth factor- β TGFβ*) (91). Postoji preko 30 različitih BMP-a od čega minimalno 14 imaju dokazana osteoinduktivna svojstva *in vivo* ili *in vitro* (92). Koštani morfogenetski proteini dijele se dalje, unutar porodice, prema sličnostima u slijedu aminokiselina (93). Poput ostalih članova, TGFβ proteini iz porodice BMP molekula prolaze karakterističan put tijekom sinteze. Put započinje velikim neaktivnim pre-polipetidom, koji sadrži signalne peptide na aminoterminalnom dijelu, propeptidno područje u sredini i zrele polipeptide na karboksiterminalnom dijelu (94). Nakon što pro-protein kinaza pocijepa protein prekursor BMP-a, oslobađa se zreli BMP polipeptid (95). Dimerizacijom dva zrela BMP monomera kovalentnom disulfidnom vezom nastaje biološki aktivan ligand koji ima sposobnost aktivacije BMP receptora (96).

Prema strukturi BMP molekule su dimerne molekule koje su međusobno povezane sa sedam disulfidnih veza. Svaki monomer sastoji se od oko 120 aminokiselina sa sedam cisteinskih ostataka. Svaki monomer ima dvije β – nabrane ploče koje čine strukturni motiv – cisteinski čvor. Tri disulfidne veze nalaze se u svakoj monomernoj jedinici, dok je samo jedna disulfidna veza odgovorna za povezivanje monomernih jedinica u dimernu molekulu. Kako

bi dimer imao biološku aktivnost, β – nabrane ploče moraju biti orijentirane u suprotnim smjerovima. Narušavanje samo jedne od disulfidnih veza, rezultira gubitkom biološke aktivnosti i ukazuje na važnost konformacije proteina koja je neophodna za biološku aktivnost molekule (97). Primarna struktura im je u 40% do 50% slična strukturi TGF-β (98) (99). Proteini BMP-2 do BMP-9 imaju slične strukturne osobitosti, za razliku od BMP-1 koji se zbog svojega slijeda aminokiselina ne može svrstati u TGF-ß nadobitelj. BMP-1 nije sposoban potaknuti stvaranje kosti i pripada skupini metaloproteinaza. Proteini BMP-2 do BMP-9 imaju slične strukturne osobitosti: 1) hidrofobnu sekretornu vodeću sekvencu, 2) veliku regiju propeptida i 3) zrelu regiju – domenu. Ta zrela domena sadržava aktivnu tvar molekule. Unutar domene nalazi se sedam cisteinskih ostataka koji su karakteristični za TGF-ß superobitelj. Iznimku čini BMP-8 koji sadržava osmi cistein u toj regiji (100). Na temelju strukturne homologije, članovi BMP obitelji mogu se podijeliti u nekoliko podobitelji: BMP-2/-4, BMP-5/-6/-7 (OP-1)/,8, BMP-9/-10 i BMP-12-/13/-14 (GDF-5/-6/-7).

Signalni putovi aktiviranja, koaktiviranja i inhibiranja djelovanja signalnih molekula još uvijek su u istraživanju. BMP svoju funkciju ostvaruju na dva načina: 1) interakcijom sa specifičnim BMP receptorima tipa I i II na površini stanica te stvaranjem BMP receptor II-receptor I kompleksa i 2) putem neklasičnog Smad-nezavisnog mitogen aktivirajućeg protein kinaza (MAPK) signalnog puta. Dominantan je prvi način, tj. interakcija sa specifičnim BMP receptorima tipa membranske serin/treonin kinaze (101). Povezujući se sa BMP receptorima tipa II aktivira se receptor BMP tipa I. Kompleks fosforilira prijenosnike signala iz obitelji Smad molekula. Posrednici prijenosa signala za BMP obitelj od receptora do jezgre su fosforilirane Smad molekule – Smad 1, 5 i 8. Oni čine heteromerički kompleks sa Smad 4, transportiraju se u jezgru i potiču transkripciju različitih gena (98).

Dvije su razine moguće inhibicije aktivnosti BMP-a: 1. izvanstanična inhibicija i 2. unutarstanična inhibicija. Izvanstanično, BMP je limitiran s BMP antagonistima poput Noggina i Chordina koji direktnim vezanjem na BMP ligand onemogućuju njegovo daljnje vezanje na receptore tip I i II (102).

Unutarstanično, molekule Smad 6 i 7 djeluju kao inhibitori signala članova skupine TGF-ß (103). Inhibitorne molekule Smad 6 i Smad 7 sprječavaju fosforilaciju molekula Smad 1 i Smad 5 tako što se vežu za receptor BMPR – 1. Protein SIP (prema engl. *Smad interacting protein*) može spriječiti vezanje heteromernog kompleksa Smad 1/ Smad 4 za DNA te tako

promijeniti izraženost gena. BMP-signalizacija završava aktivacijom ciljnih gena, među kojima su i „homeobox“ geni, neophodni za morfogenezu i transkripciju (102).

U početku proučavanja njihovog djelovanja BMP su povezivani sa osteogenezom, međutim, njihova uloga u ljudskom tijelu kasnije se pokazala značajno širom. Važni su morfogeni tijekom embriogeneze i razvoja, a ujedno reguliraju održavanje homeostaze tkiva odraslih osoba. Mnogi procesi ranog razvoja ovisni su o utjecaju BMP signala na rast, apoptozu i diferencijaciju stanica (104-106). BMP igra važnu ulogu u održavanju homeostaze tkiva odraslih osoba, poput održavanja cjelovitosti zglobova, započinjanja cijeljenja prijeloma i remodeliranje krvotoka (107,108). Zbog različitih funkcija u različitim organskim sustavima ljudskog tijela, predloženo je da BMP zaslužuje naziv tjelesnog morfogenog proteina.

Tri su poznata izbora BMP za pretklinička i klinička istraživanja (109): 1. ekstrakcija iz ljudskog ili životinjskog koštanog matriksa, 2. proizvodnja rekombiniranog humanog proteina (rhBMP) i 3. genska terapija. Sekvencioniranjem i kloniranjem gena za BMP početkom devedesetih godina, započela je prozvodnja različitih BMP-a. U zadnjih 10 godina, identificirano je 20 različitih rekombiniranih BMP molekula koje posjeduju sposobnost stvaranja kosti i hrskavice (110). Brojna pretklinička istraživanja (111) omogućila su translaciju rhBMP2 u klinička istraživanja (112). Slijedom tih rezultata, FDA (*eng. Food And Drug Administration*) je 2002.godine izdala odobrenje za korištenje rhBMP2 (InFuse^{TM}) u indikaciji prednje fuzije tijela kralješka (113). Uslijedila su i druga odobrenja vezana uz rhBMP2 u kliničkoj praksi: za indikaciju pseudoartroze tibije 2004. godine te za maksilofacijelne rekonstrukcije 2007. godine (FDA, 2014.). Ubrzo po učestalijoj kliničkoj primjeni rhBMP2, razne grupe istraživača počinju opisivati nuspojave poput: seroma, prerastanja novostvorene kosti, osteolize, retrogradne ejakulacije i povećanog rizika od tumora (114). Zbog toga je FDA u lipnju 2008. godine izdala upozorenje za moguće nuspojave prilikom korištenja rhBMP2. Iako su početna pretklinička (115) i klinička istraživanja (116) ukazivala na osteoinduktivno djelovanje i rhBMP7, kasnija istraživanja nisu to potvrdila (117). Temeljem tih nalaza, FDA je odbila izdati odobrenje za korištenje rhBMP7, čime rhBMP2 ostaje jedini odobren za kliničku primjenu. Uz ranije spomenute rhBMP 2 i 7 u fazama istraživanja je i rhBMP6. Primjer toga je novi osteogeni pripravak OSTEOGROW koji se sastoji od biološki kompatibilnog autolognog nosača dobivenog iz periferne krvi i rhBMP6 (118). Razvijen je u svrhu ubrzavanja regeneracije kosti. Pretkliničke studije potvrdile su učinkovitost i sigurnost pripravka koji je trenutno u fazi kliničkih studija (119).

1.3.3. Metaloproteinaze i čimbenici angiogeneze

Cijeljenje kosti zahtijeva pojačani protok krvi susjednog tkiva (120,121). Završna faza enhondralne osifikacije i remodeliranja kosti ovisi o djelovanju specifičnih matriks metaloproteinaza koje omogućavaju urastanje krvnih žila. Pri tome je potrebno međudjelovanje dvaju procesa: 1) molekularni mehanizmi koji reguliraju pregradnju izvanstanične tvari i 2) urastanje novih krvnih žila u područje resorbirane tvari (122). Regulacija angiogeneze zahtijeva koordinaciju dvaju odvojenih putova: 1) krvožilni endotelijalni čimbenik rasta (eng., *vascular endothelial growth factor (VEGF)*) vezani put i 2) Angiopoietin vezani put (123).

Sistemski čimbenici važni za održavanje homeostaze kosti uključuju paratiroidni hormon (PTH), kalcitotin, 1,25-dihidroksi vitamin D3 (kalcitriol), glukokortikosteroide, androgene hormone i estrogen (124, 125).

1.4. Regenerativna medicina u ortopediji

Regenerativna medicina za cilj ima tražiti načine podržavanja, poticanja i poboljšavanja prirođene sposobnosti regeneracije i reparacije našeg tijela, a upravo je ortopedija klinička disciplina koja se bavi liječenjem bolesti i ozljeda mišićno-koštanog sustava, jedno od vodećih područja primjene regenerativne medicine (126). Neki od razloga leže i u tome što su tkiva koštano-mišićnog sustava relativno jednostavna u odnosu na primjerice parenhimatozne organe (npr. hrskavica sadrži samo jednu vrstu stanica što je čini vrlo pogodnom za tkivni inženjering), a s druge strane ta ista tkiva cijele unutar 4 do 6 tjedana, što znači da je dovoljno relativno kratko vrijeme prisutnosti određenih bioaktivnih signala (127).

Najznačajnija područja primjena regenerativne medicine u ortopediji su: 1) koštano cijeljenje, 2) genetske bolesti, 3) oštećenja hrskavice, 4) cijeljenja sveza i tetiva, 5) bolesti kralježnice, a što uključuje degenerativne bolesti intervertebralnog diska, spinane fuzije te ozljede leđne moždine, 6) degenerativne promjene zglobova, 7) reumatoidni artritis, 8) tumori lokomotornog sustava te 8) druga područja poput avaskularne nekroze (40).

Koriste se različite strategije u svrhu strukturne i funkcionalne zamjene oštećenog tkiva ili poboljšanja cijeljenja. To uključuje upotrebu različitih materijala, *de novo* stvorenih stanica ili njihovu kombinaciju (128). Istraživane su različite pretkliničke i kliničke strategije. Dijele se u nekoliko glavnih skupina: 1) stvaranje nosača i 3D bioprintanje, 2) integriranje presatka u tkivo domaćina putem revaskularizacija i reinervacije, 3) promjene odgovora domaćina na terapeutske učinke primjenom infuzija stanica i modulacijom imunog sustava te 4) otkrivanje i korištenje stanica u svrhu regeneracije tkiva (128). Strategije primjene regenerativne medicine u ortopediji mijenjale se se tijekom vremena. U prošlosti, vodeća strategija regenerativne medicine bila je razvoj tehnologije koja je omogućavala rast novog tkiva izvan ljudskog tijela prije implantacije. To je podrazumijevalo prikupljanje tkiva, umnožavanje stanica u kulturi u laboratoriju, smještanje takvih stanica na nosač te inkubaciju prije implantacije u tijelo. Iako izvediva, ta strategija zbog svoje kompleksnosti i skupoće nije našla svoju primjenu u široj kliničkoj praksi (129). Iz ekonomskih i praktičnih razloga regenerativna medicina je krenula prema strategiji, pod imenom „ubrzani" tkivni inženjering, (eng., *expedited tissue engineering*) kojom se izbjegava kultivacija autolognih stanica *ex vivo*.

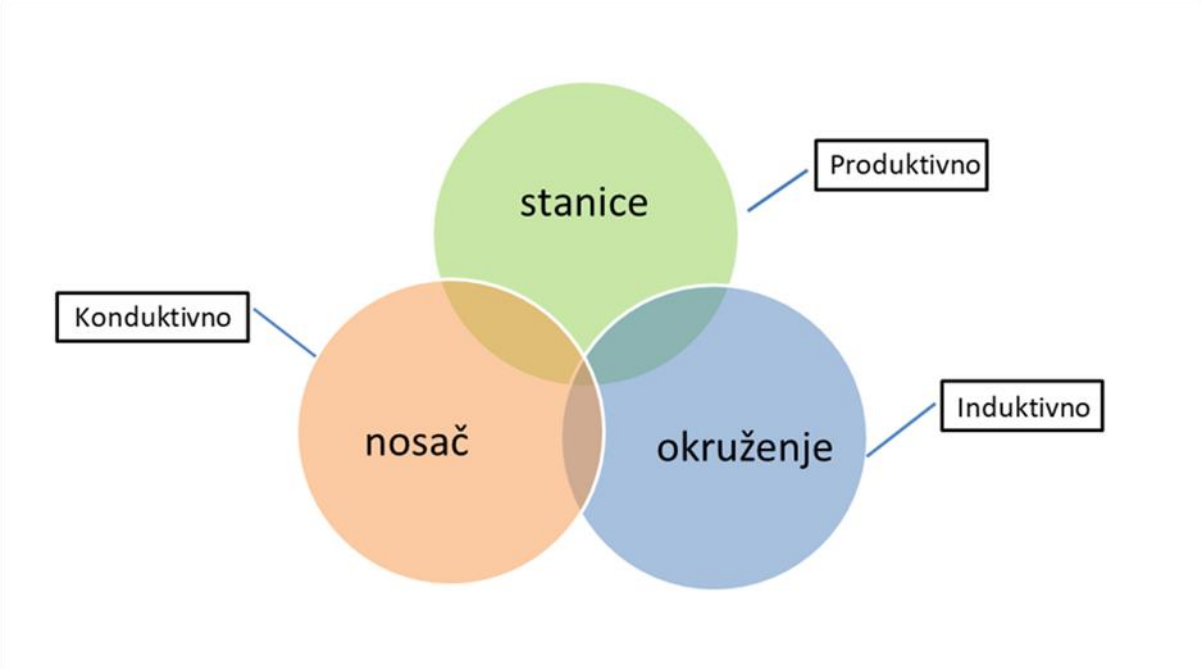
Struktura tkiva je izravno povezana s funkcijom te se smatra da je obnavljanje strukture ključno u stvaranju zdravog i funkcionalnog tkiva (130).

Ljudsko tijelo samo po sebi ima zadivljujuću sposobnost reparacije te nešto lošiju sposobnost regeneracije. Za razliku od reparacije gdje se oštećeno tkivo popravlja vezivnim tkivom, pri regeneraciji se tkivo zamjenjuje istovrsnim stanicama. Većina tkiva posjeduju sposobnost reparacije. Sposobnost regeneracije ljudskog tkiva odraslih osoba, iako prisutna, ograničena je u odnosu na niže kralježnjake (131).

Koštano tkivo je jedno od rijetkih koje ima sposobnost regeneracije, tj. cijeljenja bez stvaranja ožiljaka. Usprkos tome, postoje stanja poput: pseudartroze, osteolize kosti nakon ugradnje totalnih endoproteza zglobova ili spinalnih fuzija, velikih tumorskih koštanih defekata te koštano-tetivnog cijeljenja kada spontana sposobnost obnavljanja kosti postaje problematična. Problem su veliki koštani defekti koji se sami po sebi ne mogu regenerirati. Koštani presaci predstavljaju trenutni „zlatni standard" rješavanja takvog problema. Kost je, poslije krvi, drugo po redu najčešće transplantirano ljudsko tkivo (132). U regeneraciju kosti koštanim presatkom uključena su tri različita procesa: 1) osteogeneza, tj. proces kojim transplantat stvara novu kost, 2) osteokondukcija, tj. proces u kojem transplantat služi samo kao nosač za odlaganje novonastale kosti i 3) osteoindukcija, tj. proces kojim transplantat

potiče progenitorne stanice na diferencijaciju u osteoblaste. Autologni koštani presadci još uvijek su „zlatni standard“ u takvim situacijama. Međutim, njihova je količina ograničena, a bol i oštećenje donorskog mjesta samo su neke od komplikacija vezanih uz uzimanje presatka (133). Stoga postoje i druge opcije, poput heterolognih i sintetičkih presadaka (134). Nažalost, heterologni i sintetički presadci ne ispunjavaju sve potrebno. Za razliku od autolognog presatka, homologni presadci imaju manji osteogeni potencijal, a sintetski koštani nadomjesci imaju samo osteokonduktivno svojstvo.

Svaka uspješna regeneracija zahtijeva četiri ključne komponente: 1) stanice, 2) biološke signale, 3) nosač i 4) odgovarajuće mehaničko opterećenje (Slika 6.).



Slika 6. Regenerativni trijas - temeljni postulat regenerativne medicine

Preuzeto i dodatno preuređeno uz dozvolu iz: Ivkovic A, Marijanovic I, Hudetz D, Porter RM, Pecina M, Evans CH. *Regenerative medicine and tissue engineering in orthopaedic surgery. Frontiers in bioscience* . 2011. Jan; 3:923.–44.

Regenerativna medicina u rješavanju koštanih defekata iskorištava potencijal osteoprogenitrnih stanica kako bi one u odgovarajućem okruženju (osteoinduktivni matriks) te uz odgovarajuće biološke signale poticale stvaranje kosti. Iako se mogu koristiti diferencirane stanice, većina istraživanja je usredotočena na nediferencirane mezenhimske matične stanice koje se nalaze u različitim tkivima i još uvijek nije riješeno pitanje utjecaja tkiva koje koristimo kao izvor MSC-a. Kao morfogeni signali koriste se najčešće prirodni ili rekombinirani čimbenici rasta (40).

1.5. Mezenhimske matične stanice

Regeneracija koštanog tkiva ostaje važan izazov u ortopediji. Koštani defekti nastali traumom, infekcijom, prirođenim bolestima ili biokemijskim poremećajima predstavljaju funkcionalnu, estetsku te psihološku traumu bolesniku. Jedan od važnih ciljeva tijekom liječenja takvih bolesnika je vraćanje normalne morfologije i funkcije zahvaćene kosti. Iako je autologni koštani presadak „zlatni standard“ u liječenju koštanih defekata sama tehnika, kao što je ranije spomenuto, ima svoja ograničenja i moguće komplikacije. Slično bi se moglo reći i za različite druge vrste presadaka ili umjetnih materijala. Sve ti razlozi usmjerili su daljnja istraživanja u rješavanje problema koštanih defekata pomoću tkivnog inženjeringa te stanične i genske terapije. Korišteno je nekoliko različitih vrsta stanica: 1. osteoblasti, 2. embrionalne matične stanice, 3. periostalne progenitorne stanice (specijalizirani tip stanica koji pokriva površinu kosti, a ima sposobnost diferencijacije prema različitim mezodermalnim stanicama, uključujući i kost) te 4. mezenhimalne matične stanice. Iako je korištenje diferenciranih stanica u ortopediji uspješno, najveću pažnju izazvale su nediferencirane progenitorne mezenhimske matične stanice te njihova sposobnost diferenciranja u stanice različitog tkiva. One se mogu uz određene biološke utjecaje diferencirati u različite druge stanice i istodobno održavati pričuvu izvornih matičnih stanica. Spoznaja kako se, barem teoretski, mogu diferencirati u bilo koje tkivo našeg organizma, dovela je do stvaranja potpunog novog koncepta liječenja koji danas nazivamo regenerativnom medicinom.

Glavne značajke matičnih stanica su: 1) samoobnovljivost, 2) diferencijacija, tj. sposobnost stvaranja velikog broja stanica specijaliziranih za određenu funkciju te 3) plastičnost koja podrazumijeva mogućnost diferencijacije u različita tkiva. Plastičnost mezenhimskih

matičnih stanica opada tijekom razvoja. U najranijoj fazi embriogeneze, fazi morule, matične stanice su totipotente, tj. sposobne su diferencirati u sva embrionalna i izvanembrionalna tkiva. U fazi blastule su pluripotentne i mogu diferencirati u sva embrionalna tkiva. U odraslih matične stanice su multipotentne te zadržavaju sposobnost diferencijacije u sve stanice koje nastaju iz njihovog zametnog sloja. Mezenhimske matične stanice je predstavio A. J. Friedensteen otkrićem da dio stanica koštane srži vretenastog oblika prianja za plastičnu podlogu i ima sposobnost diferenciranja u stanice koštanog fenotipa (135). U svojim istraživanjima on je dokazao kako je iz koštane srži moguće izdvojiti fibroblastoidne stanice na osnovu njihove sposobnosti da se prilijepe za dno plastične posude. U uvjetima *in vitro* ove stanice vrlo brzo proliferiraju i od jedne stanice koja je nazvana fibroblast, koji formira kolonije (engl., *colony forming unit-fibroblast – CFU-F*), nastaje čitava kolonija. Tijekom 80-tih godina dvadesetog stoljeća potvrđena je njihova multipotentnost (136). Caplan je prvi počeo rabiti naziv mezenhimske matične stanice 1991. g. (137) te je taj naziv postao opće prihvaćen. Svojstvo adhezije za plastičnu podlogu posjeduju i druge populacije stanica poput makrofaga, endotelnih stanica, limfocita i glatkih mišićnih stanica. Stoga je Udruženje za staničnu terapiju (eng., *International Society for Cellular Therapy – ISCT*) predložilo minimalne kriterije da bi neku stanicu mogli smatrati MSC-om (138). Ti kriteriji su: 1) sposobnost adhezije za plastičnu podlogu u standardnoj kulturi stanica, 2) izražavanje površinskih biljega CD105, CD73,CD44,CD90, CD71 i Stro-1 te adhezijske molekule CD106, CD166, ICAM-1 I CD29 ((139) i 3) sposobnost diferenciranja u osteoblaste, masne stanice i hondroblaste *in vitro*). Nakon primarne izolacije iz koštane srži (140), MSC su kasnije uspješno izolirane iz različitih fetalnih tkiva, kao i iz tkiva odraslih osoba. Ta tkiva uključuju: trabekularnu kost (46), masno tkivo (47), mišićno tkivo (48), kožu (49), pokosnicu (48), sinovijalnu membranu (50), mliječne zube (51), pupčanu vrpcu (52), placentu (53) i amnijsku tekućinu (54). Iako su brojne studije pokazale kako se humane embrionalne matične stanice (engl. *human embrionic stem cells* – hESCs) mogu diferencirati u kost ili hrskavicu (141), zbog moralnih i etičkih razloga postoji veća sklonost primjeni MSC-a iz tkiva odraslih osoba. Kao što je ranije napomenuto, periostalne progenitorne stanice smještene u unutarnjem sloju periosta, tzv. kambiju, imaju važnu ulogu u razvoju kostiju te cijeljenju prijeloma (142). Brojne studije pokazale su da je periost možda i najbolji izvor matičnih stanica vezanih uz regeneraciju kosti (143). Specifičnost je periosta mehanosenzitivnost, tj. sposobnost osteodiferencijacije periostalnih progenitornih stanica vezanih uz mahaničko opterećenje (142). Smatra se da je mehanosenzitivnost periosta povezana uz djelovanje proteina periostina na specifičnu orijentaciju kolagenih niti i okruženje u kojem se kolagene

niti nalaze (144). Isto tako, iako je upotreba autolognog periostalnog presadka dobro znana i prisutna duže vrijeme u ortopediji (145), za naše istraživanje važne su MSC prisutne u mišićnom tkivu.

Znanstvenik Alexander Mauro je prije pola stoljeća uočio mononuklearne stanice na periferiji adultnih mišićnih vlakana upotrebljavajući elektronsku mikroskopiju. Nazvao je te stanice satelitskim stanicama zbog njihove sublaminarne lokacije i asocijacije s plazma membranom mišićnih vlakana (146). Položaj satelitskih stanica i mišićnih vlakana ukazivao je na hipotezu da su te stanice nekako uključene u rast i regeneraciju skeletnih mišića (147). Mišićno tkivo odraslih osoba stabilno je tijekom normalnih aktivnosti i sporadična fuzija satelitskih stanica kompenzira dnevna oštećenja mišićnih stanica nastalih trošenjem ili pucanjem mišićnih vlakana. U slučaju ozljede mišićno tkivo prolazi dobro orkestriranu degeneraciju i regeneraciju na razini tkiva, stanica i molekula. Proces završava stvaranjem ožiljnog tkiva, ali i regeneracijom inerviranog, vaskulariziranog, kontraktibilnog mišićnog aparata. Proces u velikoj mjeri ovisi o dinamičkom međuodnosu između satelitskih stanica i njihove niše (engl., *stem cell niche*) (148). Prema novijim spoznajama mišićno tkivo sadrži multiple populacije progenitornih stanica: 1) satelitske stanice, 2) ne-satelitske progenitorne stanice smještene u intersticiju te 3) pericite (55). Intersticijske ne-satelitske progenitorne stanice obilježava izraženost PDGFRα, ili Sca1 i CD34, a one djeluju prvenstveno kao fibro/adipo progenitorne stanice i njihova diferencijacija *in vivo* određena je mišićnim mikrookruženjem. Perivaskularne stanice (periciti) predstavljaju treću skupinu potencijalnih multipotentnih stanica unutar mišićnog tkiva. Pervaskularne stanice iz različitih tkiva, pa tako i iz mišićnog, imaju sposobnost osteogenediferencijcije uz za to potrebne biološke signale. Sveprisutnost pericita u različitim tkivima objašnjava direktnu povezanost između učestalosti MSC-a i gustoće krvnih žila u tkivu (149).

MSC su ujedno i imunoprivilegirane stanice sposobne uspješno izbjegavati imunološku reakciju (150). Izražavaju tzv. neimunogeni imunofenotip što omogućuje njihovu transplantaciju u alogenog domaćina i bez prethodne imunosupresije (151). Mogu stvarati različite čimbenike rasta i citokine te imaju izražen parakrini efekt (152). Osim svoje "anđeoske" strane, MSC pokazuju i svoju tamniju stranu kao što je povezanost s karcinogenezom (150). Uloga MSC-a u stvaranju karcinoma može se podijeliti na: 1) indirektni utjecaj putem tumor-modulatornog efekta i 2) direktan utjecaj malignom transformacijom MSC-a. Postoji konstantna debata o ulozi MSC-a u modulaciji tumora. Neke studije potvrđuju da MSC suprimiraju rast tumora (153,154). Druga istraživanja ukazuju da

MSC pridonose zaštiti tumorskog tkiva, progresiji tumora te metastaziranju i otpornosti na lijekove (155-157). Općenito se vjeruje da se MSC mogu sigurno kultivirati bez rizika od spontane maligne transformacije (158).

1.6. Genska terapija u regenerativnoj medicini

Genska terapija predstavlja namjeran prijenos genetskog materijala (kratkih DNA ili RNA sljedova) u stanice u profilaktičke, terapijske ili dijagnostičke svrhe. Većina genskih terapija odnosi se na unošenje genetičke informacije u stanice ili tkiva, a ne na ispravljanje genoma. Skup biokemijskih postupaka kojim se to postiže nazivamo gensko (genetičko) inženjerstvo, a sastoji se od izrezivanja skupine gena, cijelog gena ili njihovih dijelova iz DNA jednog organizma i njihovo u DNA drugog organizma.

