

Usporedba dinamike nastajanja ektopične kosti primjenom koštanog morfogenetskog proteina 2 na nosaču kolagenske spužvice i koštanog morfogenetskog proteina 6 u autolognom krvnom ugrušku

Ivanjko, Natalia

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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:105:109998>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-22**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Natalia Ivanjko

**Usporedba dinamike nastajanja
ektopične kosti primjenom koštanog
morfo-genetskog proteina 2 na nosaču
kolagenske spužvice i koštanog
morfo-genetskog proteina 6 u autolognom
krvnom ugrušku**

DISERTACIJA



Zagreb, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Natalia Ivanjko

**Usporedba dinamike nastajanja
ektopične kosti primjenom koštanog
morfo-genetskog proteina 2 na nosaču
kolagenske spužvice i koštanog
morfo-genetskog proteina 6 u autolognom
krvnom ugrušku**

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za mineralizirana tkiva u sklopu Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu (podjedinica regenerativna medicina) Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: Akademik Slobodan Vukičević

ZAHVALA

Zahvaljujem se svom mentoru, akademiku Slobodanu Vukičeviću na stručnom vodstvu, neiscrpoj inspiraciji, savjetima i pomoći tijekom izrade ovog rada. Hvala Vam na ukazanom povjerenju, strpljenju i potpori u početcima moje znanstvene karijere i prenesenom znanju. Hvala Vam što ste me prepoznali i izvukli najbolje od mene.

Zahvaljujem se Nikoli na neiscrpoj potpori i ljubavi, motivaciji, te savjetima tijekom cjelokupnog zajedničkog rada. Hvala ti na svemu; bez tebe ovo ne bi bilo moguće.

Zahvaljujem se prof.dr.sc. Nataši Kovačić i prof.dr.sc. Danki Grčević iz Laboratorija za molekularnu imunologiju na savjetima i pomoći tijekom provedbe pokusa karakterizacije stanica protočnom citometrijom.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Laboratorija za Mineralizirana tkiva na pomoći i savjetima tijekom izrade ove disertacije. Veliko hvala Đurđici Car i Mirjani Mariji Renić na predanom radu i izradi izvanrednih histoloških preparata te stručnosti u svim animalnim pokusima. Zahvaljujem se kolegi dr.sc. Igoru Erjavcu na edukaciji oko mikroCT analize, te kolegici dr.sc. Tatjani Bordukalo-Nikšić na savjetima oko ELISA-e. Hvala kolegici Marini Milešević na pomoći prilikom animalnih pokusa i kolegici Viktoriji Rumenović na pomoći oko imunohistokemijskih analiza.

Neizmjereno hvala mojim roditeljima i sestri Luciji na beskonačnoj podršci i ljubavi.

“Sve se može, kad se hoće.”

Istraživanje provedeno u svrhu ove disertacije financirao je Europski fond za regionalni razvoj u sklopu Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu (projekt Reproaktivna i regenerativna medicina – istraživanje novih platformi i potencijala, KK.01.1.1.01.0008).

Natalia Ivanjko je dobitnica stipendije Nacionalnog programa stipendiranja L'Oreal-UNESCO „Za žene u znanosti“ 2022., koje je financirano od strane L'Oréal ADRIA d.o.o. i Hrvatskog povjerenstva za UNESCO.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Koštani morfogenetski proteini	1
1.1.1.	Otkriće koštanih morfogenetskih proteina	1
1.1.2.	Definicija i klasifikacija	2
1.1.3.	Struktura	3
1.1.4.	Biološka aktivnost koštanih morfogenetskih proteina	5
1.1.4.1.	Antagonisti i potencijatori.....	6
1.2.	Klinička primjena koštanih morfogenetskih proteina	9
1.2.1.	Kliničke indikcije	9
1.2.2.	rhBMP7	10
1.2.3.	rhBMP2	11
1.2.3.1.	“Off-label” primjena i nuspojave.....	12
1.2.3.2.	Dinamika otpuštanja	13
1.3.	Razvoj novih alternativnih osteoinduktivnih rješenja	15
1.3.1.	Razvoj novih nosača za koštane morfogenetske proteine	15
1.3.2.	Animalni modeli u istraživanju regeneracije kosti primjenom koštanih morfogenetskih proteina	16
1.3.3.	OSTEOGROW	17
2.	HIPOTEZA	20
3.	CILJEVI RADA	21
3.1.	Opći cilj	21
3.2.	Specifični ciljevi.....	21
4.	MATERIJALI I METODE	22
4.1.	<i>In vitro</i> pokusi: aktivnost i dinamika otpuštanja	22
4.1.1.	Aktivnost rhBMP2 i rhBMP6 u C2C12-BRE-Luc staničnom eseju.....	22
4.1.2.	<i>In vitro</i> dinamika otpuštanja.....	22
4.2.	<i>In vivo</i> pokusi: Nastajanje koštanog tkiva na ektopičnom mjestu nakon potkožne ugradnje osteoinduktivnih implantata u aksilarnu regiju štakora	24
4.2.1.	Dizajn pokusa.....	24
4.2.1.1.	Pokus 1: Karakterizacija stanica protočnom citometrijom	24
4.2.1.2.	Pokus 2: Usporedba rhBMP2 na kolagenskoj spužvici i rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku	24
4.2.1.3.	Pokus 3: Usporedba rhBMP2 i rhBMP6 na istom nosaču u tri različite doze	25
4.2.2.	Priprema osteoinduktivnih implantata	26
4.2.3.	Eksperimentalne životinje	27

4.2.4.	Kirurški postupak	27
4.2.5.	Terminacija životinja.....	28
4.2.6.	Protočna citometrija (Pokus 1).....	28
4.2.7.	MikroCT – snimanje i analiza dobivenih snimaka (Pokus 2 i 3).....	29
4.2.8.	Histološka analiza	29
4.2.8.1.	Imunohistokemija (Pokus 2)	29
4.2.8.2.	Histomorfometrija (Pokus 3)	30
4.2.9.	Statistička obrada podataka	30
5.	REZULTATI.....	31
5.1.	<i>In vitro</i> pokusi: aktivnost i dinamika otpuštanja	31
5.1.1.	Aktivnost rhBMP2 i rhBMP6 u C2C12-BRE-Luc staničnom eseju.....	31
5.1.2.	<i>In vitro</i> dinamika otpuštanja.....	32
5.2.	<i>In vivo</i> pokusi: Nastajanje koštanog tkiva na ektopičnom mjestu nakon potkožne ugradnje osteoinduktivnih implantata u aksilarnu regiju štakora	34
5.2.1.	Karakterizacija stanica koje sudjeluju u ranoj osteogenezi te upalnom odgovoru protočnom citometrijom (Pokus 1).....	34
5.3.2.	Usporedba rhBMP2 na kolagenskoj spužvici i rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku (Pokus 2).....	38
5.3.2.1.	MikroCT analiza	38
5.3.2.2.	Histološka analiza	48
5.3.3.	Usporedba rhBMP2 i rhBMP6 na istom nosaču u tri različite doze (Pokus 3)..	64
5.3.3.1.	MikroCT analiza	64
5.3.3.2.	Histomorfometrijska i histološka analiza.....	68
6.	RASPRAVA.....	72
6.1.	<i>In vitro</i> dinamika otpuštanja	73
6.2.	Karakterizacija stanica koje sudjeluju u ranoj osteogenezi i upalnom odgovoru.....	77
6.3.	Usporedba rhBMP2 na kolagenskoj spužvici i rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku	81
6.4.	Usporedba rhBMP2 i rhBMP6 na istom nosaču u tri različite doze	84
7.	ZAKLJUČCI	86
8.	SAŽETAK.....	88
9.	SUMMARY	89
10.	POPIS LITERATURE	90
11.	BIOGRAFIJA.....	125

POPIS KRATICA

ABC – autologni krvni ugrušak

ACDF – Anteriorna cervikalana diskektomija i fuzija

ACS – Apsorbirajuća kolagenska spužvica

ALIF – anteriorna interkorporalna fuzija kralježnice

ALP – Alkalna fosfataza

ANOVA - analiza varijance

APC – Adipogeni progenitori

BAMBI – BMP i aktivin vezajući protein

BCP – bifazična keramika

BMD – Mineralna gustoća kosti

BMP – Koštani morfogenetski protein

BMSC – mezenhimalne matične stanice dobivene iz koštane srži

BSE – Goveđa spongiformna encefalopatija

CD – stanični biljeg

CRM – Matriks otporan na kompresiju

DBM – Demineralizirani koštani matriks

DMEM – Dulbeccov modificiran Eagleov medij

DRF – Distalna fraktura radijusa

EDTA – Etilendiamintetraoctena kiselina

EMP – Rani multipotentni progenitori

FBS – Fetalni goveđi serum

FDA – Američka agencija za lijekove i hranu

FMO – Kombinacija protutijela u kojima nedostaje fluorokrom za kojeg se određuje prag pozitivnosti

GDF – Faktor rasta i diferencijacije

HA – hidroksiapatit

HDE – Milosrdna primjena lijeka

HIER – Toplinom inducirana regeneracija epitopa

HRP – Peroksidaza iz hrena

HTO – Visoka osteotomija tibije

ICGB – Koštani presadak ilijačne kosti

I-Smad – Inhibitorski Smad protein

LT-CAGE - konusni implantat za lumbalnu fuziju

MDSC – Supresorske stanice mijeloidne loze

OCP – Osteohondrogeni progenitori

OP1 – Osteogeni protein 1

OSX – Osterix

PBS – Fosfatni pufer

PEG – Polietilen glikol

PGA – Poliglikolna kiselina

PLA – Polilaktična kiselina

PLF – Posterolateralna spinalna fuzija

PLGA – Polilaktično-glikolna kiselina

PLIF – Posteriorna interkorporalna fuzija kralježnice

rhBMP – Rekombinantni humani koštani morfogenetski proteini

rhBMP2/ACS – osteoinduktivni implantat koji se sastoji od rekombinantnog humanog koštanog morfogenetskog proteina 2 i apsorbirajuće kolagenske spužvice kao nosača

rhBMP6/ABC – osteoinduktivni implantat koji se sastoji od rekombinantnog humanog koštanog morfogenetskog proteina 6 i autolognog krvnog ugruška kao nosača

R-Smad – Receptor regulirani Smad protein

Sca1 – Antigen matičnih stanica 1

Smurf – Ubikvitinski regulatorni faktor Smad molekula

Sox-9 – SRY-Box transkripcijski faktor 9

TCP – β -trikalcij fosfat

TGF- β – Transformirajući faktor rasta beta

TLIF – Transforaminalna interkorporalna fuzija

7AAD – 7-amino-aktinomicin

1. UVOD

1.1. Koštani morfogenetski proteini

1.1.1. Otkriće koštanih morfogenetskih proteina

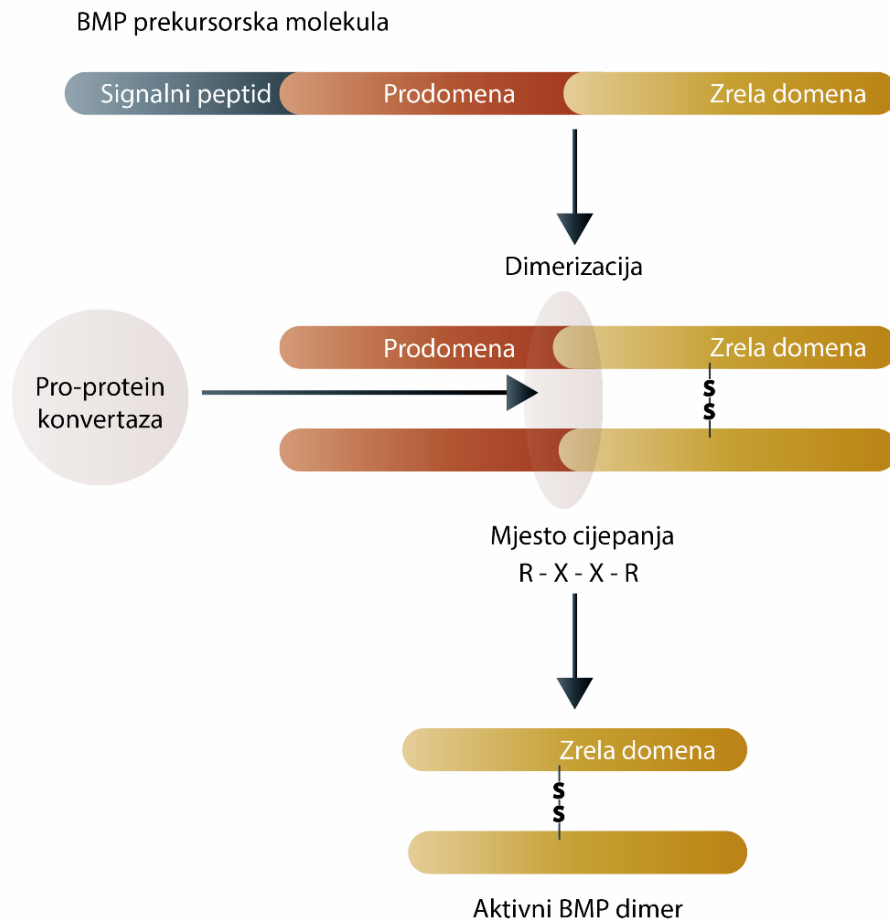
Istraživanja vezana uz regeneraciju kostiju započela su sredinom dvadesetog stoljeća kada je Pierre Lacroix postavio hipotezu induktivne uloge kosti, nazivajući je osteogeninom (1-3). Lacroix je pretpostavio da kost sadržava jednu ili više osteogenih substanci kada je pokazao da alkoholni ekstrakti epifizne hrskavice i kosti induciraju stvaranje kosti prilikom ugradnje ispod bubrežne kapsule (2). Za samo otkriće koštanih morfogenetskih proteina zaslužan je Marshall R. Urist koji je 1965. godine pokazao da se nastajanje kosti *de novo* može postići primjenom demineraliziranog koštanog matriksa (*engl. Demineralized Bone Matrix, DBM*) potkožnom ili intramuskularnom ugradnjom u životinja (4-6). Čimbenik odgovoran za ektopično nastajanje kosti nazvan je “*koštani morfogenetski protein*” s obzirom na to da je njegova osteoinduktivna aktivnost prekinuta digestijom tripsinom (5, 7). Međutim, razumijevanje same aktivnosti koštanog morfogenetskog proteina ostala je nedokučena, sve dok Wang i sur. (8) nisu pokazali da izolirana pojedinačna linija na elektroforeznom gelu iz ekstrakata goveđe kosti pokazuje BMP aktivnost pri čemu je uslijedilo sekvencioniranje peptida dobivenih digestijom tripsinom izoliranih iz spomenutog gela (7). Razvojem molekularne biologije 80-ih i 90-ih godina prošlog stoljeća omogućeno je sekvencioniranje i kloniranje koštanih morfogenetskih proteina. John Wozney i njegovi suradnici zaslužni su za prvo kloniranje BMP molekula 1988. godine, pri čemu se pokazalo da koštani morfogenetski proteini spadaju pod nadobitelj citokina transformirajućeg faktora rasta beta (*engl. Transforming Growth Factor- β , TGF- β*) (4, 8, 9). Daljnji naponi i istraživanja znanstvene zajednice doveli su do značajnih otkrića i razumijevanja uloga koštanih morfogenetskih proteina u vitalnim fiziološkim procesima koji uključuju staničnu proliferaciju, diferencijaciju, inhibiciju rasta i sazrijevanja u različitim tipovima stanica, ovisno o njihovoj staničnoj mikrookolini (4, 10).

