

# Novi markeri za praćenje cijeljena kosti u bolesnika s prijelomom duge kosti

---

Medved, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:671804>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Sara Medved**

**Novi marker za praćenje cijeljenja kosti u  
bolesnika s prijelomom duge kosti**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2014.**

Ovaj diplomski rad izrađen je pri Katedri za anatomiju i kliničku anatomiju pod vodstvom akademika Slobodana Vukičevića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2013/2014.

## POPIS KORIŠTENIH KRATICA:

BMP- koštani morfogenetski protein (prema engl. *bone morphogenetic protein*)

BSA- goveđi serumski albumin (prema engl. *bovine serum albumin*)

CDMP- morfogeni protein izoliran iz hrskavice (prema engl. *cartilage derived morphogenetic protein*)

EDTA- etilendiaminotetraoctena kiselina

ELISA- imunoenzimni test (prema engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

FGF- faktor rasta fibroblasta (prema engl. *fibroblast growth factor*)

GDF- čimbenik rasta i diferencijacije (prema engl. *growth differentiation factor*)

GDNF- neurotropni čimbenik izoliran iz glija stanica (prema engl. *glial cell-derived neurotrophic factor*)

IL 10– interleukin 10

M-CSF- čimbenik poticanja mononuklearnih fagocitnih kolonija (prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*)

mRNA- glasnička ribonukleinska kiselina

PBS- fosfatna puferirana otopina (prema engl. *phosphate buffered saline*)

PBS–T- fosfatna puferirana otopina + 0.05% Tween 20 (Sigma, SAD)

PDGF- čimbenik rasta izoliran iz trombocita (prema engl. *platelet derived growth factor*)

REML- metoda ograničene najveće vjerojatnosti (prema engl. *restricted maximum likelihood*)

Smad – molekula Smad (prema engl. *small mothers against decapentaplegic*)

TGF- transformirajući čimbenik rasta (prema engl. *transforming growth factor*)

TGFβr– receptor transformirajućeg čimbenika rasta

TMB- tetrametilbenzidin

VEGF- vaskularni endotelni čimbenik rasta (prema engl. *vascular endothelial growth factor*)

## SADRŽAJ:

1. SAŽETAK.....	I
2. SUMMARY.....	II
3. UVOD.....	1
3.1. Transformirajući čimbenik rasta (TGF- $\beta$ ).....	1
3.2. Receptori transformirajućeg čimbenika rasta $\beta$ .....	2
3.3. Receptor III transformirajućeg čimbenika rasta $\beta$ .....	2
3.4. Uloga TGF- $\beta$ III receptora u cijeljenju kosti.....	4
4. HIPOTEZA .....	5
5. CILJEVI RADA.....	5
6. ISPITANICI I METODE .....	6
6.1. Ispitanici .....	6
6.2. Prikupljanje uzoraka .....	6
6.3. ELISA .....	6
6.4. Statistička analiza.....	8
7. REZULTATI .....	9
8. RASPRAVA .....	11
9. ZAKLJUČCI .....	13
10. ZAHVALE .....	14
11. LITERATURA .....	15
12. ŽIVOTOPIS.....	19

## 1. SAŽETAK

Novi marker za praćenje cijeljenja kosti u bolesnika s prijelomom duge kosti

Sara Medved

Transformirajući čimbenik rasta beta (TGF- $\beta$ ) pripada velikoj superobitelji čimbenika rasta koji imaju važnu ulogu u mnogim fiziološkim i patološkim stanjima organizma, a djeluje na stanicu preko svojih receptora. TGF- $\beta$  ima značajnu ulogu u proliferaciji epitelnih, endotelnih i hematopoetskih stanica te staničnoj diferencijaciji, cijeljenju rana, upali, angiogenezi i tumorigenezi. Mutacija TGF- $\beta$  i njegovih receptora bitna je u patogenezi bolesti, posebno karcinoma. Uloga TGF- $\beta$  prilikom razvoja i pregradnje kosti prikazana je u mnogim istraživanjima gdje se navedena molekula kod prijeloma kostiju navodi kao jedan od prvih čimbenika koji se može detektirati u krvi pacijenata. TGF- $\beta$  III receptor (TGF $\beta$ rIII) jedan je od najzastupljenijih receptora koji sudjeluje u djelovanju TGF- $\beta$  na stanice. U zdravih ljudi TGF $\beta$ rIII nije detektiran u plazmi, ali je pronađen u pacijenata s prijelomom dugih kostiju. Cilj ove studije je pratiti koncentraciju solubilnog TGF $\beta$ rIII prilikom prijeloma dugih kostiju u ljudi, te utvrditi njegovu potencijalnu ulogu kao biomarkera u procesu koštanog cijeljenja. Istraživanje uključuje 22 pacijenata starija od 18 godina s dijagnozom jednostrukog koštanog prijeloma duge kosti traumatske naravi te 9 zdravih ispitanika bez ozljede koštanog sustava. Uzroci plazme prikupljeni su u različitim vremenskim periodima od trenutka prijeloma te tijekom redovitih kontrola, a zdravim ispitanicima tijekom sistematskog pregleda. Koncentracija TGF $\beta$ rIII u prikupljenim uzorcima plazme određena je pomoću ELISA metode, te analizirana pomoću metode ograničene najveće vjerojatnosti REML. Dobivena koncentracija solubilnog TGF $\beta$ rIII u zdravih ispitanika iznosi  $\bar{X} = 40 \pm 10.7$  pg/mL. Koncentracija solubilnog TGF $\beta$ rIII nakon prijeloma postepeno raste, doseže svoj plato između 12. i 14. tjedna te zatim postupno pada na svoju početnu razinu krajem 25. tjedna. Studija je pokazala kako postoji izražaj TGF $\beta$ rIII u plazmi zdravih pacijenata, te kako se koncentracija TGF $\beta$ rIII prilikom cijeljenja kosti parabolično mijenja. Stoga je za zaključiti kako TGF $\beta$ rIII možemo smatrati potencijalnim biomarkerom u cijeljenju kosti.