Prvi uvjerljivi argumenti za primjenu genske terapije potječu iz početka sedamdesetih godina prošlog stoljeća (159). Razvoj molekularne biologije ranih sedamdesetih osigurao je temeljno znanje za prvu kliničku studiju dvadesetak godina kasnije (160). Ljudski genom u potpunosti je sekvenciran 2003. godine (161) i mapiranje ljudskog genoma predstavlja jedno od najvećih znanstvenih iskoraka u povijesti čovječanstva. Raspolaganje takvim informacijama postalo je temelj daljnjih istraživanja ljudskog zdravlja, bolesti, biologije i medicine tijekom 21. stoljeća. Završetkom Projekta ljudskog genoma (engl. *Human Genome Project* – HGP) te razvojem genske tehnologije, sekvenciranje DNA postaje višestruko jeftinije, a time i dostupnije. Međutim, usprkos velikom i značajnom napretku, znanstvenici unazad četrdesetak godina i dalje pronalaze odgovore ne pitanje kako poboljšati kliničku primjenu genske terapije (162). Kako bi maksimalno iskoristili potencijal genetike, znanstvenici moraju shvatiti biološku ulogu svih gena. Koncept genske terapije je relativno jednostavan. Tri su osnovna sastojka potrebna za uspješnu gensku terapiju: 1) stanice kojima želimo učiniti gensku modifikaciju, 2) za to potreban genski materijal i 3) način na koji to učiniti. Iako je koncept genske terapije relativno jednostavan, gensku terapiju možemo sagledati s više strana. Prema korištenom genskom materijalu gensku terapiju možemo podijeliti na onu koja koristi DNA te na onu koja koristi RNA. Prema ciljanim stanicama možemo je podijeliti na gensku terapiju spolnih i nespolnih stanica. Iako je genska terapija spolnih stanica moguća, etičke i moralne norme usmjeravaju gensku terapiju prema somatskim stanicama. U

Europskoj uniji, zbog mogućih posljedica za buduće naraštaje genska je terapija spolnih stanica zabranjena (163).

Genski materijal nije moguće direktno dostaviti u stanicu. Najkompleksnija faza genske terapije je razvoj preciznog, dobro kontroliranog i uspješnog mehanizama prijenosa željenog genskom materijala u željene stanice. Za to su potrebni nosači, tj. vektori te različite strategije primjene istih (164).

Dvije su osnovne strategije prijenosa gena: unutrašnja, tj. *in vivo* te vanjska, tj. *ex vivo.* Tijekom genske terapije *in vivo* (lat., *u živom tijelu*), vektor s genskim materijalom se izravno ubrizgava u krvotok pacijenta. Vektor nakon toga mora pronaći željene stanice i dostaviti im genski materijal. Ovim naizgled jednostavnim načinom teško je upravljati. Vektor čiji je zadatak dostaviti genski metarijal u određenu populaciju stanica, ujedno mora izbjegavati, tj. zaštiti druge stanice. Uz to, kao ozbiljna komplikacija genske terapije *in vivo,* mogući je i imunološki odgovor domaćina na vektor (165). Tijekom provedbe konvencionalne *ex vivo* (lat., *izvan tijela*) genske terapije, stanice ili tkiva pacijenta se izoliraju iz tijela, transportiraju u laboratorij te uvode u staničnu kulturu. Prijenos genskog materijala pomoću vektora provodi se u laboratoriju *in vitro* prije reimplantacije u tijelo. Genska terapija zahtjeva prijenos genetskog materijala pomoću nekog nosača genetičkog materijala, tj. vektora. Cijeli proces započinje identifikacijom i izolacijom željenog gena, umnožavanjem, tj. aplifikacijom istoga te izborom odgovarajućeg vektora, tj. nosača genetičkog materijala. U tu svrhu istraživači koriste različite virusne, nevirusne i bakterijske vektore. Proces prenošenja genetičkog materijala pomoću virusnih vektora naziva se transdukcija (26), pomoću nevirusnih vektora transfekcija (166), a pomoću bakterijskih vektora baktofekcija (167).

Najčešće se upotrebljavaju virusni vektori temeljeni na adenovirusima, retrovirusima, lentivirusima, adeno-pridruženim virusima ili herpes-simplex virusima. Transfekcija (lat., *od transire - trans = preći preko, s druge strane + inficere = otrovati, okužiti*) je proces namjernog prijenosa gole ili purificirane nukleinske kiseline, tj. genske informacije, korištenjem nevirusnih vektora, u stanice domaćina. Proces transfekcije stanica obično podrazumijeva otvaranje prolazne pore ili "rupe" u staničnoj membrani, a što kasnije omogućava prolaz genskog materijala. Nevirusne metode prijenosa genske informacije u stanicu uključuju različite fizičke, kemijske i metode česticama (166). Fizičke metode uključuju: direktno ubrizgavanje u jezgru te različite metode fizičkog otvaranja pore u staničnoj membrani (struja – elektroporacija, zvuk - sonoporacija, ultrazvuk -

optoperformacija). Kemijske metode koriste različite polimere, liposome i katione u svrhu otvaranja prolazne pore u staničnoj membrani. Metode česticama uključuju genski pištolj te magnetofekciju. Genski pištolj ili sistem biolističke isporuke čestica je uređaj za ubrizgavanje u stanice s novom genetskom informacijom. Korisni nosač je elementarna čestica teškog metala obložena plazmidnom DNA. Ova tehnika se često jednostavno naziva biobalistika ili biolistika. Princip magnetofekacije bazira se na korištenju magnetskog polja u svrhu koncentriranja i prijenosa kationskih čestica obloženih željenom nukleinskom kiselinom u stanicu. Ključni problem vezan uz korištenje nevirusnih vektora je taj što su oni značajno manje efikasni od virusnih vektora (164).

Istraživanja vezana uz gensku terapiju u ortopediji provode se unatrag više od dvadeset godina (168). Razvojem regenerativne medicine otvorena su vrata primjeni genske terapije u reparaciji i regeneraciji tkiva lokomotornog sustava (169, 170). Opisane su različite strategije primjene genske terapije u području lokomotornog sustava (168). Svaka od tih strategija ima svoje prednosti i nedostatke (171). Konvencionalna genska terapija *ex vivo* bila je prva strategija genske terapije i prva korištena u kliničkim ispitivanjima na ljudima (168). Takva strategija dokazala se kao uspješna, ali ne i idealna za potencijalnu primjenu tijekom ortopedskih operacija. Zahtijeva dva operacijska zahvata. Prvi kada se uzima tkivo, a drugi kada se transducirane stanice vraćaju. Neizbježni su transport tkiva do laboratorija i natrag, kao i kultiviranje tkiva u laboratoriju. Na taj način cijeli zahvat postaje skup, dugotrajan i neugodan za potencijalnog bolesnika. S ciljem nadilaženja tih problema razvila se ubrzana (eng., *facilitated*) (172), tj. „*same day*“ (173) strategija genske terapije *ex vivo*. Nit vodilja u razvoju takve strategije bila je uspješna genska terapija tijekom koje se uzimanje tkiva, transdukcija i implantacija mogu izvesti unutar operacijske sale, u istom operacijskom aktu i bez potrebe za kultiviranjem tkiva. Uspješno je provedeno nekoliko istraživanja koja su potvrdila takvu ideju uz naglasak da je transdukcija izvršena unutar vremenskog intervala od dva sata (98). Iako vremenski interval od dva sata predstavlja prosječno vrijeme trajanja ortopedskih operacija, veliki broj traje značajno kraće. Primjena blijede staze (eng., *tourniquet*) često je vremenski ograničavajući čimbenik. Vrijeme korištenja blijede staze iznad 90 minuta značajno povećava mogućnost komplikacija (174). Ubrzana genska *ex vivo* terapija, iako ubrzana, još uvijek prelazi prihvatljivo vrijeme korištenja blijede staze. Nažalost, zbog toga, klinička primjena iste, tijekom ortopedskih zahvata kraćeg trajanja, poput rekonstrukcije prednje ukrižene sveze, ostaje nemoguća.

1.7. Virusni vektori

Virusi (lat., *virus* – *otrov*) – metabolički su neaktivne i zarazne čestice na granici nežive prirode i živog svijeta. Nemaju stanične dijelove već potpuno ovise o mehanizmu stvaranja energije i bjelančevina stanica domaćina. Čestice virusa (poznate kao virioni) sastoje se od dva ili tri dijela: 1) genetskog materijala sačinjenog od DNA ili RNA, 2) proteinskog omotača (kapside) koji štiti te gene, i, u nekim slučajevima, 3) lipidnog omotača koji okružuje proteinski omotač kad su virusi izvan stanice. Životni ciklus virusa sastoji se od nekoliko faza: 1) adsorpcije, tj. vezanja virusa na površinske receptore stanice domaćina, 2) penetracije, tj. ubrizgavanja genetskog materijala u stanicu domaćina, 3) replikacije, tj. umnožavanja virusnog genskog materijala i sintetiziranje virusnih proteina, 4) maturacije, tj. "pakiranja" virusnih čestica i 5) oslobađanje virusa, najčešće lizom stanice domaćina, pomoću enzima kodiranog fagnom DNA.

Veliki broj različitih strategija genskih transfera koriste viruse, kao i nevirusne vektore (26). Upotrebom virusa, kao vektora, genska terapija iskorištava milijune godina evolucije koje su divljim tipovima virusa omogućile da inficiraju stanice domaćina, iskoriste staničnu "tvornicu" i proizvedu nove virione. Njihova evolucijska sposobnost ulaska u stanice još uvijek predstavlja najučinkovitiji način transfera genskih informacija (175). Nekoliko je obilježja koja krase "dobar" virusni vektor: 1) sigurnost upotrebe brisanjem dijela virusnog genoma zaduženog za replikaciju virusa, 2) minimalna toksičnost, tj. minimalni utjecaj na fiziologiju stanica domaćina, 3) stabilnost (neki virusi su genetski nestabilni), 4) stanična specifičnost i 5) mogućnost identifikacije (geni markeri koji kasnije olakšavaju prepoznavanje transduciranih stanica) (164).

Kako bi virus postao vektor i kao takav se mogao upotrebljavati u svrhe genske terapije, virusni genom se modificira te se tehnikama genetičkog inženjerstva uklanjaju sljedovi za virulentnost i replikaciju virusa (176). Terapeutski gen, transgen, odnosno cDNA, klonira se na mjesta uklonjenih sljedova. Na taj se način konstruira rekombinantni virus koji zadržava svoju sposobnost inficiranja stanica i sposobnost učinkovitog prijenosa gena u stanicu. Takav se virus ne može replicirati unutar stanice domaćina, sigurniji je i manje virulentan od originalnog virusa. Nekoliko vrsta različitih virusa modificirano je na taj način, a razlikuju se u: 1) kapacitetu, 2) imunogenosti, 3) lakoći proizvodnje te 4) sposobnosti integriranja u

genom domaćina. Virusni vektori koji se koriste u kliničkim ispitivanjima navedeni su u Tablici 1. (169).

Tablica 1. Specifičnosti virusnih vektora koji se koriste u kliničkim ispitivanjima

Adenovirus	-Dvolančana DNA veličine 35 kb -Bez ovojnice -Preko 50 serotipova -Episomalni genom u inficiranim stanicama	-Laka produkcija visokih koncentracija virusa -Transducira stanice koje se ne dijele -Širok izbor serotipova	-Antigenost -Upale
Herpes Simplex virus	-dvolančana DNA veličine 150 kb -s ovojnicom -episomalni genom u inficiranim stanicama	-transducira stanice koje se ne dijele -prirodna latencija u neuronima -visoki kapacitet	-kompleksan genom -teška produkcija rekombinantnog virusa -citotoksičan
Adeno-pridruženi virus	-jednolančana DNA veličine 4.8 kb -bez ovojnice -veliki broj serotipova	-ne uzrokuje nikakve poznate bolesti -transducira stanice koje se ne dijele -niska imunogenost	-kompliciranа proizvodnja -mali kapacitet -niska stopa transdukcije
Onkoretrovirus	-RNA genom veličine 8-10 kb -s ovojnicom	-laka produkcija umjerenih koncentracija virusa -širok izbor stanica domaćina	-stanice moraju biti u diobi -rizik od insercijske mutageneze

1.7.1. Adenovirusi u genskoj terapiji

Adenoviruse je prvi put izdvojio Rowe 1953. godine iz adenoidnog tkiva u kulturi stanica (177). Adenovirusi pripadaju porodici *Adenoviridae*. Porodica *Adenoviridae* (gr., *αδέναϛ, što*

znači žlijezda) obuhvaća tzv. viruse bez ovojnice čija kapsida ima ikosaedričnu simetriju). Tipični adenovirus prosječnog je promjera oko 100 nm. Njegov genom sastoji se od linearne dvolančane DNA dužine od oko 36 kb. Ta porodica obuhvaća rodove: AtadenovirusAviadenovirus, Siadenovirus i Mastadenovirus. Ljudski adenovirusi pripadaju rodu Mastadenovirus. Do danas je otkriveno 51 različitih serotipova ljudskih adenovirusa koji su podijeljeni u 6 podskupina (A-F) prema svojstvima hemaglutinacije, onkogeničnosti u modelnim organizmima (glodavcima), homologiji DNA i organizaciji genoma. Primijećena je korelacija između podskupina i tropizma adenovirusa. Virusi u podskupinama B, C i E uzrokuju infekcije dišnih putova, neki virusi B podskupine inficiraju bubrege i mokraćne putove, virusi podskupine F uzrokuju gastroenteritis, a neki iz podskupine D povezuju se s epidemijskim keratokonjunktivitisom (178). Adenovirusi imaju široki spektar stanica domaćina. Oni mogu inficirati stanice u diobi, stanice koje miruju ili pak već izdiferencirane stanice (npr. neurone). Općenito, kod čovjeka, adenovirusi napadaju stanice epitela dišnih putova. Tamo prouzrokuju oko 15% svih oboljenja koje općenito nazivamo prehladama. Iako pretežno izazivaju oboljenja koja nisu opasna, ipak mogu biti i uzročnici teških oboljenja kao što je bronhitis. U vrlo rijetkim slučajevima infekcije adenovirusima mogu izazvati smrt.

Ulazak adenovirusa u stanicu domaćina zahtjeva dva seta interakcija. Ulazak u stanicu domaćina započinje jednom od domena vlaknastog proteina kapside koji se veže za stanični receptor (179). Dva najpoznatija receptora su CD46 za grupu B humanih adenovirusnih serotipova i receptori CAR (engl., *coxsakievirus-adenovirus receptor*) za sve ostale serotipove. Nakon toga, slijedi interakcija između motiva u pentonskoj bazi proteina kapside i molekule integrina αv na površini stanice. Vezanje na integrin αv rezultira endocitozom virusne čestice putem jažica obloženih klatrinom na način da se inducira polimerizacija aktina unutar stanice i virusna čestica ulazi u stanicu domaćina unutar endosoma (180).

Nakon što je virusna čestica ušla u stanicu domaćina, endosom se zakiseljava i uništava, a virion se nađe u citoplazmi. Uz pomoć staničnih mikrotubula, virus se transportira do kompleksa jezgrinih pora gdje se uklanjaju proteinski dijelovi virusa, a virusna DNA se oslobađa i tada može ući u jezgru putem kompleksa jezgrinih pora. Virusna DNA u jezgri asocira s molekulama histona i transkripcija može započeti. Produciraju se nove virusne čestice (181). Replikacija DNA virusa odvija se u dvije faze: ranoj i kasnoj fazi. U obje faze, primarni transkript je podložan alternativnom procesiranju RNA, gdje se proizvodi monocistronska mRNA, koja je kompatibilna s domaćinovim ribosomima. Rani geni su odgovorni za izraženost nestrukturnih, regulatornih proteina. Cilj ovih proteina je promijeniti

izraženost proteina domaćina s ciljem prepisivanja virusne DNA, aktivacije ostalih virusnih gena, kao npr. virusne DNA polimeraze, te blokiranje apoptoze i aktivnosti interferona (182). Kasni geni odgovorni su za proizvodnju dovoljnih količina strukturnih proteina virusa kako bi se sav genetički materijal proizveden DNA replikacijom mogao upakirati u virusne kapside. Kada su sve nove komponente sintetizirane, virus se sastavlja, inducira lizu stanice i na taj način izlazi van. U molekularnoj biologiji adenovirusi imaju vrlo značajnu ulogu razvojem genskog inženjeringa u 1970-tim godinama. Adenovirusi se tako koriste kao gentehnički vektori za prenošenje strane DNA. U svrhu pretvorbe adenovirusa u adenovirusni vektor potrebno je adenovirus gen-tehničkim metodama izmijeniti. Željeni adenovirusni vektor treba zadržati sposobnost ulaska u stanicu, prenošenja DNA, ali uz obuzdanu sposobnost razmnožavanja. To se postiže gen-tehničkom metodom pri kojoj E-1 regija virusa, neophodna za razmnožavanje, biva izrezana. Izrezana E-1 regija na taj način postaje prostor za ubacivanje željene DNA. Izgubivši sposobnost razmnožavanja, adenovirusni vektor postaje idealan za prenošenje gena u željenu stanicu, međutim, nastaje problem uzgoja.

Postupak daljnjeg korištena takvog gen-tehnički promijenog adenovirusa (zajedno sa stranom DNA) započinje kloniranjem na plazmid. Taj plazmid biti će dodan gen-tehnički promijenjenoj staničnoj kulturi, tzv. "stanicama pomoćnicima“, čije stanice u svom genomu sadrže regiju E-1 virusa neophodnu za njegovo razmnožavanje. Razmnoženi adenovirusni vektori koji sadrže stranu DNA, potom se mogu koristiti kao prenosnici željenih genetskih informacija, a da svojim razmnožavanjem ne izazivaju štetne infekcije.

Adenovirusni vektori atraktivni su za korištenje tijekom istraživanja iz nekoliko razloga: adenovirusni genom dobro je poznat, postoji mogućnost proizvodnje pročišćenih virusnih čestica visokog titra te relativno velikog kapaciteta ugradnje strane DNA, a jako su infektivni, uz sposobnosti infekcije stanica u diobi i onih koje se ne dijele, ne integriraju se u genom transducirane stanice te izražavaju proteine u visokim količinama tijekom nekoliko tjedana.

Međutim, postoji i mogući problem poticanja snažnog prirođenog i stečenog imunološkog odgovora prilikom *in vivo* upotrebe. Takav imunološki odgovor može biti poželjan tijekom korištenja u onkologiji ili procjepljivanju, ali ne i u regenerativne svrhe jer dolazi do citotoksičnosti i gubitka željene genske izraženosti. U svrhu smanjene imunogeničnosti te poboljšanja iskoristivosti tijekom korištenja u istraživanjima, adenovirusni vektori „doživjeli“ su značajne transformacije. Činjenica da izazivaju uglavnom blage bolesti značajno je

pridonijela razvoju adenovirusnih vektora. Najčešće se koriste vektori temeljeni na tipovima 2 i 5 podskupine C (183). U prvoj generaciji Ad5 vektora uklonjeni su E1 i/ili E3 geni, dozvoljavajući tako unos do 6,5 kb strane DNA. Kod E1 delecija posebno se moralo paziti da se u genomu zadrže ITR sljedovi (eng., *inverted terminal repeats*) i sljedovi potrebni za pakiranje virusne čestice. Uklanjanje E1 područja onemogućuju transkripciju ostalih ranih gena (koji su transkripcijski ovisni o E1) pa tako i replikaciju virusne DNA i proizvodnju kapsidnih proteina (183). Za umnažanje ovakvih replikacijski defektnih Ad5 koriste se stanice koje osiguravaju produkte E1 gena (npr. bubrežne stanice ljudskog embrija, HEK-293, engl., *human embryonic kidney*) (184). Iako je uklanjanje E1 područja genoma jako smanjilo izraženost ostalih virusnih gena nije ju u potpunosti onemogućilo. Stoga su razvijeni vektori druge generacije u kojima su se postupno uklanjala područja E2 i E4. Svaka novo uvedena delecija zahtijeva postojanje odgovarajuće komplementirajuće stanične linije. Takvi adenovirusni vektori imaju smanjenu toksičnost, a izraženost gena koje unose u stanicu je produljena u odnosu na one prijašnjih generacija zbog manje izraženog imunog odgovora domaćina na virusne proteine (183).

Adenovirusni vektori kod kojih su uklonjeni svi virusni geni nazivaju se visokokapacitetnima ili *"gutless"* vektorima. Oni zadržavaju samo ITR sljedove i slijed za pakiranje, no za umnažanje im je potreban pomoćni virus kojeg je još uvijek vrlo teško odvojiti od čestica Ad5 vektora. Ta činjenica glavni razlog je njihove ne tako česte upotrebe (185).

1.7.2. Geni izvjestitelji

Geni izvjestitelji (engl., *reporter genes*) koriste se kao indikatori izražaja ili ulaska gena kojeg istražujemo u stanicu. Najčešće su spojeni s genom koji istražujemo. Koriste se za proučavanje regulatornih sljedova ili drugih gena od interesa kod bakterija, staničnih kultura, životinja ili biljaka. Obilježja dobrog reporterskog gena su lako uočavanje i mjerenje (186). Najčešće korišteni reporterski geni su oni koji daju produkte koji fluoresciraju ili luminisciraju: zeleni fluorescentni protein (engl., *green fluorescent protein – GFP*), crveni fluorescentni protein (engl., *red fluorescent protein – RFP*) i luciferaza. Enzim luciferaza često se koristi kao biljeg za praćenje umnožavanja virusa i izraženosti virusnih gena u laboratorijskih životinja jer je kao enzimski test jako osjetljiv i ne izražava se inače u ljudskim tkivima (187).

Luciferaza je oksidativni enzim koji omogućava bioluminiscenciju nekim organizmima kao npr. krijesnici. Krijesnice emitiraju svjetlost, zahvaljujući kemijskoj reakciji konverzije luciferina u oksiluciferin, uz pomoć enzima luciferaze. Reakcija je energetski jako učinkovita. Cijela energija kemijske reakcije jako brzo prelazi u svjetlosnu energiju što taj test čini jako preciznim i idealnim izvjestiteljskim sustavom (188).

Adenovirusni vektor koji izražava gen za luciferazu (eng., *adenoviral vector encoding firefly luciferase reporter gene (Ad.Luc)*) je vektor koji eksprimira gen za luciferazu pod promotorom iz citomegalovirusa (CMV). Kada virusna DNA uđe u stanicu, stanica prepisuje i virusnu DNA što znači da u stanici transduciranoj virusnim vektorom Ad.Luc postoji enzim luciferaza. Nakon dodavanja supstrata luciferina, doći će do enzimske reakcije pretvaranja luciferina u oksiluciferin što možemo očitati na luminometru kao svjetlost. Intenzitet svjetlosti direktno je proporcionalan koncentraciji luciferaze (189). Koliko je stanica uspješno transducirana s Ad.Luc, tolika je koncentracija luciferaze, tj. intenzitet svjetlosti. Shematski prikaz enzimske reakcije luciferaze dan je jednadžbom:

$$\text{Luciferaza} + \text{luciferin} + \text{ATP} + \text{Mg2+} \longleftrightarrow \text{luciferaza}\cdot\text{luciferil-AMP} + \text{PPi}$$

$$\text{luciferaza}\cdot\text{luciferil-AMP} + \text{O2} \longleftrightarrow \text{luciferaza} + \text{oksiluciferin} + \text{AMP} + \text{CO2} + h\upsilon$$

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je optimizirati *in vitro* transdukciju humanog mišićnog tkiva adenovirusnim vektorom koji nosi gen za kodiranje koštanog morfogenetskog proteina-2 (eng., *adenoviral vector encoding bone morphogenetic protein-2 – Ad.BMP2*) te dokazati da tako transducirano humano mišićno tkivo ima sposobnost osteogene diferencijacije.

Glavna hipoteza:

Uporabom adenovirusnog vektora koji nosi gen za kodiranje koštanog morfogenetskog proteina-2, moguće je uspješno transducirati *in vitro* humano mišićno tkivo te ga usmjeriti prema osteogenoj diferencijaciji uz trajanje transdukcije manje od 90 minuta.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

Nakon odobrenja Etičkih povjerenstava Specijalne bolnice „Sveta Katarina“ u Zaboku i KB-a „Sveti Duh“ u Zagrebu pristupili smo istraživanju. Kriteriji uključivanja pacijenata čije je tkivo upotrijebljeno u studiji bili su klinički, radiološki, a magnetskom je rezonancom utvrđena prijeoperacijska dijagnoza traumatskog, primarnog puknuća ACL-a s ili bez dodatnih intraartikularnih oštećenja u području koljena. Životna dob svih ispitanika, čije je tkivo testirano, bila je između 18 i 55 godina. Svi bolesnici u potpunosti su bili upoznati s istraživanjem i potpisali su informirani pristanak.

Obavljene su 33 artroskopske rekonstrukcije ACL-a uz upotrebu presatka načinjenog od učetverostručenih tetiva mišića gracilisa i semitendinosusa. Prilikom priprema presatka, koji su korišteni tijekom rekonstrukcije prednje ukrižene sveze, dio muskulature zaostale uz tetive odvaja se od njih te se ne koristi u daljnjem operacijskom zahvatu. Takvo mišićno tkivo pohranjeno je uz aseptične uvjete rada u operacijskoj sali u odgovarajuće sterilne posude ispunjene Dulbeccovim modificiranim esencijalnim medijem (engl. *Dulbecco´s Modified Essential Medium* – DMEM, Thermo Fisher Scientific, Walthem, MA, SAD). Tkivo je transportirano na Zavod za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

3.2. Vektori

Zahvaljujući susretljivosti Medicinskog fakulteta na Harvardu dobili smo rekombinantni adenovirusni vektor koji nosi gen za kodiranje *Ad.BMP2* te rekombinantni adenovirusni vektor koji nosi gen za enzim luciferazu (Ad.Luc).

Oba rekombinantna adenovirusna vektora konstruirana su Cre-Lox rekombinacijom. Regije važne za replikaciju adenovirusa su tzv. rane (E1, E2, E3 i E4) i kasne (L1, L2, L3, L4 i L5). Nakon delecije, regije E1, E3 i mjesto uzvodno od E4 služe kao mjesta za inserciju stranog slijeda DNA u adenovirusni genom. Na mjesto regija odgovornih za replikaciju virusa, ubačena je željena cDNA (BMP– 2, luciferaza), a na mjestu uzvodno promotor. Promotor

korišten za konstrukciju naših vektora bio je CMV (citomegalovirus) koji je konstitutivno aktivan u raznim staničnim tipovima i smatra se jednim od najjačih promotora *in vitro* (126).