1.1.2. Definicija i klasifikacija

Koštani morfogenetski proteini (*engl. Bone Morphogenetic Proteins, BMPs*) su grupa filogenetski konzerviranih pleotropnih faktora rasta koji su članovi nadobitelji *TGF- β* , a uključeni su u brojne uloge, uključujući staničnu proliferaciju, apoptozu, diferencijaciju i morfogenezu (11-13). Mehanicistički, koštani morfogenetski proteini su glikoproteini koje luči stanica, a djeluju kao ligandi za receptore prisutne na plazma membrani različitih tipova stanica, čime se ostvaruju parakrini i autokrini učinci. Transdukcija ovoga signala prolazi kroz kaskadu specifičnih molekula, započinjući s receptorima serin/treonin kinaze, a zatim preko Smad proteina u jezgru stanice (13). Trenutno, poznato je oko dvadeset molekula koštanih morfogenetskih proteina koji su identificirani i grupirani s obzirom na njihovu sličnost u aminokiselinskom slijedu (13). Ime “*koštani morfogenetski protein*” ne determinira biološku aktivnost odnosno osteoinduktivnu funkciju svih BMP članova *TGF- β* nadobitelji. Naime, ovi morfogenetski proteini dobili su isto ime jer su klonirani na temelju homologije DNA ili aminokiselinskog slijeda, a ne na temelju njihove biološke aktivnosti (7). Biološka aktivnost stvaranja kosti odnosno osteoindukcija u neskeletnim mekim tkivima, prisutna je kod nekoliko BMP i GDF (*engl. Growth and Differentiation Factors, GDF*) molekula, ali ne i kod *TGF- β* proteina i aktivina. Koštani morfogenetski proteini imaju vrlo konzerviranu strukturu koja je slična članovima *TGF- β* nadobitelji od 30 do 50% (9, 13). Na temelju strukturne homologije BMP molekula one mogu biti podijeljene na nekoliko podobitelji: BMP2/BMP4, BMP5/6/7(OP-1)/8, BMP9/10 i BMP12/13/14 (GDF5/6/7) (14-18). Većina proteina u podobiteljima BMP2/BMP4, BMP5/6/7(OP-1)/8 i BMP9/10 inducira nastanak hrskavice i koštanog tkiva *in vivo*, dok proteini podobitelji GDF5/6/7 induciraju nastanak hrskavice i tkiva nalik na tetivu, ali ne i kosti (16, 17, 19). BMP2, BMP6 i BMP9 pokazali su se kao najpotentiji u indukciji aktivacije alkalne fosfataze i indukcije osteokalcina, te u diferencijaciji mezenhimalnih progenitornih stanica u osteoblaste. Neke od molekula BMP i GDF podobitelji, kao što su BMP3 i GDF8 (miostatin) ne aktiviraju receptore tipa I serin-treonin kinaze i Smad molekule, pa posljedično niti nemaju mogućnost stvaranja hrskavice i koštanog tkiva *in vivo* (16, 19). Također, u sklopu članova BMP obitelji, samo BMP1 ima strukturu metaloproteinaze koja cijepa kolagen tipa I (7). Također, analozi spomenutih molekula pronađeni su u beskralježnjacima na temelju strukturne homologije. Primjerice u *Drosophila melanogaster* pronađen je decapentaplegic (Dpp) koji je strukturno vrlo sličan BMP2 i BMP4, te 60A/glass bottom boat (Gbb) koji je strukturno sličan BMP6 i BMP7, dok su u *Caenorhabditis elegans* pronađeni analozi GDF11, BMP8 i BMP2 odnosno Daf-7, Tig-2 i Tig-3 (7, 20, 21).

1.1.3. Struktura

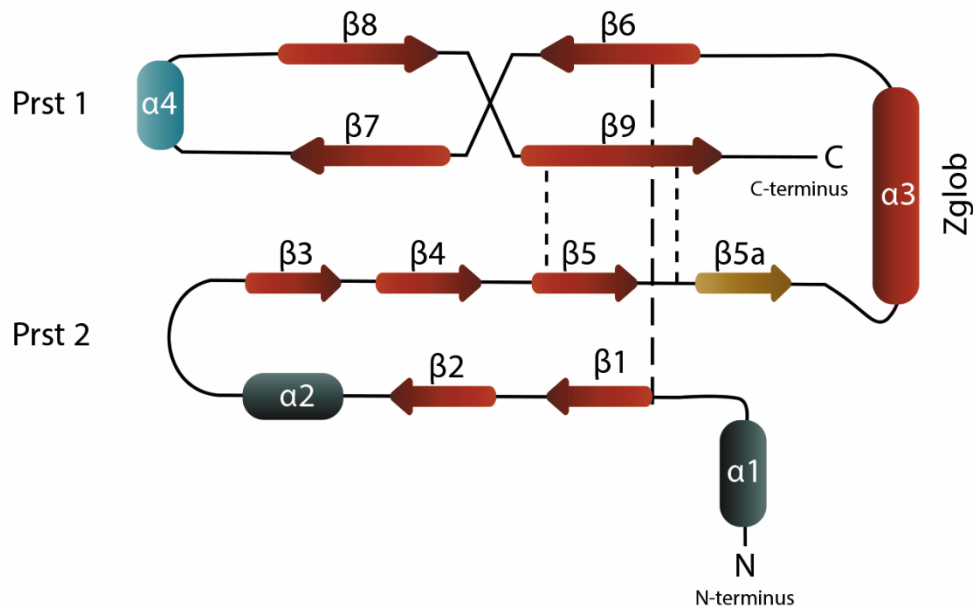
Koštani morfogogenetski proteini, kao i svi članovi TGF- β nadobitelji su homodimeri ili heterodimeri povezani disulfidnim vezama (22). BMP molekule sintetiziraju se kao inaktivni prekursori veličine od 400 do 525 aminokiselinskih ostataka, sastojeći se od signalnog peptida (N-terminus), prodomene, i zrele domene (C-terminus) (Slika 1). Prekursori BMP molekula cijepani su od strane furina, pro-protein konvertaze pri čemu se oslobađa zrela domena (23).



Slika 1 Građa prekursora i zrelog dimera BMP molekule. BMP prekursorska molekula sastoji se od signalnog peptida, prodomene i zrele domene. Nakon dimerizacije i proteolitičkog cijepanja prekursora nastaje aktivna dimerna molekula BMP-a koja se izlučuje iz stanice.

Zrela domena sadržava sedam cisteina, od kojih šest tvore intramolekulske disulfidne veze. Preostali cistein ključan je za dimerizaciju s drugim BMP monomerom koja se odvija na endoplazmatskom retikulumu pri čemu nastaje disulfidni most koji kovalentno povezuje dvije zrele domene, što u konačnici rezultira biološki aktivnom molekulom (7, 13, 24).

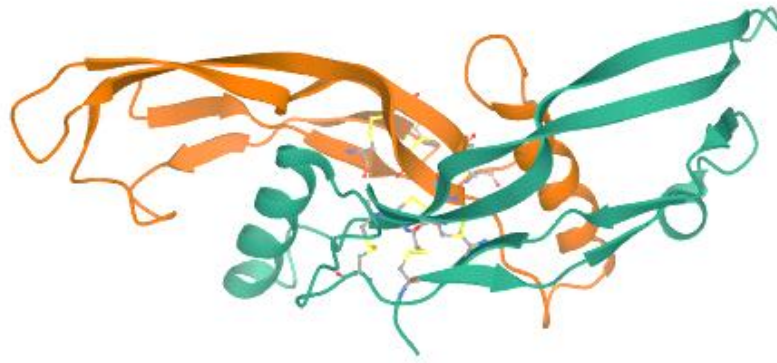
Cisteinski čvor je strukturalni motiv koji je karakterističan za TGF- β nadobitelj, a karakteriziran je uskim osmeročlanim prstenom koji se sastoji od dvije unutarlančane disulfidne veze dok treći cistein prolazi kroz prsten. Dvije duge sekvence između četiri cisteina tvore



Slika 2 Topološka shema molekula TGF- β nadobitelji bazirana na trodimenzionalnim strukturama BMP2, BMP7, TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3. Motivi sekundarne strukture koji su prisutni u svim spomenutim molekulama prikazani su u crvenoj boji. β -nabrana ploča β 5a je tipična za BMP2 (žuta boja), dok je za BMP7 tipična α -uvojnica α 4. α -uzvojnice α 1 i α 2 tipične su za članove TGF- β podobitelji. Disulfidni mostovi prikazani su isprekidanim linijama. Preuzeto i modificirano iz rada Innis i sur.(2000).

neznatno zakrivljenu paralelnu, prstu sličnu β -nabrano ploču (*engl. β -sheet*) koja se proteže u suprotnom smjeru prema N-terminusu i C-terminusu. Sekvenca između preostala dva cisteina stvara petlju i α -uzvojnica (*engl. α -helix*). Opisana struktura podsjeća na oblik otvorene ruke (*engl. "wrist and knuckle"*) gdje β -nabrana ploča podsjeća na prste, cisteinski čvor na dlan, a α -uzvojnica na zapešće (Slika 2) (25, 26).

Dimerizacija se odvija u području "zapešća" jednog monomera koja se spaja s područjem drugoga monomera koje podsjeća na prste pri čemu nastaje disulfidna veza između cisteinskih ostataka svakog monomera povezujući ih u dimer (Slika 3). Ovakav strukturalni motiv izrazito doprinosi stabilnosti proteina uključujući otpornost na kiselinske i alkalne tretmane, te na djelovanje visokih temperatura i proteolize (7, 27-30).



Slika 3 Kristalna struktura koštanog morfogenetskog proteina 6. Homodimeri su prikazani zelenom odnosno narančastom bojom (preuzeto s Data Protein Bank).

1.1.4. Biološka aktivnost koštanih morfogenetskih proteina

Svi članovi TGF- β nadobitelji, pa tako i koštani morfogenetski proteini vežu se na serin-treonin receptore na staničnoj površini kojim se započinju specifični intracelularni putevi koji reguliraju i aktiviraju transkripciju gena koji imaju ulogu u staničnoj proliferaciji i diferencijaciji (14, 22, 31). Sveukupno postoje tri tipa receptora na koje se vežu članovi TGF- β nadobitelji, međutim samo tip I i II igraju važnu ulogu u vezanju BMP molekula, pri čemu su oba esencijalna za transdukciju signala (22, 32, 33). Različite kombinacije receptora tipa I i II omogućavaju različite signale koje rezultiraju specifičnim staničnim događajima (22, 34).

Smad molekule su glavni prijenosnici signala serin-treonin receptora (32, 33, 35). Nakon vezanja BMP molekule, receptor tipa I fosforilira receptor-regulirani Smad odnosno R-Smad (*engl. Receptor-regulated Smad, R-Smad*) među koje spadaju Smad1, Smad5 i Smad8. BMP2 i BMP4 aktiviraju sve R-Smadove uključene u BMP signalizaciju, dok BMP6, BMP7 i BMP9 aktiviraju isključivo Smad1 i Smad5 (29, 33, 35). Dvije aktivirane R-Smad molekule formiraju heterotrimerni kompleks sa Smad4 odnosno za sada jedino poznatom Co-Smad molekulom (*engl. Common-partner Smad, Co-Smad*). Takav kompleks se translocira u jezgru te regulira transkripciju specifičnih gena (22, 29, 33, 35). Inhibicija transdukcije signala putem Smad molekula regulirana je inhibitornim Smad molekulama (*engl. Inhibitory Smad, I-Smad*) među koje spadaju Smad6 i Smad7 molekule (22, 36, 37). I-Smad molekule interferiraju s R-Smad-ovima i na taj način sprječavaju stvaranje kompleksa sa Smad4 molekulom i daljnju transdukciju signala u jezgru (37-39). BMP signalizacija je također regulirana degradacijom Smad molekula putem ubikvitin ovisnih proteina odnosno Smurf-ova (*engl. Smad ubiquitin regulatory factors, Smurfs*) (37, 38, 40).