Ključne riječi: TGF $\beta$ rIII, betaglikan, biološki marker, prijelom kosti, cijeljenje

## 2. SUMMARY

New marker for following bone healing in patients with long-bone fracture

Sara Medved

Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) belongs to a large growth factor superfamily having an important role in a number of physiologic and pathologic states of the organism, and it binds to the cell by means of its receptors. TGF- $\beta$  has an important role in proliferation of epithelium, endothelium and hematopoietic cells and cell differentiation, wound healing, inflammation, angiogenesis and tumorigenesis. Mutation of TGF- $\beta$  and its receptors is essential in pathogenesis of disease, especially carcinoma. The influence of TGF- $\beta$  during bone formation and remodeling has been shown throughout many researches where the respective molecule in bone fracture is noted as one of primary factors able to be detected in patients' blood. TGF- $\beta$  III receptor (TGF $\beta$ rIII) is among the most present receptors participating in action of TGF- $\beta$  on cells. TGF $\beta$ rIII is not detected in plasma of healthy people, but it has been found in patients with long bone fracture. The aim of this study is to monitor the concentration of soluble TGF $\beta$ rIII during long bone fractures in humans and to determine its possible role as a biomarker in bone healing follow up. The study involved 22 patients aged 18 and above with the diagnosis of single long bone fracture induced by trauma and 9 healthy volunteers (no skeletal trauma). Plasma samples were taken in different temporal instants beginning with moment of fracture during regular control examinations and in healthy subjects during physical examination. TGF $\beta$ rIII concentration in collected samples was determined using ELISA method, and was analyzed using REML method. Concentration of soluble TGF $\beta$ rIII in healthy individuals amounts to  $\bar{X} = 40 \pm 10.7$  pg/mL. Concentration of soluble TGF $\beta$ rIII after fracture rises steadily, reaching plateau between week 12 and 14, and then falls slowly to its initial value at the end of week 25. This study has shown that there is expression of TGF $\beta$ rIII in plasma of healthy individuals and that concentration of TGF $\beta$ rIII during bone healing exhibits parabolic change. It can be concluded therefore that TGF $\beta$ rIII may be considered potential biomarker for bone healing.

Key words: TGF $\beta$ rIII, betaglycan, biological marker, bone fracture, fracture healing.

### 3. UVOD

#### 3.1. Transformirajući čimbenik rasta (TGF- $\beta$ )

Transformirajući čimbenik rasta beta (TGF- $\beta$  prema engl. *transforming growth factor*  $\beta$ ) je član TGF- $\beta$  superobitelji, koja obuhvaća niz proteina, poput aktivina, koštanog morfogenetskog proteina BMP-a (prema engl. *bone morphogenetic protein*), čimbenika rasta i diferencijacije GDF-a (prema engl. *growth differentiation factor*), neurotrofnog čimbenika izoliranog iz glija stanice GDNF-a (prema engl. *glial cell-derived neurotrophic factor*), ali i mnogih drugih. Članovi TGF- $\beta$  superobitelji imaju veliku ulogu u embrionalnom razvoju, staničnoj diferencijaciji, sekreciji hormona te utjecaj na imunološki sustav (Kingsley 1994). Svi pripadnici TGF- $\beta$  superobitelji polaze od zajedničkog prekursora te se proteolitičkim cijepanjem oslobađaju funkcionalni dimeri. Posljedično tomu, sve tri izoforme TGF- $\beta$ : TGF- $\beta$  1, TGF- $\beta$  2, TGF- $\beta$  3 nastaju iz zajedničkog prekursora. Većina tkiva u fiziološkim uvjetima ima normalno izražene molekule TGF- $\beta$ , što je suprotno nekim anti-inflamatornim citokinima, poput IL-10, čija je ekspresija regulirana prisutnošću patogena (Li et al. 2012). U epitelnim stanicama molekula TGF- $\beta$  ima antiproliferativno djelovanje, a takvo djelovanje ima i u početnom stadiju onkogeneze (Hill et al. 2009). TGF- $\beta$  indukcijom inhibitora protein kinaza zaustavlja napredovanje kroz stanični ciklus u G1-fazi (Cooper & Hausman 2004).

Molekula TGF- $\beta$  igra važnu ulogu u mnogim fiziološkim, ali i patološkim stanjima organizma (Santibanez et al. 2011). Poznata je i uloga TGF- $\beta$  molekule u nekim patološkim stanjima poput kardiovaskularnih oboljenja (primjerice u aterosklerozi, arterijskoj hipertenziji, primarnoj plućnoj hipertenziji), bolesti vezivnog tkiva (Marfanov sindrom, fibroza), bolesti mišićno-koštanog sustava (Camurati-Engelmannova bolest, *fibrodisplazija ossificans progressiva*, osteoporoza, Duchennova mišićna distrofija), reproduktivnog sustava (npr. *menopausa precox*), hereditarne karcinomatose (juvenilna polipoza, Cowdenov sindrom, hereditarni nepolipozni karcinom kolona), sporadičnog karcinoma (karcinom dojke, kolorektalni karcinom, karcinom gušterače, karcinom pluća, karcinom prostate), poremećaja razvoja (rascjep nepca, *situs inversus* i *situs ambiguus*) kao i u neurološkim bolestima (Parkinsonova bolest, Alzheimerova bolest) (Santibanez et al. 2011; Gordon & Blobel 2008).



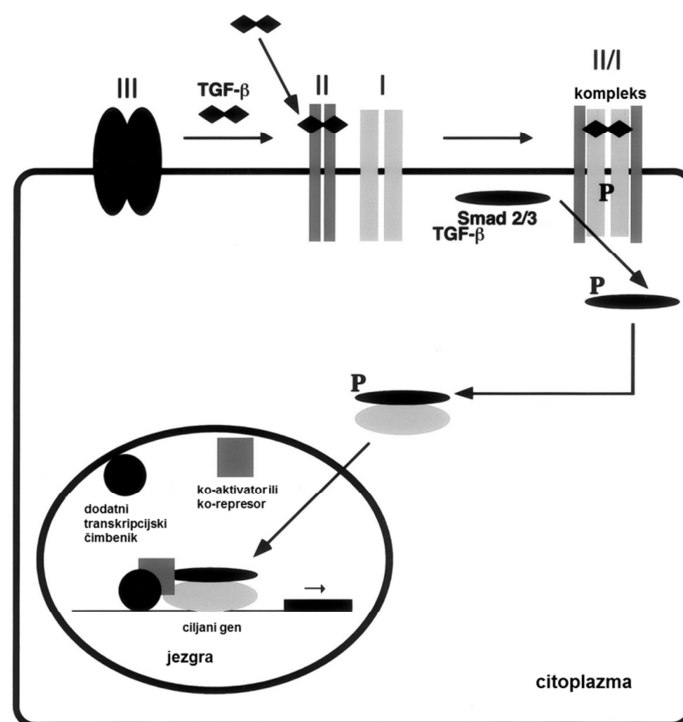
### 3.2. Receptori transformirajućeg čimbenika rasta $\beta$