Iako je regija genoma E1 nužna za replikaciju virusa u staničnoj kulturi, moguće je deletirati tu regiju i na njeno mjesto ubaciti strani slijed DNA. Preduvjet replikacije tako defektnih virusa je kultura stanica koje imaju sposobnost izraženosti E1 ili E1-sličnog slijeda. Stanice HEK 293 (engl., *human embryonic kindey*) su transformirane adenovirusnom DNA i konstitutivno eksprimiraju slijed E1. Za umnažanje rekombinantnih adenovirusa u staničnoj kulturi koristili smo upravo tu staničnu liniju.

3.2.1. Umnažanje i pročišćavanje replikacijski defektnih adenovirusa u kulturi stanica

U svrhu replikacije svakog od replikacijski defektnih adenovirusnih vektora nasadili smo stanice HEK-293 u 80 Petrijevih zdjelica u tekućoj hranjivoj podlozi kompletnog medija DMEM uz 4500 mg/L glukoze (Lonza, Visp, Švicarska), 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Walthem, MA, SAD), 100 U/mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina (Lonza Visp, Švicarska,). Kada su stanice postigle 80-90% konfluentnosti, uklonili smo DMEM-FBS sa stanica i na njih pažljivo stavili 1 mL DMEM-FBS u kojem su se nalazili virusi. Inkubirali smo 1 sat pri 37°C uz 5% CO2 pri čemu smo pažljivo naginjali Petrijevu zdjelicu svakih 20 minuta. Nakon sat vremena, na stanice smo dodali 5 mL DMEM-FBS i ostavili u inkubatoru pri 37°C uz 5% CO2 tijekom 4 dana. Sakupili smo stanice zajedno s tekućom podlogom i centrifugirali pri 2000 x g tijekom 10 minuta. Talog nastao centrifugiranjem, sačinjen od transduciranih HEK 293 stanica, ostavili smo u 10 mL tekuće hranjive podloge. S ciljem oslobađanja što više virusnih čestica, stanice smo izložili trima ciklusima zamrzavanja/odmrzavanja na -80°C vodenoj kupelji zagrijanoj na 37°C. Prije svakog ciklusa, stanice smo izmiješali vibracijskom miješalicom. Po završetku zadnjeg ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja, centrifugirali smo stanice 5 minuta pri 4000 x g. Talog nastao raspadom stanica smo bacili, a supernatant dalje pročišćavali. Replikacijski defektni adenovirusi pročišćavani su u dva koraka. Prvo na jastučiću cezijevog klorida, pri čemu se virusne čestice, uslijed djelovanja centrifugalne sile, zaustavljaju na razdiobi dviju otopina cezijevog klorida različite gustoće i na taj način stvaraju bijelu zonu.

Pripremili smo otopine cezijevog klorida različite gustoće u Tris-HCl puferu: 1,25 w/w, 1,34 w/w i 1,4 w/w. U epruvetu za centrifugiranje stavili smo 2,5 mL 1,4 w/w cezijevog klorida.

Na sloj cezijeva klorida smo nadslojili 2,5 mL 1,25 w/w cezijevog klorida. Do vrha epruvete smo nadslojili ranije spomenuti supernatant, tj. lizat inficiranih stanica.

Centrifugirali smo pri 20°C, 1:45 minuta pri 60000 x g na ultracentrifugi s tzv. (engl.) *swing-out* rotorom uz isključenu kočnicu. Sloj virusa koji se stvorio nakon centrifugiranja na granici dva sloja cezijevog klorida, sakupili smo špricom s iglom kojoj je suženi vrh prethodno savinut sterilnom pincetom tako da je otvor igle okrenut prema gore.

U sljedećem koraku virusi se pročišćavaju u gradijentu cezijevog klorida koji nastaje centrifugiranjem preko noći i gdje se bijela zona virusa zaustavlja na mjestu koje je jednake gustoće kao i gustoća virusnih čestica. U epruvete za centrifugiranje stavili smo 3 mL suspenzije virusa i dopunili s 10 mL cezijevog klorida (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka) gustoće 1,34 w/w. Dobro smo pomiješali suspenziju virusa i cezijevog klorida te centrifugirali pri 20°C preko noći pri 60000 x g na ultracentrifugi. Uklonili smo, bez potresanja, gornji sloj sve do 2 cm iznad zone virusa. Sloj virusa koji se stvorio po sredini epruvete za centrifugiranje smo sakupili. Sljedeći korak bio je uklanjanje cezijevog klorida iz pročišćenih adenovirusa dijalizom. Crijeva za dijalizu smo odrezali na komade od 8 cm i kuhali 10 min u otopini za pripremu crijeva. Otopina za pripremu crijeva za dijalizu se sastojala od 2% natrijevog bikarbonata i 1 mM EDTA. Crijevo smo isprali s reH2O i kuhali još 10 min u 1 mM EDTA pri pH=8.0. Crijevo smo čuvali u 75% etanolu na 4°C te prije upotrebe dobro isprali s reH2O.

Pripremili smo pufer za dijalizu sastava: 10mM Tris (pH=7,4) i 1mM MgCl2

Zatvorili smo crijevo za dijalizu s jedne strane plastičnom štipaljkom. Pažljivo smo stavili suspenziju virusa u crijevo te drugi kraj crijeva također zatvorili plastičnom štipaljkom. Crijeva smo stavili u čašu napunjenu puferom za dijalizu koja se nalazi na magnetskoj miješalici pri 4°C.

Dijalizu smo provodili 6 sati uz 6-7 izmjena hladnog pufera za dijalizu, uz stalno miješanje na magnetskoj miješalici.

Otvorili smo pažljivo plastične štipaljke, pipetom izvadili dijalizirani virus te mu dodali glicerol tako da ga u konačnoj koncentraciji bude 10%. Viruse smo razdijelili u alikvote od 20 µL te ih smrznuli na -80°C.

3.2.2. Određivanje koncentracije i infektivnosti adenovirusnih čestica

Pripremili smo razrjeđenja pročišćenih virusa 5x, 10x, 20x, 25x u puferu PBS s 0,1% SDS i inkubirali ih 10 minuta pri 56°C. Pripremljena razrjeđenja virusa smo centrifugirali kratko pri 10000 x g i supernatant prenijeli u drugu epruveticu. Koristeći svojstvo DNA adenovirusa da apsorbira ultraljubičastu svijetlost valne duljine 260 nm, apsorbanciju smo mjerili pri 260 nm prema puferu PBS + 0,1% SDS na NanoDrop spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific, Walthem, MA, SAD).

Broj virusnih čestica u ml suspenzije pročišćenih adenovirusa smo računali prema formuli:

N=A260 x r x 1,1x1012

gdje je: N - broj virusnih čestica u mL, A260 - izmjerena apsorbancija pri 260nm, a R – razrjeđenje.

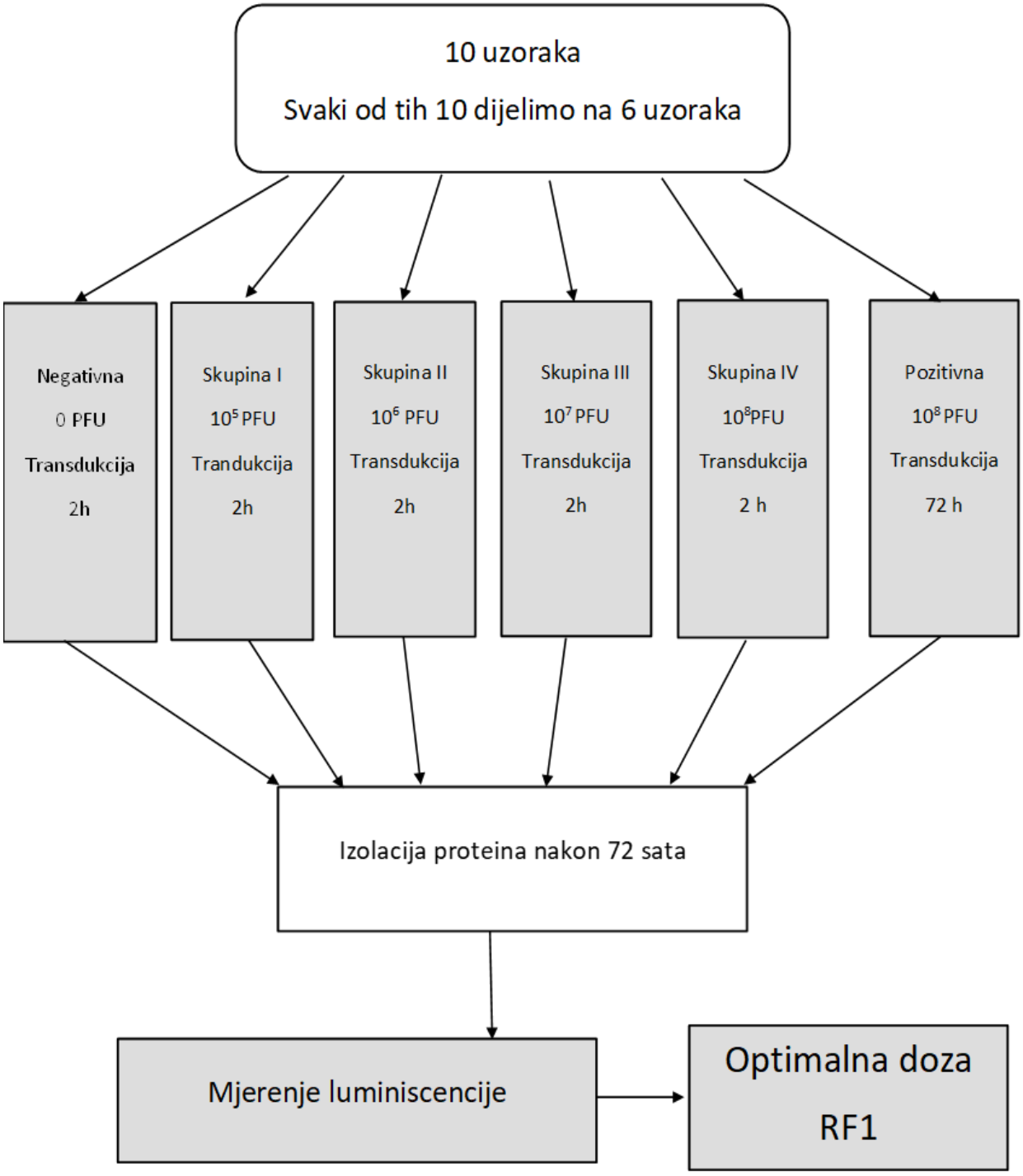
Koncentracija infektivnih adenovirusnih čestica u nekoj suspenziji replikacijski defektnih adenovirusa može se mjeriti sposobnošću stvaranja plakova. Određivanje koncentracije infektivnih adenovirusnih čestica rađeno je prema opisanom protokolu (190). Nasadili smo stanice HEK-293 u posudu s 6 bunarića u tekućoj hranjivoj podlozi DMEM-FBS, tako da je sutradan popunjenost staničnog sloja bila 90%. Pročišćenu suspenziju virusa razrijedili smo do razrjeđenja 1012 u DMEM-u. Pripremili smo 1%-tnu otopinu agaroze u PBS-u. Na nasađene stranice u posudi sa 6 bunarića, dodali smo 2 mL razrjeđenja virusa u DMEM-u te ih inkubirali sat vremena pri 37°C uz 5% CO2. Nakon sat vremena, odisali smo razrjeđenja virusa u DMEM-u i prekrili stanice s 3 mL pripremljene i ohlađene agaroze.

Nakon pet dana inkubacije, pri 37°C uz 5% CO2, obojili smo agarozu s 0.1V otopine MTT-a (eng., *3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*) koncentracije 5 mg/mL otopljenim u PBS-u te smo inkubirali tri sata pri 37°C uz 5% CO2. Nakon inkubacije, izbrojali smo plakove i izrazili koncentraciju infektivnih adenovirusnih čestica kao broj plakova (PFU eng., *plaque forming units*) x volumen razrjeđenje virusa.

3.3. Transdukcija mišićnog tkiva

3.3.1. Određivanje optimalnog broja adenovirusnih čestica za transdukciju mišićnog tkiva pomoću luciferase

Uzorke mišićnog tkiva 10 pacijenata izrezali smo na komadiće od 6 x50 μg u sterilnim uvjetima te ih stavili u 500 μL DMEM u posudu s 24 bunarića, razdjelivši ih tako u 6 skupina. Pročišćenu suspenziju virusa Ad.Luc razrijedili smo u mediju DMEM tako da smo u 20 ml suspenzije imali 0, 10^5, 10^6, 10^7 i 10^8 PFU. Odstranili smo DMEM s mišića pazeći da on ostane vlažan te smo direktno na mišiće nanijeli 20 μL pripremljene razrijeđene suspenzije virusa. Posudu s 24 bunarića smo stavili u inkubator pri 37°C uz 5% CO2 sat vremena. Nakon sat vremena inkubacije, na mišiće smo dodali 1 mL DMEM-a te vratili u inkubator na još sat vremena. Nakon toga smo odstranili hranjivi medij s mišića te ih dobro isprali u PBS-u 3x po 2 mL. Dodali smo 1 mL DMEM-a te inkubirali 72 h. Nakon 72 h slijedila je izolacija proteina i test aktivnosti luciferaze kojom je određen optimalni broj adenovirusnih čestica za transdukciju mišićnog tkiva. Kao pozitivnu kontrolnu skupinu koristili smo uzorke mišića transducirane 20 ml suspenzijom $10^{8,}$ ali bez ispiranja mišića nakon 2 h inkubacije (Slika 7.).

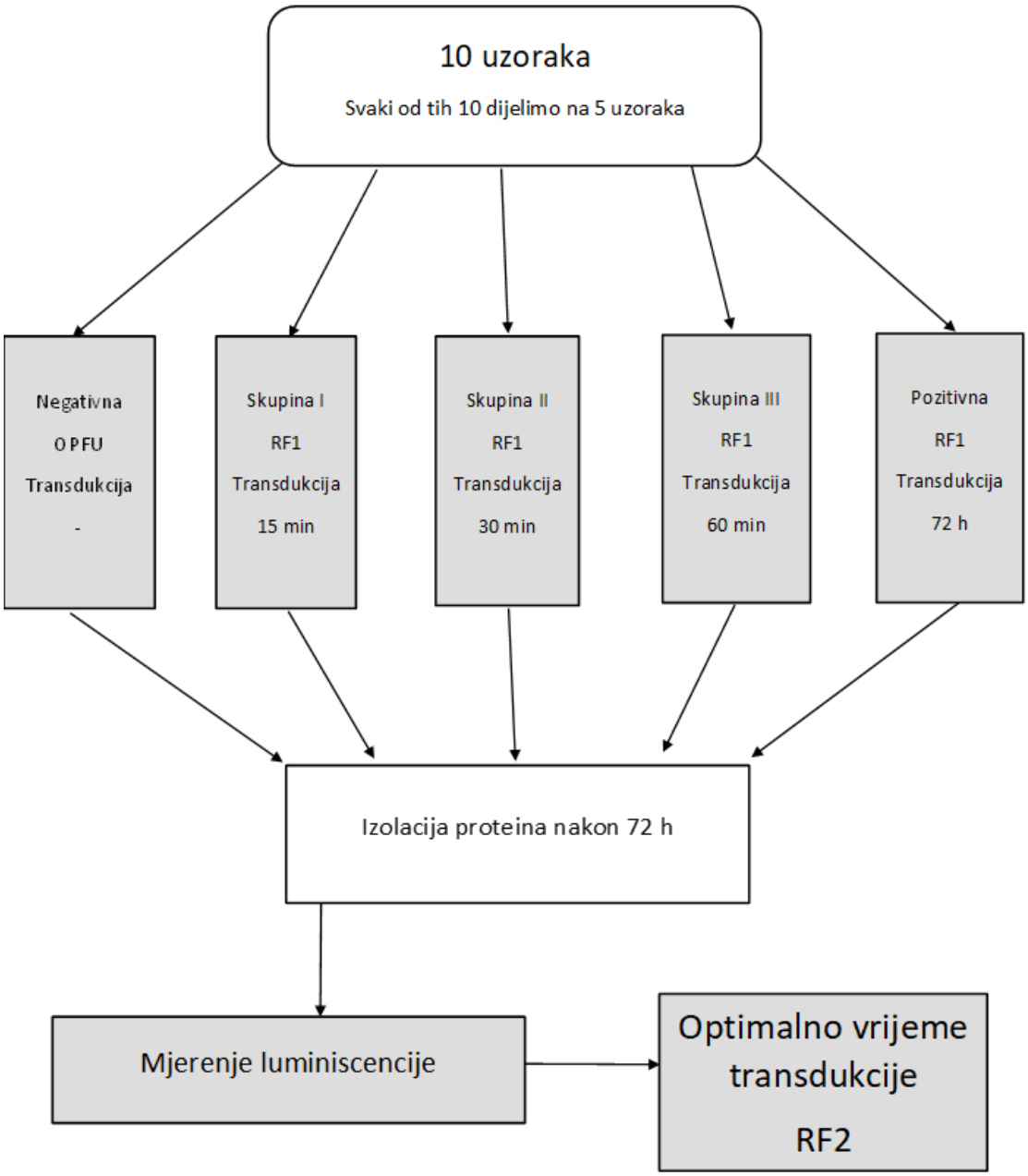


Slika 7. Prikaz hodograma određivanja optimalnog broja adenovirusnih čestica za transdukciju mišićnog tkiva pomoću luciferaze

3.3.2. Određivanje optimalnog vremena kontakta mišićnog tkiva i adenovirusnih čestica pomoću luciferase

Uzorke mišićnog tkiva 10 pacijenata smo narezali na komade od 5 x 50 μg u sterilnim uvjetima te ih stavili u 500 μL DMEM u posudu s 24 bunarića. Optimizirani broj infektivnih čestica smo nakapali direktno na mišiće. U svrhu određivanja optimalnog vremena kontakta mišićnog tkiva i adenovirusnih čestica, mišiće smo inkubirali s virusom 0, 15, 30 i 60 minuta, uz pozitivnu kontrolu gdje je virus bio u kontaktu s mišićima 72 h.

Nakon 15 minuta inkubiranja na 37°C uz 5% CO2, mišiće smo dobro isprali u puferu PBS 3 x 2 mL. Dodali smo 1 mL DMEM-a i inkubirali 72 h, nakon čega slijedi izolacija ukupnih proteina i test aktivnosti luciferaze. Isti protokol smo ponovili s uzorcima koji su se inkubirali 30 i 60 minuta (Slika 8.).



Slika 8. Prikaz hodograma određivanja optimalnog vremena kontakta mišićnog tkiva i adenovirusnih čestica pomoću luciferase

3.3.3. Određivanje utjecaja iona lantana i kalcija na poboljšanje transdukcije mišićnog tkiva

Uzorke mišićnog tkiva 10 pacijenata smo narezali na komade od 5 x 50 μg u sterilnim uvjetima te ih stavili u 500 μL DMEM u posudu s 24 bunarića. Pročišćenu suspenziju virusa pripremili smo na sljedeći način:

a) suspenzija optimiziranog broja čestica pročišćenog Ad.Luc virusa

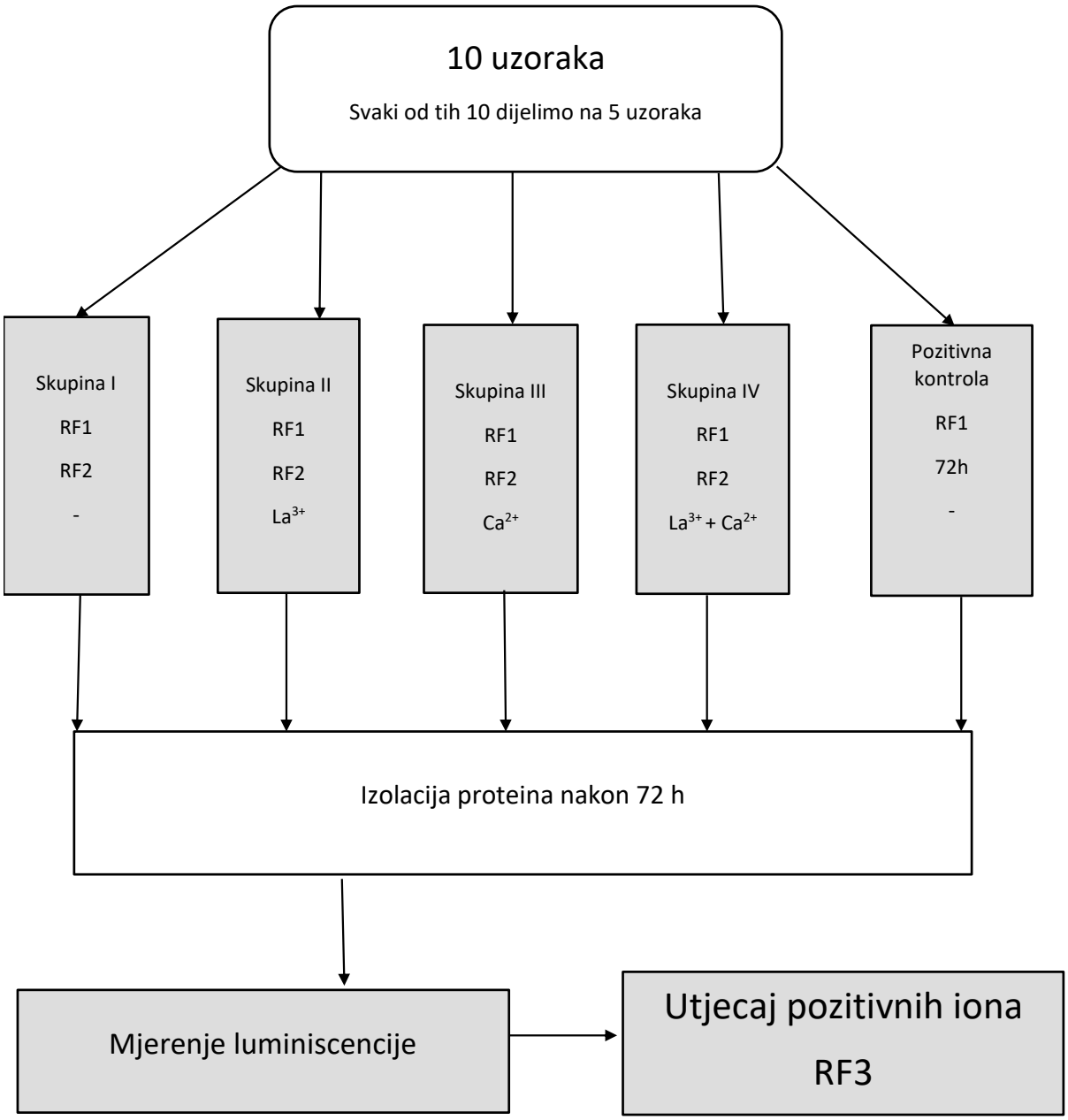
b) suspenzija optimiziranog broja čestica pročišćenog Ad.Luc virusa + 0,2 mM lantan klorida

c) suspenzija optimiziranog broja čestica pročišćenog Ad.Luc virusa + 5 mM kalcij klorida

d) suspenzija optimiziranog broja čestica pročišćenog Ad.Luc virusa + 0,2 mM lantan klorida + 5 mM kalcij klorida.

Suspenzije pročišćenog adenovirusa, lantanovog klorida i kalcijevog klorida inkubirali smo pola sata na ledu da se stvori koprecipitat dvovalentni/trovalentni ion-virus koji omogućava bolji ulazak virusnih čestica u stanicu.

Pripremljene otopine smo nakapali direktno na mišiće te inkubirali kroz prethodno utvrđeno vrijeme na 37°C uz 5% CO2. Nakon inkubacije, mišiće smo dobro isprali u puferu PBS, 3 x 2 mL te inkubirali 72 h pri 37°C uz 5% CO2. Po završetku smo izolirali ukupne proteine te napravili test aktivnosti luciferaze (Slika 9.).



Slika 9. Prikaz hodograma određivanja utjecaja iona lantana i kalcija na poboljšanje transdukcije mišičnog tkiva pomoću luciferaze

3.3.4. Izolacija i određivanje ukupnih staničnih proteina

Ukupna količina staničnih proteina dobivena je koristeći reagens CelLytic M (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka) prema preporuci proizvođača. Medij DMEM smo odstranili s uzoraka i uzorci su isprani 3 puta u 2 ml PBS pufera, smrznuti u tekućem dušiku te homogenizirani pomoću mužara i tučka.

Svakom uzorku dodano je 300 µL of reagensa CelLytic M te su lagano miješani tijekom 45 minuta pri 4° C. Nakon tri ciklusa smrzavanja pri -80° i odmrzavanja pri 37°, lizirane stanice smo centrifugirali 5 minuta pri 4° C te 12000 x g. Supernatant koji sadrži protein smo sakupili. Koncentraciju izoliranih proteina odredili smo koristeći proteinsku analizu Pierce BCA (*Thermo Fisher Scientific*, Walthem, MA, SAD) prema uputama proizvođača. Prvo su pripremljena razrjeđenja albuminskih (engl., *bovine serum albumin, BSA*) standarda radnog raspona od 20 do 2000 µg/ml. Nakon toga, pripremili smo radni reagens BCA miješanjem reagenata koncentracija 2000 µg/ml i 1500 µg/ml u omjeru 50:1.

Otpipetirali smo po 25 µL standarda i 25 µL svakog proteinskog uzorka u jažice mikrotitarske pločice te na kraju dodali 200 µL radnog reagensa u svaku jažicu s uzorkom ili standardom. Nakon inkubacije mikrotitarske pločice pri 37°C u trajanju 30 min, izvršeno je mjerenje apsorbancije proteina na čitaču mikrotitarskih pločica *Victor multilabel X* (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, MA, SAD). Iz dobivenih apsorbancija izračunate su koncentracije proteina.

3.3.5. Određivanje aktivnosti luciferase

Neprozirnu (engl. *opaque*) mikrotitarsku pločicu za određivanje aktivnosti luciferaze ohladili smo na ledu. Priredili smo pufer za određivanje aktivnosti luciferaze sastava: ATP (90 mM), luciferin (25 mM), 10% BSA, MgCl2 (1000 mM), DTT (100 mM), EGTA (50 mM). U jažice mikrotitarske pločice otpipetirali smo po 100 µL staničnog lizata dobivenog izolacijom ukupnih proteina. Neposredno prije samog mjerenja luminiscencije, dodali smo 100 µL pufera za određivanje aktivnosti luciferaze u svaku jažicu s uzorkom. Luminiscencija izazvana aktivnošću luciferaze mjerena je na čitaču mikrotitarskih pločica *Victor multilabel X* (Perkin Elmer ,Waltham, MA, SAD).

3.3.6. Primjena optimiziranog protokola za transdukciju mišićnog tkiva s Ad.BMP2

Po uspostavljanu optimiziranog protokola, tijekom ove završne faze, koristili smo mišićno tkivo prikupljeno tijekom 5 novih rekonstrukcija ACL-a i osteogeni medij u kojem se to mišićno tkivo kasnije nalazilo tijekom 21 dan.

Uzorke mišićnog tkiva 5 pacijenata narezali smo na komade od 50 μg u sterilnim uvjetima te ih stavili u 500 μL DMEM u posudu s 24 bunarića.