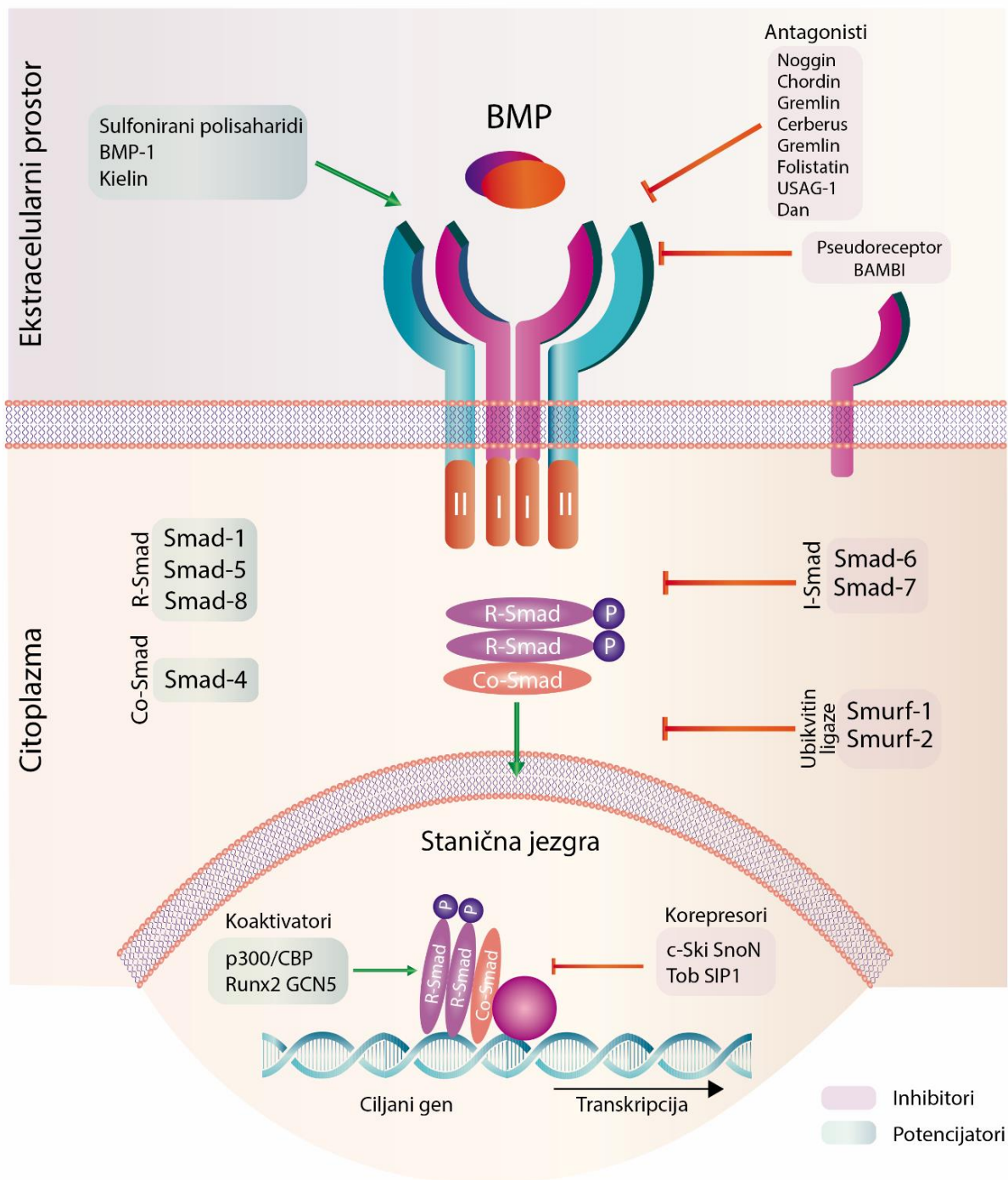
Heterotrimerni kompleks Smad molekula nakon što se translocira u jezgru stanice, regulira transkripciju gena vezanjem na specifične DNA sekvence i/ili interakcijom s drugim transkripcijskim faktorima, koaktivatorima i korepresorima (17). Runx2 (*engl. Runt-related transcription factor, Runx*) je jedan od najpoznatijih transkripcijskih faktora koji sudjeluje u BMP signalizaciji, regulirajući stvaranje koštanog tkiva i hematopoezu (41). Postoji više izoformi Runx transkripcijskog faktora, od kojih Runx2 regulira transkripciju gena koji sudjeluju diferencijaciji mezenhimalnih progenitornih stanica u osteoblaste (41-44). Runx2 u konačnici inducira različite osteogene markere poput alkalne fosfataze (*engl. Alkaline Phosphatase, ALP*), osteokalcina, osteopontina i drugih koji su involvirani u endohondralnu osifikaciju (44, 45). Osterix (*engl. Osterix, OSX*) je još jedan važan transkripcijski faktor involviran u BMP/Smad signalizaciju i posljedično u diferencijaciju mezenhimalnih matičnih stanica u stanice koštanog sustava (46, 47).

1.1.4.1. Antagonisti i potencijatori

Stanice koje izražavaju BMP molekule također ekspimiraju i njihove antagoniste kako bi se u konačnici postigla regulirana aktivnost BMP molekula. Aktivnost BMP molekula može biti kontrolirana na nekoliko razina koja uključuje inhibiciju putem ekstracelularnih proteina, prisutnost negativnih ne-signalizirajućih membranskih receptora, prisutnost inhibirajućih Smad molekula te ubikvitinacija i proteosomalna degradacija molekula koje sudjeluju u signalnim putevima BMP molekula (11). Najpoznatiji ekstracelularni BMP antagonist je zasigurno noggin koji se različitim afinitetom veže na BMP2/4/5/6/7, GDF5/6, ali ne i na ostale članove TGF- β obitelji (48) (Slika 4). Vezanjem noggina na BMP molekule stvara se kompleks koji nije u mogućnosti vezati se na tip I i II BMP receptora i na taj način se sprječava transdukcija signala. Povećana ekspresija noggina onemogućuje diferencijaciju stromalnih stanica u funkcionalne osteoblaste, a uz to smanjuje funkciju onih već diferenciranih (12, 48-50). Govoreći o različitom afinitetu noggina prema različitim BMP molekulama, za ovu disertaciju važno je spomenuti da je BMP6 superiorniji u odnosu na BMP2 i BMP7 zbog njegovog reverzibilnog vezanja na noggin, a razlog tomu je što su prolin odnosno glutamat na poziciji 60 zrele dome koji su zamjenjeni lizinom (51). U ovu skupinu ekstracelularnih antagonista spadaju još i chordin, Tsg (*engl. Twisted gastrulation, Tsg*) te Dan (*engl. Differential screening – selected gene aberrative in Neuroblastoma, Dan*) obitelj u koju se ubrajaju Gremlin, Sclerostin, USAG-1 (*engl. Uterine sensitization associated gene, USAG-1*), Cerberus, Caronte, Coco, i Dante (Slika 4). Svaki od navedenih antagonista ima specifičan afinitet za BMP molekule, ali i važnu ulogu u diferencijaciji stanica i razvoju organizma (11).

U negativne ne-signalizirajuće membranske receptore ubraja se BAMBI (*engl. BMP and activin bound protein, BAMBI*), transmembranski glikoprotein s ekstracelularnom domenom vrlo sličnoj tipu I TGF – β i BMP receptora. Vezivanjem BMP molekula na ovaj pseudoreceptor onemogućuje se transdukcija signala kroz regularne receptore i na taj način se indirektno inhibira aktivnost BMP molekula (Slika 4) (11, 52). Osim spomenutih mehanizama antagonizma, postoji i mehanizam djelovanja inhibitornih Smad molekula, preciznije Smad6 i Smad7, poznatih kao i I-Smad-ovi. Naime, oni se vežu na BMP receptor tipa I te onemogućuju Smad1/5/8 fosforilaciju te heterodimerizaciju sa Smad4 (11). BMP signalizacija je također regulirana putem ubikvitinskog sustava; Smad specifične ubikvitin ligaze Smurf1 i Smurf2 (*engl. Smad – ubiquitination regulatory factor, Smurf*) stupaju u interakciju sa Smad1/5/6/7 što posljedično dovodi do njihove razgradnje putem 26S proteasoma (Slika 4) (11, 53).

Dodatno, osim spomenutih antagonista i njihovih mehanizama djelovanja, važno je spomenuti i neke od ekstracelularnih potencijatora BMP molekula (Slika 4). Primjerice BMP1 je metaloproteinaza koja cijepa prekursore proteina ekstracelularnog matriksa uključujući fibrilarne prokolagene tipa I, II, III, i VII, biglikane, te lance laminina (54, 55). S obzirom na to da oslobađaju BMP molekule iz neaktivnog kompleksa s ekstracelularnim antagonistom Chordinom, BMP1 možemo smatrati potencijatorom BMP signalizacije (56). Također, zabilježeno je da polisaharidi, kao što su heparin, heparan sulfat i dekstran sulfat potenciraju BMP2, BMP4 i BMP7 induciranu diferencijaciju osteoblasta (57-59). Nadalje, Kielin ili chordin-u sličan protein (*engl. Chordin-like protein, KCP*) veže se na BMP molekule te poboljšava parakrinu BMP signalizaciju (60).



Slika 4 Shematski prikaz BMP signalizacije putem receptora tipa I i II te Smad molekula. Inhibitori (ružičasta boja) i potencijatori (zelena boja) prikazani su s desne odnosno lijeve strane a imaju ulogu u signalizaciji u ekstracelularnom prostoru, staničnoj membrani, citoplazmi i staničnoj jezgri. Preuzeto i modificirano iz rada Katagiri i Watabe (2000).

1.2. Klinička primjena koštanih morfogenetskih proteina

Razvojem metoda molekularne biologije omogućena je izolacija i karakterizacija koštanih morfogenetskih proteina, što je posljedično dovelo i do njihove kliničke primjene s obzirom na njihov osteoinduktivni potencijal. U kliničkoj primjeni za regeneraciju kosti ispitivali su se koštani morfogenetski protein 7 (BMP7) i koštani morfogenetski protein 2 (BMP2), poznatiji pod komercijalnim imenima OP-1 Putty® (Olympus, Japan) odnosno INFUSE™ Bone Graft (Medtronic Sofamor Danek, TN, SAD) (61). Također, trenutno se u kliničkim studijama ispituje i koštani morfogenetski protein 6 (BMP-6) u autolognom krvnom ugrušku kao nosaču(62-64).

1.2.1. Kliničke indikcije

Kod većine slučajeva prijeloma kost cijeli samostalno pri čemu se ponovo postiže integritet kosti odnosno koštani kontinuitet. Međutim 5 – 10 % od sveukupnih prijeloma čine tzv. nesrasli prijelomi i prijelomi koji kasne u cijeljenju (65-67). Razlozi tomu mogu biti brojni, a uključuju operativne i neoperativne intervencije kao što su neadekvatna imobilizacija prijeloma, pretjerano kretanje u ranoj fazi cijeljenja kosti, a mogu biti i posljedica infekcija koje su nastale prilikom ozlijede ili nakon operativnog zahvata. Također, važno je napomenuti da su neki dijelovi skeleta kao što su vrat femura i talusa, ukoliko se na tom mjestu dogodi ozljeda, podložni nesraslom cijeljenju, a razlog tomu je smanjena opskrba krvi te povećano mehaničko naprezanje na tom dijelu kosti (66). Osim nesraslih prijeloma, problem predstavljaju i mnoge indikacije vezane uz kralježnicu koje uključuju neuspješne spinalne operacijske zahvate, slučajeve spondilolisteze, degenerativne bolesti i specifične lezije diska, određene spinalne infekcije te prijelomi kralježaka (68).

Zlatni standard za tretiranje nesraslih prijeloma i specifičnih poremećaja kralježnice je autologni koštani presadak, odnosno autograft. Autologni koštani presadak može se dobiti iz različitih anatomskih mjesta kao što su primjerice femur i fibula, međutim najčešće se dobiva iz ilijačne kosti (*engl. Iliac Crest Bone Graft, ICBG*) iz koje se može dobiti najveća količina presadka (69). Autograft ima najmanji rizik od imunološkog odbacivanja i ima jaku osteokondukcijsku sposobnost, te osteoinduktivna i osteogena svojstva, što ga čini vrijednim dodatkom za liječenje posttraumatskih stanja kao što su nesrasli prijelomi i zakašnjelo srastanje (70). Međutim, s obzirom da se autograft prikuplja od samog pacijenta on predstavlja određeni zdravstveni rizik za istoga. Uzimanje autografta može rezultirati različitim komplikacijama kao što su infekcije, hematomi, neurološke ozlijede i fraktura ilijačne kosti (71). Osim toga,

dostupnost autografta ima svoje limitacije, pa kod određenih posttraumatskih stanja nije moguće dobiti adekvatnu količinu kako bi se postiglo uspješno liječenje (70). S obzirom na navedene nedostatke autografta, znanstvena zajednica pokušala je na nebrojene načine pronaći alternativna rješenja koja uključuju primjenu alogenične (kadaverične) kosti, sintetske keramike na bazi hidroksiapatita i kalcij fosfata, demineralizirani koštani matriks te primjenu koštanih morfogenetskih proteina na odgovarajućem nosaču (72). Koštani morfogenetski proteini pokazali su se kao vrlo uspješna alternativa za autogeni koštani usadak jer se njihovom primjenom smanjilo vrijeme cijeljenja, a incidencija pseudoartroze bila je manja nego u odnosu na ICBG (73). Osim toga izbjegava se intervencija uzimanja koštanog presatka, a time se izbjegava rizik od infekcija, hematoma, neuroloških ozljeda i same frakture ilijačne kosti.

1.2.2. rhBMP7

Koštani morfogenetski protein 7 ili OP-1 (*engl. Osteogenic protein 1, OP-1*) poznat je pod komercijalnim imenima OP-1 Putty® (američko tržište) odnosno Osigraft (europsko tržište), a sastoji se od dvije komponente - vijale koja sadrži 3.5 mg suhog praha rhBMP7 (OP-1) i goveđeg kolagena te vijale koja sadrži 10 mL aditiva s 230 mg karboksimetilceluloze (24, 74). rhBMP7 je pokazao sigurnost korištenja i efikasnost u pretkliničkim (75-82) i kliničkim studijama (61, 83-95) koje uključuju prijelome i nesrasle prijelome te primjenu u spinalnim fuzijama.

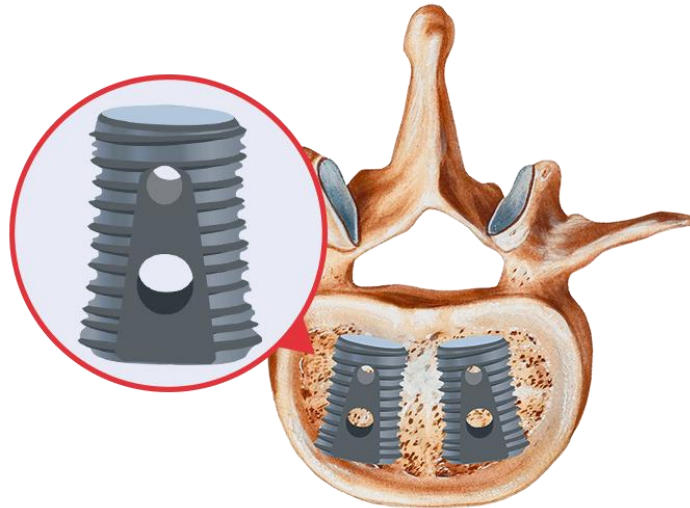
Koštani morfogenetski protein 7 u pretkliničkim studijama pokazao je veliki potencijal u cijeljenju kritičnih defekata dugih kostiju na animalnim modelima koji uključuju kuniće, pse, ovce, ali i primata (75-80, 96). Najveći iskorak u primjeni ovog osteoinduktivnog proteina napravljen je u studiji koji su proveli Friedlaender i sur. (86) nakon čega je Američka agencija za hranu i lijekove (*engl. Food and Drug Agency, FDA*) odobrila iznimno stavljanje ovog medicinskog proizvoda na tržište prije potvrde njegove djelotvornosti (*engl. Humanitarian Device Exemption, HDE*) koje uključuje primjenu na 4000 pacijenata i to uz nadzor institucionalnog odbora za recenziju (*engl. Institutional Review Board, IRB*). rhBMP7 je odobren za istraživačku primjenu u prospektivnoj, randomiziranoj kliničkoj studiji u cilju evaluacije ovog osteoinduktivnog sustava za liječenje nesraslih prijeloma tibije (86). Osim za tretiranje nesraslih prijeloma tibije, rhBMP7 je primjenjivan u drugim kliničkim studijama koje uključuju defekte fibule (87), humerusa (90), klavikule, ulne, femura (88), skapule (83) te metafizealnih defekata nakon osteotomije distalnog radijusa (89).