Djelovanje TGF- $\beta$  na tkiva i stanice ostvaruje putem receptora koji potom utječu na daljnji prijenos signala. TGF- $\beta$  receptori su protein kinaze koje fosforiliraju serinske ili treoninske ostatke na svojim proteinskim supstratima (Cooper & Hausman 2004). Izolirane su dvije vrste receptora za TGF- $\beta$ , izoforme tipa I (TGF $\beta$ rI) i II (TGF $\beta$ rII). Međusobno se razlikuju strukturalno i funkcijski (Pakyari et al. 2013). Radi se o transmembranskim proteinima s kratkom izvanstaničnom regijom, jednostrukom hidrofobnom transmembranskom uzvojnicom i citoplazmatskim dijelom koji djeluje kao serin treonin kinaza. Međusobno se razlikuju u broju cisteinskih ostataka u izvanstaničnoj regiji, te u slijedu aminokiselina koje prethode kinaznoj regiji (Kingsley 1994). TGF $\beta$ rI ne može vezati ligande TGF- $\beta$  1 niti TGF- $\beta$  2, dok TGF $\beta$ rII pokazuje nizak afinitet za TGF- $\beta$  1, a za TGF- $\beta$  2 nema afinitet. TGF- $\beta$  1 veže se visokim afinitetom na receptore TGF $\beta$ rI i TGF $\beta$ rII ukoliko su oba receptora istodobno izražena na membrani. Međutim, zajednički izražaj TGF $\beta$ rI i TGF $\beta$ rII na membrani ne utječe na afinitet vezanja TGF- $\beta$  2, stoga je i tada afinitet vezanja TGF- $\beta$  2 na receptore nizak. Osim vezanja na receptore tipa I i II TGF- $\beta$  se također veže i na njegove koreceptore: endoglin i TGF- $\beta$  III receptor (TGF $\beta$ rIII) (Gatza et al. 2010). Koreceptori olakšavaju vezanje i djelovanje TGF- $\beta$  na receptore tipa I i II na površini stanice. TGF- $\beta$  III receptor na koji je vezana molekula TGF- $\beta$  ima veliki afinitet za vezanje na TGF- $\beta$  1 i TGF- $\beta$  2 molekulu (Lopez-Casillas et al. 1991). Stoga, djelovanje TGF $\beta$ rIII pojačava vezanje TGF- $\beta$  na pripadajuće signalne receptore. To svojstvo posebno je vidljivo na primjeru TGF $\beta$ rI i TGF $\beta$ rII koji u odsutnosti TGF $\beta$ rIII pokazuju slabi afinitet za TGF- $\beta$  2 molekulu. Najveći udio receptora iz TGF- $\beta$  skupine čini upravo TGF- $\beta$  III receptor.

### 3.3. Receptor III transformirajućeg čimbenika rasta $\beta$

TGF- $\beta$  III receptor ili betaglikan je transmembranski proteoglikan koji se sastoji od dvije velike izvanstanične regije te kratke citoplazmatske domene (Santibanez et al. 2011). S izvanstaničnom N-regijom veže na sebe TGF- $\beta$  molekulu koju onda dalje prezentira TGF- $\beta$  I ili II receptoru, gdje vezanje liganda na betaglikan dovodi do formiranja odnosno stabilizacije TGF $\beta$ rI i TGF $\beta$ rII te do aktivacije kinazne regije TGF $\beta$ rII koja potom fosforilira i time aktivira TGF $\beta$ rI. Tako aktivirani TGF $\beta$ rI započinje

kaskadu signalnog puta fosforilacijom pripadnika porodice transkripcijskih čimbenika Smad, koji se potom translociraju u jezgru gdje utječu na izražaj gena (Slika 1.) (Shi & Massague 2003). Stanice imaju mogućnost odcjepljenja izvanstanične regije betaglikana sa svoje stanične membrane te tako otpušteni se naziva solubilni betaglikan. U takvom obliku betaglikan gubi mogućnost prezentiranja TGF- $\beta$  molekule TGF- $\beta$  receptorima I i II, dapače, topljivi betaglikan je potentni inhibitor vezanja TGF- $\beta$  molekule na membranske receptore (Lopez-Casillas et al. 1994). Mnoge studije dokazale su važnost TGF $\beta$ RIII već u embrionalnom razvoju. U miševa s izbačenim genom za TGF $\beta$ RIII zamijećena je uloga TGF $\beta$ RIII u razvoju testisa. U tako genetski modificiranih miševa pronađen je i reducirani broj nefrona i hipoplazija bubrega, inducirana apoptoza hepatocita te manjkavi razvoj koronarnih arterija, što sve posljedično dovodi do smrti miševa prije okota (Sarraj et al. 2013; Walker et al. 2011; Stenvers et al. 2003; Compton et al. 2007). Osim spomenutog, funkcija TGF $\beta$ RIII proučavana je i u onkogenezi (Mytheeye & Blobe 2009).



Slika 1. Glavni signalni put transformirajućeg čimbenika rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Prilagođeno prema: Wells (2000), uz dopuštenje American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology

### 3.4. Uloga TGF- $\beta$ III receptora u cijeljenju kosti

Kost je u stalnom procesu pregradnje koju čini uravnoteženi sustav razgradnje i izgradnje djelovanjem koštanih stanica te velikog broja regulatornih molekula. Prilikom koštanog prijeloma dolazi to otpuštanja čimbenika rasta i citokina, čija se prisutnost može detektirati u plazmi i urinu (Anderson & Anderson 2002). Većinu njih sintetizira koštano tkivo, a manji broj upalne stanice (Barnes et al. 1999). Među prvim čimbenicima koji se neposredno poslije prijeloma mogu detektirati su čimbenik rasta izoliran iz trombocita, PDGF (prema engl. *platelet derived growth factor*) te TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  je pleotropni čimbenik rasta kojeg u stvorenom hematomu oslobađaju degranulirani trombociti te izvanstanični matriks na mjestu prijeloma (Bolander 1992). Nakon otpuštanja citokina slijedi infiltracija makrofaga i ostalih stanica upale koje podupiru sintezu PDGF-a i TGF- $\beta$  te čimbenik rasta fibroblasta, FGF (prema engl. *fibroblast growth factor*) (Barnes et al. 1999). Ekspresija TGF- $\beta$  izražena je tijekom cijele hondrogeneze i enhondralnog okoštavanja, s vrhuncem koncentracije mRNA oko 6. dana poslije frakture. Nakon 10. dana razina ekspresije mRNA pada, da bi se ponovno povećala 14. dan i kao takva ostala uvećana do kraja 4. tjedna. Rast koncentracije TGF- $\beta$  do 6. dana podudara se s hipertrofijom hondrocita, dok pad u koncentraciji TGF- $\beta$  poslije 4. tjedna korelira s vrhuncem ekspresije kolagena tipa II (Joyce et al. 1990; Barnes, et al. 1999).