Kako bismo potvrdili osteogenu diferencijaciju, eksperiment smo dizajnirali po sljedećoj shemi:

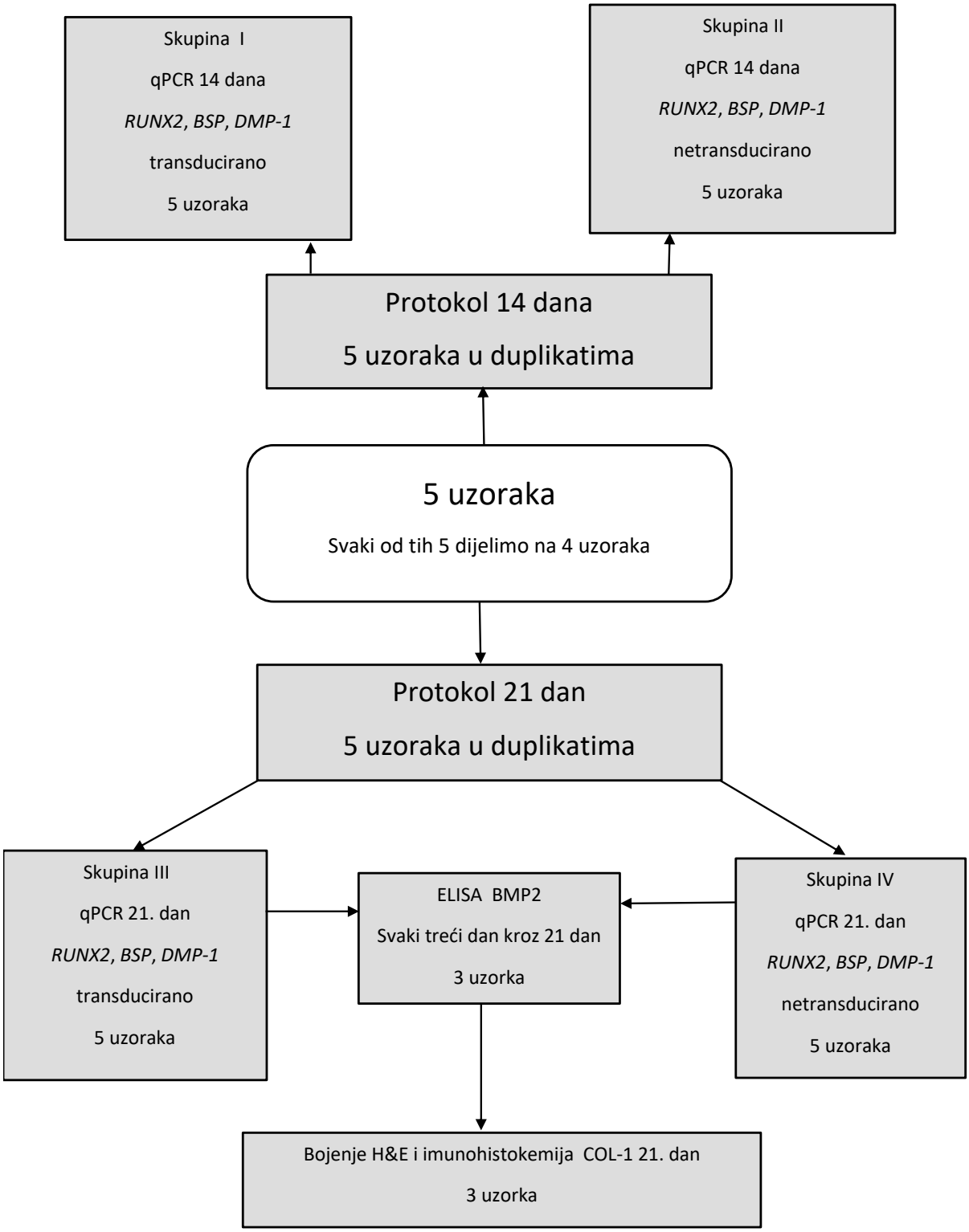
Grupa 1: mišić

Grupa 2: mišić + 20 uL suspenzije Ad.BMP2 virusa

Nakon što smo odstranili hranjivi medij, na sve uzorke mišića druge grupe nakapali smo 20 uL priređene virusne suspenzije Ad.BMP2 u prethodno utvrđenoj infektivnosti. Mišići su potom inkubirani kroz prethodno određeno vrijeme pri 37°C uz 5% CO2 te po završetku inkubacije tri puta isprani u PBS otopini. Svim mišićima je nakon toga dodan medij α MEM (engl. *Minimum Essential Medium Eagle (MEM) Alpha Modifications*) koji je sadrzavao 10% FBS, 1X Pen/Strep, askorbinsku kiselinu (50 μg/ml) te β glicerofosfat (10mM).

Medij je mijenjan svaka 3 dana, a količina otpuštenog BMP2 proteina u mediju izmjerena je pomoću komercijalnog enzim vezujućeg imunosorbent testa (*engl. Enzyme-linked imunosorbent essey* - ELISA) prema preporuci proizvođača koristeći kit Quantikine ELISA BMP2 DBP200. Količina otpuštenog BMP2 izračunata je u odnosu na nastala razrjeđenja.

Za svaki uzorak, nakon 14. i 21. dana inkubacije, napravljena je izolacija RNA te kvantitativni *real time* qPCR s početnicama za gen *BSP* (engl. *Bone sialoprotein*), *DMP-1* (engl. *Dentine matrix protein-1*), *OC* (engl. *Osteocalcin*) i transkripcijski čimbenik *RUNX2* (engl. *Runt-related transcription factor 2*). Ukupno smo koristili uzorke mišića 5 pacijenata za analizu genske izraženosti (dan 14. i dan 21.) te uzorke mišića 3 pacijenta za analizu ELISA (Slika 10.).



Slika 10. Prikaz hodograma potvrde optimiziranog protokola za transdukciju mišićnog tkiva s Ad.BMP2

3.3.7. Izolacija RNA iz mišićnog tkiva i određivanje njene koncentracije

Izolacija ukupne stanične RNA iz mišića transduciranih adenovirusnim vektorom s proteinom BMP2 rađena je 14. te 21. dan nakon transdukcije. Izolacija je napravljena pomoću reagensa TRIzol (*Invitrogen, Carlsbad*, USA) prema preporuci proizvođača.

Proces izolacije sastojao se od: homogenizacije tkiva, faze odvajanja, taloženja RNA, ispiranja RNA i ponovnog otapanja RNA. Utvrđivanje koncentracije RNA izvršeno je pomoću spektofotometra (*NanoVue plus, GE Healthcare*, Velika Britanija).

Homogenizacija

Mišićno tkivo smo isprali 3 puta u hladnom puferu PBS-a, stavili u mikrotubicu Eppendorf te dodali 1mL TRIzola (*Invitrogen, Carlsbad*, SAD). U mikrotubicu smo također dodali kuglice za homogenizaciju tkiva prethodno isprane u vodi s dietil pirokarbonatom (DEPC). Tijekom homogenizacije koristili smo laboratorijsku mješalicu (*Retsch, Haan*, Njemačka).

Nakon homogenizacije, prema preporuci za rad s mišićnim tkivom slijedi dodatno centrifugiranje na 12000 x g, tijekom 10 min pri 4° C. Supernatant smo prebacili u novu Eppendorf mikrotubicu te inkubirali homogenizirani uzorak kroz 5 min na sobnoj temperaturi.

Faza odvajanja

Dodali smo 0,2 ml kloroforma na 1 ml reagensa TRIzola. Zatvorili smo epruvetu, vorteksirali je 15 s i inkubirali 3 min na sobnoj temperaturi. Centrifugirali smo uzorak na 12 000 x g kroz 15 min pri 4 ° C. Nakon centrifugiranja, smjesa se podijelila u 3 faze. Bezbojnu najpovršniju tekuću fazu iskoristili smo za daljnje testiranje.

Taloženje RNA

Nakon centrifugiranja, gornji tekući sloj pažljivo je prebačen u novu mikrotubicu te je dodano 0,5 ml 100% izopropanola uz kratko vorteksiranje. Takav uzorak smo inkubirali 10

min na 20°C te centrifugirali 10 min na 12000 x g pri 4°C. Istaložena RNA u obliku gelatinoznih kuglica smjestila se sa strane i na dnu epruvete.

Ispiranje RNA

Uklonili smo sav supernatant. Istaloženu RNA u obliku kuglica isprali smo sa 75% etanolom i dodali 1 mL 75%-tnog etanola. Ponovo smo centrifugirali na 7500 x g, 5 minuta pri 4°C.

Ponovno otapanje RNA

Supernatant smo uklonili, a talog smo osušili na zraku 10 min. U mikrotubicu smo dodali 50 µL DEPC vode. Uzorke smo inkubirali 5 minuta na 55°C na tresilici te prebacili na led. Uzorke smo pohranili na -80°C.

Utvrđivanje koncentracije RNA spekrofotometrijskom analizom

Koncentraciju RNA smo spektrofotometrijski odredili na NanoDrop (*Thermo Fisher Scientific, Walthem*, MA, SAD) spektrofotometru prema preporuci proizvođača. Razrijedili smo 1 µL RNA s 39 µL DEPC vode te dobili razrjeđenje 1:40. Odredili smo optičku gustoću pri 260 nm i 280 nm te tako utvrdili koncentraciju RNA.

3.3.8. Određivanje razine izraženosti gena metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (*real-time* PCR)

Relativnom kvantifikacijom pomoću *real-time* PCR-a analizirali smo relativnu količinu mRNA za gene: RUNX2 (eng., *runt-related transcription factor 2*), koštani sijaloprotein (eng., *bone sialoprotein – BSP*) i dentin matriks protein 1 (eng., *dentin matrix protein 1 – DMP-1*). Ranije dobivenih 2 µg RNA dodatno smo pročistili primjenom *Deoxyribonucleasea* I *Amplification Gradea* (*Invitrogen, Carlsbad*, CA, SAD), čime smo odstranili postojeći DNA.

U 0,5 ml epruvete za mikrocentrifugu, koju smo držali na ledu, dodali smo na 1 µg RNA uzorka, 1 µL 10 x *DNase Reaction Buffer*, 1 µL *DNase I Amp Grade* (1 U/µl) i DEPC tretiranu vodu do 10 µL. Inkubirali smo 15 min na sobnoj temperaturi. DNazu I smo inaktivirali dodavanjem 1 µL 25 mM EDTA u reaktivnu smjesu. Smjesu smo zagrijavali 10 min pri 65°C. Tako pročišćena 2 µg RNA koristili smo tijekom daljnjeg određivanja razine izraženosti gena metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. Reverzna transkripcija RNA u cDNA izvedena je pomoću GeneAmp RNA PCR kita (*Applied Biosystems, Waltham*, MA, SAD) prema preporuci proizvođača. Svi za to potrebni reagensi su otopljeni i lagano centrifugirani. Slijedi priprema otopine za reverznu transkripciju (engl., *reverse transcription master mix*) na način da je 20 µL reakcijske otopine sadržavalo 2 µL 10x PCR Buffer II bez MgCl2 (Roche, Mannheim, Njemačka), 4 µL 25 mM MgCl2 (*Thermo Fisher Scientific, Waltham*, MA, SAD), 2 µL 10 mM dNTPs (*Sigma-Aldrich, Taufkirchen*, Njemačka), 1 µL (20U/µL) RNase Inhibitora (*TaKaRa Bio Inc.,Otsu, Shiga*, Japan)), 1 µL (50U/µL) MuLV reverzne transkriptaze (*Applied Biosystems, Waltham*, MA, SAD) te DEPC-tretiranu vodu do potpunih 20 µL. Nakon kraćeg centrifugiranja, otopini je dodan RNA uzorak te početnice. Reverzna transkripcija provedena je koristeći *ThermoMixer* (*Eppendorf, Hamburg*, Njemačka) u sljedećim uvjetima: 10 min na sobnoj temperaturi, 1 h/42°C, 5 min/99°C i 5 min/5°. Komercijalni kit *TaqMan Gene expression Assays* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham*, MA, SAD) primijenjen je za analizu izraženosti transkripcijskog čimbenika *RUNX2* (RUNX2, Mm00501584 m1), koštanog sijeloproteina (BSP, Hs00173720 m1) i dentin matriks proteina I (Dmp I, Ms01009391 g1). Kvantificirajući PCR u stvarnom vremenu (engl., *real-time qPCR*) izveden je na 7900HT *Real-Time PCR Systemu* (*Applied Biosystems, Waltham*, MA, SAD) prema preporuci proizvođača. PCR reakcija odvijala se u sljedećim uvjetima: 1 ciklus 10 min/95°C, slijedi 15 sec/95°C te 1 min/60°C kroz 40 ciklusa. Nakon završetka PCR reakcije, analizirali smo rezultate pomoću delta delta-Ct metode. Za normalizaciju rezultata genske izraženosti kao unutarnja kontrola korišten je engl. *housekeeping gen* glicerolaldehid -3- fosfat (GAPDH) (Hs02758991 g1).

3.3.9. Određivanje količine otpuštenog proteina BMP2 u mediju pomoću ELISA

Medij, koji je mijenjan svaka tri dana, iskoristili smo za određivanje otpuštenog proteina BMP2 pomoću Quantikine ELISA kita (*R&D Systems, Minneapolis*, MN, SAD). Svi reagensi

pripremljeni su na sobnoj temperaturi prema uputama proizvođača. U svaku od jažica mikrotitarske pločice dodali smo 100 µL pufera *Assay Diluenta* RD1-19. Nakon toga smo u svaku jažicu dodali 50 µL priređenih BMP2 standarda i uzoraka. Pločicu smo prekrili ljepljivom trakom i slijedila je inkubacija na tresilici mikrotitarskih pločica uz 500 rpm kroz 2 h na sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacije svaka jažica je aspirirana i isprana četiri puta puferom za ispiranje.

U svaku jažicu smo dodali 200 µL BMP2 konjugata, prekrili novom adhezivnom trakom te inkubirali kroz 2 h na sobnoj temperature na tresilici. Pločica je ponovo isprana 4 puta nakon čega smo u svaku od jažica dodali 200 µL otopine substrata. Inkubacija je trajala 30 min na radnom stolu uz zaštitu od svjetla. U svrhu zaustavljanje enzimske reakcije u svaku od jažica dodano je 50 µL tekućine za zaustavljanje enzimske reakcije. Unutar 30 min pomoću čitača mikrotitarskih pločica (*GloMax Promega Madison,* WI SAD) postavljenog na 450 nm, određena je optička gustoća. Prema standardnoj krivulji dobivenoj iz apsorbancija standarda izračunata je koncentracija BMP2 u našim uzorcima.

3.3.10. Histološko bojenje uzoraka hematoksilin-eozinom

Uzorci su fiksirani u 4% PFA (puferiranom parafolmadehidu), zatim su isprani u PBS-u te uronjeni u 10% saharozu/PBS 24h pa u 30% saharozu/PBS 48h. Nakon fiksacije i krioprotekcije pomoću saharoze, tkiva su uronjena u tekućinu za smrzavanje (*Tissue-Tek, OCT Compound Containing*) te su naglo smrznuta na -80°C. Uklopljeni uzorci tkiva rezani su na rezove debljine 10 µm pomoću kriorezača (*Leica,* CM 1850) na temperaturi -20ºC i postavljeni na pozitivno nabijena stakla (*Superfrost plus, Thermo Scentific*). Narezana tkiva su, do bojanja, pohranjena u frižideru na -20ºC. Za histolosku analizu rezovi su obojani metodom hematoksilin-eozin te alizarinom S. Rezovi su promatrani pomoću mikroskopa (*Olympus BX51*).

3.3.11. Imunohistokemijska detekcija kolagena tipa I (COL-I)

Uzorci su fiksirani u 4%-om paraformaldehidu nakon čega je slijedila dekalcifikacija u 14%-oj otopini EDTA. Tkivni uzorci su inkubirani u 30 %-oj otopini saharoze u fosfatnom puferu (PBS) kroz 48 h, nakon čega su uklopljeni u *Tissue-Tek* (*O.C.T. Compound, Sakura,* CA, SAD) i smrzavani na -80°C. Uzorci su rezani na rezove debljine 10 μm pomoću uređaja kriostat *Leica, CM 1850,* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham,* MA, SAD) te su stavljeni na predmetna stakalca *Superfrost plus slides* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham,* MA, SAD) i pohranjeni na -20°C.

U određivanju razmještaja antigena, rezovi su inkubirani s proteinazom K (*Dako/Agilent, Santa Clara,* CA, SAD) u trajanju od 3 minute. Aktivnost endogene peroksidaze blokirana je dodatkom 3% H2O2 u PBS-u kroz 10 minuta. Nakon blokiranja s 10% kozjim serumom (*Dako/Agilent, Santa Clara,* CA, SAD) u PBS-u u trajanju od 1 h, rezovi su ispirani PBS-om te inkubirani s primarnim antitijelom (*anti-collagen I, Abcam, Cambridge*, Velika Britanija) u razrjeđenju 1:400 s 1% kozjim serumom u PBS-u te su ostavljeni preko noći na 4°C. Nakon ispiranja u PBS-u (4 x 5 min), detekcija signala provedena je pomoću *EnVision Detection Systems Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse (Dako/Agilent, Santa Clara,* CA, SAD) prema uputi proizvođača.

Za kontrastno bojanje primijenjen je hematoksilin (Majerov hematoksilin Biognost, Zagreb, Hrvatska) u trajanju od 30 sekundi, nakon čega je slijedilo ispiranje vodom kroz 5 min. Rezovi su dehidrirani i pokriveni sredstvom za pokrivanje (Biognost, Zagreb, Hrvatska) te su potom promatrani pod svjetlosnim mikroskopom (*Olympus BX51, Shinjuju,* Tokyo, Japan).

Kao negativne kontrole pripravljena su stakalca tkiva bez primarnog antitijela. Kao pozitivna kontrola upotrjebljen je uzorak kostiju. Za razliku od uzoraka mišića, kosti su prethodno uklopljene u parafin, nakon čega slijedi deparafinizacija te time to nije primjenjivo za imunohistokemijsku usporedbu, već se primjenjuje isključivo kao pozitivna kontrola.

3.4. Statistički postupci

Cilj ovog translacijskog istraživanja bio je dokazati valjanosti koncepta te utvrditi koja metoda ima najveći potencijal za buduća istraživanja. Zbog toga smo bili primarno zainteresirani kontrolirati grešku tip I, odnosno ne odbaciti istinitu nultu hipotezu. U cilju utvrđivanja potrebnog broja uzoraka koristili smo varijancu vrijednosti očekivanih mjerenja koristeći rezultate studija koje su proveli Evans i Virk:

1. Evans, C. H.; Liu, F.-J.; Glatt, V.; Hoyland, J. A.; Kirker-Head, C.; Walsh, A.; Betz, O.; Wells, J. W.; Betz, V.; Porter, R. M.; Saad, F. A.; Gerstenfeld, L. C.; Einhorn, T. A.; Harris, M. B.; Vrahas, M. S. *Use of genetically modified muscle and fat grafts to repair defects in bone and cartilage. European cells & materials 2009., 18, 96.–111.*

2. Virk, M. S.; Sugiyama, O.; Park, S. H.; Gambhir, S. S.; Adams, D. J.; Drissi, H.; Lieberman, J. R. *"Same day" ex-vivo regional gene therapy: a novel strategy to enhance bone repair. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy 2011., 19., 960.–8.*

Statistička analiza izvršena je uporabom SPSS 20.0 statističkog modela (SPSS Inc., Chicago, IL, SAD). U statističkoj analizi korištene su deskriptivne i analitičke parametrijske metode. Izračun veličine potrebnih uzoraka temeljio se na rezultatima ranijih studija. U prve tri faze istraživanja pomoću Ad.Luc vektora testirali smo optimalnu koncentraciju virusa, potrebno trajanje transdukcije te utjecaj pozitivnih iona lantana i kalcija na uspješnost iste. Sve dobivene vrijednosti su iskazane kao aritmetička sredina i standardna devijacija (M+SD).

Prije same obrade podataka, Shapiro-Wilksovim testom provjerili smo normalnost raspodjele podataka za ispitivane kvantitativne ovisne varijable. Budući da se radilo o uzorcima tkiva istih ljudi tretiranih na različite načine, a kako bismo ispitali razlike u rezultatima, usporedili smo prosječne rezultate pomoću analize varijance za ponovljena mjerenja. Nakon što smo utvrdili postojanje statički značajnih razlika, daljinom analizom pomoću *post hoc* usporedbe s Bonferonijevom korekcijom utvrdili smo koji se rezultati statistički razlikuju i na kojoj razini vjerojatnosti. Po utvrđivanju optimiziranog protokola transdukcije pristupili smo provjeri istoga s pomoću Ad.BMP2 vektora. Uzorci su podijeljeni u dvije grupe s ciljem utvrđivanja osteogenog odgovora. Jedna grupa je transducirana s Ad.BMP2 vektorom prema ranije utvrđenom protokolu, dok druga grupa nije transducirana. Sve dobivene vrijednosti su

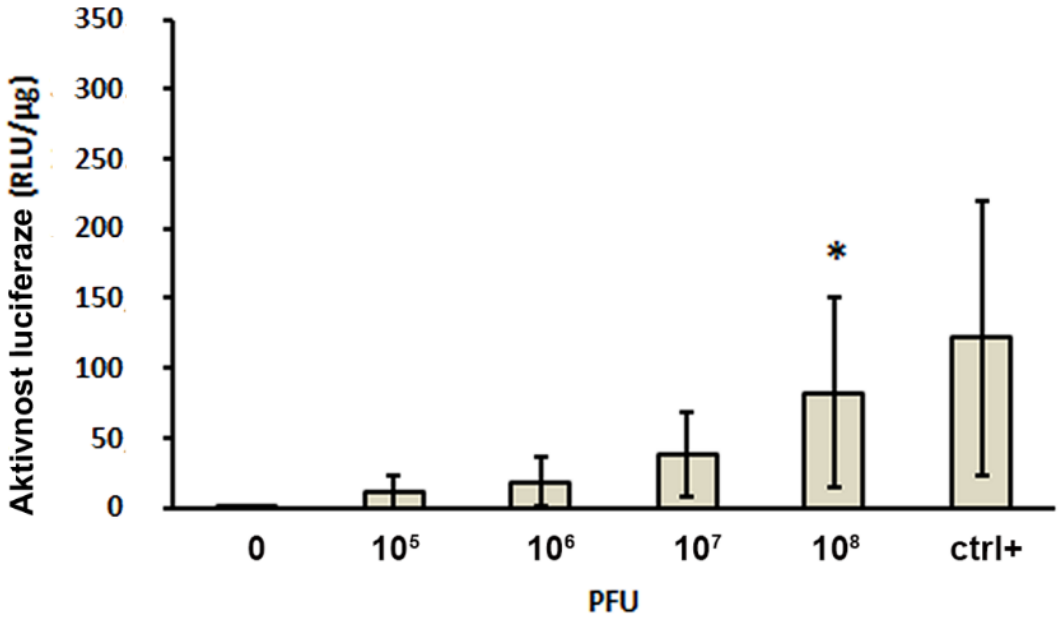
iskazane kao aritmetička sredina i standardna devijacija (M+SD). Za usporedbu aritmetičkih sredina normalno distribuiranih podataka koristili smo Studentov t-test.

Tijekom završne faze istraživanja analizirali smo moguće razlike otpuštanja BMP2 transduciranog mišića tijekom testiranog vremena te utvrđivali biljege osteogeneze. Sve dobivene vrijednosti su također iskazane kao aritmetička sredina i standardna devijacija (M+SD). Utvrdili smo normalnu distribuciju podataka te pomoću jednosmjerne analize varijance testirali značajnost razlike. Prilikom svih usporedbi razina statističke značajnosti postavljena je na $P<0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Određivanje optimalne doze Ad.Luc-a potrebne za transdukciju humanog mišićnog tkiva

Zbog infekcije pojedinačnih komadića mišića odstranili smo iz daljnjeg istraživanja dva mišićna uzorka. Iz preostalih 8 mišićnih uzoraka izolirali smo ukupne stanične proteine, izmjerili smo aktivnost luciferaze na luminometru i rezultat izrazili kao relativne jedinice luminiscencije po mikrogramu proteina (RLU/µg) u svrhu normaliziranja rezultata. Uzorci humanog mišićnog tkiva koji nisu tretirani adenovirusnim vektorom (negativna kontrola), očekivano nisu pokazali nikakvu razinu aktivnosti enzima luciferaze. Naprotiv, pozitivna kontrola, uzorci humanog mišićnog tkiva tretirani adenovirusnim vektorom koncentracije 10^8 PFU i bez ispiranja do izolacije proteina 72 h kasnije, pokazali su najvišu razinu aktivnosti luciferaze 121,97± 98,55, $P< 0,001$). Preostali uzorci tretirani različitim koncentracijama adenovirusnog vektora uz transdukciju u trajanju od 2 h, međusobno su se statistički značajno razlikovali u aktivnosti enzima luciferaze. Uzorci humanog mišićnog tkiva, tretirani adenovirusnim vektorom 10^8 PFU, pokazali su statistički značajno višu razinu aktivnosti luciferaze u odnosu na ostale uzorke (82,10 ± 68,33, $P< 0,001$) te su prihvaćeni kao optimizirani rezultat ove faze (Slika 11.).



Slika 11. Prikaz uspješnosti transdukcije humanog mišićnog tkiva u ovisnosti o titru adenovirusnog vektora Ad.luc. *p<0,001

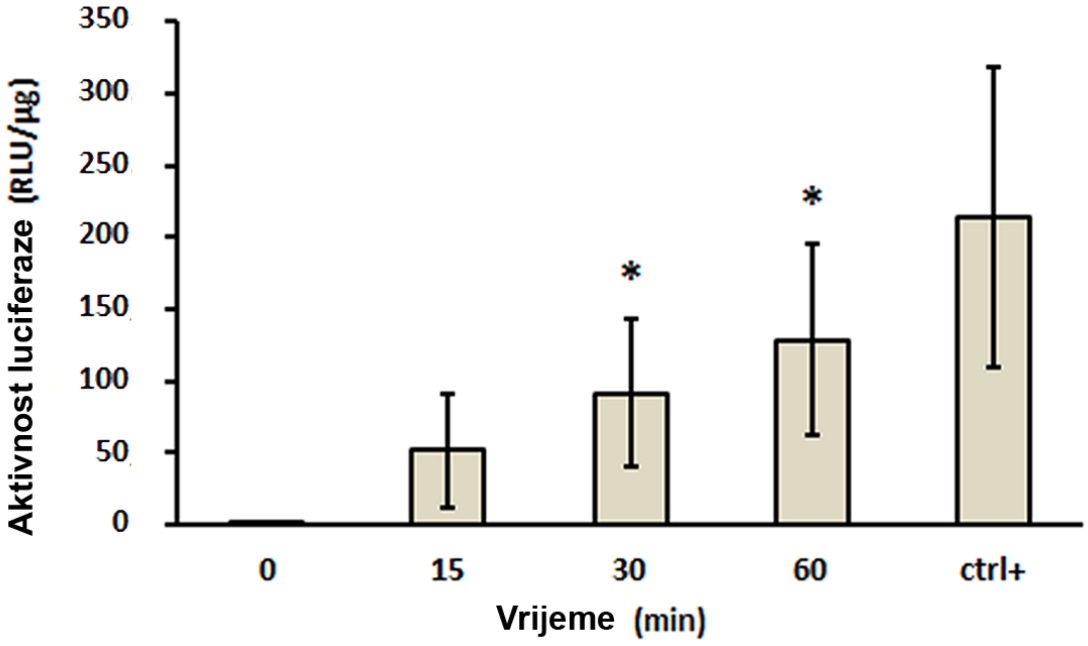
4.2. Određivanje optimalnog trajanja kontakta Ad.Luc-a i humanog mišićnog tkiva

Uzorci humanog mišićnog tkiva koji nisu tretirani adenovirusnim vektorom (negativna kontrola) očekivano nisu pokazali nikakvu razinu aktivnosti luciferaze. Naprotiv, uzorci humanog mišićnog tkiva inkubirani sve do izolacije proteina, tj. 72 h (pozitivna kontrola), pokazali su statistički značajno najvišu razinu aktivnosti luciferaze u usporedbi s ostalim uzorcima (213.3± 104.18, P< 0,001).