Osim prijeloma i nesraslih prijeloma, rhBMP7 ispitivan je u indikacijama spinalne fuzije; efikasnost i sigurnost pokazao je u velikom broju pretkliničkih studija na animalnim modelima koji uključuju kuniće, pse i ovce (76, 81, 82). Također, kliničke studije pokazale su efikasnost rhBMP7 i u primjeni kod spinalnih fuzija u indikacijama koje uključuju različite deformitete i degenerativne promjene kao što je to degenerativna spondilolisteza (61, 91-95). U konačnici to je 2004. godine dovelo do uvjetnog odobrenja od strane FDA-a da se rhBMP7 koristi kao zamjena za autologni koštani presadak prilikom revidirajuće posterolateralne spinalne fuzije, odnosno kod pacijenata s neuspješnom posterolateralnom spinalnom fuzijom koji su skloni riziku opetovane pseudoartroze (74, 97).

1.2.3. rhBMP2

Koštani morfogenetski protein 2 trenutno je jedini klinički odobreni osteoinduktivni rekombinantni humani protein koji se primjenjuje u različitim indikacijama koštanih defekata. Poznatiji je pod komercijalnim nazivom INFUSE™ Bone Graft (američko tržište) odnosno InductOS® (europsko tržište). Formulacija se sastoji od kombinacije liofiliziranog praha rhBMP2 (koji se rekonstituiru u destiliranoj vodi) i upijajuće kolagenske spužvice (*eng. Absorbable Collagen Sponge, ACS*). Nakon rekonstitucije u koncentraciji od 1.5 mg/mL, otopina se ravnomjerno raspoređuje po površini kolagenske spužvice i primjenjuje na mjesto traume (24, 98). Djelotvornost i efikasnost rhBMP2 ispitana je u kombinaciji s različitim nosačima u brojnim animalnim studijama provedenim na kunićima, psima, ovcama i primatima (99-114). Kako bi se pokazalo da je rhBMP2 ekvivalentan ICBG-u, odnosno zlatnom standardu u indikaciji anteriorne interkorporalne fuzije kralježnice (*engl. Anterior Lumbar Interbody Fusion, ALIF*), Burkus i sur. (115) proveli su studiju gdje su korištena dva konusna implantata u području diska koji su bili napunjeni rhBMP2 na kolagenskoj spužvici ili autograftom. S obzirom na to da 143 pacijenata koji su primili INFUSE™ Bone Graft, nisu morali podlijeći operativnom zahvatu uzimanja ICBG-a, samo vrijeme trajanja operativnog zahvata i gubitka krvi bilo je značajno smanjeno. Studija je u konačnici 2002. rezultirala odobrenjem INFUSE™ Bone Graft-a od strane FDA-a kao zamjena za autologni koštani usadak u operativnom zahvatu ALIF-a u kombinaciji s konusnim implantatom za lumbalnu fuziju (*engl. Lumbar Tapered Fusion Device, LT-CAGE*) napravljenog od titana (Slika 5) (116-119).

Također, rhBMP2 se pokazao efektivnim u indukciji i stvaranju nove kosti na različitim ortotopičnim mjestima u raznim animalnim modelima, od glodavaca do primata (117, 120-122). Ekstenzivne pretkliničke i kliničke studije rezultirale su odobrenjem INFUSE™ Bone Graft-a od strane FDA-a i za primjenu u otvorenim prijelomima tibije (95, 122-124) te 2007. godine kao alternativu za autogeni koštani presadak za augmentaciju sinusa i lokaliziranu augmentaciju alveolarnog grebena (125-127).



Slika 5 Shematski prikaz anteriorne interkorporalne fuzije kralježnice (ALIF) u kombinaciji s konusnim implantatom za lumbalnu fuziju napravljenog od titana. Preuzeto sa www.drugwatch.com.

1.2.3.1. “Off-label” primjena i nuspojave

Primjena rhBMP2 u svim operativnim postupcima spinalne fuzije porasla je za više od 50 % u periodu od 2002. do 2007. godine – od odobrenog postupka od strane FDA, ALIF-a do “off-label” primjena koje uključuju posteriornu (*engl. Posterior Lumbar Interbody Fusion, PLIF*) i transforaminalnu interkorporalnu fuziju kralježnice (*engl. Transforaminal Lumbar Interbody Fusion, TLIF*), posterolateralnu spinalnu fuziju (*engl. Posterolateral Spinal Fusion, PLF*) te anteriornu cervikalnu diskektomiju i fuziju (*engl. Anterior Cervical Discectomy and Fusion, ACDF*) (128-131).

“Off-label” primjena dovela je do pojave mnogih nuspojava, a glavni razlozi za to su korištenje suprafizioloških doza rhBMP2 te primjena kolagenske spužvice kao nosača koja ne pruža zadovoljavajuću retenciju ovog osteogenog proteina što uglavnom rezultira

heterotopičnom osifikacijom (128, 132). Najčešće prijavljivane nuspojave uključivale su disfagiju nakon cervikalnih spinalnih fuzija, postoperativni radikulitis i kompresiju živčanih korijena, te već spomenutu heterotopičnu osifikaciju (128, 132). INFUSE™ Bone Graft se obično koristi u dozama od 6 do 12 mg, no važno je spomenuti da je Medtronic u kliničkim ispitivanjima proizvoda AMPLIFY (rhBMP2 na poroznom nosaču napravljenog od kolagena i resorbirajućih sintetičkih keramičkih čestica) koristio doze od čak 40 mg rhBMP2 za tretman degenerativne bolesti diska, što je u nekim slučajevima rezultiralo pojavom karcinoma, pa shodno tomu taj proizvod nikada nije bio odobren od strane FDA-a (130, 132-136).

1.2.3.2. Dinamika otpuštanja

Esencijalna karakteristika nosača u sklopu osteoinduktivnog sustava je stopa otpuštanja BMP molekula. Adekvatni profil otpuštanja ključan je parametar kako bi se u konačnici postiglo optimalno cijeljenje kosti. Naime, neadekvatna odnosno prebrza stopa otpuštanja proteina s nosača može rezultirati različitim neželjenim nuspojavama kao što su heterotopična osifikacija, oticanje i upala na mjestu ugradnje. Brzina i vrijeme otpuštanja BMP molekula s odgovarajućeg nosača trebala bi ovisiti o primjeni. Naime, postoji više opcija željenih profila otpuštanja BMP molekula s nosača ovisno o tipu prijeloma ili primjenjivanim indikacijama. Farmakokinetika različitih profila otpuštanja ovisit će o samoj formulaciji implantata, količini BMP-a, ali i o pH vrijednostima i temperaturi okoline (137-139).

Kemijske promjene poput oksidacije i deaminacije te fizičke promjene poput pogrešnog smatanja, agregacije i površinske adsorpcije mogu u konačnici dovesti do degradacije proteina. Svaka promjena konformacije nativnog proteina može dovesti do djelomične ili potpune inaktivacije proteina. Kemijska i fizička nestabilnost može dovesti do smanjene aktivnosti i negativnih učinaka, kao što je primjerice imunološka reakcija (132, 140-142). Stabilnost proteina ovisi o nekoliko faktora, između kojih su najbitniji temperatura i pH vrijednost okoline. Ravnoteža sveukupnog naboja aminokiselinskih ostataka unutar proteinske strukture utječe na stabilnost i topljivost proteina. Izlaganje proteina pH vrijednostima blizu njegove izoelektrične točke može rezultirati gubitkom naboja na aminokiselinskim ostacima, pa se posljedično smanjuje elektrostatičko privlačenje između njih. To rezultira dominacijom hidrofobnih interakcija između aminokiselinskih ostataka što u konačnici dovodi do agregacije proteina. Svi koštani morfogenetски proteini imaju izoelektričnu točku (pI) između 7.7 i 9 (132, 138, 139, 143) i u neutralnom pH okruženju stvaraju agregate i precipitiraju, što može dovesti do degradacije i gubika njegove aktivnosti.

Tržišna formulacija INFUSE-a, sastoji se od rhBMP2, homodimernog proteina premoštenog disulfidnim mostom, veličine do 26 kDa i izoelektrične točke od 8.2, koji je puferiran na pH vrijednosti od 4.5 nakon rekonstitucije. Pri ovoj pH vrijednosti rhBMP2 ima snažan pozitivni naboj i posljedično dobru topivost, no Schwatrz i sur. (144) pokazali su da i dalje postoji tendencija za agregaciju, iako to u konačnici ne utječe na samu biološku aktivnost. Osim toga, rhBMP2 zadržava svoj puni integritet u precipitiranom stanju te ostaje biološki aktivan. Gubitak topljivosti rhBMP2 događa se iznad pH vrijednosti 6, što je razlog zašto je INFUSE™ Bone Graft formuliran pri relativno niskoj pH vrijednosti od 4.5, s obzirom na njegovu izoelektričnu točku od 8.2. Na topljivost rhBMP2 također snažno utječu ionska jakost i sastav pufera, dok je agregacija još izraženija kod rhBMP2 koji je eksprimiran u *E. coli* u odnosu na rhBMP2 eksprimiran u stanicama jajnika kineskog hrčka (*engl. Chinese Hamster Ovary cells, CHO cells*) zbog nedostatka glikozilacije (145, 146). S druge strane, studije vezanja pokazale su da se pri pH vrijednostima između 3 i 4, rhBMP2 u zanemarivoj količini veže za apsorbirajuću kolagensku spužvicu. Pri pH vrijednosti od 4.5, značajne količine rhBMP2 vezane su na kolagen, a vezanje se dalje povećava pri pH vrijednostima između 5.2 i 6.5 na 0.1-0.2 mg rhBMP2 po miligramu kolagena (147, 148). Ova dinamika vezanja može se objasniti razlikama u izoelektričnim točkama dvaju proteina u interakciji, odnosno kolagena i rhBMP2.

1.3. Razvoj novih alternativnih osteoinduktivnih rješenja

Apsorbirajuća kolagenska spužvica kao nosač za BMP molekule pokazala se kao relativno neadekvatan nosač zbog nekontroliranog otpuštanja, nedovoljne mehaničke otpornosti, ali i potencijalne imunogenosti. Znanstvena zajednica je stoga pokazala veliki interes za razvoj novih materijala u svojstvu nosača za koštane morfogenetske proteine.

1.3.1. Razvoj novih nosača za koštane morfogenetske proteine

U cilju razvoja optimalnog nosača za BMP molekule osmišljeni su i proizvedeni brojni materijali koji su se pokazali superiorniji u odnosu na goveđi kolagen koji se primjenjivao kao nosač za rhBMP2 i rhBMP7 (108). Idealan nosač bi trebao omogućiti lokalizaciju BMP molekule na ciljno mjesto popravka te osigurati dovoljno visoku lokalnu koncentraciju BMP-a kroz vrijeme u cilju postizanja željene osifikacije (132, 149). Osim toga, nosač treba posjedovati svojstvo imunološke inertnosti, biorazgradivosti, dobra mehanička svojstva te biti jednostavan za primjenu (150, 151). Materijali koji se istražuju kao mogući nosači za BMP molekule i regeneraciju kosti mogu se podijeliti u četiri skupine: prirodni polimeri, sintetički polimeri, anorganski materijali i kompoziti svega navedenog (132, 151). Svaka skupina ima svoje prednosti i nedostatke ovisno o konkretnoj primjeni.

Odlika prirodnih polimera je biokompatibilnost i biorazgradivost, međutim s obzirom na animalno podrijetlo istih uvijek postoji mogućnost imunogeničnosti takvih nosača kao i transmisije animalnih patogena. Kolagen je najčešće primjenjivani nosač za koštane morfogenetske proteine koji spada u skupinu prirodnih polimera (132, 151). Njegova prednost je dostupnost te relativno jednostavna izolacija i purifikacija iz animalnih izvora. Usprkos mnogim prednostima, kolagen ima i brojne mane koje uključuju slabu mehaničku otpornost koja rezultira nekontroliranim otpuštanjem BMP molekula (132, 152, 153), a što posljedično dovodi do neželjenih nuspojava. Osim toga, biorazgradivost kolagena je nepredvidiva što opet dovodi do nekontrolirane kinetike otpuštanja BMP-a, a animalno podrijetlo ovog nosača može izazvati imunološku reakciju (132, 154). Osim kolagena, u skupinu prirodnih polimera spadaju i hijaluronska kiselina, fibrin, želatina, hitozan, alginat i svila (155-158).

Biorazgradivi sintetički polimeri u odnosu na prirodne polimere imaju manji rizik za imunogenu reakciju, eliminiranu mogućnost prijenosa animalnih patogena te mogućnost dizajna samog nosača što uključuje modulabilnost mehaničke otpornosti, stope degradacije i kinetike otpuštanja (159, 160). Međutim, glavni problem ovih nosača je nastanak razgradnih

produkta koji snižuju pH te mogu utjecati na stabilnost osteoinduktivnog proteina te izazvati upalnu reakciju. Ovakvi nosači baziraju se uglavnom na poli- α -hidroksi kiselinama koje uključuju polilaktičnu (*engl. Polylactic acid, PLA*) i poliglikolnu kiselinu (*engl. Polyglycolic acid, PGA*) te njihov kopolimer, poli(D,L-laktid-ko-glikolid) (*engl. poly(D,L-lactide-coglycolide), PLGA*). Osim toga istražuju se polietilen glikol (*engl. Poly-ethylene glycol, PEG*) i polianhidridi (132).

Anorganski materijali kao potencijalni nosači BMP molekula uglavnom uključuju sintetičku keramiku građenu od kalcijevog fosfata, no istražuju se i materijali na bazi silikata (bioaktivno staklo) te kalcij sulfata. Sintetičku keramiku na bazi kalcij fosfata možemo podijeliti na hidroksiapatit (*engl. Hydroxyapatite, HA*) i β -trikalcij fosfat (*engl. β -tricalcium phosphate, TCP*), koji se razlikuju po svojoj strukturi, a u konačnici i po fizikalnim svojstvima. Također, postoji i bifazična keramika koja je kombinacija HA i TCP u različitim omjerima (151, 161-164). Osteoinduktivna i osteokonduktivna svojstva kalcij fosfata su vrlo važna za koštanu regeneraciju, a oni ovise o hrapavosti površine i poroznosti keramičkih čestica koji utječu na adheziju proteina i stanica, ali i omogućavanju urastanje kosti i angiogenezu (165). Također, i sama veličina i sastav keramičkih čestica utječu na kakvoću i arhitekturu novonastale kosti (161). Ovisno o primjeni, bitan faktor je i resorpcija keramičkih čestica; HA je najstabilniji i ima nisku topivost u fiziološkim uvjetima, dok je TCP manje stabilan i veću stopu biodegradacije (163, 165, 166).