Prva saznanja o ulozi TGF- $\beta$  u cijeljenju kosti dobivena su u studiji o cijeljenju defekta lubanje u zečeva kod koje je jednokratna primjena rekombinantnog humanog TGF- $\beta$ 1 na koštani defekt inducirala ubranu migraciju i proliferaciju osteoblasta u prva tri dana, dok se nova kost formirala i u potpunosti zatvorila defekt unutar 28 dana (Richardson et al. 1993). Osim spomenutog utjecaja na plosnatu kost, zamijećen je utjecaj na duge kosti. U studiji koja je pratila cijeljenje goljenične kosti u zečeva kontinuirana infuzija TGF- $\beta$  proteina rezultirala je povećanom maksimalnom snagom savitljivosti te uvećanom formacijom kalusa (Lind et al. 1993). Međutim, upravo način primjene TGF- $\beta$  u vidu kontinuirane infuzije jedan je od glavnih nedostataka ove spoznaje. Naime, u pokušajima reproduciranja rezultata pri individualnim dozama isti nisu postignuti. Tako se smatra da je upravo način primjene, poput kontinuirane infuzije ili učestalog injiciranja TGF- $\beta$  na mjesto frakture limitirao kliničku korisnost (Barnes et al. 1999).

Solubilni oblik TGF $\beta$ III u zdravih ljudi do sada nije karakteriziran u ljudskoj plazmi, no njegova prisutnost je potvrđena u uzorcima plazme pacijenata s prijelomom dugih kostiju tehnikom spektrometrije (Grgurevic et al. 2007, 2012). Prisutnost TGF $\beta$ III u patološkom stanju poput koštanog prijeloma nameće se kao mogućnost definiranja TGF $\beta$ III kao biomarkera u praćenju dinamike cijeljenja. Određivanje TGF $\beta$ III receptora u plazmi pacijenata s koštanim prijelomom moglo bi značajno pomoći i nadopuniti konvencionalne metode poput rendgenskih slika, magnetske rezonance te scintigrafije kostiju (Grgurevic et al. 2012), posebice kada se radi o prijelomima koji imaju veliku mogućnost nastanka pseudoartroze. Upotreba TGF $\beta$ III kao specifičnog biomarkera uz pomoć kojeg bi se kroz promjene koncentracije moglo pratiti cijeljenje kosti zasigurno bi pripomogla dijagnozi, terapiji, ali i prognozi.

#### **4. HIPOTEZA**

Promjena koncentracije solubilnog TGF $\beta$ III u plazmi bit će jasno definirana za svaku pojedinu fazu koštane regeneracije, odnosno cijeljenja.

#### **5. CILJEVI RADA**

Opći cilj ove studije je utvrditi mogućnost korištenja solubilnog TGF $\beta$ III kao biomarkera cijeljenja kostiju. Specifični cilj je pratiti ekspresiju solubilnog TGF $\beta$ III u plazmi pacijenata s prijelomom duge kosti, te opisati opaženu promjenu ekspresije.

## 6. ISPITANICI I METODE

### 6.1. Ispitanici

U studiju su bili uključeni pacijenti stariji od 18 godina s dijagnozom jednostrukog prijeloma duge kosti traumatske naravi (isključenje ženskih osoba starijih od 65 godina radi moguće prisutnosti nedijagnosticirane osteoporoze). Kao kontrola korišteni su uzorci plazme zdravih osoba bez prisutnosti koštane traume. Ispitanicima je objašnjen cijeli postupak i uvjeti uključivanja u studiju, te je od svakog dobiven informirani pristanak za korištenje uzorka plazme u znanstvene svrhe. Za navedeno dobivene su suglasnosti institucionalnih Etičkih povjerenstava, Klinike za traumatologiju KBC „Sestre milosrdnice“ gdje se odvijalo prikupljanje uzoraka kao i Medicinskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu gdje je napravljena analiza uzoraka.

### 6.2. Prikupljanje uzoraka

Uzimanje uzoraka ispitanicima s prijelomima vršilo se u ambulanti Klinike za traumatologiju KBC „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu u razdoblju od 2009. do 2011. godine po postavljanju dijagnoze jednostrukog koštanog prijeloma duge kosti. Uzimanje uzoraka ispitanicima bez prijeloma provodilo se prilikom redovnih sistematskih pregleda nakon utvrđivanja zdravstvenog stanja.

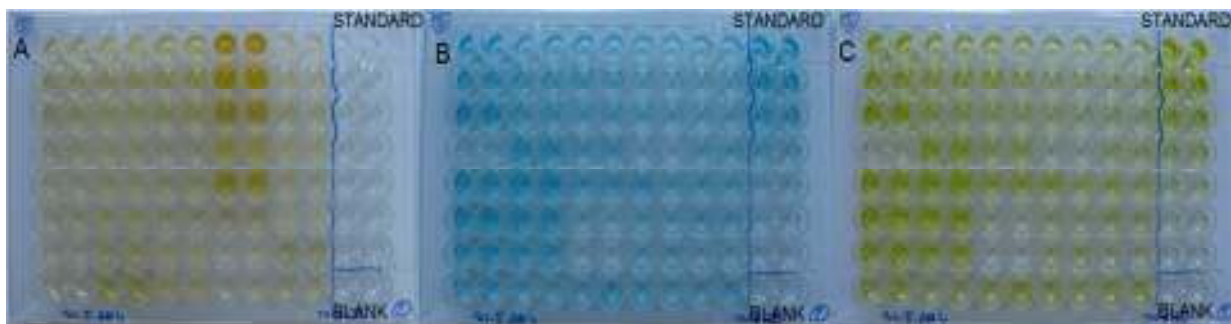
Prikupljeni su uzorci plazme od 22 pacijenta s dijagnosticiranim koštanim prijelomom, te 9 uzoraka plazme zdravih pojedinaca. Zdravi dobrovoljci dali su po jedan uzorak pune krvi. Ispitanicima s prijelomom uzeto je najmanje 1 do najviše 7 uzoraka u različitim vremenskim intervalima u odnosu na dan prijeloma. Uzorci krvi vađeni su u epruvete s antikoagulansom EDTA (etilendiaminotetraoctena kiselina) (BD, SAD, 4 ml). Uzorci su vađeni unutar 24 sata od postavljanja dijagnoze, zatim unutar 48 sati od postavljanja dijagnoze te po dolasku pacijenta na kontrolu ambulantno (4, 6 odnosno 7 dana poslije prijeloma, a potom varijabilno do 176. dana nakon dijagnosticiranja prijeloma). Nakon prikupljanja uzorci krvi su centrifugirani na 20 minuta pri centrifugalnoj sili od 1000 x g, pri čemu se plazma odvojila od krvnih stanica. Plazma je odvojena u čiste polipropilenske tube te je ista zamrznuta prvo na -20°C, potom na -80°C. Do analize uzorci su bili pohranjeni na temperaturi od -80°C.