Uzorci humanog mišićnog tkiva, tretirani s optimalnom koncentracijom adenovirusnog vektora i inkubirani 15 min, pokazuju statistički značajno najnižu razinu aktivnosti luciferaze u odnosu na druge tretirane uzorke te u odnosu na pozitivnu kontrolu, a višu razinu aktivnosti luciferaze s obzirom na negativnu kontrolu (52.20± 39.59, P< 0,001).

Rezultati 30 minutne transdukcje uzoraka humanog mišićnog tkiva pokazuju statistički višu razinu aktivnosti luciferaze u odnosu na negativnu kontrolu te 15-minutnu inkubaciju (91.73±51.67 P< 0,001), ali se nisu statistički značajno razlikovali od rezultata 60-minutne transdukcije (128.21± 66.39, P< 0,001) (Slika 12.). S obzirom na to da je cilj istraživanja bio

što je moguće više skratiti vrijeme trajanja transdukcije, a da nije postojala statistički značajna razlika između trajanja transdukcije 30 i 60 minuta, vrijeme trajanja transdukcije od 30 minuta prihvaćeno je kao optimizirani rezultat ove faze istraživanja.

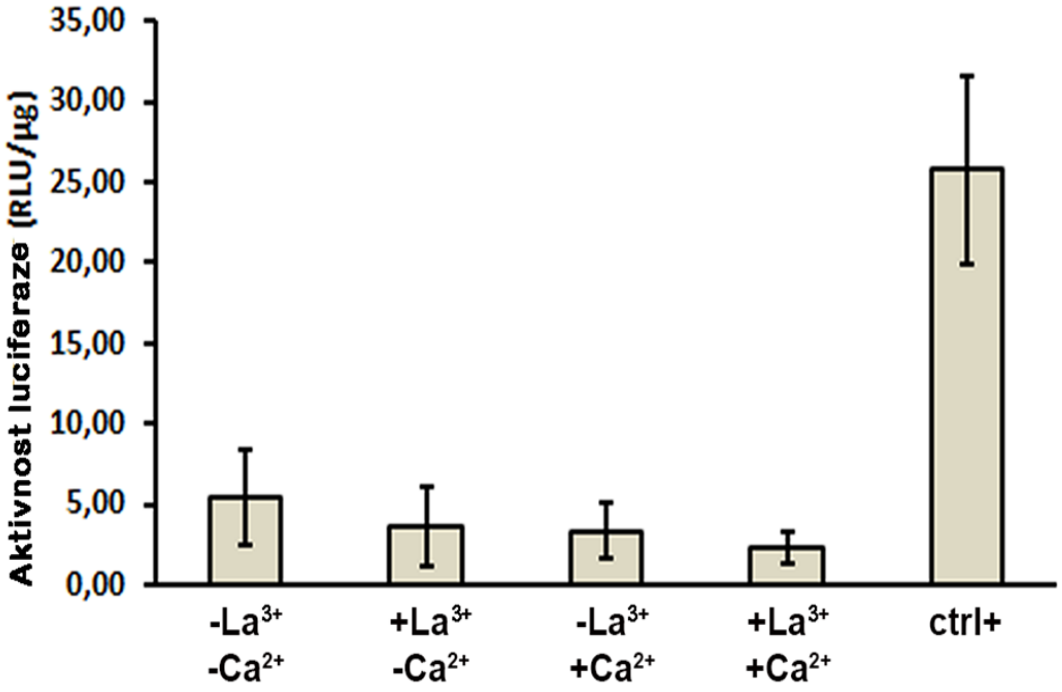


Slika 12. Uspješnost transdukcije ovisno o vremenu kontakta humanog mišićnog tkiva i adenovirusnog vektora Ad.Luc infektivnosti 10^8 PFU. *p<0,001

4.3. Utvrđivanje utjecaja pozitivnih iona lantana i kalcija na transdukciju humanog mišićnog tkiva s Ad.Luc-om

Mišićni uzorci transducirani su prema ranije optimiziranom postupku. Koristili smo adenovirusni vektor Ad.Luc infektivnosti 10^8 PFU uz trajanje transdukcije 30 min i izolaciju proteina nakon 72 sata. Tijekom testiranja koristili smo četiri različite suspenzije: 1) pročišćenu, 2) uz dodatak 0,25 M lantan klorida, 3) uz dodatak 1M kalcijeva klorida te 4) uz dodatak kombinacije 0,25 M lantan klorida i 1 M kalcijeva klorida. Uzorci mišićnog tkiva tretirani adenovirusnim vektorom infektivnosti 10^8 PFU i inkubirani bez ispiranja do izolacije proteina nakon 72 h (pozitivna kontrola), pokazali su najvišu razinu aktivnosti luciferaze u odnosu na sve ostale uzorke (25.80 SD 5.82, P< 0,001). Rezultati svih ostalih testiranih uzoraka nisu pokazali statistički značajnu razinu aktivnosti. Zaključili smo da ioni lantana i

kalcija ne pomažu u efektivnijoj transdukciji humanog mišićnog tijekom našeg optimiziranog protokola (Slika 13.).



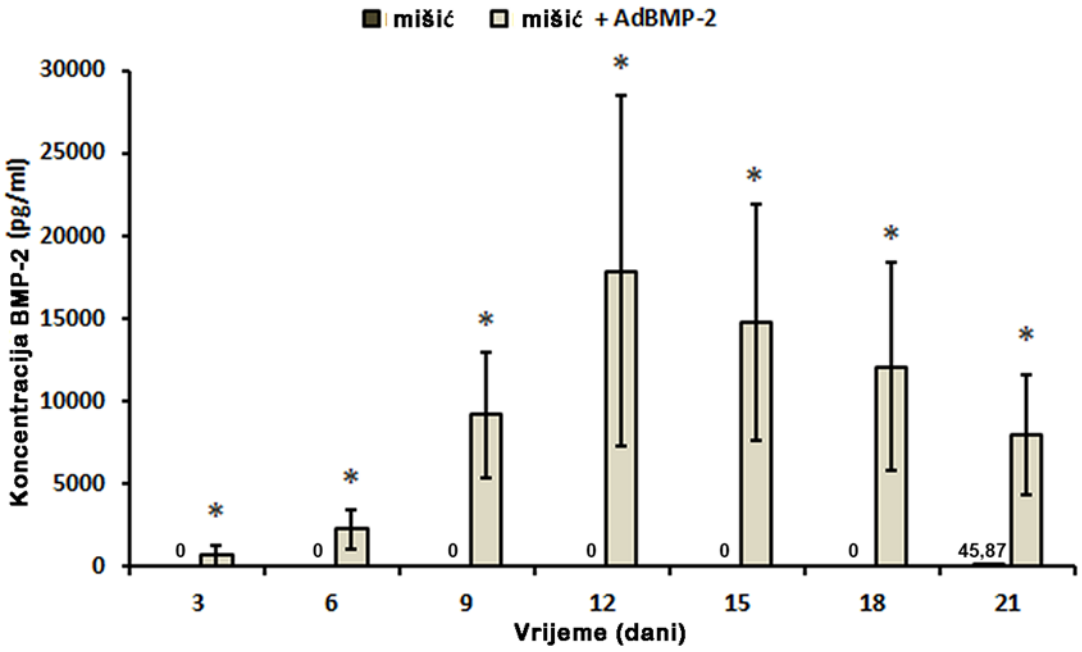
Slika 13. Prikaz uspješnosti transdukcije u ovisnosti o izloženosti kalcijevim i lantanovim ionima

4.4. Primjena optimiziranog protokola transdukcije koristeći Ad.BMP2 u svrhu poboljšanja osteodiferencijacije humanog mišićnog tkiva

4.4.1. Analiza otpuštanja BMP2 pomoću ELISA

Rezultati otpuštanja BMP2 u osteogenom mediju transduciranih mišića mjereni ELISA-om pokazuju statistički značajnu razliku ($P<0,001$) u odnosu na netransducirani mišić kroz cijeli period testiranja od 21 dan. Analizirajući razlike otpuštanja BMP2 transduciranog mišića, tijekom tog vremena nije utvrđena statistički značajna razlika. Gledajući apsolutne vrijednosti vidi se u početku nagli porast vrijednosti otpuštenog BMP-a transduciranih mišića, postizanje

najviše vrijednosti 12. dana mjerenja te nakon toga postepeno opadanje. Netransducirani mišić tijekom cijelog vremena nije otpuštao BMP2, sve do 21. dana kada je izmjereno otpuštanje niske razine BMP2 (Slika 14.).



Slika 14. Rezultati otpuštanja BMP2 u osteogenom mediju mjereni ELISA-om

Rezultati su prikazani kao središnja vrijednost ± SD (n=3). *P<0,001

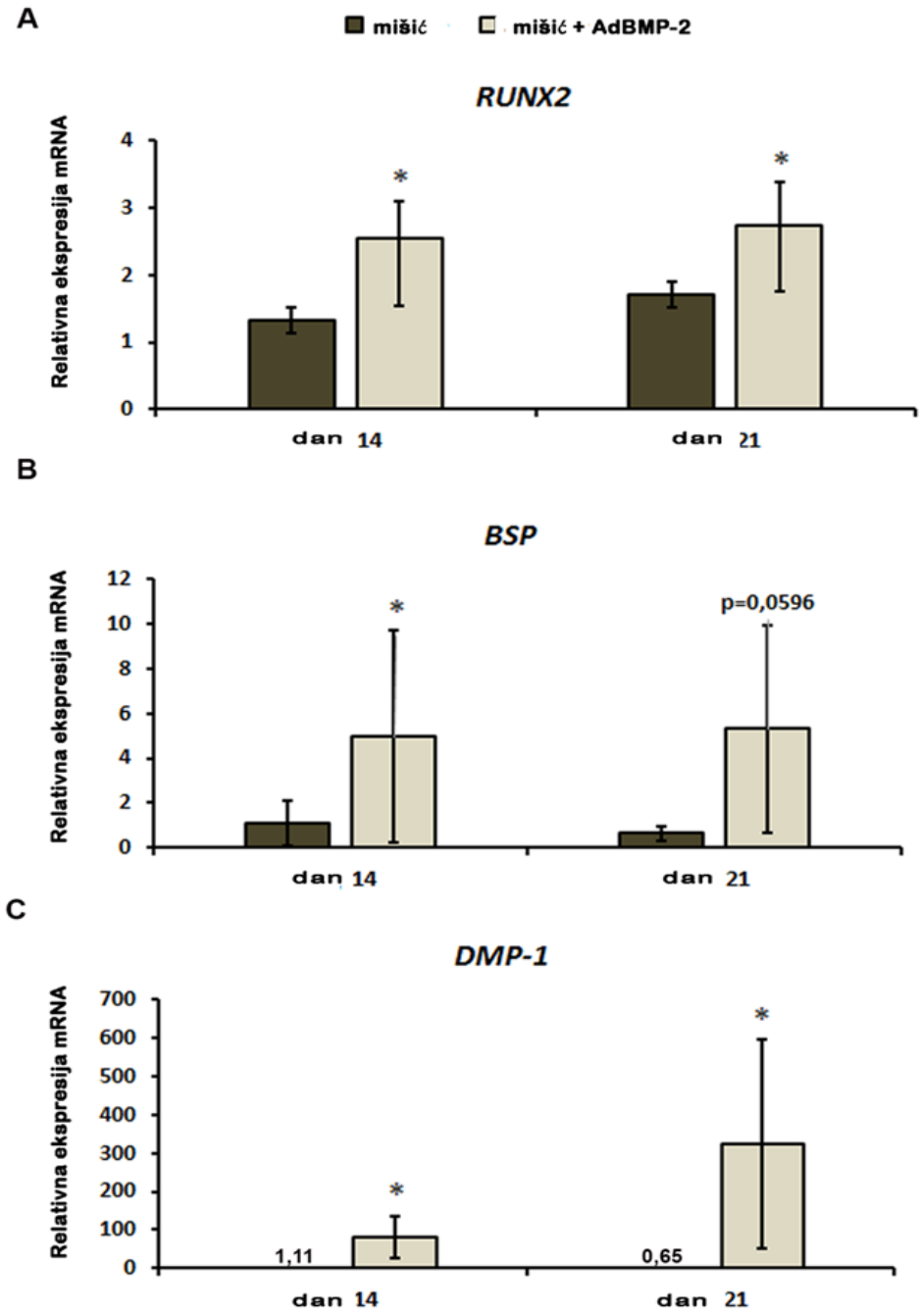
4.4.2. Analiza genske izraženosti markera osteogeneze pomoću PCR-a

Kvantitativnim PCR-om u stvarnom vremenu analizirana je genska izraženost markera osteogeneze *RUNX2*, *DMP-1* i *BSP* 14. i 21. dan.

Rezultati razine izraženosti gena za *RUNX2* transduciranog mišića pokazuju statistički značajnu razliku (p=0,045) u odnosu na netransducirani mišić u obje vremenske točke mjerenja (Slika 15.A).

Razina izražaja gena za *BSP* transduciranog mišića pokazuje statistički značajnu razliku (p=0.016) 14. dan nakon transdukcije u odnosu na mišić koji nije bio transduciran. Rezultati izraženosti gena za *BSP* 21. dana gotovo su statistički značajni (mišić 0.65±0.33 vs mišić + Ad BMP2 5.31± 4.62, p= 0.0596) (Sika 15.B).

Uzorci transducirani adenovirusnim vektorom Ad.BMP2 prema ranije optimiziranom protokolu transdukcije pokazuju nekoliko puta više rezultate izraženosti gena *DMP-1* u odnosu na netransducirane uzorke. Rezultati su statistički značajni 14. i 21. dan mjerenja (P<0,001) (Slika 15.C).



Slika 15. Analiza genske izraženosti markera osteogeneze pomoću PCR-a

Rezultati su prikazani kao središnja vrijednost ± SD (n=3). *P<0,001

A) Rezultati razine izraženosti gena za *RUNX2*

Rezultati su prikazani kao središnja vrijednost± SD (n=5). (*P=0,045) transducirani mišić prema optimiziranom protokolu u odnosu na netransducirani mišić.

B) Rezultati razine izraženosti gena za *BSP*

Rezultati su prikazani kao središnja vrijednost ± SD (n=5). (*P=0.016) transducirani mišić prema optimiziranom protokolu u odnosu na netransducirani mišić.

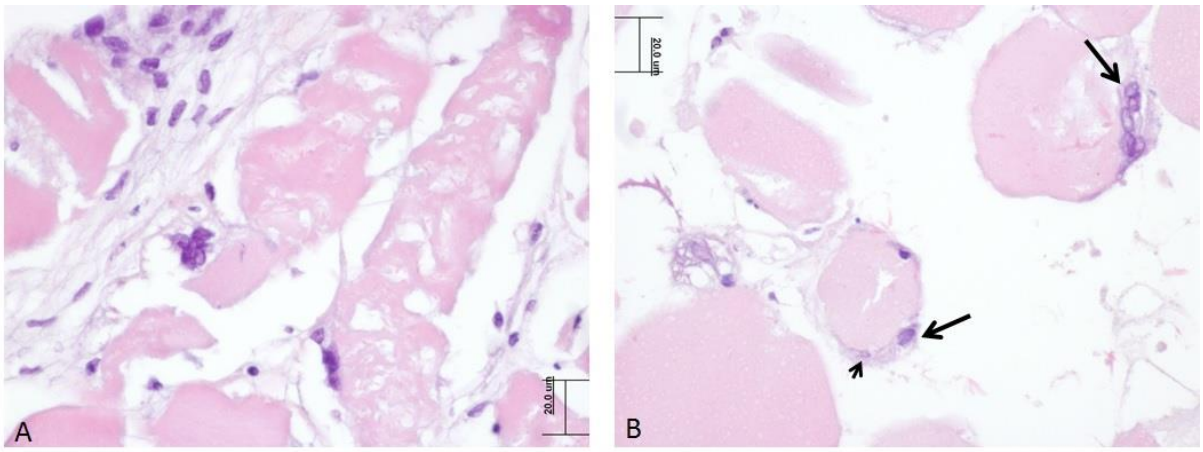
C) Rezultati razine izraženosti gena za *DMP-1*

Rezultati su prikazani kao središnja vrijednost ± SD (n=5). (*P<0,001) transducirani mišić prema optimiziranom protokolu u odnosu na netransducirani mišić.

4.4.3. Histološko bojenje mišićnih uzoraka hematoksilin-eozinom

Nakon 21-og dana kultivacije u osteogenom mediju, netransducirano mišićno tkivo i mišićno tkivo transducirano prema optimiziranom protokolu obojeno je na hematoksilin-eozinu. Na histološkim preparatima obojanim hematoksilin-eozinom vide se mišićna vlakna na poprečnim i uzdužnim presjecima u obje skupine. Uočena je diskretna razlika u građi jezgara smještenih uz sam rub mišićnih vlakana te u endomiziju. U skupini netransduciranih mišića, na poprečnim presjecima, jezgre stanica smještene uz rub mišićnih vlakana okruglaste su, bazofilne i s izraženim heterokromatinom. U skupini transduciranih mišića uz sam rub mišićnih vlakana primijećene su stanice nešto većih, okruglijih jezgara (na poprečnom presjeku). Ove jezgre su manje bazofilne, prozračnijeg izgleda, što ukazuje na prisustvo veće količine eukromatina (slika 16.).

.

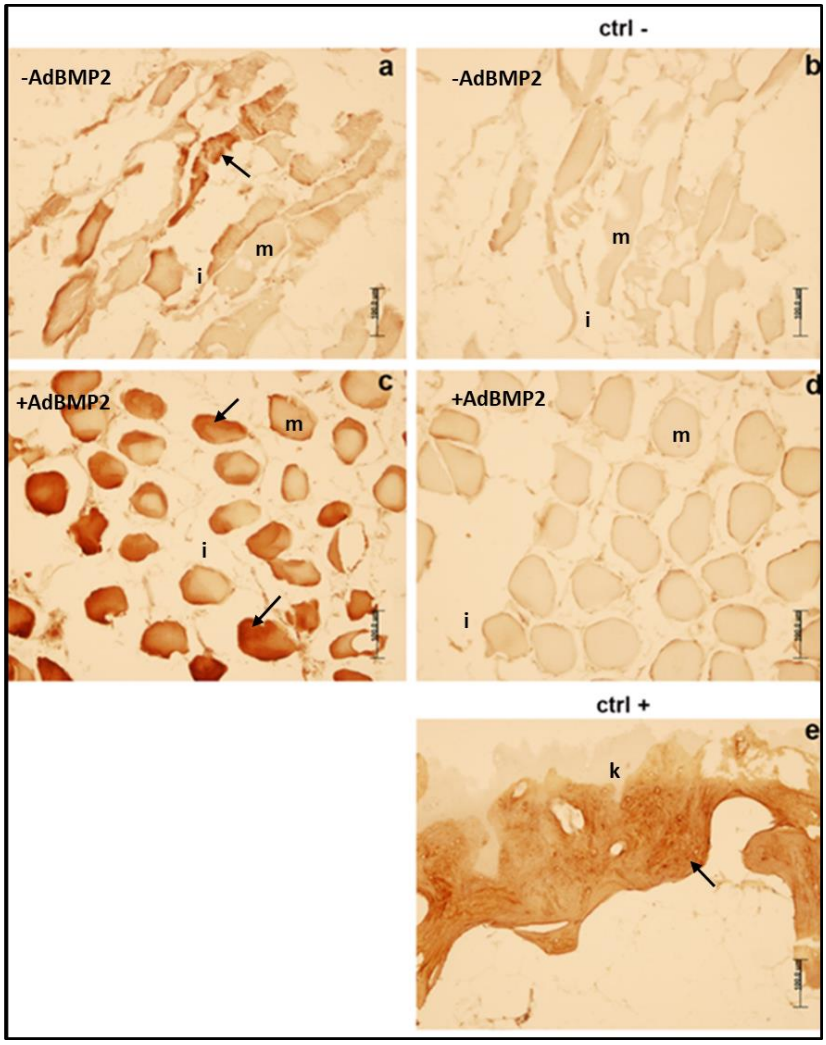


Slika 16. Histološko bojenje mišićnih uzoraka hematoksilin-eozinom

Strelice označavaju stanice nešto većih, okruglijih jezgara (na poprečnom presjeku). Ove jezgre su manje bazofilne, prozračnijeg izgleda, što ukazuje na prisustvo veće količine eukromatina.

4.4.4. Utvrđivanje prisustva COL-I u transduciranim mišićima imunihistokemijskim bojenjem

Nakon 21-og dana kultivacije u osteogenom mediju, netransducirano mišićno tkivo i mišićno tkivo transducirano prema optimiziranom protokolu je imunohistokemijski obojeno na kolagen tip I (COL-I). Kao negativna kontrola, korišteno je isto mišićno tkivo, ali bez dodatka protutijela za COL-I tijekom bojenja. Pozitivnu kontrolu predstavljali su uzorci ljudske kosti imunohistokemijski obojeni na COL-I. Skupina netransduciranog mišića pokazala je slab izražaj imunohistokemijskog bojanja na COL-I. Negativna kontrola nije pokazala izražaj imunohistokemijskog bojanja na COL-I. Skupina mišića transducirana s Ad.BMP 2 virusnim vektorom prema optimiziranom protokolu i imunohistokemijski obojena na kolagen tip I, pokazala je jak izražaj istoga. Pozitivna kontrola pokazala je jak izražaj kolagena tip I (Slika 17.).



Slika 17. Imunohistokemijsko bojanje na kolagen tip I (COL I)

Imunohistokemijsko obojen kolagen tip I prikazan je smeđom bojom.

– AdBMP2 je netransducirano ljudsko mišićno tkivo imunohistokemijski obojeno na COL-I.

+AdBMP2 je mišićno tkivo transducirano prema optimiziranom protokolu imunohistokemijski obojeno na COL-I .

CTRL – je negativno kontrolno bojenje.

CTRL + je imunohistokemijski na COL-I obojeno ljudsko koštano tkivo.

Strelice označavaju pojačan izažaj COL-1, m- označava mišić, i- označava intersticij, a k- označava kost.

5. RASPRAVA

Operacijska rekonstrukcija ACL-a veoma je čest zahvat. Danas prevladavaju dvije mikroinvazivne, artroskopske operacijske metode i kod obje se kao presadak koristi tkivo samog pacijenta (tzv. autologno tkivo) u svrhu rekonstrukcije ligamenta. Najčešće se kao presadak koriste tetive mišića gracilisa i semitendinosusa. Nakon uvođenja presatka u koštane tunele očekujemo da presadak zacijeli u umjetno stvorenim koštanim tunelima procesom nalik na intramembranozno cijeljenje, tzv. koštano-tetivnim cijeljenje (17,18). Nažalost, proces koštano-tetivnog cijeljenja često biva usporen i nepotpun te završava djelomičnim rastapanjem okolne kosti uz proširenje koštanih tunela. Učestalost i mogući problemi koji nastaju ponovnim puknućem, odnosno ponovnom potrebom za rekonstrukcijom ACL-a uz dosadašnje više ili manje uspješne pokušaje sprječavanja, razlog su započinjanja ovog istraživanja.

Regenerativna medicina traži načine do podrži, potakne i poboljša prirođenu sposobnost regeneracije i reparacije našeg tijela. Ideja da se oštećeno tkivo koštano-mišićnog sustava može obnoviti prirodnim procesom cijeljenja umjesto kirurškim zahvatima, potaknula je implementaciju različitih strategija regenerativne medicine i tkivnog inženjeringa u ortopediju (40, 191). Ključ uspjeha leži u interakciji stanica, bioloških signala i okruženja u kojem se proces odvija. Esencijalne komponente potrebne za regeneraciju kosti su osteogene stanice, osteoinduktivni čimbenici rasta te osteokonduktivna struktura u području u kojem se to događa (192, 193). Do sada su korištene različite strategije s ciljem poboljšanja koštano-tetivnog cijeljenja slijedeći ranije navedeni princip uključujući i gensku terapiju.

Prva esencijalna komponenta potrebna za regeneraciju kosti, a u ovom slučaju sprječavanja proširenja koštanih tunela nakon rekonstrukcije ACL-a, su osteogene stanice. Tijekom rekonstrukcije ACL-a, a prilikom obrade tetiva za presadak, na mišićnom kraju uvijek zaostaje dio mišićnog tkiva, koji se u standardnoj pripremi presatka odstranjuje i baca. U skladu s principima regenerativne medicine, mišićni kraj presatka, kao izvor progenitornih stanica, mogao bi se sačuvati i iskoristiti za poticanje cijeljenja tkiva. Na važnost čuvanja mišićnog tkiva, vezanog uz tetive tijekom rekonstrukcije ACL-a, ukazala su i dosadašnja istraživanja (58).

Druga esencijalna komponenta potrebna za regeneraciju kosti je nosač, odnosno osteokonduktivna struktura, koja osteogene stanice „drži“ na potrebnom mjestu. U ovom

slučaju radi se o idealnom već postojećem rješenju, tj. tetivama m gracilisa i semitendinosusa na kojim se mišićno tkivo već i onako nalazi, što rješava probleme izrade nosača.