1.3.2. Animalni modeli u istraživanju regeneracije kosti primjenom koštanih morfogenetskih proteina

Razvoj osteoinduktivnih sustava koji se sastoje od adekvatnog nosača i koštanih morfogenetskih proteina u cilju evaluacije ispituju se u raznim animalnim modelima koji uključuju miševе, štakore, kuniće, pse, ovce i u konačnici primata (151, 167). Animalni modeli, osim prema životinjskoj vrsti, mogu se podijeliti i prema ispitivanoj indikaciji. U malih glodavaca, koji uključuju miševе i štakore, najčešće se primjenjuju modeli ektopičnog nastajanja kosti pri čemu se osteoinduktivni sustavi ugrađuju potkožno ili intramuskularno u cilju inicijalne evaluacije osteoinduktivnog sustava (151). Ektopični modeli u velikoj mjeri omogućavaju kontrolirani *in vivo* eksperiment nastanka kosti zbog toga što iskazuju apsolutni osteoinduktivni kapacitet ispitivanog materijala zbog relativnog nedostatka stimulacije od strane koštanih citokina, koštanotvornih i matičnih stanica koje formiraju kost. Također, ovakvi modeli su relativno izolirani od mehaničkog utjecaja na novostvorenu kost odnosno mehanotransdukcije (168). Glavni spektar primjene ovakvih modela je uglavnom u cilju

istraživanja biologije kosti i molekularnih mehanizama. S druge strane, na malim glodavcima provode se i ortotopični modeli poput koštanih defekata kalvarije i dugih kostiju u cilju ispitivanja potencijala osteointegracije novih osteoinduktivnih sustava, ali i za njihov kapacitet za promicanje popravka diskontinuiranih prijeloma i prijeloma koji nose težinu. Međutim, valja napomenuti da se zbog veće sličnosti koštane biologije između čovjeka i štakora, preferiraju štakorski modeli u odnosu na mišje (151, 161). Glavni nedostatak ovih modela je relativno mala veličina defekta u usporedbi s klinički relevantnim proporcijama. Osim toga, teško je postići potpunu stabilizaciju prijeloma, što može rezultirati povećanim stvaranjem koštanog kalusa. U cilju napredne evaluacije i translacijskih istraživanja osteoinduktivnih sustava koriste se modeli koji uključuju više vrste poput kunića, ovaca, pasa i majmuna (151, 167). Na spomenutim vrstama primjenjuju se modeli PLF-a (*engl. Posterolateral spinal fusion, PLF*), ali i modeli koštanih defekata koji uključuju defekte femura, ulne, radiusa ili tibije (151, 169).

1.3.3. OSTEOGROW

OSTEOGROW je novi osteoinduktivni sustav za regeneraciju kostiju koji se sastoji od autolognog krvnog ugruška kao nosača za rekombinantni humani koštani morfogenetski protein 6 (*engl. Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 6, rhBMP6*) (62, 170). rhBMP6 je superiorniji u odnosu na rhBMP2 i rhBMP7 zbog njegovog reverzibilnog vezanja na noggin, a razlog tomu je što su prolin odnosno glutamat na poziciji 60 zrele domene zamijenjeni sa lizinom (51, 62). Osim toga, rhBMP6 veže se na većinu receptora tipa I i II te dovodi do povećane specifične aktivnosti alkalne fosfataze u kulturi osteoblasta (51, 171, 172). Autologni krvni ugrušak pokazao se dobrim nosačem za rhBMP6 zbog njegovih neimunogenih i protuupalnih svojstava, te nije animalnog podrijetla kao što je to slučaj za nosače unutar komercijalnih osteoinduktivnih sustava. Također, ugrušak omogućava dobro vezivanje rhBMP6 s proteinima plazme unutar fibrinske mreže što posljedično omogućava polagano otpuštanje, te omogućava propuštajući okoliš za diferencijaciju endohondralne kosti. Osim toga, jednostavan je za pripremu, modulabilan, i ekonomičan (62). Njegova biomehanička svojstva mogu se poboljšati dodatkom matriksa otpornog na kompresiju (*engl. Compression Resistant Matrix, CRM*), a to uključuje autograft, alograft ili sintetičku keramiku građenu od kalcij fosfata.

Efikasnost i sigurnost lijeka OSTEOGROW ispitani su u kliničkim ispitivanjima na indikacijama frakture distalnog radijusa (*engl. Distal Radius Fracture, DRF*) (63) i visoke osteotomije tibije (*engl. High Tibial Osteotomy, HTO*) (64). Također, ovaj osteoinduktivni lijek

s dodatkom matriksa otpornog na kompresiju koja uključuje alograft ispituje se u kliničkoj studiji u indikaciji PLF-a. Kontrolirana randomizirana, dvostruko slijepa klinička studija u indikaciji DRF-a realizirana je u cilju evaluacije sigurnosti i efikasnosti, a provedena je na 32 pacijenta u trajanju od 26 tjedana. Pacijenti su tretirani osteoinduktivnim lijekom OSTEOGROW, placebo ili su pak obrađeni standardnim postupkom. Primjena lijeka OSTEOGROW u ovoj indikaciji pokazala se sigurnom, ne izazivajući neželjene nuspojave poput oticanja, crvenila kože, edema, neželjene osifikacije ili povećane boli. Osim toga, u plazmi pacijenata nisu detektirana protutijela na rhBMP6 nakon 13 i 26 tjedana, što ukazuje na dobro vezivanje rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku (*engl. Autologous blood coagulum, ABC*) kao nosaču. Također, primjena lijeka OSTEOGROW ubrzala je regeneraciju kosti u ranom dijelu cijeljenja u odnosu na standardni postupak i placebo (63). Visoka osteotomija tibije je kirurški postupak u cilju ispravka pozicije varusa kako bi se odgodila progresija osteoartritis koljena. U kliničkoj studiji HTO-a sudjelovalo je 20 pacijenata koji su tretirani osteoinduktivnim lijekom OSTEOGROW ili placebo gdje je OSTEOGROW pokazao brže cijeljenje u odnosu na placebo. OSTEOGROW u indikaciji HTO, pokazao se sigurnim, ne izazivajući neželjene nuspojave (64).

Osim u kliničkim studijama, djelotvornost i sigurnost, ali i nove, različite formulacije lijeka OSTEOGROW ispitivane su u brojnim pretkliničkim studijama na animalnim modelima koji uključuju štakore, kuniće i ovce. Nove formulacije lijeka OSTEOGROW, koje uključuju dodatak CRM-a u obliku sintetičke keramike građene od kalcij fosfata ispitane su u brojnim studijama u modelu potkožne ugradnje kod štakora (161, 173, 174). Također, OSTEOGROW je ispitivan u studijama regeneracije kosti u modelu segmentalnog defekta ulne u kunića (172), zatim u modelu PLF-a kod kunića (171, 175) i ovce, te u modelu ALIF-a kod ovce (176).

U pretkliničkoj studiji posterolateralne spinalne fuzije na modelu kunića ispitan je utjecaj dodatka koštanog alografta kao CRM-a u cilju poboljšanja biomehaničkih svojstava Osteogrow-a na sveukupno 40 kunića. U spomenutoj pretkliničkoj studiji ispitivan je raspon doza rhBMP6 (125 – 1000 µg), a kao kontrolne skupine koristili su se implantati koji su sadržavali samo autogni krvni ugrušak ili ugrušak s dodatkom koštanog alografta. Rezultati istraživanja pokazali su kako OSTEOGROW sam ili s dodatkom koštanog alografta postiže fuziju između transverzalnih nastavaka, međutim dodatkom alografta poboljšavaju se biomehanička svojstva implantanata. Osim toga, optimalna količina rhBMP6 potrebna za fuziju pokazala se doza od 250 µg po implantatu (171). Nastavno, ova formulacija ispitana je na modelu PLF-a u ovcama (176) gdje se također testirala djelotvornost lijeka OSTEOGROW s

dodatkom koštanog alografta ili bez njega kao matriksa otpornog na kompresiju gdje su rezultati pokazali da dodatak alografta OSTEOGROW-u poboljšava biomehanička svojstva implantata te doprinosi većem koštanom volumenu i povoljnom ishodu fuzije. S obzirom na pozitivan ishod prekliničkih istraživanja, formulacija OSTEOGROW-a s dodatkom koštanog alografta, ispituje se u kliničkoj studiji (EudraCT broj 2017-000860-14) PLIF-a u sklopu projekta OSTEOproSPINE.

Novi osteoinduktivni lijek OSTEOGROW pokazao se vrlo uspješnim kao tretman za regeneraciju kostiju, međutim od esencijalne važnosti je usporediti ga sa zlatnim standardom za cijeljenje kostiju, a to je trenutno jedini komercijalno dostupni proizvod INFUSE™ Bone Graft koji se sastoji od rhBMP2 i kolagenske spužvice kao nosača. Svrha ove disertacije je temeljito ispitati razlike u nosačima spomenutih osteoinduktivnih proteina (autolognog krvnog ugruška i kolagenske spužvice) odnosno ispitati dinamiku otpuštanja, karakterizirati stanične populacije koje sudjeluju u ranoj osteogenezi i istražiti samu dinamiku nastanka ektopične kosti kroz vrijeme. Također, važno je i ispitati samu potentnost odnosno efikasnost spomenutih osteoinduktivnih proteina na jednakom nosaču (autologni krvni ugrušak s dodanom bifazičnom keramikom). Svi navedeni nalazi ove disertacije bit će važni za daljnja preklinička i klinička ispitivanja u cilju boljeg razumijevanja prednosti i mana OSTEOGROW-a u odnosu na osteoinduktivni lijek INFUSE™ Bone Graft.

2. HIPOTEZA

Koštani morfogenetski protein 6 u autolognom krvnom ugrušku kao nosaču bit će superiorniji biološki i biokemijski u stvaranju ektopične kosti u odnosu na koštani morfogenetski protein 2 na goveđem kolagenu kao nosaču, koji je komercijalno odobren kao terapija za cijeljenje kosti.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

Detaljno opisati i usporediti vremenski tijek histoloških i staničnih događaja te samu dinamiku stvaranja ektopičnog koštanog tkiva primjenom komercijalno dostupnog rhBMP2 na kolagenskoj spužvici goveđeg podrijetla i rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku.

3.2. Specifični ciljevi

- Ispitati *in vitro* aktivnost rhBMP2 i rhBMP6 putem C2C12-BRE-Luc reporter eseja
- Odrediti i usporediti dinamiku otpuštanja rhBMP2 s kolagenske spužvice i rhBMP6 iz autolognog krvnog ugruška
- Karakterizirati stanice koje sudjeluju u ranoj osteogenezi te upalnom odgovoru organizma na komponente implantata
- Istražiti tijek stvaranja ektopičnog koštanog tkiva nakon ugradnje osteoinduktivnih implantata histološkom analizom
- Imunohistokemijski detektirati ključne molekule u procesu osteogeneze koštanog tkiva na ektopičnom mjestu
- Putem mikroCT analize kvantitativno odrediti proces nastajanja i pregradnje koštanog tkiva

4. MATERIJALI I METODE

4.1. *In vitro* pokusi: aktivnost i dinamika otpuštanja

4.1.1. Aktivnost rhBMP2 i rhBMP6 u C2C12-BRE-Luc staničnom eseju

Aktivnost rhBMP2 i rhBMP6 određena je putem C2C12-BRE-Luc staničnog eseja. Stanična linija mišjih mioblasta (C2C12) stabilno je transficirana s BRE-Luc konstruktom koja reagira na BMP molekule. Ovaj konstrukt sadrži regije mišjeg Id-1 promotora (važnog za indukciju transkripcije putem BMP molekula) koji je konjugiran s luciferaznim genom koji ima izvjestiteljsku ulogu (177). Mišije C2C12-BRE-Luc stanice su uzgajane u potpunom mediju – Dulbeccovom modificiranom mediju (*engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM*) s visokim udjelom glukoze (Merck, Njemačka) s dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma (*engl. Fetal Bovine Serum, FBS*) (Termo Fischer Scientific, MA, SAD). Stanice su subkultivirane u T-bocama (T-75 cm²) u potpunom mediju u staničnom inkubatoru na 37° C pri čemu je udio CO₂ bio 5%. Pri doseg 80% konfluentnosti, stanice se odvajaju od dna T-boce dodatkom tripsina, a zatim se nasađuju u triplikatima po 10 000 stanica po jažici u ploči s 96 jažica. Sljedećeg dana, nakon što su stanice došle više od 80% konfluencije, kompletan medij zamijenjen je medijem za izgladnjivanje (DMEM s 0,1% FBS) u volumenu od 150 µL po jažici, koji je zatim ostavljen na stanicama sljedećih 6 sati. Nakon razdoblja gladovanja, stanice su tretirane različitim rasponom koncentracija rhBMP2 odnosno rhBMP6 (1 – 400 ng). Nakon 24 sata od tretmana, medij se uklanja, a stanice se ispiru s hladnim PBS-om (*engl. Phosphate Buffer Saline, PBS*) te se liziraju dodatkom lizatnog pufera. U lizatima je izmjerena luciferazna aktivnost (luminiscencija) korištenjem luciferaznog reagensa (20 µl lizata + 100 µl reagens) na luminometru (Perkin Elmer, MA, SAD).

4.1.2. *In vitro* dinamika otpuštanja

In vitro pokus otpuštanja rhBMP2 s kolagenske spužvice i rhBMP6 iz autolognog krvnog ugruška proveden je u cilju usporedbe njihove dinamike otpuštanja i određivanja ukupne količine otpuštenog proteina sa svojih nosača. Osteoinduktivni implantati pripremljeni su standardnim postupkom (vidjeti poglavlje 4.2.3.) pri čemu je konačna doza rhBMP2 odnosno rhBMP6 bila 1 µg po implantatu. Pripremljeni implantati stavljeni su u plastične ploče s 24 jažice u kojem je smanjena adsorbcija proteina (Corning, NY, SAD). Uzorcima je dodan medij (0.1 M Soerensenov pufer s dodatkom 1% BSA) (Tablica 1) koji je uzorkovan u različitim

vremenskim točkama, odnosno koncentracije otpuštenih proteina s njihovih nosača mjereni su u vremenskim točkama od 0h, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, te 72h.

Tablica 1 Priprema 0.1M Soerensenovog pufera

Otopina	Priprema	Volumen	pH
Otopina A	3.12g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 100 mL diH_2O	19 mL	7,4
Otopina B	2.84g Na_2HPO_4 +100 mL diH_2O	81 mL	

Nakon svakog uzorkovanja, medij je skupljen i pohranjen na $-20\text{ }^\circ\text{C}$, te je zamjenjen svježim medijem u istom volumenu. Po vremenskoj točki broj uzoraka bio je četiri, a mjerenja su provedena u tehničkim duplikatima. Kao metoda detekcije koristili su se ELISA setovi kemikalija za detekciju rhBMP2 (Human BMP-2 DuoSet ELISA, DY355, R&D Systems, MN, SAD) odnosno rhBMP6 (Human BMP-6 DuoSet ELISA, DY507, R&D Systems, MN, SAD).