### 6.3. ELISA

Prikupljeni uzorci plazme su radi utvrđivanja TGFβrIII kao potencijalnog biomarkera cijeljenja prijeloma kosti analizirani pomoću ELISA metode (prema engl. *Enzyme-*

*Linked Immunosorbent Assay*). Uzorci su analizirani u mikrotitarskim pločicama (Immunolon, 2HB, ThermoScientific, SAD) čiji su bunarčići bili presvučeni TGFβrIII monoklonskim protutijelima (Mab242-1, R&D, SAD) koja su korištena kao protutijela za vezanje TGFβrIII iz plazme pacijenata. Postupak vezanja u bunarčiće na pločici odvijao se inkubacijom protutijela s 1x PBS-om (fosfatna puferirana otopina) na +4°C preko noći. Sljedeći dan pločica je isprana tri puta s 1x PBS-T puferom (fosfatna puferirana otopina + 0.05% Tween 20 (Sigma, SAD)), te su nespecifična vezna mjesta blokirana s 1% BSA (albumin iz goveđeg seruma) u 1xPBS-u inkubacijom 30 minuta na 37°C. Nakon blokiranja pločica je isprana 3 puta s 1x PBS-T puferom te je nanesen standard u serijskim razrjeđenjima od 300ng/mL do 6.25ng/mL i prikupljeni uzorci plazme u ukupnom volumenu od 100 μL po bunarčiću.

Nakon 120 minuta inkubacije na +37°C, pločica je isprana 3 puta s 1x PBS-T puferom nakon čega je uslijedilo dodavanje detektirajućeg protutijela koje prepoznaje epitop TGFβrIII proteina (poliklonsko protutijelo proizvedeno u kunića u Laboratoriju za mineralizirana tkiva) u razrjeđenju od 1:5000 i posljedična inkubacija u trajanju od 60 minuta na 37°C. Nakon inkubacije, pločica je isprana 3 puta s 1x PBS-T puferom te je na pločicu nanoseno sekundarno protutijelo proizvedeno u kunića konjugirano s biotinom (anti-rabbit+Biotin, BAF0008, R&D, SAD). Zatim je uslijedila inkubacija od 45 minuta na 37°C nakon čega je pločica isprana 3 puta s 1x PBS-T puferom. Za detekciju vezanih TGFβrIII proteina korišten je kompleks streptavidina konjugiranog s enzimom peroksidazom (DY998, R&D, SAD) te je pločica inkubirana 30 minuta na +37°C. Uslijedilo je ispiranje pločice 3 puta s 1x PBS-T puferom i dodavanje supstrata tetrametilbenzidina, TMB-a (T2885, Sigma, SAD), koji je bio pomiješan sa citrat-acetatnim puferom, pH 5.9, i vodikovim peroksidom, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kemika, Hrvatska). Nakon pojave plavog obojenja, reakcija je zaustavljena 1M otopinom sumporne kiseline, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Apsorbancija uzoraka je očitana na Biotek El808 čitaču mikrotitarskih pločica (Biotek, SAD) pri 450 nm. Iz krivulje standarda, nelinearnom regresijom u 4 točke izračunata je koncentracija TGFβrIII proteina u uzorcima plazme pacijenata s prijelomom.



Slika 2. ELISA metoda: A) mikrotitarska pločica s obostrano nanesenim uzorcima plazme pacijenata s dijagnozom prijeloma duge kosti, B) mikrotitarska pločica nakon dodavanja supstrata TMB u bunarčice, C) mikrotitarska pločica nakon zaustavljanja reakcije otopinom  $H_2SO_4$ .

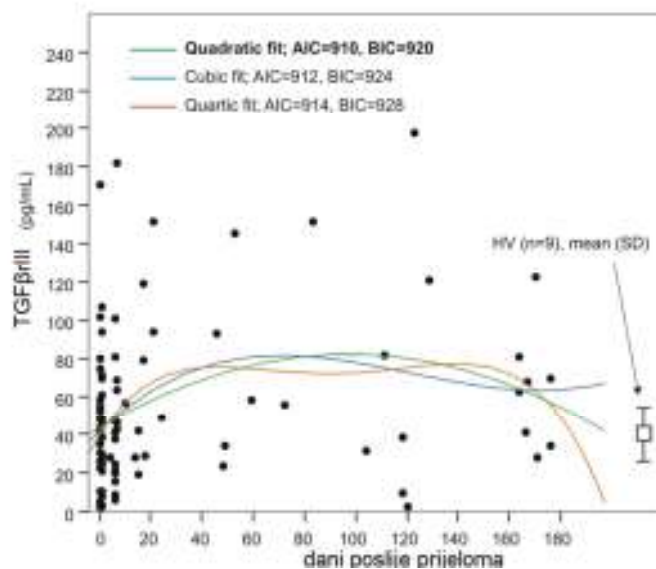
#### 6.4. Statistička analiza

Iz dobivenih vrijednosti koncentracija  $TGF\beta_{rIII}$  proteina u plazmi pacijenata s prijelomom dugih kostiju izbačeni su oni uzorci za koje je primijećeno povećano geliranje plazme budući da postoji mogućnost smanjena koncentracije  $TGF\beta_{rIII}$  proteina u plazmi takvih uzoraka. Analiza prema mješovitom modelu zasniva se na primjeni metode ograničene najveće vjerojatnosti REML (prema engl. *restricted maximum likelihood*) metode procjene komponenti varijance. U ovom slučaju se izbor najboljeg modela provodi na temelju Akaikeovog informacijskog kriterija (AIC) i Bayesovog informacijskog kriterija (BIC). REML metodom dobiven je uvid u zastupljenost pojedinih izvora varijabilnosti u ukupnoj varijanci za sve istraživane varijable. U analizi se koristila programska podrška SAS za operacijski sustav Windows 9.3 (SAS Inc., Cary, NJ) licenciran Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

## 7. REZULTATI

Dobivene koncentracije solubilnog TGF $\beta$ III proteina u plazmi pacijenata širokog su raspona te se kreću od 1.12 pg/mL do 197.78 pg/mL.