Treća esencijalna komponenta su osteoinduktivni čimbenici rasta. Poboljšanjem razumijevanja regeneracije kosti otkrivene su različite molekule koje na molekularnoj razini reguliraju proces osteogeneze (194). Među njima najintenzivnije istraživane molekule su BMP (195). Trenutno je u potvrđenoj kliničkoj primjeni samo molekula BMP2 (196). Pitanje koje se ovdje postavilo je na koji način dostaviti BMP2 dovoljno dugo i u dovoljnoj količini u područje koštanih tunela tijekom koštano-tetivnog cijeljenja nakon rekonstrukcije ACL-a. Kao rješenje tog problema nametnula se genska terapija koja predstavlja dobru metodu dostave molekula BMP2 na željeno mjesto. Postoje različite tehnike genske terapije te različiti nosači. Proces koštano-tetivnog cijeljenja unutar koštanog tunela traje nekoliko tjedana i u tom slučaju nema potrebe za trajnom izraženosti bioloških čimbenika poput BMP2. Zbog toga nam je bila potrebna metoda genske terapije koja je uspješna, ali čije je djelovanje vremenski ograničeno te lokalizirano na područje samog koštanog tunela. *Ex vivo* genski aktivirano mišićno tkivo adenovirusnim vektorom BMP2 dokazano cijeli značajne osteohrskavične defekte (172) te smo to odlučili iskoristiti u ovom istraživanju. Adenovirusni vektori imaju nekoliko prednosti: mogu se proizvesti u visokom titru, visoko su infektivni, sposobni su inficirati stanice u fazi mirovanja i dijeljenja te je njihova genska izraženost prolazna zahvaljujući episomalnom spajanju (197). Iako uspješna, takva genska terapija, tj. dosadašnji proces transdukcije mišićnog tkiva pomoću AdBMP2 traje predugo da bi bila primjenjiva tijekom operacijskog zahvata poput rekonstrukcije prednje ukrižene sveze. Cilj ovog istraživanja bila je moguća primjena u kliničkoj praksi te je optimiziranje, tj. ubrzavanje postojeće metode, postalo imperativ.

Kad tražimo optimalnu dozu adenovirusnog vektora, ustvari tražimo infektivnost pri kojoj adenovirusni vektor dovodi do najbolje genske ekspresije uz najmanju moguću citotoksičnost. Tijekom istraživanja optimalnog protokola transdukcije, uzorci humanog mišićnog tkiva tretirani su različitim dozama adenovirusnih vektora (od 10^5 do 10^8 PFU), a najveća doza od 10^8 PFU, ujedno se pokazala i kao najuspješnija. Ranija istraživanja pokazala su također tendenciju poboljšanja genske ekspresije povišenjem infektivnosti adenoviralnih vektora prilikom upotrebe genetski modificiranih mišića u svrhu popravka koštanih defekata (172), ali i smanjenje gense ekspresije moždanog tkiva štakora tijekom korištenja adenovirusnih vektora infektivnosti iznad 10^8 PFU (198). Nažalost, tijekom ovog

istraživanja nismo uspjeli postići infektivnost adenovirusnog vektora iznad 10^8 PFU te potvrditi ili odbaciti mogući citotoksični učinak pri višim infektivnostima.

Kao što je ranije napomenuto, primarni cilj istraživanja bio je pokušaj skraćivanja potrebnog vremena za uspješnu transdukciju mišićnog tkiva pomoću AdBMP2. Uzorci humanog mišićnog tkiva inkubirani 72 h pokazali su statistički značajno najvišu razinu aktivnosti, međutim, takav protokol nije prihvatljiv u svrhu izvođenja olakšane ili ubrzane *ex-vivo* genske terapije unutar vremenskog perioda manjeg od 2 h. Uspoređujući rezultate transdukcije kraćih vremena prihvatili smo kao optimizirano vrijeme trajanja 30 min. Rezultati tog vremena nisu se statistički razlikovali od dužeg vremena transdukcije (60 min), a bili su statistički značajniji od kraćeg vremena (15 min). Ovdje je važno napomenuti da, iako smo prihvatili 30 minuta kao optimalno vrijeme transdukcije, i kraće je vrijeme, tj. 15 minuta, pokazalo sposobnost uspješne transdukcije te bi to mogao biti smjer daljnjih istraživanja.

Ranijim istraživanjima provjerene su različite strategije poboljšanja efikasnosti transdukcije adenovirusnim vektorima poput: sprječavanja elektrostatskog odbijanja između negativnih iona površina stanice i adenovirusa (199-201), razvoj novih serotipova adenovirusa (202) te promjena proteina ovojnice virusa u svrhu poboljšanja tkivne specifičnosti, kao i vezanja na površinu stanice (203). Zahvaljujući sposobnosti povezivanja, poput mosta, između negativnih naboja površine stanice i adenirusnih vektora, pozitivni ioni lantana (La^{3+}) povećavaju postotak transduciranih stanica, kao i transgenu izraženost po stanici (201). Iako La^{3+} povećava učinkovitost transdukcije uz različite doze virusa, rezultati su značajno bolji pri nižim dozama (201). U cilju daljnjeg poboljšanja transdukcije, a po uspostavljanu optimizirane doze adenovirusnog vektora i trajanja transdukcije, tijekom prve dvije faze istraživanja, odlučili smo u trećoj fazi provjeriti učinak pozitivnih iona La3+ i Ca2+ na efikasnost transdukcije. Rezultati našeg istraživanja nisu pokazali poboljšanje transdukcije humanog mišićnog tkiva adenovirusnim vektorom uz dodatak pozitivnih ioni lantana i/ili kalcija. Rezultat toga najvjerojatnije je korištenje visoke doze adenovirusnog vektora 10^8 PFU tijekom istraživanja, što je onemogućilo utjecaj pozitivnih iona na transdukciju, a što odgovara i rezultatima dosadašnjih istraživanja.

Po završetku optimiziranja protokola transdukcije provjerili smo korištenje istoga uz Ad.BMP2. Analizirali smo: 1.otpuštanje BMP2 pomoću ELISA-e (komercijalni, validirani test koji koristi specifična monoklonska antitijela za BMP2), 2. gensku izraženost markera

osteogeneze pomoću PCR-a, 3. histološke promjene transduciranog tkiva bojenjem hematoksilin-eozinom te 4. prisutnost kolagena tip I imunohistokemijskim bojanjem.

Glavni cilj mjerenja otpuštanja BMP2 u osteogeni medij bio je dokazati postojanje kontinuiranog otpuštanja, što omogućuje utjecaj na lokalne stanice i indukciju osteogeneze. Rezultati otpuštanja BMP2 u osteogenom mediju transduciranih mišića potvrdili su statistički značajnu razliku otpuštanja BMP2 u odnosu na netransducirani mišić kroz cijeli period testiranja od 21 dan. Za mjerenja u trajanju od 21 dan odlučili smo se jer klasičan protokol indukcije osteogeneze traje 21 dan, uz izmjenu staničnog medija svaka 3 dana, što je neophodno za dostatnu ishranu stanica. Medij za stanice koji smo koristili sadrži puferske sustave koji su osiguravali konstantni pH i upravo je izmjena medija svaka 3 dana dodatno osiguravala svježinu i konstantnost pH u mediju, a količina izlučenog BMP2 je kalkulirana u odnosu na razrjeđenje. Kontinuitet otpuštanja u periodu od 21 dan dovoljan je za proliferaciju progenitora prema osteogenoj liniji stanica. Izlučeni BMP2 djeluje kao ligand koji se veže na receptore na membranama stanica i na taj način aktivira signalne putove koji vode u osteogenu diferencijaciju. Na specifičnost cijeljenja tetivnog presatka LCA unutar koštanog tunela ukazuje podatak da je mehanička čvrstoća presatka unutar koštanog tunela najslabija između 6. tjedna nakon operacije (204). Trajanje bioloških signala za poticanje osteogeneze potrebno je upravo u tom periodu. U daljnjem istraživanju bilo bi zanimljivo pratiti ukupno trajanje transgene episomalne izraženosti, utvrditi vrijeme opadanja količine otpuštenog BMP2 te koliko je dugo i u kojoj količini potrebno lučenja BMP2 za uspješno koštano-tetivno cijeljenje nakon rekonstrukcije LCA. Ranije istraživanje na imunosuprimiranim *Fischer* štakorima utvrdilo je brzo i pouzdano cijeljenje koštanih defekata korištenjem autolognog mišićnog tkiva transduciranog pomoću Ad.BMP2, iako je produkcija BMP2 bila samo u nanogramima i trajala je 1 do 3 tjedna (205). Tijekom statističke obrade rezultata primijećene su velike standardne devijacije u uzorcima od 12 dana na dalje, što je i očekivano jer je, iako se radi o jednakoj masi uzorka, teško postići da je jednaka površina izložena virusima te se sigurno razlikuju i u statusu receptora za adenoviruse. Primjena negativne kontrolne skupine, tj. netransduciranih mišićnih stanica, predstavljala je kontrolu ekspresije endogenog BMP2, kao i kontrolu nespecifičnosti antitijela, tj. križne reakcije drugim BMP molekulama.

Kvantitativnim PCR-om u stvarnom vremenu, 14. i 21. dan, analizirana je genska izraženost markera osteogeneze (*RUNX2*, *DMP-1* i *BSP*). *RUNX2* je korišten kao rani marker osteogeneze, tj. marker osteoprogenitoprnih stanica, *BSP* kao marker osteoblasta, a *DMP1* kao kasni marker, tj. marker osteocita.

RUNX2 je važan regulator osteogenog razvoja (206), igra esencijalnu ulogu u diferencijaciji osteoblasta (207,208) te inducira izraženost osteogenih gena tijekom maturacije osteoblasta (209). Detektira se prvi puta na razini preosteoblasta, izraženost mu se povećava u nezrelih osteoblasta, a smanjuje u zrelih osteoblasta. Prvi je transkripcijski faktor potreban za utvrđivanje prisustva osteoblasta (210). Tijekom našeg istraživanja, osteoprogenitorni marker *RUNX2* pokazao je gensku izraženost i kod netretiranih i kod tretiranih mišića. Genska izraženost *RUNX2* tretiranih mišića pokazala je statistički značajno pojačanu izraženost u odnosu na netretirane mišiće u oba vremena mjerenja. Uspoređujući međusobno promjenu intenziteta genske izraženosti *RUNX2* tretiranih mišića, 14. i 21. dan nije primijećena razlika u izraženosti. Razlog takvoga rezultata mogao bi biti dugotrajni utjecaj BMP2 na ostoprognitorne stanice te njihovo usmjeravanje prema nezrelim osteoblastima kroz ta tri tjedna. Ranije istraživanje na genetski transduciranom mišićnom tkivu štakora pomoću Ad.BMP2 pokazalo je također značajnu izraženost *RUNX2* tijekom 20 dana (172).

BSP je nekolageni glukoprotein obilno izražen u mineraliziranom tkivu. Učestalo se koristi kao biljeg diferencijacije osteoblasta (211). Tijekom našeg istraživanja genska izraženost markera osteoblasta *BSP* dokazana je i u transduciranih i netransduciranih mišića kroz cijeli period praćenja. Razina izraženosti *BSP* transduciranih mišića 14. dan bila je statistički značajno povećana u odnosu na netransducirane mišiće. Iako nije pokazano statistički značajno povišenje izraženosti 21. dan u odnosu na netransducirane mišiće, rezultati genske izraženosti transduciranih mišića su bili gotovo statistički značajni ($p < 0,0596$). Povećanje izraženosti *BSP* transduciranih mišića pokazatelj je maturacije osteoblasta te usmjeravanja mišićnog tkiva prema stvaranju koštanog tkiva.

DMP-1 je kiseli fosfoprotein prisutan u izvanstaničnoj osnovnoj tvari. Član je SIBILING glikoproteinske obitelji (eng., *small integrin binding ligand N-linked glycoprotein family*). Ključan je u mineralizaciji kosti i dentina te je prisutan u koštanim i dentinskim stanicama koje se dijele (211, 212, 58). Svi testirani uzorci pokazali su gensku izraženost markera osteocita *DMP-1*. Transducirani uzorci pokazali su višestruko jaču izraženost gena *DMP-1* u odnosu na netransducirane uzorke. Uspoređujući razinu genske izraženosti *DMP-1*

transduciranih mišića vidljivo je značajno povišenje 21. u odnosu na 14. dan (četverostruko povišenje). Rezultat ukazuje da je period od 3 tjedna dovoljan za uspješan prijelaz od osteoprogenitora do faze osteocita, nakon optimalnog protokola transdukcije humanog mišićnog tkiva tretiranog rekombiniranim adenoviralnim vektorom BMP2.

Tijekom ovog istraživanja, svi uzorci ljudskog mišićnog tkiva su se nalazili u osteogenom diferencijacijskom mediju i pokazali su baznu izraženost markera osteogeneze. Takav rezultat potvrđuje ranija istraživanja gdje je pomoću izraženosti ranih i kasnih markera osteogeneze utvrđen osteogeni diferencijacijski potencijal svježeg ljudskog mišićnog tkiva nakon *in vitro* kultivacije sa standardnim osteogenim diferencijskim medijem (213).

Nakon 21-og dana kultivacije u osteogenom mediju, tkivo je histološki obojeno te imunohistokemijski obojeno na COL-I. Prikazana razlika u građi stanica na histološkim preparatima obojenim hematoksilin-eozinom, ukazuje na veću transkripcijsku aktivnost transduciranih stanica, a što potvrđuje rezultate kvantitativnog PCR-a i ELISA. Imunohistokemijsko bojanje na kolagen I pokazalo je značajan izražaj tog proteina u transduciranoj skupini. Iako je kolagen I nespecifična bjelančevina, njegov povećani izražaj u mišićnom tkivu nakon transdukcije s AdBMP-2, ukazuje da se u tkivu događaju promjene u smjeru stvaranja vezivnog tkiva. Kako bismo potvrdili opsežnost i značajnost tih promjena, potrebna su dodatna imunohistokemijska bojanja, kao i daljnja istraživanja.

Očekivano, netransducirani mišići pokazali su izražaj kolagena tip I uslijed bazalne osteodiferencijacije mišićnog tkiva u osteogenom mediju, no njegov izričaj je značajno jači u transduciranih mišićima, što je u korelaciji s pojačanom izraženosti osteogenih markera u tim tkivima.

Ograničenja ove predkliničke studije, koja služi kao dokaz izvedivosti (engl. *proof of concept*), možemo podijeliti na: 1. ograničenja vezana uz samo istraživanje te 2. ograničenja vezana uz moguću kliničku primjenu dobivenih rezultata istraživanja.

Gledajući ograničenja vezana uz samo istraživanje potrebno je izdvojiti: 1. statističku snagu testova te 2. izvođenje studije u kontroliranim laboratorijskim uvjetima.

Tijekom istraživanja korištena je značajna količina adenovirusnih vektora velike koncentracije, što je ograničilo broj uzoraka po skupinama faza istraživanja. Manji broj uzoraka umanjio je snagu statističkih testova, a time i statističku značajnost nekih dobivenih rezultata. Dosadašnja istraživanja prvenstveno su bila povezana uz uspješnost prijenosa

genske informacije adenovirusnim vektorima, a ne na vremensko ubrzanje, tj. optimizaciju metode u kliničke svrhe. Iz tog razloga, cilj ovog „dokaza izvedivosti“ bio je dokazati valjanost koncepta te utvrditi koja metoda ima najveći potencijal za buduća istraživanja. U cilju utvrđivanja potrebnog broja uzoraka, koristili smo varijancu vrijednosti očekivanih mjerenja ranijih istraživanja (172, 173). Međutim, kao što je napomenuto, niti jedno od nama znanih istraživanja, nije istraživalo optimizaciju te metode. Zbog toga je potrebno, koristeći dobivene rezultate, u daljnjem biološkim i kliničkim istraživanjima povećati statističku snagu testova.

Studija je izvedena *in vitro,* tj. u kontroliranim laboratorijskim uvjetima bez uzimanja u obzir utjecaja interakcije unutar živog organizma, kao i mehaničkih sila u području koštano-tetivnog cijeljenja. Različiti su i nedovoljno razjašnjeni mehanizmi koji dovode do problema koštano-tetivnog cijeljenja, tj. proširenja tunela. Možemo ih podijeliti na mehaničke i biološke. Mogući mehanički uzroci proširenja tunela su: 1) manji pomaci između presatka i tunela tijekom cijeljenja, 2) nepravilan prijenos opterećenja na presadak, 3) loše učvršćivanje presatka, 4) nepravilan položaj tunela i 5) pretjerano agresivna rehabilitacija. Kao biološki uzroci navode se: 1) citokinima posredovana nespecifična upalna reakcija, 2) imunološki odgovor na strano tijelo i 3) smrt stanica prouzročena povišenjem temperature zbog bušenja kosti ili toksičnih produkata (etilen, oksid, metal, itd.). Tijekom ovog *in vitro* istraživanja nije bilo moguće simulirati mehaničke i biološke uzroke koji dovode do problema koštano-tetivnog cijeljenja te je rezultat primjene metode potrebno provjeriti daljnjim biološkim i kliničkim istraživanjima.

Ograničenja vezana uz moguću kliničku primjenu dobivenih rezultata istraživanja mogu se podijeliti na tehničke probleme primjene te probleme vezane uz primjenu genske terapije, odnosno adenovirusnih vektora. Kao jedan od tehničkih problema ističe se potreba za razvojem tehnologije koja bi omogućila transdukciju mišićnog tkiva vezanog uz sam presadak unutar operacijske sale. Tijekom istraživanja, korišteni su uzorci mišićnog tkiva veličine 50 μg. To ne odgovara površini, volumenu, kao ni količini mišićnog tkiva koja zaostaje na mišićnom kraju tetivnih presadaka tijekom rekonstrukcije prednje ukrižene sveze. Površina, volumen i količina mišićnog tkiva koja zaostaje na presadcima, značajno nadilazi testirane uzorke te to moglo utjecati na penetraciju adenovirusnih vektora u dublje slojeve tkiva. Zbog toga ostaje pitanje količine AdBMP2 koncentracije 10^8 PFU potrebne za poticanje željene osteogene diferencijacije, tj. poboljšanja koštano-tetivnog cijeljenja nakon

rekonstrukcije prednje ukrižene sveze, kao i mehanizma provođenja transdukcje u tijeku rekonstrukcije prednje ukrižene sveze.

Na gensku terapiju se gleda kao na nesigurnu i riskantnu. Glavni su razlozi potencijalna imunogeničnost i citotoksičnost adenovirusnih vektora. Problem takve percepcije genske terapije povezan je uz smrt Jesseja Gelsingera 17. rujna 1999. godine. Gelsinger je bolovao od genetske spolno vezane bolesti jetre uzrokovane djelomičnom deficijencijom ornitin transkarbamilaze (OTC). Bolest je obično smrtonosna već kod rođenja, ali zbog tek djelomične deficijencije, Galsinger je živio uz lijekove i specifičnu dijetu. Dobrovoljno je pristupio kliničkom istraživanju te je tijekom istraživanja dobio infuziju genski promijenjenih virusa koji su nosili gen za ornitin transkarbamilazu. Nažalost, preminuo je nekoliko dana kasnije uslijed snažne imune reakcije na sam virus. Radilo se o direktnoj, tj. unutarnjoj *in vivo* primjeni adenovirusnog vektora prve generacije u visokoj dozi. Tijekom našeg istraživanja, koristili smo vanjsku, tj. *ex vivo* gensku terapiju prilikom koje se transdukcija stanica izvodi izvan tijela. Međutim, iako *ex vivo* genska terapija značajno smanjuje rizik vezan uz imunološku reakcija, on i dalje postoji. Razlog tome je velik broj infekcija povezanih uz adenoviruse te moguće prethodno egzistiranje imunološkog odgovora na adenoviruse. Iz tog razloga, razvijene su nove generacije adenovirusnih vektora. Adenovirusni vektori treće generacije, tzv. visokokapacitetni, odnosno *"gutless"* vektori koji ne sadrže virusne proteine, mogli bi biti izvrstan izbor tijekom daljnjih istraživanja.

Rezultat ove pretkliničke translacijske studije ukazuje na mogućnost uspješne, unutar 30 minuta, *in vitro* transdukcije humanog mišićnog tkiva te njegovo usmjeravanje prema osteogenoj diferencijaciji uporabom adenoviralnog vektora koji nosi gen za kodiranje BMP2.

Ubrzavanje cijelog procesa približava se kliničkoj primjeni istoga, u svrhu poboljšanja intraosealnog koštano-tetivnog cijeljenja nakon rekonstrukcije prednje ukrižne sveze.

Protokol transdukcije u trajanju od 30 minuta potrebno je provjeriti daljnjim istraživanjima u živom organizmu te ga na taj način približiti kliničkoj praksi.

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je 30 minuta dovoljno za *in vitro* transdukciju humanog mišićnog tkiva adenovirusnim vektorom koji nosi gen za kodiranje BMP2.

2. Rezultati otpuštanja BMP2 u osteogenom mediju transduciranih mišića potvrdili su kontinuirano otpuštanja BMP2 kroz cijeli period testiranja od 21 dan.

3. Genska izraženost markera osteogene *RUNX2, BSP* i *DMP-1* tretiranih mišića pokazala je statistički značajno pojačanu izraženost u odnosu na netretirane mišiće.

4. Najbolji rezultati transdukcije postignuti su uz dozu adenovirusnog vektora od 10^8 PFU.

5. Dodatak pozitivnih ioni lantana i/ili kalcija nije poboljšao transdukcije humanog mišićnog tkiva adenovirusnim vektorom uz dozu 10^8 PFU

6. Iako su potrebna još brojna istraživanja te zajednička suradnja znanstvenika i kliničara, našim istraživanjem je tzv. ubrzana *ex vivo* genska terapija približena kliničkoj primjeni za još jedan korak.

7. SAŽETAK

Uvod: Problem koštano-tetivnog cijeljenja nakon rekonstrukcije prednje ukrižene sveze učestao je i klinički značajan. Različite strategije, uključujuću gensku terapiju, korištene su u svrhu poboljšanja koštano-tetivnog cijeljenja. Ubrzana *ex vivo* genska terapija, iako uspješna, još uvijek prelazi prihvatljivo vrijeme u svrhu korištenja takve, tijekom rekonstrukcije prednje ukrižene sveze.

Cilj: Cilj ovog istraživanja bio je ubrzati, tj. optimizirati *in vitro* transdukciju humanog mišićnog tkiva adenovirusnim vektorom koji nosi gen za kodiranje koštanog morfogenetskog proteina-2, dokazati da tako transducirano humano mišićno tkivo ima sposobnost osteogene diferencijacije te na taj način približiti metodu kliničkoj uporabi.

Metode: U istraživanju je korišteno mišićno tkivo prikupljeno tijekom 35 artroskopskih rekonstrukcija prednjih ukriženih sveza. Istraživanje je podijeljeno na fazu optimizacije protokola *ex vivo* genske terapije i fazu potvrde osteogene diferencijacije mišićnog tkiva prema tako optimiziranom protokolu. U svrhu optimizacije protokola transdukcije korišteno je mišićno tkivo 30 pacijenata te adenovirusni vektor koji izražava gen za luciferazu (AdLuc). Određivan je optimalan broj adenovirusnih čestica za transdukciju mišićnog tkiva, optimalno vrijeme kontakta mišićnog tkiva i adenovirusnih čestica te utjecaja iona lantana i kalcija na poboljšanje transdukcije mišićnog tkiva. Pri uspostavljanju optimiziranog *ex vivo* genskog protokola, u svrhu potvrde osteogene diferencijacije, korišteni su mišićni uzorci 5 novih pacijenta te adenovirusni vektor koji izražava gen za koštani morfogenetski protein -2 (Ad.BMP2). Markeri osteogeneze transduciranih mišićnih uzoraka *RUNX2, BSP* i *DMP-1* analizirani su kvantitativnom polimeraza lančanom reakcijom, otpuštenim BMP2 enzimskim imunotestom na čvrstoj fazi ELISA te prisustvom kolagena tip I (COL-I) u transduciranim mišićima imunihistokemijskim bojenjem.

Rezultati: Mišićni uzorci transducirani prema optimiziranom protokolu *ex vivo* genske terapije, koristeći Ad.BMP2 iskazali su izraženu izraženost markera osteogeneze, visoku razinu otpuštanja BMP2 te jak izražaj za COL-I.

Zaključak: Rezultati ove studije potvrđuju uspješnost osteogene diferencijacije ljudskih mišića nakon tridesetominutne *in vitro* transdukcije adenovirusnim vektorom Ad.BMP2 prema novom optimiziranom protokolu.

8. SUMMARY

Title: **Optimization of an *ex vivo* gene transfer to the hamstrings tendons muscle remnants: potential for genetic enhancement of bone healing**

Introduction: The purpose of this study was to explore the hypothesis that adenoviral vector carrying the BMP2 gene is capable of transducing human tendon and muscle tissue harvested during ACL reconstruction and direct it towards osteogenic differentiation within the period shorter than one hour. Expedited *ex vivo* gene therapy is a novel and proved approach to tissue engineering. However, to be suitable for clinical application currently established protocols need optimization.

Methods: Human samples from gracilis and semitendinosus muscle were harvested during ACL reconstruction from 35 patients. To optimize the transduction protocol, samples from 30 patients were transduced with Ad.Luc vector using different number of a plaque-forming unit (PFU/ml), different times of transduction and addition of positive ions for transduction enhancement. When the optimized protocol has been established, muscle samples from 5 patients were transduced with adenoviral vector Ad.BMP2, and analyzed by means of qRT-PCR, ELISA and Immunohistochemistry (IHC).

Results: Samples transduced with adenoviral vector BMP2 according to the previously optimized protocol showed enhanced expression of all osteogenic markers, high BMP2 release and strong expression of Collagen type I (COL-I).

Conclusion: Results of this proof of concept study suggest the possibility of successful *in vitro* transduction of human muscle tissue within 30 minutes and its differentiation towards osteogenic lineage.