4.2. *In vivo* pokusi: Nastajanje koštanog tkiva na ektopičnom mjestu nakon potkožne ugradnje osteoinduktivnih implantata u aksilarnu regiju štakora

4.2.1. Dizajn pokusa

In vivo pokusi podijeljeni su na tri glavna pokusa koja uključuju karakterizaciju stanica koje sudjeluju u ranoj osteogenezi te upalnom odgovoru protočnom citometrijom (Pokus 1), zatim usporedba rhBMP2 na kolagenskoj spužvici (rhBMP2/ACS) i rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku (rhBMP6/ABC) u vremenu (Pokus 2), te usporedba rhBMP2 i rhBMP6 na istom nosaču u tri različite doze (Pokus 3).

4.2.1.1. Pokus 1: Karakterizacija stanica protočnom citometrijom

Stanične populacije koje sudjeluju u ranoj osteogenezi te upalnom odgovoru organizma na osteoinduktivne implantate ispitane su u vremenskim točkama od 24h i 72h, te su određeni stanični markeri limfoidnih (CD3, B220), mijeloidnih (CD11b, GR) te mezenhimalnih populacija (CD44, CD90, CD140a).

Tablica 2 Opis pokusnih skupina i broj implantata po skupinama i vremenskim točkama praćenja

Eksperimentalna skupina	24h	72h
rhBMP2 (20 µg) + ACS	10	10
rhBMP6 (20 µg) + ABC	10	10

Broj implantanata: **40**; broj štakora: **20**

4.2.1.2. Pokus 2: Usporedba rhBMP2 na kolagenskoj spužvici i rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku

U Pokusu 2 uspoređena je dinamika stvaranja ektopične kosti u potkožnom eseju kod štakora primjenom „zlatnog standarda“, rhBMP2 na kolagenskoj spužvici te rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku, čija se primjena trenutno ispituje u kliničkim istraživanjima. Stvaranje kosti praćeno je u dvije različite doze za oba proteina (5 µg i 20 µg) kroz četiri različite vremenske točke u kojima su ujedno pokusne životinje i terminirane - 7, 14, 35, 50 dana nakon ugradnje osteoinduktivnih implantata. Nakon terminacije životinja, implantati su eksplantirani te su snimljeni mikroCT uređajem i histološki obrađeni.

Tablica 3 Opis pokusnih skupina i broj implantata po skupinama i vremenskim točkama praćenja

Eksperimentalna skupina	Dan 7	Dan 14	Dan 35	Dan 50
rhBMP2 (5 µg) + ACS	10	10	10	10
rhBMP2 (20 µg) + ACS	10	10	10	10
rhBMP6 (5 µg) + ABC	10	10	10	10
rhBMP6 (20 µg) + ABC	10	10	10	10

Broj implantanata: **160**; broj štakora: **80**

4.2.1.3. Pokus 3: Usporedba rhBMP2 i rhBMP6 na istom nosaču u tri različite doze

U ovom pokusu ispitana je učinkovitost rekombinantnih proteina, rhBMP2 i rhBMP6, u tri različite doze (5, 20 i 50 µg) na jednakom nosaču u jednoj vremenskoj točki (14 dana nakon ugradnje). Nosač se sastoji od autolognog krvnog ugruška kojem je dodan matriks otporan na kompresiju (*engl. Compression Resistant Matrix, CRM*) u obliku biokompatibilnih, bifazičnih (TCP/HA 80/20), sintetičkih keramičkih čestica u rangu veličine 500 – 1700 µm radi poboljšanja biomehaničkih svojstava. Nakon terminacije životinja, implantati su izvađeni i snimljeni mikroCT uređajem i histološki obrađeni (deskriptivna i kvantitativna analiza).

Tablica 4 Opis pokusnih skupina i broj implantata po skupinama

Eksperimentalna skupina	Dan 14	Eksperimentalna skupina	Dan 14
rhBMP2 (5 µg) + ABC + CRM	6	rhBMP6 (5 µg) + ABC + CRM	6
rhBMP2 (20 µg) + ABC + CRM	6	rhBMP6 (20 µg) + ABC + CRM	6
rhBMP2 (50 µg) + ABC + CRM	6	rhBMP6 (50 µg) + ABC + CRM	6

Broj implantanata: **36**, broj životinja: **18**

4.2.2. Priprema osteoinduktivnih implantata

rhBMP2 (InductOs, Wyeth, UK) i rhBMP6 (Genera Istraživanja, Hrvatska) koji su korišteni u istraživanju nalaze se u liofiliziranom obliku u vijalama koje su pohranjene na -20°C. Neposredno prije pripreme implantata rhBMP2 odnosno rhBMP6 otopljeni su u vodi za injekcije, te otpipetirani u odgovarajućem volumenu u plastičnu tubu u cilju dobivanja odgovarajuće doze.

A. rhBMP2 na kolagenskoj spužvici (INFUSE) (Pokus 1 i 2)

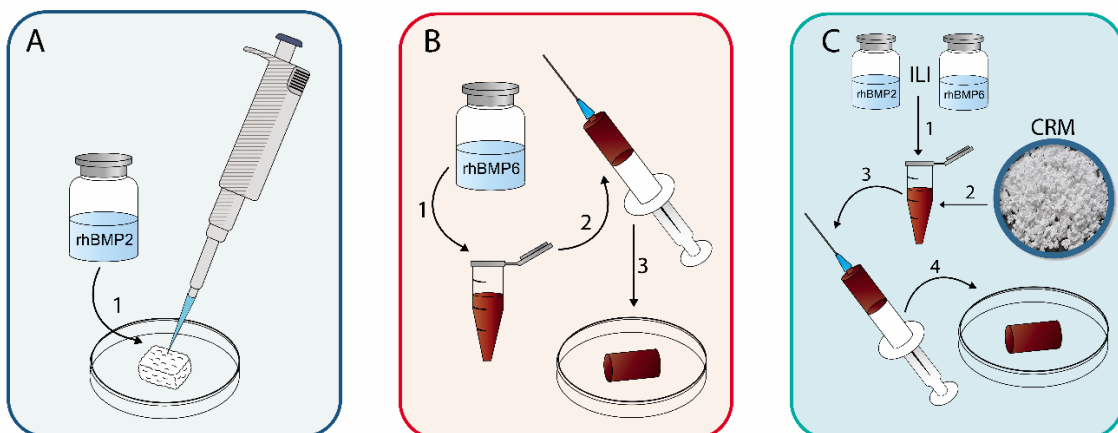
U sterilnim uvjetima kolagenska spužvica je izrezana na veličinu 12 x 7 x 7 mm, te je natopljena otopinom rhBMP2 u volumenu od 100 µL kako bi konačna doza u implantatu bila 5 µg odnosno 20 µg (Slika 6A).

B. rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku (OSTEOGROW) (Pokus 1 i 2)

Svaki implantat je pripremljen iz 500 µL krvi koja je pomiješana s otopinom rhBMP6 kako bi konačna doza u implantatu bila 5 µg odnosno 20 µg, te je implantat ostavljen da koagulira na sobnoj temperaturi unutar 60 minuta (Slika 6B).

C. rhBMP2 ili rhBMP6 na nosaču koji se sastoji od autolognog krvnog ugruška i matriksa otpornog na kompresiju (Pokus 3)

Svaki implantat sadržavao je 100 mg sintetičkih keramičkih čestica uz dodatak 500 µL krvi koja je pomiješana s otopinom rhBMP2 ili rhBMP6 kako bi konačna doza u implantatu bila 5, 20 ili 50 µg. Implantati su ostavljeni da koaguliraju na sobnoj temperaturi unutar 60 minuta (Slika 6C).



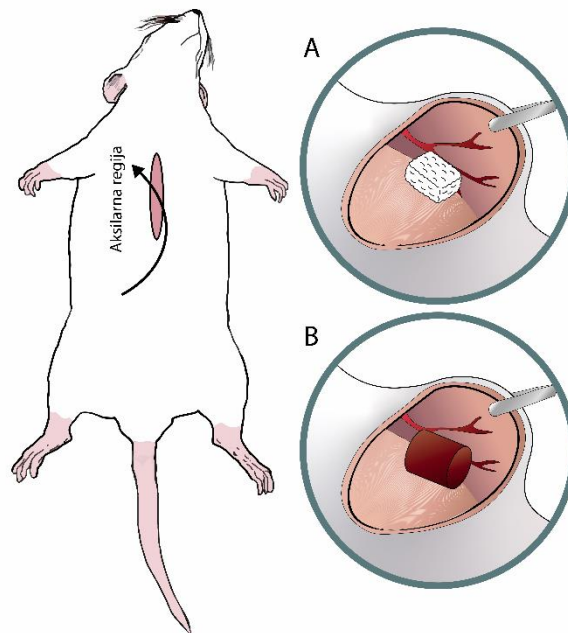
Slika 6 Postupak pripreme osteoinduktivnih implantata. (A) rhBMP2/ACS: (1) Otopina rhBMP2 nanosi se na kolagensku spužvicu; (B) rhBMP6/ABC: Otopina rhBMP6 dodaje se u autolognu krv (1) te se navlači u špricu od 2 mL (2) gdje koagulira (3); (C) Otopina rhBMP2 ili rhBMP6 miješa se s krvlju (1) i CRM-om (2) u šprici od 2 mL (3) gdje koagulira (4).

4.2.3. Eksperimentalne životinje

Laboratorijski štakori (*lat. Rattus Norvegicus*) soja Sprague Dawley iz vlastitog uzgoja (nastamba HR-POK.001), mužjaci, tjelesne mase 250-300 grama, starosti 6-8 tjedana korišteni su u pokusima u sklopu ove disertacije.

4.2.4. Kirurški postupak

Neposredno prije kirurškog postupka, laboratorijske životinje bile su anestezirane injekcijom ketamina (60 mg/kg) i ksilazina (100 mg/kg) intraperitonealno (i/p). Operativna procedura provedena je prema svim pravilima sterilnosti, a životinje su tijekom operativnog zahvata bile prekrivene sterilnim platnom uz prikaz i pristup samo operativnom polju. U medijalnoj liniji prsnog koša napravljen je rez dužine 1 cm. Laganim odvajanjem kože i potkožnog tkiva od miškulature prema području aksilarne regije formiran je prostor u blizini torakalne arterije (dobro vaskularizirana regija) u koji je ugrađen osteoinduktivni implantat (Slika 7). Postavljanjem jednog kirurškog šava u blizini nosača osigurana je pozicija nosača na navedenom mjestu, dok je središnji rez kirurški zašiven. Prema kliničkim znacima skale boli, korišten je analgetik buprenorfin u dozi 0,05 mg/kg i/p.



Slika 7 Potkožna ugradnja osteoinduktivnih implantata u aksilarnu regiju u blizini torakalne arterije (dobro vaskularizirana regija) u koji su ugrađeni osteoinduktivni implantati: (A) rhBMP2 na kolagenskoj spužvici i (B) rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku kao nosaču.

4.2.5. Terminacija životinja

Laboratorijski štakori eutanazirani su prekomjernom dozom anestetika primjenom 80 mg/kg ketamina intraperitonealno (i/p). Nakon toga napravljen je rez u medijalnoj ravnini te je nakon eksploracije aksilarne regije izvađen implantat odnosno novonastala kost koja je nadalje fiksirana i uklopljena u parafinske blokove te proslijeđena na daljnju histološku analizu u cilju praćenja traženih parametara staničnog odgovora na ugrađeni implantat. Eutanazirane laboratorijske životinje su potom neškodljivo uklonjene. U slučaju razvijanja patnje ili nepredviđenih popratnih pojava eksperimentalnog postupka, životinje su odmah eutanazirane.

4.2.6. Protočna citometrija (Pokus 1)

Osteoinduktivni implantati, rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC pripremljeni su kako je prethodno opisano te su implantirani u aksilarnu regiju štakora. 24h i 72h nakon kirurškog zahvata, implantati su sakupljeni u Falcon tube s puferom PBS, na ledu. Nadalje, implantati su mehanički (upotrebom sterilnih škara) i enzimski (korištenjem kolagenaze tipa I, 37 °C) homogenizirani. Dobivena suspenzija filtrirana je kroz mrežicu u FACS epruvete koje su potom centrifugirane. Supernatant je uklonjen i talog je resuspendiran u PBS-u. Stanične suspenzije obilježene su sljedećim štakorskim protutijelima: CD3-PE, B220, GR-FTIC, CD11b-APC, CD44-AF647, CD90-APCCy7 i CD140a. Obilježavanje je provedeno na temperaturi 2-8 °C, u tami. Nakon obilježavanja, suvišak protutijela uklonjen je ispiranjem puferom PBS s dodatkom 2% FBS-a (*engl. Fetal Bovine Serum, FBS*), a uzorcima obilježenim protutijelima koja su vezana na biotin dodan je streptavidin konjugiran s fluorescentnom bojom te su suspenzije inkubirane dodatnih 25 minuta u tami na 2 – 8 °C, a suvišak streptavidina je potom uklonjen ispiranjem u puferu PBS. Stanice su nakon centrifugiranja resuspendirane u puferu PBS s 2% FBS. Svakom uzorku dodan je 7-AAD (*engl. 7-amino-actinomycin, 7-AAD*) koji obilježava mrtve stanice vežući se na DNA ulazeći u citoplazmu kroz oštećenu staničnu membranu. Stanična suspenzija je nakon toga propuštena na protočnom citometru Attune (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, MA, SAD), a dobiveni podatci analizirani su pomoću programa FlowJo (FlowJo, Oregon, SAD). Za korekciju preklapanja signala emisijskih spektara različitih fluorokroma te za određivanje okvira za analizu koriste se neobilježene stanice i stanice obojane kombinacijom protutijela u kojima nedostaje fluorokrom za kojeg se određuje prag pozitivnosti (*engl. Fluorescence Minus One, FMO*).

4.2.7. MikroCT – snimanje i analiza dobivenih snimaka (Pokus 2 i 3)

Implantati su snimljeni pomoću SkyScan 1076 MicroCT uređaja (Bruker, MA, SAD) na 18 mm rezoluciji. Parametri skeniranja bili su postavljeni na 50 kV/200mA, aluminijski filter (0.5 mm), te 0.5° rotacioni pomak. Dobivene snimke rekonstruirane su putem Nrecon (Bruker, Belgija) softvera, a kvantifikacija, odnosno koštani volumen i trabekularni parametri dobiveni su putem CTAn (Bruker, MA, SAD) softvera. Osim koštanog volumena, za novonastalu kost određen je i broj, debljina te razmak između trabekula. 3D modeli novonastale ektopične kosti dobiveni su putem CTVox (Bruker, MA, SAD) softvera.

4.2.8. Histološka analiza

Nakon fiksacije u formalinu, implantati su stavljeni u otopinu za dekalcinaciju - etilendiamintetraoctenu kiselinu (*engl. ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA*). Po završetku dekalcinacije napravljeni su histološki rezovi debljine 5 µm. Najmanje jedan histološki preparat od svakog implantata obojen je hematoksilin-eozinom dok su odabrani histološki preparati ovisno o vremenskoj točki obojeni Goldnerovim bojenjem ili toluidinskim modrilom. Histološki preparati analizirani su deskriptivno (7. i 14. dan) ili kvantitativno (histomorfometrija) ovisno o eksperimentalnoj skupini. Minimalno 3 uzorka po skupini iz 3 različite životinje korišteni su za histološke analize.