Slika 3. prikazuje trend kretanja koncentracija TGF $\beta$ III proteina u pacijenata tijekom vremena kao i aritmetički sredinu i standardnu devijaciju koncentracije TGF $\beta$ III proteina u plazmi osoba bez dijagnosticiranog prijeloma (HV). Rezultati su pokazali kako u osoba bez dijagnosticiranog prijeloma postoji izražaj TGF $\beta$ III ( $\bar{X}=40\pm 10.7$  pg/mL). Promjenu koncentracije solubilnog TGF $\beta$ III u pacijenata s koštanim prijelomom najbolje opisuje polinomijalni model 2. reda (kvadratični model, eng. *quadratic fit*), odnosno parabola. U tom su modelu Akaikeov i Bayesov informacijski kriteriji najniži. Linija kvadratičnog modela presijeca ordinatu na vrijednosti koncentracije od 40pg/mL, upravo u vrijednostima aritmetičke sredine izmjerenih koncentracija ispitanika bez prijeloma.

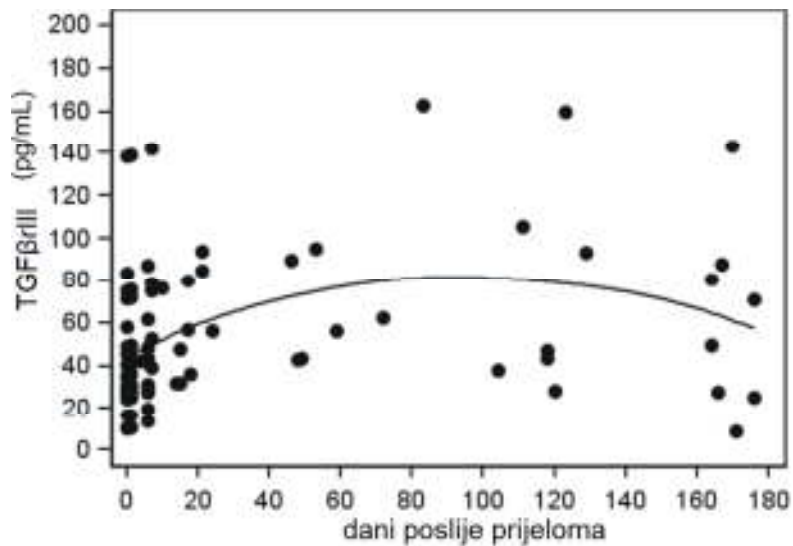


Slika 3. Prikaz raspodjele koncentracije uzoraka ispitanika te opis raspodjele koncentracije uzoraka pacijenata s prijelomom polinomijalnim modelom 2. reda

Pomoću REML metode izrađena je prediktivna krivulja koja opisuje kretanje solubilnog TGF $\beta$ III proteina u plazmi poslije jednostrukog prijeloma duge kosti. Fiksni elementi su „vrijeme“ te „spol“, dok je nasumičan efekt (G-matriks kovarijance) odnos ponovljenih mjerenja u svakog ispitanika.

Slika 4. prikazuje kvadratični model krivulje koja opisuje prediktivnu promjenu koncentracija solubilnog TGF $\beta$ III proteina u ispitanika s prijelomom.





Slika 4. Prikaz kvadratične krivulje koja opisuje prediktivnu promjenu koncentracije TGFβrIII u ispitanika s prijelomom duge kosti

Utvrđena promjena TGFβrIII proteina u cijeljenju kosti može se opisati parabolom: koncentracija TGFβrIII uslijed prijeloma postepeno raste, doseže svoj plato između 12. i 14. tjedna od nastanka prijeloma, te zatim počinje padati, da bi kroz 180 dana koncentracija TGFβrIII došla na početnu razinu trenutka nastanka prijeloma.

Tablica 1. prikazuje vremensko gibanje koncentracije TGFβrIII proteina u ispitanika ženskog spola. Razlike u spolu nisu statistički značajne ( $p < 0.414$ ).

Tablica 1. Utjecaj vremena na TGFβrIII vrijednost u plazmi

	koeficijent (95% CI)	p-vrijednost
Ženski spol	12.4 (-18.5, 43.2)	0.414
Vrijeme (u danima)	0.530 (0.133, 0.927)	0.001
Umnožak vremena	-0.003 (-0.006, -0.001)	0.014

Cijeli model kvadratične krivulje objašnjava oko 9% varijabilnosti izmjerenih koncentracija.

## 8. RASPRAVA

Dosadašnje studije prikazuju proces cijeljenja ne samo kao lokalnu, već i sistemsku reakciju uslijed uklanjanja bioaktivnih molekula s mjesta prijeloma (Sarahrudi et al. 2011). Mnoge studije opažaju karakteristične promjene u serumskim koncentracijama brojnih enzima i čimbenika rasta tijekom cijeljenja (Weiss et al. 2005; Zimmermann et al. 2005; Giannoudis et al. 2008). Ova studija prikazuje koncentraciju solubilnog TGF $\beta$ III u serumu pacijenata s prijelomom duge kosti i uspoređuje ju s koncentracijom u zdravih ljudi. U našoj studiji promjene koncentracije ne pokazuju razlike između spolova, stoga možemo komentirati dobivene rezultate neovisno o spolu ispitanika.