9. POPIS LITERATURE

1. Zantop T, Herbort M, Raschke MJ, Fu FH, Petersen W. The role of the anteromedial and posterolateral bundles of the anterior cruciate ligament in anterior tibial translation and internal rotation. Am J Sports Med [Internet]. 2007 Feb [cited 2016 May 11];35(2):223–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17158275

2. Noyes FR, Butler DL, Grood ES, Zernicke RF, Hefzy MS. Biomechanical analysis of human ligament grafts used in knee-ligament repairs and reconstructions. J Bone Joint Surg Am [Internet]. 1984 Mar [cited 2016 Apr 10];66(3):344–52. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6699049

3. Hootman JM, Dick R, Agel J. Epidemiology of collegiate injuries for 15 sports: summary and recommendations for injury prevention initiatives. J Athl Train [Internet]. Jan [cited 2015 Oct 13];42(2):311–9. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1941297&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

4. Chappell JD, Herman DC, Knight BS, Kirkendall DT, Garrett WE, Yu B. Effect of fatigue on knee kinetics and kinematics in stop-jump tasks. Am J Sports Med [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2016 May 14];33(7):1022–9. Available from: http://ajs.sagepub.com/content/33/7/1022.long

5. September A V, Schwellnus MP, Collins M. Tendon and ligament injuries: the genetic component. Br J Sports Med [Internet]. 2007 Apr [cited 2016 May 14];41(4):241–6; discussion 246. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2658952&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

6. Deie M, Sakamaki Y, Sumen Y, Urabe Y, Ikuta Y. Anterior knee laxity in young women varies with their menstrual cycle. Int Orthop [Internet]. 2002 Jan [cited 2016 May 14];26(3):154–6. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3620888&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

7. Vaishya R, Hasija R. Joint hypermobility and anterior cruciate ligament injury. J

Orthop Surg (Hong Kong) [Internet]. 2013 Aug [cited 2016 May 14];21(2):182–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24014780

8. Chaudhari AMW, Zelman EA, Flanigan DC, Kaeding CC, Nagaraja HN. Anterior cruciate ligament-injured subjects have smaller anterior cruciate ligaments than matched controls: a magnetic resonance imaging study. Am J Sports Med [Internet]. 2009 Jul [cited 2016 May 14];37(7):1282–7. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3641641&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

9. Woo SL, Vogrin TM, Abramowitch SD. Healing and repair of ligament injuries in the knee. J Am Acad Orthop Surg [Internet]. Jan [cited 2016 May 14];8(6):364–72. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11104400

10. Goradia VK, Rochat MC, Grana WA, Rohrer MD, Prasad HS. Tendon-to-bone healing of a semitendinosus tendon autograft used for ACL reconstruction in a sheep model. Am J Knee Surg [Internet]. 2000 [cited 2018 Jun 6];13(3):143–51. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11277242

11. Murray MM. Current Status and Potential of Primary ACL Repair. Vol. 28, Clinics in Sports Medicine. 2009. p. 51–61.

12. Ajuied A, Wong F, Smith C, Norris M, Earnshaw P, Back D, et al. Anterior cruciate ligament injury and radiologic progression of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. Am J Sports Med [Internet]. 2014 Sep [cited 2016 May 14];42(9):2242–52. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24214929

13. Snook GA. A short history of the anterior cruciate ligament and the treatment of tears. Clin Orthop Relat Res [Internet]. [cited 2017 Jul 16];(172):11–3. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6336998

14. Benjamin M, McGonagle D. Entheses: tendon and ligament attachment sites. Scand J Med Sci Sports [Internet]. 2009 Aug [cited 2016 May 15];19(4):520–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19522749

15. Deehan DJ, Cawston TE. The biology of integration of the anterior cruciate ligament. J Bone Joint Surg Br [Internet]. 2005 Jul [cited 2016 May 14];87(7):889–95. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972898

16. Grana WA, Egle DM, Mahnken R, Goodhart CW. An analysis of autograft fixation after anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model. Am J Sports Med [Internet]. Jan [cited 2016 May 13];22(3):344–51. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8037275

17. St Pierre P, Olson EJ, Elliott JJ, O'Hair KC, McKinney LA, Ryan J. Tendon-healing to cortical bone compared with healing to a cancellous trough. A biomechanical and histological evaluation in goats. J Bone Joint Surg Am [Internet]. 1995 Dec [cited 2016 May 15];77(12):1858–66. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8550654

18. Blickenstaff KR, Grana WA, Egle D. Analysis of a semitendinosus autograft in a rabbit model. Am J Sports Med [Internet]. Jan [cited 2016 May 13];25(4):554–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9240991

19. Weiler A, Hoffmann RFG, Bail HJ, Rehm O, Südkamp NP. Tendon healing in a bone tunnel. Part II: Histologic analysis after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. Arthroscopy. 2002;18(2):124–35.

20. Chen C-H. Graft healing in anterior cruciate ligament reconstruction. Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol [Internet]. 2009 Jan [cited 2016 Apr 24];1(1):21. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2757018&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

21. Yamakado K, Kitaoka K, Yamada H, Hashiba K, Nakamura R, Tomita K. The influence of mechanical stress on graft healing in a bone tunnel. Arthroscopy [Internet]. 2002 Jan [cited 2016 May 13];18(1):82–90. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11774147

22. Aglietti P, Zaccherotti G, Simeone AJ, Buzzi R. Anatomic versus non-anatomic tibial fixation in anterior cruciate ligament reconstruction with bone-patellar tendon-bone graft. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc [Internet]. 1998 Jan [cited 2016 May 15];6 Suppl 1:S43-8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9608463

23. Buelow JU, Siebold R, Ellermann A. A new bicortical tibial fixation technique in

anterior cruciate ligament reconstruction with quadruple hamstring graft. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc [Internet]. 2000 Jan [cited 2016 May 15];8(4):218–25. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10975262

24. Fink C, Zapp M, Benedetto KP, Hackl W, Hoser C, Rieger M. Tibial tunnel enlargement following anterior cruciate ligament reconstruction with patellar tendon autograft. Arthroscopy [Internet]. 2001 Feb [cited 2016 May 15];17(2):138–43. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11172242

25. Fahey M, Indelicato PA. Bone tunnel enlargement after anterior cruciate ligament replacement. Am J Sports Med [Internet]. 1994 Jun [cited 2017 May 13];22(3):410–4. Available from: http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/036354659402200318

26. Cameron M, Buchgraber A, Passler H, Vogt M, Thonar E, Fu F, et al. The natural history of the anterior cruciate ligament-deficient knee. Changes in synovial fluid cytokine and keratan sulfate concentrations. Am J Sports Med [Internet]. Jan [cited 2016 May 15];25(6):751–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9397261

27. Edgar CM, DeBerardino T, Arciero R. Two-Stage ACL Revision: Indications and Technique. In: Revision ACL Reconstruction [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2014 [cited 2018 Jan 29]. p. 127–38. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-0766-9_13

28. Vacanti CA. The history of tissue engineering. J Cell Mol Med [Internet]. Jan [cited 2016 May 10];10(3):569–76. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3933143&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

29. Evans CH. Advances in regenerative orthopedics. Mayo Clin Proc [Internet]. 2013 Nov [cited 2016 Apr 11];88(11):1323–39. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4214280&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

30. Hexter AT, Thangarajah T, Blunn G, Haddad FS. Biological augmentation of graft healing in anterior cruciate ligament reconstruction. Bone Joint J [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2019 Feb 18];100-B(3):271–84. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29589505

31. Wen C-Y, Qin L, Lee K-M, Chan K-M. The use of brushite calcium phosphate cement for enhancement of bone-tendon integration in an anterior cruciate ligament reconstruction rabbit model. J Biomed Mater Res B Appl Biomater [Internet]. 2009 May [cited 2016 May 15];89(2):466–74. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18937262

32. Mayr HO, Hube R, Bernstein A, Seibt AB, Hein W, von Eisenhart-Rothe R. Beta-tricalcium phosphate plugs for press-fit fixation in ACL reconstruction--a mechanical analysis in bovine bone. Knee [Internet]. 2007 Jun [cited 2016 May 15];14(3):239–44. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17376691

33. Lui PPY, Wong OT, Lee YW. Application of tendon-derived stem cell sheet for the promotion of graft healing in anterior cruciate ligament reconstruction. Am J Sports Med [Internet]. 2014;42(3):681–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24451112

34. Chen C-H. Strategies to enhance tendon graft--bone healing in anterior cruciate ligament reconstruction. Chang Gung Med J [Internet]. 2009;32(5):483–93. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19840505

35. Radice F, Yánez R, Gutiérrez V, Rosales J, Pinedo M, Coda S. Comparison of magnetic resonance imaging findings in anterior cruciate ligament grafts with and without autologous platelet-derived growth factors. Arthroscopy [Internet]. 2010 Jan [cited 2016 May 15];26(1):50–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20117627

36. Mirzatolooei F, Alamdari MT, Khalkhali HR. The impact of platelet-rich plasma on the prevention of tunnel widening in anterior cruciate ligament reconstruction using quadrupled autologous hamstring tendon: a randomised clinical trial. Bone Joint J [Internet]. 2013 Jan [cited 2016 May 15];95-B(1):65–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23307675

37. Andriolo L, Di Matteo B, Kon E, Filardo G, Venieri G, Marcacci M. PRP Augmentation for ACL Reconstruction. Biomed Res Int [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 May 15];2015:371746. Available from:

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4430629&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

38. Chen C-H, Chen W-J, Shih C-H, Chou S-W. Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction with periosteum-enveloping hamstring tendon graft. Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc [Internet]. 2004 Sep 2 [cited 2017 Jul 12];12(5):398–405. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15060762

39. Dong Y, Zhang Q, Li Y, Jiang J, Chen S. Enhancement of tendon-bone healing for anterior cruciate ligament (ACL) reconstruction using bone marrow-derived mesenchymal stem cells infected with BMP-2. Int J Mol Sci [Internet]. 2012 Jan [cited 2016 May 15];13(10):13605–20. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3497344&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

40. Ivkovic A, Marijanovic I, Hudetz D, Porter RM, Pecina M, Evans CH. Regenerative medicine and tissue engineering in orthopaedic surgery. Front Biosci (Elite Ed) [Internet]. 2011 Jan [cited 2016 May 12];3:923–44. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21622102

41. Schmitt A, van Griensven M, Imhoff AB, Buchmann S. Application of stem cells in orthopedics. Stem Cells Int [Internet]. 2012 Jan [cited 2016 May 12];2012:394962. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3328166&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

42. Lieberman JR, Daluiski A, Stevenson S, Wu L, McAllister P, Lee YP, et al. The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. J Bone Joint Surg Am [Internet]. 1999 Jul [cited 2016 Apr 3];81(7):905–17. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10428121

43. Breitbart AS, Grande DA, Mason JM, Barcia M, James T, Grant RT. Gene-enhanced tissue engineering: applications for bone healing using cultured periosteal cells transduced retrovirally with the BMP-7 gene. Ann Plast Surg [Internet]. 1999 May [cited 2016 Apr 17];42(5):488–95. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10340856

44. Hsu WK, Wang JC, Liu NQ, Krenek L, Zuk PA, Hedrick MH, et al. Stem cells from human fat as cellular delivery vehicles in an athymic rat posterolateral spine fusion model. J Bone Joint Surg Am [Internet]. 2008 May [cited 2016 Apr 17];90(5):1043–52. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18451397

45. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. Exp Hematol [Internet]. 1974 [cited 2017 Jul 12];2(2):83–92. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4455512

46. Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. J Orthop Res [Internet]. 2002 Sep [cited 2016 May 17];20(5):1060–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12382974

47. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng [Internet]. 2001 Apr [cited 2015 Feb 19];7(2):211–28. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11304456

48. Matthews BG, Torreggiani E, Roeder E, Matic I, Grcevic D, Kalajzic I. Osteogenic potential of alpha smooth muscle actin expressing muscle resident progenitor cells HHS Public Access. Bone [Internet]. 2016 [cited 2017 Mar 15];84:69–77. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4755912/pdf/nihms-747029.pdf

49. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. Anat Rec [Internet]. 2001 Sep 1 [cited 2016 May 17];264(1):51–62. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11505371

50. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. Arthritis Rheum [Internet]. 2001 Aug [cited 2016 May 14];44(8):1928–42. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11508446

51. Huang GT-J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. J Dent Res [Internet]. 2009 Sep [cited 2016 Apr 1];88(9):792–806. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2830488&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

52. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. Stem Cells [Internet]. 2007 Feb [cited 2016 May 17];25(2):319–31. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17053211

53. Semenov O V, Koestenbauer S, Riegel M, Zech N, Zimmermann R, Zisch AH, et al. Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: critical parameters for isolation and maintenance of stemness after isolation. Am J Obstet Gynecol [Internet]. 2010 Feb [cited 2016 May 17];202(2):193.e1-193.e13. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20035913

54. Baghaban Eslaminejad M, Jahangir S, Aghdami N. Mesenchymal stem cells from murine amniotic fluid as a model for preclinical investigation. Arch Iran Med [Internet]. 2011 Mar [cited 2016 May 17];14(2):96–103. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21361715

55. Vanden Bossche L, Vanderstraeten G. Heterotopic ossification: a review. J Rehabil Med [Internet]. 2005 May [cited 2016 May 12];37(3):129–36. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16040468

56. Kaplan FS, Xu M, Glaser DL, Collins F, Connor M, Kitterman J, et al. Early diagnosis of fibrodysplasia ossificans progressiva. Pediatrics [Internet]. 2008 May [cited 2016 May 11];121(5):e1295-300. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3502043&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

57. Matthews BG, Torreggiani E, Roeder E, Matic I, Grcevic D, Kalajzic I. Osteogenic potential of alpha smooth muscle actin expressing muscle resident progenitor cells. Bone [Internet]. 2016 Mar [cited 2016 May 11];84:69–77. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26721734

58. Ćuti T, Antunović M, Marijanović I, Ivković A, Vukasović A, Matić I, et al. Capacity of muscle derived stem cells and pericytes to promote tendon graft integration and ligamentization following anterior cruciate ligament reconstruction. Int Orthop [Internet]. 2017 Jun 15 [cited 2018 Jan 24];41(6):1189–98. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28299448

59. Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. Acta Reumatol Port [Internet]. [cited 2019 Oct 2];32(2):103–10. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17572649

60. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen K-S, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. Int J Biochem Cell Biol [Internet]. 2008 [cited 2019 Oct 2];40(1):46–62. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17659995

61. Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. Vol. 80, Bone. Elsevier Inc.; 2015. p. 14–8.

62. Staines KA, Pollard AS, McGonnell IM, Farquharson C, Pitsillides AA. Cartilage to bone transitions in health and disease. Vol. 219, Journal of Endocrinology. 2013.

63. Mackie EJ, Tatarczuch L, Mirams M. The skeleton: a multi-functional Mackie, E. J., Tatarczuch, L., & Mirams, M. (2011). The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. The Journal of Endocrinology, 211(2), 109–21. http://doi.org/1. J Endocrinol [Internet]. 2011 Nov 1 [cited 2019 Oct 2];211(2):109–21. Available from: http://joe.endocrinology-journals.org/content/211/2/109.full

64. Villemure I, Stokes IAF. Growth plate mechanics and mechanobiology. A survey of present understanding. Vol. 42, Journal of Biomechanics. 2009. p. 1793–803.

65. Safadi FF, Barbe MF, Abdelmagid SM, Rico MC, Aswad RA, Litvin J, et al. Bone structure, development and bone biology. In: Bone Pathology. Humana Press; 2009. p. 1–50.

66. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: Mechanisms and interventions. Vol. 11, Nature Reviews Rheumatology. Nature Publishing Group; 2015. p. 45–54.

67. Benjamin M, Toumi H, Ralphs JR, Bydder G, Best TM, Milz S. Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load. J Anat [Internet]. 2006 [cited 2017 Jul 12];208:471–90. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2100202/pdf/joa0208-0471.pdf

68. Parfitt AM. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. Bone [Internet]. 2002 Jan [cited 2017 May 22];30(1):5–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792557

69. Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic Control of Bone Formation. Annu Rev Cell Dev Biol [Internet]. 2009 Nov [cited 2017 Apr 19];25(1):629–48. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19575648

70. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS, Cerri PS, et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. Biomed Res Int [Internet]. 2015 Jul 13 [cited 2017 Jul 15];2015:421746. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26247020

71. Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. J Cell Biol [Internet]. 1988 Jun [cited 2017 Jul 15];106(6):2139–51. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3384856

72. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell [Internet]. 1997 May 30 [cited 2017 Jul 15];89(5):747–54. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9182762

73. Fakhry M, Hamade E, Badran B, Buchet R, Magne D. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. 2013 [cited 2017 Jul 15]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3812518/pdf/WJSC-5-136.pdf

74. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. Arch Biochem Biophys [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2017 Jul 15];561:3–12. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24832390

75. Tang W, Li Y, Osimiri L, Zhang C. Osteoblast-specific Transcription Factor Osterix (Osx) Is an Upstream Regulator of Satb2 during Bone Formation *. 2011 [cited 2017

Jul 15]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3190908/pdf/zbc32995.pdf

76. Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? Am J Pathol [Internet]. 2007 Feb [cited 2017 Apr 19];170(2):427–35. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17255310

77. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. Bone [Internet]. 2008 Apr [cited 2017 Apr 19];42(4):606–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18280232

78. Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, et al. The Bone Lining Cell: Its Role in Cleaning Howship's Lacunae and Initiating Bone Formation. J Bone Miner Res [Internet]. 2002 Jan 1 [cited 2017 Apr 19];17(1):77–90. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11771672

79. Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE, Dagnaes-Hansen F, Plesner TL, Hauge EM, et al. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. Am J Pathol [Internet]. 2009 Jan [cited 2017 Apr 19];174(1):239–47. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010612825

80. Bruzzaniti A, Baron R. Molecular regulation of osteoclast activity. Rev Endocr Metab Disord [Internet]. 2007 Jan 3 [cited 2017 May 22];7(1–2):123–39. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951988

81. Bonewald LF, Mundy GR. Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. Clin Orthop Relat Res [Internet]. 1990 Jan [cited 2017 May 22];(250):261–76. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2403492

82. HOCK JM, CENTRELLA M, CANALIS E. Insulin-Like Growth Factor I Has Independent Effects on Bone Matrix Formation and Cell Replication*. Endocrinology [Internet]. 1988 Jan [cited 2017 May 22];122(1):254–60. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3335207

83. Phan TCA, Xu J, Zheng MH. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. Histol Histopathol [Internet]. 2004 [cited 2017 Jul 15];19(4):1325–44. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15375775

84. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. J Cell Biochem [Internet]. 2003 Apr 1 [cited 2017 Apr 17];88(5):873–84. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12616527

85. Strong AL, Gimble JM, Bunnell BA. Analysis of the Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines Secreted by Adult Stem Cells during Differentiation. Stem Cells Int [Internet]. 2015 [cited 2017 Apr 17];2015:1–12. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26300921

86. Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the Inflammatory Response for Enhanced Bone Tissue Regeneration. Tissue Eng Part B Rev [Internet]. 2008 Jun [cited 2017 Apr 17];14(2):179–86. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18544015

87. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis P V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. Injury [Internet]. 2005 Dec [cited 2017 Apr 17];36(12):1392–404. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102764

88. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science [Internet]. 1965 Nov 12 [cited 2019 Sep 24];150(3698):893–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5319761

89. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science [Internet]. 1988 Dec 16 [cited 2016 Mar 30];242(4885):1528–34. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3201241

90. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. Nat Biotechnol [Internet]. 1998 Mar [cited 2016 May 18];16(3):247–52. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9528003

91. Wozney JM. Bone morphogenetic proteins. Prog Growth Factor Res [Internet]. 1989 Jan [cited 2016 May 18];1(4):267–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2491264

92. Katagiri T, Watabe T. Bone Morphogenetic Proteins. Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2019 Sep 24];8(6). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27252362

93. Beederman M, Lamplot JD, Nan G, Wang J, Liu X, Yin L, et al. BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation* HHS Public Access. J Biomed Sci Eng [Internet]. 2013 [cited 2017 Apr 2];6(8A):32–52. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4725591/pdf/nihms729950.pdf

94. Xiao Y-T, Xiang L-X, Shao J-Z. Bone morphogenetic protein. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2007 Oct 26 [cited 2019 Sep 24];362(3):550–3. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17719560

95. Nelsen SM, Christian JL. Site-specific cleavage of BMP4 by furin, PC6, and PC7. J Biol Chem. 2009 Oct 2;284(40):27157–66.

96. Bragdon B, Thinakaran S, Moseychuk O, Gurski L, Bonor J, Price C, et al. Casein kinase 2 regulates in vivo bone formation through its interaction with bone morphogenetic protein receptor type Ia. Bone. 2011 Nov;49(5):944–54.

97. Sapkota G, Alarcón C, Spagnoli FM, Brivanlou AH, Massagué J. Balancing BMP Signaling through Integrated Inputs into the Smad1 Linker. Mol Cell. 2007 Feb;25(3):441–54.

98. Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, Sogayar MC, Taga R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui médicas e biológicas / Soc Bras Biofísica . [et al] [Internet]. 2005 Oct [cited 2016 May 18];38(10):1463–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16172739

99. Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications. Arch Biochem Biophys [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2016 Mar 7];561:64–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25043976

100. Katagiri T, Watabe T. Bone Morphogenetic Proteins. Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2019 Jun 15];8(6):a021899. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27252362

101. Yamashita H, Ten Dijke P, Heldin CH, Miyazono K. Bone morphogenetic protein receptors. Bone [Internet]. 1996 Dec [cited 2016 May 18];19(6):569–74. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8968021

102. Groppe J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Kwiatkowski W, et al. Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. Nature [Internet]. 2002 Dec [cited 2019 Jun 15];420(6916):636–42. Available from: http://www.nature.com/articles/nature01245

103. Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. Eur J Biochem [Internet]. 2000 Dec [cited 2016 May 18];267(24):6954–67. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11106403

104. Hemmati-Brivanlou A, Thomsen GH. Ventral mesodermal patterning inXenopus embryos: Expression patterns and activities of BMP-2 and BMP-4. Dev Genet [Internet]. 1995 [cited 2017 Jul 15];17(1):78–89. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7554498

105. Zou H, Niswander L. Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. Science [Internet]. 1996 May 3 [cited 2016 May 18];272(5262):738–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8614838

106. Stewart A, Guan H, Yang K. BMP-3 promotes mesenchymal stem cell proliferation through the TGF-beta/activin signaling pathway. J Cell Physiol [Internet]. 2010 Jun [cited 2016 Apr 26];223(3):658–66. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20143330

107. Bobacz K, Gruber R, Soleiman A, Erlacher L, Smolen JS, Graninger WB. Expression of bone morphogenetic protein 6 in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulation of matrix synthesis in vitro. Arthritis Rheum [Internet]. 2003 Sep [cited 2016 May 18];48(9):2501–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13130469

108. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. Nat Genet [Internet]. 2006 Dec [cited 2016 May 18];38(12):1424–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17099713

109. Subach BR, Haid RW, Rodts GE, Kaiser MG. Bone morphogenetic protein in spinal fusion: overview and clinical update. Neurosurg Focus [Internet]. 2001 Apr 15 [cited

2019 Sep 24];10(4):E3. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16732630

110. Axelrad TW, Einhorn TA. Bone morphogenetic proteins in orthopaedic surgery. Cytokine Growth Factor Rev [Internet]. [cited 2019 Sep 24];20(5–6):481–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19892584

111. Minamide A, Kawakami M, Hashizume H, Sakata R, Tamaki T. Evaluation of carriers of bone morphogenetic protein for spinal fusion. Spine (Phila Pa 1976) [Internet]. 2001 Apr 15 [cited 2019 Sep 24];26(8):933–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11317116

112. Boden SD. Overview of the biology of lumbar spine fusion and principles for selecting a bone graft substitute. Spine (Phila Pa 1976) [Internet]. 2002 Aug 15 [cited 2019 Sep 24];27(16 Suppl 1):S26-31. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12205416

113. Burkus JK, Transfeldt EE, Kitchel SH, Watkins RG, Balderston RA. Clinical and radiographic outcomes of anterior lumbar interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2. Spine (Phila Pa 1976) [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2019 Sep 24];27(21):2396–408. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438990

114. Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. Spine J [Internet]. 2011 Jun [cited 2019 Sep 24];11(6):471–91. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21729796

115. T.Ch. P, J.S. E, J.N. G, N.W. T, M.M. P, G.E. F, et al. Osteogenic protein-1 overcomes the inhibitory effect of nicotine on posterolateral lumbar fusion. Spine (Phila Pa 1976) [Internet]. 2001 [cited 2019 Sep 24];26(15):1656–61. Available from: http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L32756654

116. Vaccaro AR, Anderson DG, Patel T, Fischgrund J, Truumees E, Herkowitz HN, et al. Comparison of OP-1 putty (rhBMP-7) to iliac crest autograft for posterolateral lumbar arthrodesis: A minimum 2-year follow-up pilot study. Spine (Phila Pa 1976). 2005

Dec;30(24):2709–16.

117. Vaccaro AR, Whang PG, Patel T, Phillips FM, Anderson DG, Albert TJ, et al. The safety and efficacy of OP-1 (rhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft for posterolateral lumbar arthrodesis: minimum 4-year follow-up of a pilot study. Spine J. 2008 May;8(3):457–65.

118. Vukicevic S, Oppermann H, Verbanac D, Jankolija M, Popek I, Curak J, et al. The clinical use of bone morphogenetic proteins revisited: a novel biocompatible carrier device OSTEOGROW for bone healing. Int Orthop [Internet]. 2014 Mar [cited 2019 Sep 25];38(3):635–47. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24352822

119. Grgurevic L, Oppermann H, Pecin M, Erjavec I, Capak H, Pauk M, et al. Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 6 Delivered Within Autologous Blood Coagulum Restores Critical Size Segmental Defects of Ulna in Rabbits. JBMR plus [Internet]. 2019 May [cited 2019 Sep 25];3(5):e10085. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31131338

120. Glowacki J. Angiogenesis in fracture repair. Clin Orthop Relat Res [Internet]. 1998 Oct [cited 2017 Apr 17];(355 Suppl):S82-9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9917629

121. Rowe NM, Mehrara BJ, Luchs JS, Dudziak ME, Steinbrech DS, Illei PB, et al. Angiogenesis during mandibular distraction osteogenesis. Ann Plast Surg [Internet]. 1999 May [cited 2017 Apr 17];42(5):470–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10340853

122. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. Cell [Internet]. 1998 May 1 [cited 2017 Apr 17];93(3):411–22. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9590175

123. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. Cell [Internet]. 1996 Dec 27 [cited 2017 Apr 17];87(7):1171–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8980224

124. Calvi LM, Sims NA, Hunzelman JL, Knight MC, Giovannetti A, Saxton JM, et al. Activated parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor in osteoblastic cells differentially affects cortical and trabecular bone. J Clin Invest [Internet]. 2001 Feb [cited 2017 Jul 15];107(3):277–86. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160151

125. Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C. Androgens and Bone. Endocr Rev [Internet]. 2004 Jun [cited 2017 Jul 15];25(3):389–425. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15180950

126. Hudetz D, Borić I, Rod E, Jeleč Ž, Radić A, Vrdoljak T, et al. The Effect of Intra-articular Injection of Autologous Microfragmented Fat Tissue on Proteoglycan Synthesis in Patients with Knee Osteoarthritis. Genes (Basel) [Internet]. 2017 Oct 13 [cited 2019 Jan 22];8(10):270. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29027984

127. Saccomanno MF, Capasso L, Fresta L, Milano G. Biological enhancement of graft-tunnel healing in anterior cruciate ligament reconstruction. Joints [Internet]. 2016 [cited 2017 Aug 3];4(3):174–82. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27900311

128. Bajaj P, Schweller RM, Khademhosseini A, West JL, Bashir R. 3D Biofabrication Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Annu Rev Biomed Eng [Internet]. 2014 Jul 11 [cited 2017 Apr 16];16(1):247–76. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24905875

129. Evans CH, Palmer GD, Pascher A, Porter R, Kwong FN, Gouze E, et al. Facilitated endogenous repair: making tissue engineering simple, practical, and economical. Tissue Eng [Internet]. 2007 Aug [cited 2016 Apr 17];13(8):1987–93. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17518747

130. Nelson CM, Bissell MJ. Of Extracellular Matrix, Scaffolds, and Signaling: Tissue Architecture Regulates Development, Homeostasis, and Cancer. Annu Rev Cell Dev Biol [Internet]. 2006 Nov [cited 2017 Apr 16];22(1):287–309. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16824016

131. Kami D, Gojo S. Tuning cell fate: from insights to vertebrate regeneration.

Organogenesis [Internet]. 2014 [cited 2017 Apr 16];10(2):231–40. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24736602

132. Elsalanty ME, Genecov DG. Bone grafts in craniofacial surgery. Craniomaxillofac Trauma Reconstr [Internet]. 2009 Oct [cited 2016 Apr 30];2(3):125–34. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3052656&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

133. Ehrler DM, Vaccaro AR. The use of allograft bone in lumbar spine surgery. Clin Orthop Relat Res [Internet]. 2000 Feb [cited 2016 May 21];(371):38–45. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10693548

134. Shafiei Z, Bigham AS, Dehghani SN, Nezhad ST. Fresh cortical autograft versus fresh cortical allograft effects on experimental bone healing in rabbits: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. Cell Tissue Bank [Internet]. 2009 Feb [cited 2016 May 21];10(1):19–26. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18626789

135. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova K V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol [Internet]. 1966 Dec [cited 2016 Feb 4];16(3):381–90. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5336210

136. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. Clin Orthop Relat Res [Internet]. 1980 Sep [cited 2016 Mar 8];(151):294–307. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7418319

137. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res [Internet]. 1991 Sep [cited 2015 Dec 30];9(5):641–50. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1870029

138. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy [Internet]. 2006;8(4):315–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606

139. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. Bone [Internet].