4.2.8.1. Imunohistokemija (Pokus 2)

Imunohistokemija provedena je nakon deparafinizacije i rehidracije tkiva. Toplinski inducirana revitalizacija epitopa (*engl. Heat-induced epitope retrieval, HIER*) provedena je u natrij citrat puferu (pH 6,0) u mikrovalnoj pećnici kroz 15 minuta, te 30 minuta hlađenja na sobnoj temperaturi. Mišji i zečji specifični komplet kemikalija HRP/AEC IHC–micro-polymer (Abcam, UK) bio je korišten za detekciju u svim pokusima. Stakalca su inkubirana sa primarnim protutijelima na Sox-9, Osterix, te kolagen tipa II preko noći na 4 °C u vlažnoj komori. Kao sekundarno protutijelo korišteno je sekundarno protutijelo u kombinaciji s peroksidazom hrena (*engl. Horseradish peroxidase, HRP*), a detektirano je korištenjem diaminobenzidin (DAB) kromogena. Stakalca su obojena u hematoksilinu i fiksirana pomoću ImmunoHistoMount™ (Sigma-Aldrich, MO, SAD). Histološki preparati na kojim je napravljena imunohistokemija su deskriptivno analizirani (3 uzorka po skupini iz 3 različite životinje).

4.2.8.2.Histomorfometrija (Pokus 3)

Histološki preparati obojani su Goldnerovim bojanjem, pri čemu se kost boji tirkizno zeleno, a matriks otporan na kompresiju se boji bijelom bojom. Preparati su vizualizirani putem mikroskopskog sustava Olympus - Olympus SZX10 lupe i Olympus BX53 mikroskopa sa DP27 kamerom (5 megapiksela, 15 fps) putem cellSens Dimension programa (Olympus, Japan). Područja od interesa (kost, matriks otporan na kompresiju) selektirani su i maskirani distinktivnom bojom nakon čega je izmjerena njihova površina putem Fiji ImageJ programa (National Institute of Health, MD, SAD).

4.2.9. Statistička obrada podataka

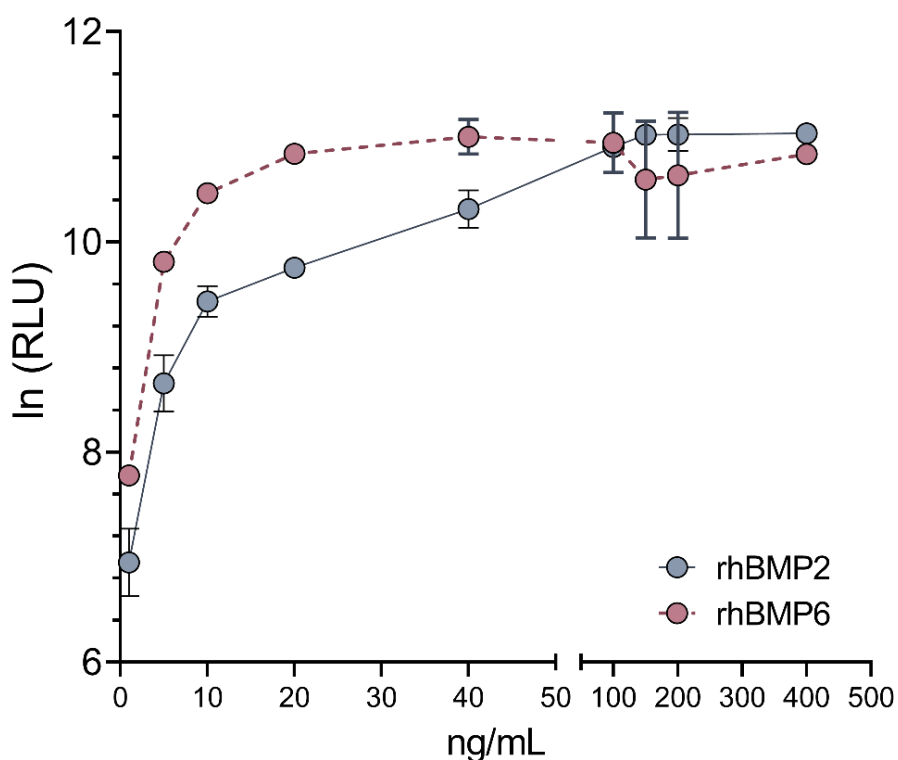
Gaussova raspodjela podataka testirana je Kolmogorov – Smirnovljevim testom te pomoću QQ-dijagrama (*engl. quantile-quantile plot, QQ-plot*). U slučaju normalne distribucije primijenjena je jednostrana ili dvostrana analiza varijance (ovisno o eksperimentu), a u slučaju nejednakih standardnih devijacija primijenjen je test po Welchu uz Dunnet T3 *post-hoc* test. U slučaju ne-Gaussove raspodjele, primijenjeni su neparametrijski testovi (Kruskal-Wallis test) uz odgovarajuće *post-hoc* testove. Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost sa standardnom devijacijom (+/-) ili kao medijan s rasponom od minimalne do maksimalne vrijednosti unutar pokusne skupine. Rezultati su smatrani statistički značajnim kad je vjerojatnost pogreške (P) manja od 0,05. Sve statističke analize provedene su statističkim programom GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, SAD).

5. REZULTATI

5.1. *In vitro* pokusi: aktivnost i dinamika otpuštanja

5.1.1. Aktivnost rhBMP2 i rhBMP6 u C2C12-BRE-Luc staničnom eseju

Aktivnost rhBMP2 i rhBMP6 izmjerena je u C2C12-BRE-Luc staničnom eseju pri čemu je stabilno transfecirana stanična linija mišjih mioblasta tretirana s rasponom koncentracija od 1 do 400 ng/mL rhBMP2 odnosno rhBMP6 (Slika 8). U nižim koncentracijama, od 1 do 40 ng/mL, rhBMP2 pokazao je slabiju luciferaznu aktivnost u odnosu na rhBMP6, međutim pri višim koncentracijama, od 100 do 400 ng/mL, razlike u aktivnosti nije bilo.

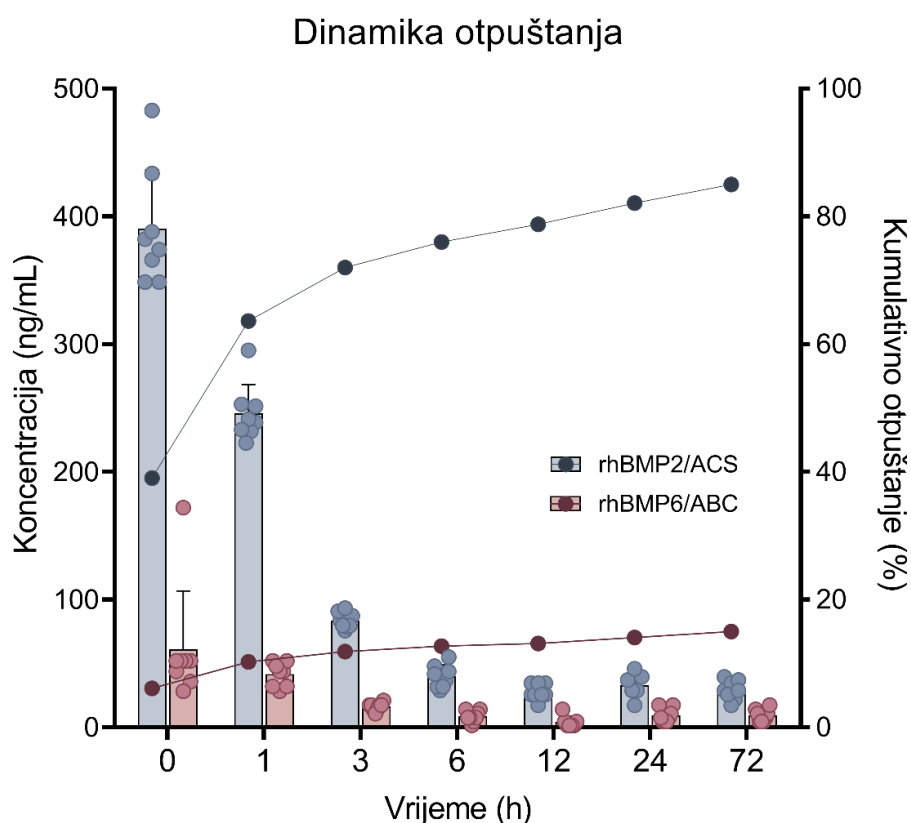


Slika 8 Specifična aktivnost rhBMP2 i rhBMP6 izmjerena je u C2C12-BRE-Luc staničnom eseju. Aktivnost je testirana u rasponu koncentracija 1 do 400 ng/mL koje su prikazane na x osi, dok je aktivnost izražena u relativnim svjetlosnim jedinicama (RLU) na y osi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom.

5.1.2. *In vitro* dinamika otpuštanja

U cilju razumijevanja dinamike otpuštanja rhBMP2 s apsorbirajuće kolagenske spužvice te rhBMP6 iz autolognog krvnog ugruška provedene su serije pokusa otpuštanja pri čemu su determinirane količine otpuštenih proteina s njihovih nosača u medij. Koncentracije otpuštenih proteina s njihovih nosača mjereni su u sljedećim vremenskim točkama – 0h, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 72h. Također, osim determiniranih količina odnosno koncentracija u navedenim vremenskim točkama izračunato je i kumulativno otpuštanje kroz 72h.

Za dinamiku otpuštanja rhBMP2 s apsorbirajuće kolagenske spužvice karakteristično je naglo otpuštanje (*engl. "burst release"*) prilikom inicijalnog ispiranja (vremenska točka 0h), te nakon 1h, gdje se otpustilo 39,05% odnosno 63,63% sveukupne količine rhBMP2 s nosača. Nakon toga slijedi sporija dinamika otpuštanja gdje se u konačnici nakon 72h u medij otpusti 84,99% sveukupne količine rhBMP2 s kolagenskog nosača (Slika 9). S druge strane, za dinamiku otpuštanja rhBMP6 iz autolognog krvnog ugruška nije uočeno naglo otpuštanje u inicijalnim vremenskim točkama kao kod rhBMP2 s kolagenske spužvice. Naime, prilikom



Slika 9 Profil otpuštanja u pojedinoj vremenskoj točki te kumulativno otpuštanje rhBMP2 iz apsorbirajuće kolagenske spužvice (plava boja) i rhBMP6 iz autolognog krvnog ugruška (crvena boja) koji su mjereni setom kemikalija za ELISA-u. Mjerenje je provedeno u tehničkim duplikatima po uzorku (n=4).

inicijalnog ispiranja (vremenska točka 0h), te nakon 1h, otpustilo se svega 6,10% odnosno 10,25% sveukupne količine rhBMP6 iz krvog ugruška, dok se kumulativno kroz 72h otpustilo 15,00% (Slika 9).

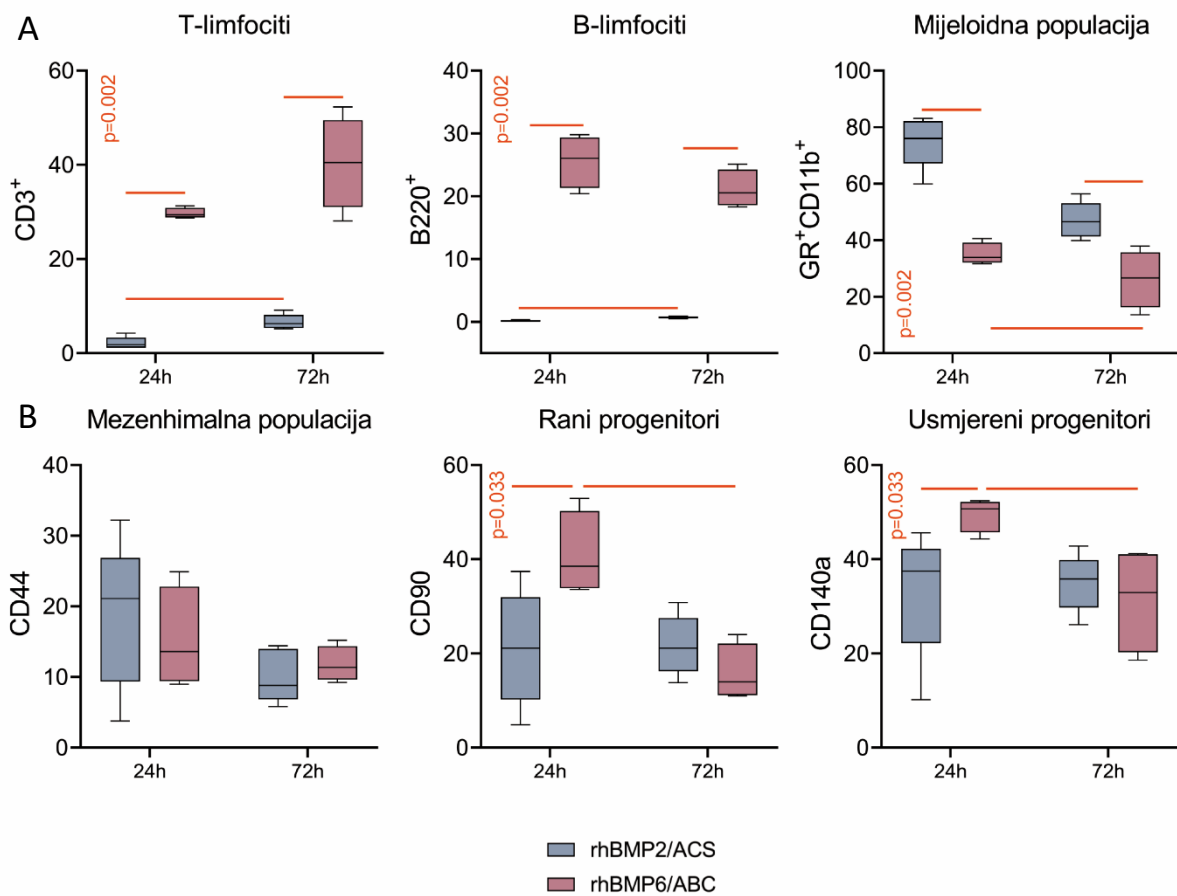
5.2. *In vivo* pokusi: Nastajanje koštanog tkiva na ektopičnom mjestu nakon potkožne ugradnje osteoinduktivnih implantata u aksilarnu regiju štakora

5.2.1. Karakterizacija stanica koje sudjeluju u ranoj osteogenezi te upalnom odgovoru protočnom citometrijom (Pokus 1)

Stanične populacije prisutne u osteoinduktivnim implantatima koji se sastoje od rhBMP2 na kolagenskoj spužvici (rhBMP2/ACS) i rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku (rhBMP6/ABC) determinirane su 24h odnosno 72h nakon potkožne ugradnje u aksilarnu regiju štakora primjenom protočne citometrije. U cilju utvrđivanja staničnih populacija u ranoj osteogenezi ektopičnog koštanog tkiva, protočnom citometrijom je analiziran udio limfoidnih, mijeloidnih i mezenhimalnih staničnih populacija. Stanice su za protočnu citometrijsku analizu obilježene protutijelima usmjerenim na biljege limfoidnih (CD3, B220), mijeloidnih (CD11b, GR) te mezenhimalnih populacija (CD44, CD90, CD140a).