Rezultati su pokazali kako u osoba bez dijagnosticiranog prijeloma postoji izražaj solubilnog TGF $\beta$ III, dok u dosadašnjim istraživanjima ekspresija solubilnog TGF $\beta$ III u zdravih nije zamijećena (Grgurevic et al. 2012). Kako se TGF- $\beta$  može detektirati pri mnogim patološkim stanjima (Santibatez et al. 2011; Gordon & Blobe 2008) ne možemo isključiti mogućnost da nasumično odabranim ispitanicima bez prijeloma nije u podlozi nedijagnosticirani patološki proces. Međutim, ukoliko i postoji patološki proces u tijeku, nisu se još razvili simptomi ni znakovi bolesti, budući da su ispitanici poslije sistematskog pregleda utvrđeni kao zdravi. Ova spoznaja je stoga novi uvid u razumijevanje ekspresije solubilnog TGF $\beta$ III u zdravih osoba.

Rezultati su pokazali kako poslije jednostrukog prijeloma duge kosti dolazi do promjena koncentracije TGF $\beta$ III u plazmi. Takvi rezultati idu u prilog dosadašnjim spoznajama o TGF $\beta$ III (Grgurevic et al. 2007, 2012). Plato koncentracije solubilnog TGF $\beta$ III u plazmi pacijenata nastupa između 12. i 14. tjedna od nastanka prijeloma. S druge strane, plato koncentracije TGF- $\beta$  1 nastupa između 4. i 8. tjedna od nastanka prijeloma (Sarahrudi et al. 2011). U tom periodu dolazi do pozitivne povratne sprege u aktivaciji osteoblasta putem TGF- $\beta$ . Ovakve promjene uočene su i u promjenama koncentracije čimbenika poticanja mononuklearnih fagocitnih kolonija M-CSF-a (prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*) i vaskularnog endotelnog čimbenika rasta VEGF-a (prema engl. *vascular endothelial growth factor*) (Sarahrudi et al. 2011), stoga se može zaključiti da je njihova sistemska prisutnost potrebna prilikom cijeljenja. Budući da za vezanje TGF- $\beta$  1 nije nužno potreban TGF $\beta$ III, sporije dosezanje platoa TGF $\beta$ III u ovoj studiji te naknadni pad može biti pripisan interakciji s TGF- $\beta$  2 za čije djelovanje je TGF $\beta$ III značajnije potreban.

Trajanje cijeljenja prijeloma dugih kostiju u odraslih traje od 4. do 16. tjedana (Sosa et al. 2007). Primijećeno je da koncentracija TGFβrIII krajem 25. tjedna (180. dan) dolazi na razinu koncentracija TGFβrIII zdravih ispitanika, stoga je za pretpostaviti da iako simptomatski niti rendgenološki znakovi remodeliranja kosti do tada više nisu vidljivi, na staničnoj osnovi i dalje je uvećani izražaj TGFβrIII. U studiji ne definiramo različite vrste prijeloma dugih kostiju, stoga možemo samo nagađati promjenu TGFβrIII u specifičnom prijelomu, poput usporedbe ekspresije u prijelomu palčane kosti čije cijeljenje traje od 4. do 6. tjedana te bedrene kosti čije cijeljenje traje od 12. do 16. tjedana. No, razine TGFβrIII poprimaju početnu vrijednost daleko poslije zacjeljivanja dugih kostiju, što govori u prilog dugotrajnoj staničnoj ekspresiji TGFβrIII poslije prijeloma, a za pretpostaviti je mogućnost promjene u kretanjima koncentracije solubilnog TGFβrIII prilikom nastanka pseudoartroze. Također, vrijednosti TGFβrIII bi se mogle uspoređivati i u različitim vrstama terapije, poput imobilizacije u sadrenom zavoju, odnosno različitim metodama kirurške imobilizacije. Isto tako, u studiji nisu uključene informacije o dobi ispitanika. Možemo pretpostaviti da određene razlike postoje u kontekstu izražaja TGFβrIII u ovisnosti o dobi. Povećanjem broja ispitanika i broja uzoraka prilikom cijeljenja dobio bi se točniji uvid u koncentracije TGFβrIII, te u promjenu koncentracije. Usporedbom praćenja solubilnog TGFβrIII s rendgenskim snimkama cijeljenja koštanog prijeloma postigao bi se i jasniji klinički značaj rezultata. Ovakav tip istraživanja mnogo ovisi o suradljivosti ispitanika, odnosno o njihovim dolascima na redovite kontrole u nadležnu zdravstvenu ustanovu, te je važno prilikom daljnjeg istraživanja solubilnog TGFβrIII kao biomarkera za cijeljenje kosti sve ove parametre imati u vidu.

## 9. ZAKLJUČCI

1. Solubilni TGF $\beta$ III prisutan je u plazmi zdravih ispitanika u koncentraciji od  $\bar{X}=40\pm 10.7$  pg/mL.
2. U pacijenata s prijelomom duge kosti utvrđen je trend kretanja vrijednosti koncentracije solubilnog TGF $\beta$ III koji opisuje parabolična, kvadratna krivulja: koncentracija TGF $\beta$ III u serumu pacijenata uslijed prijeloma duge kosti počinje rasti, da bi između 12. i 14. tjedna nastupio plato krivulje, nakon čega dolazi do smanjenja koncentracije TGF $\beta$ III na razinu detektirane koncentracije TGF $\beta$ III u serumu zdravih ispitanika krajem 25. tjedna.
3. TGF $\beta$ III možemo smatrati potencijalnim biomarkerom u cijeljenju kosti.
4. Za daljnju verifikaciju solubilnog TGF $\beta$ III kao biomarkera potrebno je sustavno korelirati ovdje uporebljenu metodu sa standardnim metodama praćenja cijeljenja, ovisno o spolu, dobi, vrsti i mjestu prijeloma te vrstom terapije.

## 10. ZAHVALE

Iskreno se zahvaljujem akademiku Slobodanu Vukičeviću na nesebičnoj pomoći kao i na izuzetnoj motiviranosti tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se prof.dr.sc. Lovorki Grgurević na stručnoj potpori i iskazanom povjerenju.

Od srca se zahvaljujem i dipl.ing. Igoru Erjavcu na ukazanom strpljenju i velikodušnoj pomoći uz koju je ovaj rad s lakoćom dovršen.

Zahvaljujem se mr.sc. Draganu Đurđeviću na pomoći prilikom prikupljanja uzoraka.

Moje zahvale također idu prof.dr.sc. Vladimiru Trkulji na iznimno učinkovitoj pomoći pri obradi podataka.

Također, veliko hvala svim djelatnicima Laboratoriju za mineralizirana tkiva pri Centru za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilištu u Zagrebu.