1992 Jan [cited 2016 May 17];13(1):69–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1316137

140. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet [Internet]. 1970 Oct [cited 2015 May 22];3(4):393–403. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5523063

141. Ahn SE, Kim S, Park KH, Moon SH, Lee HJ, Kim GJ, et al. Primary bone-derived cells induce osteogenic differentiation without exogenous factors in human embryonic stem cells. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2006 Feb 10 [cited 2016 May 17];340(2):403–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16389066

142. Evans SF, Chang H, Knothe Tate ML. Elucidating multiscale periosteal mechanobiology: A key to unlocking the smart properties and regenerative capacity of the periosteum? Vol. 19, Tissue Engineering - Part B: Reviews. 2013. p. 147–59.

143. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. J Cell Biochem [Internet]. 1997 Feb [cited 2019 Oct 4];64(2):278–94. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9027588

144. Merle B, Garnero P. The multiple facets of periostin in bone metabolism. Osteoporos Int [Internet]. 2012 Apr [cited 2019 Oct 4];23(4):1199–212. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22310955

145. Doi K, Sakai K. Vascularized periosteal bone graft from the supracondylar region of the femur. Microsurgery [Internet]. 1994 [cited 2019 Oct 4];15(5):305–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7934797

146. Cao B, Huard J. Muscle-derived stem cells. Vol. 3, Cell Cycle. 2004. p. 104–7.

147. MAURO A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. J Biophys Biochem Cytol [Internet]. 1961 Feb [cited 2015 Mar 8];9:493–5. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2225012&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

148. Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. Physiol Rev [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Sep 13];93(1):23–67. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4073943&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

149. da Silva Meirelles L, Sand TT, Harman RJ, Lennon DP, Caplan AI. MSC frequency correlates with blood vessel density in equine adipose tissue. Tissue Eng Part A [Internet]. 2009 Feb [cited 2016 May 16];15(2):221–9. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2810211&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

150. Wong RSY. Mesenchymal stem cells: angels or demons? J Biomed Biotechnol [Internet]. 2011 Jan [cited 2016 May 17];2011:459510. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3142786&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

151. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Stem Cells [Internet]. 2007;25(11):2739–49. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17656645

152. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators. J Cell Biochem J Cell Biochem [Internet]. 2006 [cited 2017 Aug 5];98(98):1076–84. Available from: http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.464.9107&rep=rep1&type=pdf

153. Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, Bian C, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. Leukemia [Internet]. 2009 May [cited 2016 May 17];23(5):925–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19148141

154. Tian K, Yang S, Ren Q, Han Z, Lu S, Ma F, et al. p38 MAPK contributes to the growth inhibition of leukemic tumor cells mediated by human umbilical cord mesenchymal stem cells. Cell Physiol Biochem [Internet]. 2010 Jan [cited 2016 May 17];26(6):799–808. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21220911

155. Konopleva M, Konoplev S, Hu W, Zaritskey AY, Afanasiev B V, Andreeff M.

Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. Leukemia [Internet]. 2002 Sep [cited 2016 May 17];16(9):1713–24. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200686

156. Lin Y, Zhang G, Leng Z, Lu Z, Bu L, Gao S, et al. Study on the bone marrow mesenchymal stem cells induced drug resistance in the U937 cells and its mechanism. Chin Med J (Engl) [Internet]. 2006 Jun 5 [cited 2016 May 17];119(11):905–10. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16780769

157. Tian LLH, Yue W, Zhu F, Li S, Li W. Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth in vitro and in vivo. J Cell Physiol [Internet]. 2011 Jul [cited 2016 May 11];226(7):1860–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21442622

158. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. Cancer Res [Internet]. 2007 Oct 1 [cited 2016 May 17];67(19):9142–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17909019

159. Friedmann T, Roblin R. Gene therapy for human genetic disease? Science [Internet]. 1972 Mar 3 [cited 2016 May 20];175(4025):949–55. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5061866

160. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. Science [Internet]. 1995 Oct 20 [cited 2016 Mar 1];270(5235):475–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7570001

161. Hardy S, Kitamura M, Harris-Stansil T, Dai Y, Phipps ML. Construction of Adenovirus Vectors through Cre-lox Recombination. J Virol [Internet]. 1997 [cited 2018 Jan 29];71(3):1842–9. Available from: http://jvi.asm.org/content/71/3/1842.full.pdf

162. Fox MS, Littlefield JW. Reservations concerning gene therapy. Science [Internet]. 1971 Jul 16 [cited 2016 May 20];173(3993):195. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5087488

163. Blasimme A, Rial-Sebbag E. Regulation of cell-based therapies in Europe: current challenges and emerging issues. Stem Cells Dev [Internet]. 2013 Dec [cited 2019 Jun 16];22 Suppl 1(Suppl 1):14–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24304069

164. Lundstrom K. Viral Vectors in Gene Therapy. Dis (Basel, Switzerland) [Internet]. 2018 May 21 [cited 2019 Jun 16];6(2). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29883422

165. Marshall E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. Science [Internet]. 1999 Dec 17 [cited 2016 Mar 26];286(5448):2244–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10636774

166. Hardee CL, Arévalo-Soliz LM, Hornstein BD, Zechiedrich L. Advances in Non-Viral DNA Vectors for Gene Therapy. Genes (Basel) [Internet]. 2017 Feb 10 [cited 2017 Jul 17];8(2). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28208635

167. Celec P, Gardlik R. Gene therapy using bacterial vectors. Front Biosci (Landmark Ed [Internet]. 2017 [cited 2019 Jan 2];22:81–95. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27814603

168. Evans CH. Gene delivery to bone. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. 2012 Sep [cited 2016 Apr 11];64(12):1331–40. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3392363&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

169. Evans C. Gene therapy for the regeneration of bone. Injury [Internet]. 2011 Jun [cited 2016 Apr 19];42(6):599–604. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3106986&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

170. Balmayor ER, van Griensven M. Gene Therapy for Bone Engineering. Front Bioeng Biotechnol [Internet]. 2015;3(February):1–7. Available from: http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fbioe.2015.00009/abstract

171. Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD. Orthopedic gene therapy--lost in translation? J Cell Physiol [Internet]. 2012 Feb [cited 2016 May 4];227(2):416–20. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3264489&tool=pmcentrez

&rendertype=abstract

172. Evans CH, Liu F-J, Glatt V, Hoyland JA, Kirker-Head C, Walsh A, et al. Use of genetically modified muscle and fat grafts to repair defects in bone and cartilage. Eur Cell Mater [Internet]. 2009 Jan [cited 2016 Apr 11];18:96–111. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4382019&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

173. Virk MS, Sugiyama O, Park SH, Gambhir SS, Adams DJ, Drissi H, et al. "Same day" ex-vivo regional gene therapy: a novel strategy to enhance bone repair. Mol Ther [Internet]. 2011 May [cited 2016 Apr 19];19(5):960–8. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3098640&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

174. Sharma JP, Salhotra R. Tourniquets in orthopedic surgery. Indian J Orthop [Internet]. 2012 Jul [cited 2017 Jul 16];46(4):377–83. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22912509

175. Phillips JE, Gersbach CA, García AJ. Virus-based gene therapy strategies for bone regeneration. Biomaterials [Internet]. 2007 Jan [cited 2016 May 12];28(2):211–29. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961206006557

176. Kay M a., Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy : the art of turning infectious. Nature. 2001;7:33–40.

177. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. Exp Biol Med [Internet]. 1953 Dec 1 [cited 2019 Jan 17];84(3):570–3. Available from: http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.3181/00379727-84-20714

178. Zhang Y, Bergelson JM. Adenovirus Receptors. J Virol [Internet]. 2005 Oct 1 [cited 2019 Jan 17];79(19):12125–31. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16160140

179. Nemerow GR, Stewart PL, Reddy VS. Structure of human adenovirus. Curr Opin Virol. 2012;2:115–21.

180. Meier O, Greber UF. Adenovirus endocytosis. Vol. 5, Journal of Gene Medicine.

2003. p. 451–62.

181. Hoeben RC, Uil TG. Adenovirus DNA replication. Vol. 5, Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2013.

182. Leopold PL, Crystal RG. Intracellular trafficking of adenovirus: Many means to many ends. Vol. 59, Advanced Drug Delivery Reviews. 2007. p. 810–21.

183. Russell WC. Adenoviruses: update on structure and function. J Gen Virol [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2019 Jan 17];90(1):1–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19088268

184. Russell WC, Graham FL, Smiley J, Nairn R. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. J Gen Virol [Internet]. 1977 Jul 1 [cited 2019 Jan 17];36(1):59–72. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/886304

185. Alba R, Bosch A, Chillon M. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. Gene Ther [Internet]. 2005 Oct 18 [cited 2019 Jan 16];12(S1):S18–27. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16231052

186. Brader P, Serganova I, Blasberg RG. Noninvasive molecular imaging using reporter genes. J Nucl Med. 2013;54:167–72.

187. Allard STM, Kopish K, Corporation P. Luciferase Reporter Assays : Powerful , Adaptable Tools for Cell Biology Research. Notes. 2008;

188. Sherf BA, Navarro SL, Hannah RR, Wood K V. Dual-Luciferase Reporter Assay: An Advanced Co-Reporter Technology Integrating Firefly and Renilla Luciferase Assays. Promega Notes. 1996;57:2–8.

189. Smale ST. Luciferase assay. Cold Spring Harb Protoc. 2010;5.

190. Ambriović Ristov, Andreja ; Brozović, Anamaria ; Bruvo Mađarić, Branka ; Ćetković, Helena ; Herak Bosnar, Maja ; Hranilović, Dubravka ; Katušić Hećimović, Silva ; Meštrović Radan, Nevenka ; Mihaljević, Snježana ; Slade, Neda ; Vujaklija D. Methods in molecular biology [Internet]. 1st ed. Zagreb: Institut Ruđer Bošković; 2007 [cited 2018 Oct 24]. 1021 p. Available from: https://www.bib.irb.hr/319044

191. Henkel J, Woodruff MA, Epari DR, Steck R, Glatt V, Dickinson IC, et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions — A 21st Century Perspective. Bone Res [Internet]. 2013 Sep 25 [cited 2017 Mar 15];1(3):216–48. Available from: http://www.nature.com/articles/boneres201317

192. Bruder SP, Fox BS. Tissue engineering of bone. Cell based strategies. Clin Orthop Relat Res [Internet]. 1999 Oct [cited 2019 Jan 17];(367 Suppl):S68-83. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10546637

193. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. Eur Spine J [Internet]. 2001 Oct [cited 2017 Mar 15];10 Suppl 2(Suppl 2):S96-101. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11716023

194. Sagalovsky S. Physiological role of growth factors and bone morphogenetic proteins in osteogenesis and bone fracture healing: a review. [cited 2017 Mar 15]; Available from: http://www.almclinmed.ru/jour/article/viewFile/276/273

195. Wagner DO, Sieber C, Bhushan R, Börgermann JH, Graf D, Knaus P. BMPs: from bone to body morphogenetic proteins. Sci Signal [Internet]. 2010 Jan [cited 2016 Apr 21];3(107):mr1. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20124549

196. Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R. BONE MORPHOGENETIC PROTEINS IN CLINICAL APPLICATIONS. ANZ J Surg [Internet]. 2007 Aug [cited 2017 Mar 15];77(8):626–31. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17635273

197. Ehrhardt A, Haase R, Schepers A, Deutsch MJ, Lipps HJ, Baiker A. Episomal vectors for gene therapy. Curr Gene Ther [Internet]. 2008 Jun [cited 2017 Mar 16];8(3):147–61. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18537590

198. Thomas CE, Birkett D, Anozie I, Castro MG, Lowenstein PR. Acute direct adenoviral vector cytotoxicity and chronic, but not acute, inflammatory responses correlate with decreased vector-mediated transgene expression in the brain. Mol Ther. 2001;

199. Arcasoy SM, Latoche JD, Gondor M, Pitt BR, Pilewski JM. Polycations increase the efficiency of adenovirus-mediated gene transfer to epithelial and endothelial cells in vitro. Gene Ther [Internet]. 1997 Dec 18 [cited 2017 Mar 8];4(1):32–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9068793

200. Toyoda K, Andresen JJ, Zabner J, Faraci FM, Heistad DD. Calcium phosphate precipitates augment adenovirus-mediated gene transfer to blood vessels in vitro and in vivo. Gene Ther [Internet]. 2000 Jul 25 [cited 2017 Mar 8];7(15):1284–91. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10918499

201. Palmer GD, Stoddart MJ, Gouze E, Gouze J-N, Ghivizzani SC, Porter RM, et al. A simple, lanthanide-based method to enhance the transduction efficiency of adenovirus vectors. Gene Ther [Internet]. 2008 Mar 24 [cited 2017 Mar 8];15(5):357–63. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18283289

202. Nilsson M, Ljungberg J, Richter J, Kiefer T, Magnusson M, Lieber A, et al. Development of an adenoviral vector system with adenovirus serotype 35 tropism; efficient transient gene transfer into primary malignant hematopoietic cells. J Gene Med [Internet]. 2004 Jun [cited 2017 Mar 8];6(6):631–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15170734

203. Mizuguchi H, Hayakawa T. Targeted Adenovirus Vectors. Hum Gene Ther [Internet]. 2004 Nov [cited 2017 Mar 8];15(11):1034–44. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15610604

204. Tomita F, Yasuda K, Mikami S, Sakai T, Yamazaki S, Tohyama H. Comparisons of intraosseous graft healing between the doubled flexor tendon graft and the bone-patellar tendon-bone graft in anterior cruciate ligament reconstruction. Arthroscopy [Internet]. 2001 May [cited 2016 May 13];17(5):461–76. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11337712

205. Liu F, Ferreira E, Porter R, Glatt V, Schinhan M, Shen Z, et al. RAPID AND RELIABLE HEALING OF CRITICAL SIZE BONE DEFECTS WITH GENETICALLY MODIFIED SHEEP MUSCLE HHS Public Access. Eur Cell Mater [Internet]. 2015 [cited 2017 Apr 2];30:118–31. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4625846/pdf/nihms-726451.pdf

206. Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. Cell Tissue Res [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2017 Apr 3];339(1):189–95. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19649655

207. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. J Cell

Biochem [Internet]. 2006 Dec 1 [cited 2017 Apr 5];99(5):1233–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16795049

208. Hill TP, Später D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. Canonical Wnt/??-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. Dev Cell. 2005;

209. Cohen Jr. MM. Perspectives on *RUNX* genes: An update. Am J Med Genet Part A [Internet]. 2009 Dec [cited 2017 Apr 5];149A(12):2629–46. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.33021

210. Komori T. Regulation of Osteoblast Differentiation by Runx2. In: Advances in experimental medicine and biology [Internet]. 2009 [cited 2017 Apr 5]. p. 43–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19950014

211. Feng JQ, Huang H, Lu Y, Ye L, Xie Y, Tsutsui TW, et al. The Dentin Matrix Protein 1 (Dmp1) is Specifically Expressed in Mineralized, but not Soft, Tissues during Development. J Dent Res [Internet]. 2003 Oct [cited 2017 Mar 18];82(10):776–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14514755

212. Narayanan K, Ramachandran A, Hao J, He G, Park KW, Cho M, et al. Dual functional roles of dentin matrix protein 1. Implications in biomineralization and gene transcription by activation of intracellular Ca2+ store. J Biol Chem [Internet]. 2003 May 9 [cited 2017 Apr 5];278(19):17500–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615915

213. Miao C, Zhou L, Tian L, Zhang Y, Zhang W, Yang F, et al. Osteogenic Differentiation Capacity of In Vitro Cultured Human Skeletal Muscle for Expedited Bone Tissue Engineering. Biomed Res Int [Internet]. 2017 [cited 2017 Apr 3];2017:1–7. Available from: https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/8619385/

10. ŽIVOTOPIS

EDUARD ROD

Datum rođenja: 15. kolovoza 1970.

Mjesto rođenja: Koprivnica

Adresa:

Rudolfa Horvata 7

48 000 Koprivnica

e-pošta: eduardrod1508@gmail.com

RADNO ISKUSTVO:

1995. - 1997. Stručni pripravnički staž u OB „Tomislav Bardek“ Koprivnica

1997. - 1998. Liječnik u stacionaru vojarne u Koprivnici

1998. - 1999. Liječnik hitne službe OB „Tomislav Bardek“ Koprivnica

1999. - 2011. Odjelni liječnik na Odjelu za ortopediju OB „Tomislav Bardek“ Koprivnica

2011. - danas Liječnik u Specijalnoj bolnici „Sveta Katarina“, Zabok

OBRAZOVANJE:

2011. – danas: Poslijediplomski studij „Translacijska istraživanja u biomedicini (TRIBE)“ Medicinskog fakulteta u Splitu

1999. - 2003. Specijalizacija iz ortopedije, Klinika za ortopediju, Šalata, Zagreb

1989. - 1995. Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

NASTAVNE AKTIVNOSTI:

2016. - danas Asistent na Medicinskom fakultetu u Osijeku za predmet Ortopedija

2012. - 2016. Vanjski suradnik Kineziološkog fakulteta u Zagrebu te više trenerske škole u Zagrebu za predmet Sportska medicina i higijena

2013. - 2017. Asistent na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu za predmet Ortopedija

POSEBNA ISKUSTVA:

2002. – danas Licencirani liječnik Prve hrvatske nogometne lige

2002. - danas Voditelj liječničkog tima NK „Slaven Belupo“ Koprivnica

2013. - 2016. Vanjski suradnik Hokejaškog kluba „Medveščak“ Zagreb

2015. – danas Vanjski suradnik Taekwondo kluba „Jastreb“ Zagreb

2019. – danas Liječnik Hrvatske A-nogometne reprezentacije

PUBLIKACIJE:

Međunarodno indeksirane publikacije:

1. Hudetz, D. et al. *Early results of intra-articular micro-fragmented lipoaspirate treatment in patients with late stages knee osteoarthritis: a prospective study*.. Croat. Med. J. 60(3), 227–236 (2019).

2. Rod, E et al. Optimization of an *ex vivo* gene transfer to the hamstrings tendons muscle remnants: potential for genetic enhancement of bone healing. Croat. Med. J. 60(3), 201–211 (2019).

3. Rod, E. et al. Optimizacija genske (*ex vivo*) terapije koštanim morfogenim proteinom -2 u rekonstrukiji prednje ukrižene sveze koljena, Paediatr Croat. 2018;62:172

4. Polančec, D. et al. Imunotipizacija strmalne vaskularne frakcije iz mkrofragmentiranog adipoznog tkiva i lipoaspirata pacijenata s osteoartritisom, Paediatr Croat. 2018;62:171

5. Hudetz, D. et al. The Effect of Intra-articular Injection of Autologous Microfragmented Fat Tissue on Proteoglycan Synthesis in Patients with Knee Osteoarthritis. Genes (Basel). 2017 Oct 13;8(10)

6. Boban, LJ et al. Osteogenesis imperfecta – molekularna osnova i lijekovi budućnosti, Paediatr Croat. 2017;61:147-55

7. Marjanović, D. et al. Identification of human remains from the Second World War mass graves uncovered in Bosnia and Herzegovina. Croat. Med. J. 56, 257–62 (2015).

8. Rod, E. et al. Acute hyperextension/valgus trauma to the elbow in top-level adult male water polo goalkeepers: A cause of osteochondritis disecans of the capitellum? Injury 44, (2013).

9. Bartolek D, Rakić M, Rod E, Radić A, Granec D, Perović D, Houra K. Femoral nerve block- or intravenous- guided patient control analgesia for early physical rehabilitation after anterior cruciate ligament reconstruction in fast-track orthopedics urgery: what is optimal? Period. Biol. UDC 5761 VOL. 115, 219–224, (2013).

10. Hudetz, D., Rod, E., Radic, A. & Ivkovic, A. Diagnosis and treatment of peri-prosthetic infections in total hip replacement. Med. Glas. Ljek. Komore Zenickodobojskog Kantona 9, 152–159 (2012).

11. Radić, A., Rod, E., Hudetz, D. & Ivkovic, A. Hip resurfacing arthroplasty, then and now: A review. Minerva Ortopedica e Traumatologica 63, 147–153 (2012).

Ostale publikacije:

1. Rod E. The kinetic chain and its effect on injuries. Sports Ortho A La Carte March 2018. Book of abstract

2. Hudetz D, Borić I, Rod E, Jeleč Ž, Vrdoljak T, Primorac D. Paradigm shift in treating osteoarthritis pain: Personalized medicine approach. 4th Croatian Congress on the treatment of pain with international participation. (Endorsed by European Pain Federation). Osijek, Republic of Croatia, May 18th, 2018.

4. Höppner W, Antičević D, Jeleč Ž, Stubbe S, Salazar S, Rod E, Mićić S, Turkalj M, Hudetz D, Borić I, Radić A, Vrdoljak T, Rykunov A, Skok I, Čutura T. Prpić-Vučković, Primorac D. An interdisciplinary personalized medicine approach in diagnosis and treatment of patients with Osteogenesis Imperfecta Type 3. 10th ISABS Conference of Forensic and Anthropological Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, Dubrovnik June 19-24, 2017. book of abstracts.

5. Hudetz D, Borić I, Rod E, Jeleč Ž, Radić A, Vrdoljak T, Skelin A, Lauc G, Trbojević Akmačić I, Plećko M, Polašek O, Primorac D. Year follow-up study of Ad MSC therapy in patients with knee osteoarthritis. 10th ISABS Conference of Forensic and Anthropological Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, Dubrovnik June 19-24, 2017. book of abstracts

6. Rod E, Matić I,Antunović M, Marijanović I, Primorac D,Ivković A. Optimization of an *ex vivo* gene transfer to the hamstrings tendons muscle remnants: potential for genetic enhancement of bone-tendon healing. 10th ISABS Conference of Forensic and

Anthropological Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, Dubrovnik June 19-24, 2017. book of abstracts

7. Houra,K. et al., PERSONALIZIRANA MEDICINA U MODERNOJ RADIOLOGIJI, NEUROLOGIJI, NEUROKIRURGIJI, ORTOPEDIJI, ANESTEZIOLOGIJI, FIZIKALNOJ MEDICINI I REHABILITACIJI TE PEDIJATRIJI: MODEL SPECIJALNE BOLNICE SV. KATARIN. Paediatr Croat 60, 1–17 (2016).

8. Rod E. Autologous spongioplasty and cell free scaffold assisted femur lateral condyle stage IV avascular necrosis repair. SEEFORT 2015, book of abstract

9. Rod E. „Same day“ ex vivo regional gene therapy: The optimization of the human skeletal muscle transduction with recombinant adenoviral vector. SEEFORT 2015, book of abstract

10. Matić I, Pribolsan L, Rod E, Antunović M, Vetma V, Pavičić I, Caput Mihalić K, Ivković A, Marijanović I. Optimization of BMP-2 gene therapy for osteogenic induction in muscle grafts ISABS 9th 2015, book of abstract

11. Rod E, Matić I, Hudetz D, Janković S, Marijanović I, Ivković A. Optimization of in vitro transduction of human skeletal muscle with recombinant adenovial vector carrying the luciferase reporter gene. ISABS 8th, 2013, book of abstract

12. Rod E, Hudetz D, Radić A, Bartolek D, Ivković A. Ultrasound quided barbotage and local injections for rotator cuff calcific tendinitis treatment. Periodicum biologorum 2013, Vol 115, Supp 1

13. Radić A, Houra K, Perović D, Rod E, Hudetz D, Ivković A. Bolovi u kuku i križima – česta kombinacija. Nova bolnica 2013; 11(1):40-44

14. Rod E. Dijagnosticiranje i liječenje problema vezanih uz rotatornu manšetu koristeći preporuke medicine utemeljene na dokazima. IV kongres koordinacije hrvatske obiteljske medicine, Šibenik, 2013; Zbornik radova

15. Radić A, Rod E, Houra K, Perović D, Hudetz D, Bartolek D. Invasive technique in tretaing chronic pain: Lumbar sympathetic block in treatment of complex regional pain syndrome of lower extremities. Periodicum biologorum 2013, Vol 115, Supp 1

16. Bartolek D, Rakić M, Rod E, Radić A, Granec D, Perović D, Houra K. Peripheral nerve block-or intravenous –PCA analgesia for early physical rehabilitation in „ fast –track“ orthopaedics surgery: What is optimal? Periodicum biologorum 2013, Vol 115, Supp 1

17. Borić I, Mustapić M, Prpić Vučković R, Rod E, Ivelj R, Radić A. Procjena oštećenja ploče rasta magnetskom rezonancijom (MR). Liječnički vjesnik 2012; 134:1-42

18. Ivković A, Hudetz D, Rod E, Janković S. Smjernice za konzervativno liječenje osteoartritisa koljena. XIX kongres obiteljske medicine 2012; zbornik radova

19. Radić A, Houra K, Perović D, Rod E, Hudetz D, Ivković A. Što me boli kuk ili križa? Oboje! Fizikalna medicina i rehabilitacija 2012; Suplement 1:50-52

20. Rod E, Hudetz D, Radić A, Borić I, Ivković A. Fiksacija osteohondralnog prijeloma ivera u adolescenata transpatelarnim šavovima. Liječnički vjesnik 2012; 134:1-42

Poglavlja u knjizi:

1. Koautor poglavlja Koštane bolesti u knjizi: Medicinsko biokemijska dijagnostika u kliničkoj praksi drugo izdanje, Medicinska Naklada, Zagreb, 2017

Urednik/ci: Topić, Elizabeta ; Primorac, Dragan ; Janković, Stipan

2. Koautor poglavlja Primjena mikrofragmentiranog masnog tkiva sa stromalnom vaskularnom frakcijom u liječenju oštećenja zglobne hrskavice: iskustva liječnika Specijalne bolnice Sv. Katarina u knjizi: Molekularna genetika novosti u dijagnostici i terapiji, Medicinska naklada, Zagreb, 2018.

Urednici: Sertić, Jadranka; Gamulin, Stjepan, Sedlić Filip

3. Koautor poglavlja The Future of Cartilage Repair u knjizi Personalized Medicine in Healthcare System, Springer, 2019.

Urednici: Bodiroga-Vukobrat, Nada; Rukavina, Daniel; Pavelić, Krešimir; Sanders, Gerald