## 11. LITERATURA

Anderson NL, Anderson NG (2002) The human plasma proteome history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 11:845-867.

Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (1999) Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 14:1805-1815.

Bolander ME (1992) Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol* 200:165-70.

Compton LA, Potash DA, Brown CB, Barnett JV (2007) Coronary vessel development is dependent on the type III transforming growth factor  $\beta$  receptor. *Circ Res* 101:784-791.

Cooper GM, Hausman RE (2004) *The Cell: A Molecular Approach*, 3rd ed. Washington, D.C.: ASM Press; Sunderland, MA: Sinauer Associates. Chapter 13.

Gatza CE, Oh SY, Blobel GC (2010) Roles for the type III TGF- $\beta$  receptor in human cancer. *Cell Signal* 8:1163-1174.

Giannoudis PV, Pountos I, Morley J, Perry S, Tarkin HI, Pape HC (2008) Growth factor release following femoral nailing. *Bone* 42:751–757.

Gordon KJ, Blobel GC (2008) Role of transforming growth factor- $\beta$  superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1782:197-228.

Grgurevic L, Macek B, Durdevic D, Vukicevic S (2007) Detection of bone and cartilage-related proteins in plasma of patients with a bone fracture using liquid chromatography-mass spectrometry. *Int Orthop* 31:743-751.

Grgurevic L, Macek B, Vukicevic S (2012) Blood biomarkers for bone fracture and cartilage injury. United States Patent No.: US 8,182,998 B2 (May 22, 2012).

Hill JJ, Tremblay TL, Cantin C, O'Connor-McCourt M, Kelly JF, Lenferink A (2009) Glycoproteomic analysis of two mouse mammary cell lines during transforming growth factor (TGF)-beta induced epithelial to mesenchymal transition. *Proteome Sci* 7:2.

Kingsley DM (1994) The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organism. *Genes Dev* 8:133-146.

Joyce ME, Jingushi S, Bolander ME (1990) Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. *Orthop Clin North Am* 21:199-209.

Li X, Mai J, Virtue A, Yin Y, Gong R, Sha X, Gutchigian S, Frisch A, Hodge I, Jiang X, Wang H, Yang XF (2012) IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine-a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines. *PLoS One* 7:e33628. doi: 10.1371/journal.pone.0033628

Lind M, Schumacker B, Soballe K, Keller J, Melsen F, Bunger C (1993) Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop Scand* 64:553-556.

Lopez-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massague J (1991) Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- $\beta$  receptor system. *Cell* 67: 785-795.

Lopez-Casillas F, Payne HM, Andres JL, Massague J (1994) Betaglycan can act as a dual modulator of TGF- $\beta$  access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol* 124:557-568.

Mytheye K, Blobe Gc (2009) Proteoglycan signaling co-receptors: roles in cell adhesion, migration and invasion. *Cell Signal* 11:1548-1558.

Pakyari M, Farrokhi A, Mahaklooei MK, Ghahary A (2013) Critical role of transforming growth

factor beta in different phases of wound healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 5:215-224.

Richardson L, Zioncheck TF, Amento EP, Deguzman L, Lee WP, Xu Y, Beck LS (1993) Characterization of radioiodinated recombinant human TGF-beta 1 binding to bone matrix within rabbit skull defects. *J Bone Miner Res* 8: 1407-14.

Santibanez JF, Quintanilla M, Bernabeu C (2011). TGF- $\beta$ / TGF- $\beta$  receptor system and its roel in physiological and pathological conditions- *Cli Sci* 121:233-251.

Sahrudi K, Thomas A, Mousavi M, Kaiser G, Kottstorfer J, Kecht M, Hajdu S, Aharinejad S (2011) Elevated transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) levels in human fracture healing. *Injury* 42(8): 833-837.

Sarraj MA, Escalona RM, Western P, Findlay JK, Stenvers KL (2013) Effects of TGFbeta2 on wild-type and Tgfbr3 knockout mouse fetal testis- *Biol Reprod* 88:66. doi: 10.1095/bioreprod.112.102194.

Shi Y, Massague J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 13;113(6):685-700.

Sosa T, Sutlic Z, Stanec Z, Tonkovic I (2007) *Surgery*. Zagreb: Naklada Ljevak. Chapter 30.

Stenvers KL, Tursky ML, Harder KW, Kontouri N, Amatayakul-Chantler S, Grail D, Small C, Weinberg RA, Sizeland AM, Zhu HJ (2003) Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos. *Mol Cell Biol* 12:4371-4385.

Walker KA, Sims-Lucas S, Caruana G, Cullen-McEwen L, Li J, Sarraj MA, Bertram JF, Stenvers KL (2011) Betaglycan is required for the establishment of nephron endowment in the mouse. *PLoS One*. April 18;6:e18723. doi: 10.1371/journal.pone.0018723.



Weiss S, Zimmermann G, Baumgart R, Kasten P, Bidlingmaier M, Henle P (2005) Systemic regulation of angiogenesis and matrix degradation in bone regeneration – distraction osteogenesis compared to rigid fracture healing. *Bone* 37:781–790.

Wells RG (2000) Fibrogenesis: TGF- $\beta$  signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G845-G850.

Zimmermann G, Henle P, Kusswetter M (2005) TGF-beta1 as a marker of delayed fracture healing. *Bone* 36:779–785.

## 12. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 10. studenoga 1989. godine u Zagrebu gdje sam pohađala osnovnu i srednju školu te sam maturirala na XV gimnaziji. Godine 2008. upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, na kojem sam trenutačno upisana u 12. semestar. 2009. godine nagrađena sam Dekanovom nagradom kao najbolja studentica prve godine. Dvije sam godine bila demonstrator na Katedri za anatomiju i kliničku anatomiju. Primala sam stipendiju za najbolje studente (2009./2010.) odnosno za deficitarna zanimanja (2010./2011.) od Nacionalne Zaklade za potporu učenikom i studentskom standardu iz Zagreba, također sam bila stipendist Sveučilišta u Zagrebu u kategoriji izvrsnost (2012./2013.), a trenutno sam stipendist Grada Zagreba (2013/2014). Od svibnja 2012. sam članica Savjeta Mladih Grada Zagreba, predložena od strane CroMSIC-a. Licencirana sam učiteljica skijanja pri Hrvatskom zboru učitelja i trenera sportova na snijegu (HZUTS) od 2012. godine. Aktivno se služim engleskim, te pasivno njemačkim jezikom.