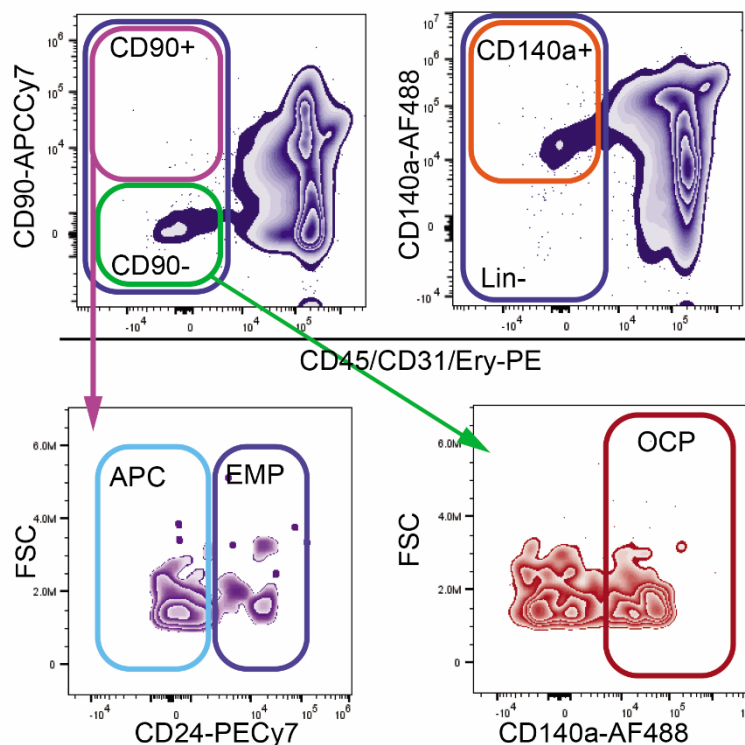
Analiza udjela hematopoetskih staničnih populacija pokazala je kako su CD3⁺ i B220⁺ pozitivne populacije odnosno limfoidne populacije (T-limfociti i B-limfociti) u značajno većem broju prisutne kod osteoinduktivnih implantata koji se sastoje od rhBMP6 i autolognog krvnog ugruška (rhBMP6/ABC) u odnosu na rhBMP2 na kolagenskoj spužvici (rhBMP2/ACS) 24h i 72h nakon potkožne ugradnje u aksilarnu regiju kod štakora. Mijeloidna populacija, odnosno populacija koja izražava GR⁺CD11b⁺ fenotip bila je u značajno većem broju prisutna u rhBMP2/ACS nego u rhBMP6/ABC implantatima nakon 24h odnosno 72h (Slika 10A). Analiza udjela mezenhimalnih staničnih populacija pokazala je kako u obje pokusne skupine nakon 24h odnosno 72h ne postoji razlika u broju CD44 pozitivnih stanica. Rani progenitori, odnosno CD90 pozitivne stanične populacije u većem broju prisutne su kod rhBMP6/ABC nego u rhBMP2/ACS implantatima 24h nakon ugradnje. Međutim, nakon 72h broj CD90 pozitivnih stanica opada i ne postoji značajna razlika između pokusnih skupina, odnosno rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC implantata. CD140a pozitivne populacije odnosno usmjereni progenitori prisutni su u značajno većem broju u rhBMP6/ABC implantatima nakon 24h od potkožne

ugradnje u odnosu na rhBMP2/ACS implantate, premda 72h nakon ugradnje broj CD140a pozitivnih stanica opada i ne postoji značajna razlika između pokusnih skupina (Slika 10B).



Slika 10 Učestalost staničnih populacija u osteoinduktivnim implantatima 24h i 72h nakon potkožne ugradnje. (A) Učestalost limfoidnih ($CD3^+$, $B220^+$) i mijeloidnih populacija (GR^+CD11b^+) među pojedinačnim, živim hematopoetskim ($CD45^+$) stanicama prisutnih u osteoinduktivnim implantatima koji se sastoje od rhBMP6 i autolognog krvnog ugruška (rhBMP6/ABC) te rhBMP2 na kolagenskoj spužvici (rhBMP2/ACS) 24h i 72h nakon potkožne ugradnje. (B) Učestalost mezenhimalnih stanica ($CD44$), ranih progenitora ($CD90$) i usmjerenih progenitora ($CD140a$) prisutnih među pojedinačnim, živim, nehematopoetskim ($CD45^-CD31^-Ery^-$) stanicama u rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC implantatima 24h i 72h nakon potkožne ugradnje. Podatci su prikazani kao kutijasti dijagram (*engl. Box and Whisker plot*) sa rasponom od minimalne do maksimalne vrijednosti unutar pokusne skupine, medijanom te p vrijednostima (Kruskal-Wallis test s *post-hoc* testom po Conoveru) koje su označene na grafovima.

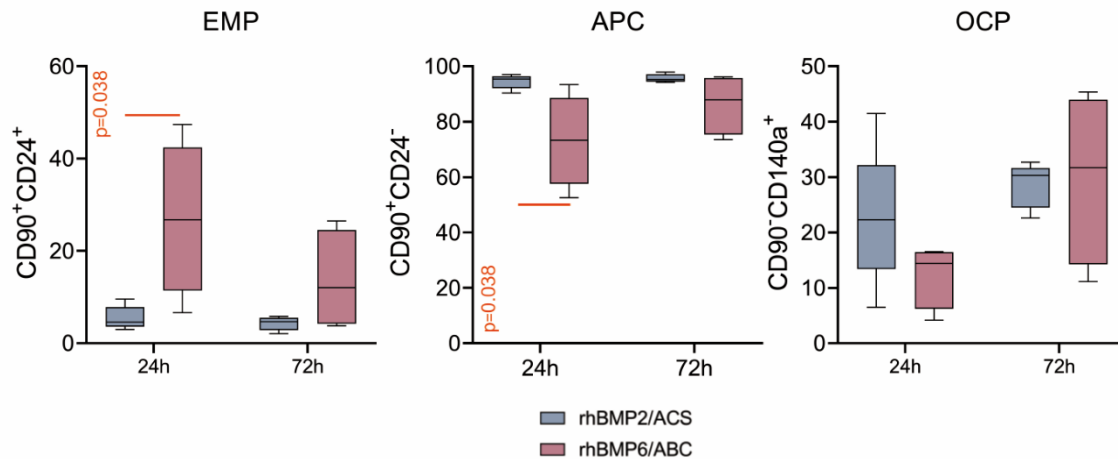
Mezenhimalne stanične populacije analizirane su s ciljem utvrđivanja promjena u sastavu populacija koštanih i hrskavičnih progenitora. Prvom kombinacijom protutijela usmjerenim na mezenhimalne biljege su unutar svih nehematopoetskih stanica, odnosno stanica negativnih na leukocitne (CD45), endotelne (CD31) i eritroidne (Ery) biljege analizirani udjeli stanica koje izražavaju biljege CD90 i CD140a. Nadalje, CD90⁺ stanice su nadalje podijeljene prema ekspresiji CD24 staničnog biljega; stanični fenotip CD90⁺CD24⁺ smatra se najranijim multipotentnim progenitorima ili matičnim stanicama (*engl. Early Multipotent Progenitors, EMP*), stanične populacije CD90⁺CD24⁻ fenotipa smatraju adipogenim progenitorima (*engl. Adipogenic Progenitors, APC*) dok se osteohondrogenim progenitorima (*engl. Osteochondroprogenitors, OCP*) smatraju se stanice koje izražavaju CD90⁻CD140a⁺ fenotip (Slika 11).



Slika 11 Strategija određivanja okvira (*engl. gating*) staničnih populacija. Određivanje matičnih stanica (*engl. Early Multipotent Progenitors, EMP*), adipogenih progenitora (*engl. Adipogenic Progenitors, APC*) te osteohondrogenih progenitora (*engl. Osteochondroprogenitors, OCP*) kod nehematopoetskih staničnih populacija koje izražavaju CD45⁻CD31⁻Ery⁻ fenotip.

Matične stanice, koje izražavaju CD90⁺CD24⁺ fenotip, u najvećem broju prisutne su u rhBMP6/ABC implantatima 24h nakon ugradnje. Nakon 72h, nema značajne razlike u broju stanica koje izražavaju CD90⁺CD24⁺ fenotip u rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC implantatima (Slika 12). Suprotno tome, adipogeni progenitori koji izražavaju CD90⁺CD24⁻ fenotip, u najvećem broju prisutni su u rhBMP2/ACS implantatima, 24h nakon potkožne ugradnje. Nakon

72h, nema značajne razlike u broju adipogenih progenitora kod rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC implantata (Slika 12). Nadalje, u testiranim osteoinduktivnim implantatima, rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC, nakon 24h odnosno 72h, ne postoji razlika u broju osteohondrogenih progenitora koji izražavaju stanični fenotip CD90⁻CD140a⁺ (Slika 12).



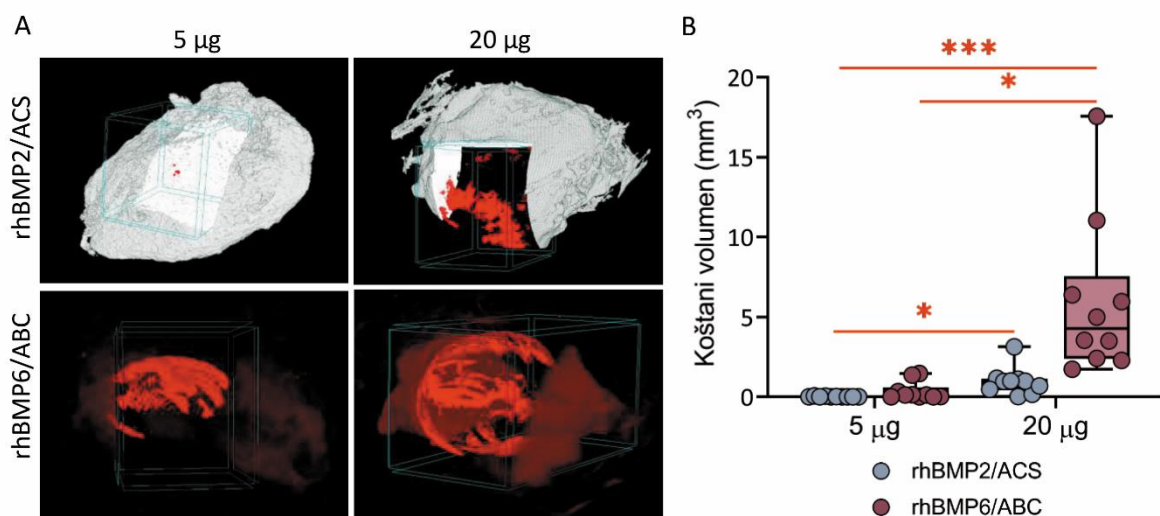
Slika 12 Učestalost najranijih multipotentnih progenitora (CD90⁺CD24⁺), adipogenih progenitora (CD90⁺CD24⁻) te osteohondrogenih progenitora (CD90⁻CD140a⁺) kod nehematopoetskih staničnih populacija CD45⁻CD31⁻Ery⁻ fenotipa. Podatci su prikazani kao kutijasti dijagram (*engl. Box and Whisker plot*) sa rasponom od minimalne do maksimalne vrijednosti unutar pokusne skupine, medijanom te p vrijednostima (Kruskal-Wallis test s *post-hoc* testom po Conoveru) koje su označene na grafovima.

5.3.2. Usporedba rhBMP2 na kolagenskoj spužvici i rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku (Pokus 2)

5.3.2.1. MikroCT analiza

Dan 7

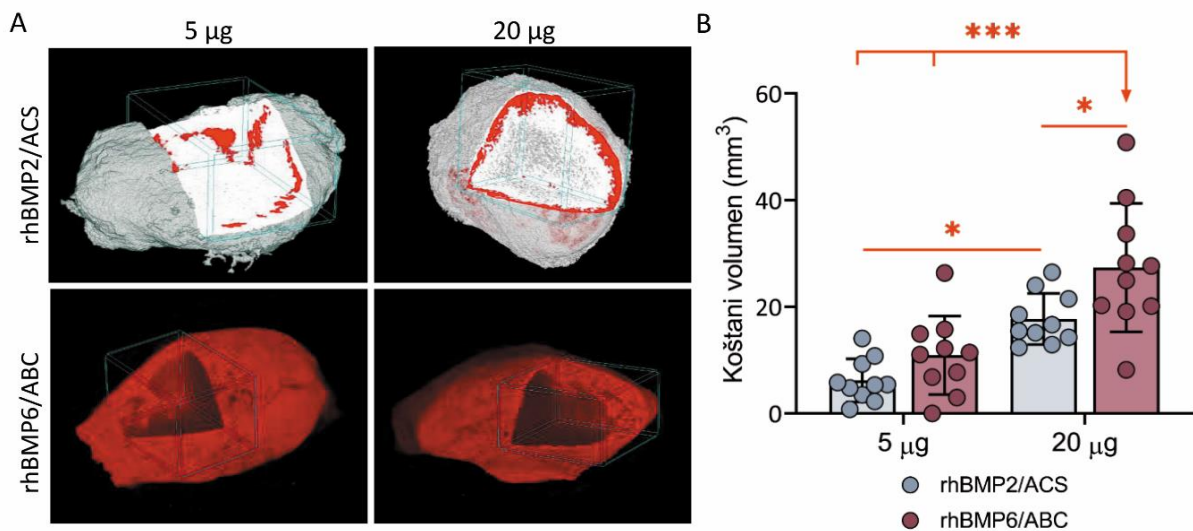
Proces ektopičnog stvaranja kosti i struktura novostvorene kosti evaluirani su mikroCT analizom osteoinduktivnih implantata u zadanim vremenskim točkama. Osim toga, za sve eksperimentalne skupine napravljene su 3D rekonstrukcije implantata. Sedmoga dana nakon potkožne ugradnje osteoinduktivnih implantata, rhBMP2/ACS u dozi od 5 μg pokazuje jedva zamjetnu indukciju kosti, dok su kod primjene veće doze (20 μg) suptilna područja okoštavanja bila vidljiva na perifernim dijelovima implantata. Kolagen (ACS) koji je nosač za rhBMP2 još uvijek je prisutan u velikoj količini u osteoinduktivnim implantatima. Nadalje, rhBMP6/ABC u dozi od 5 μg pokazuje zamjetno više kosti u odnosu na osteoinduktivni implantat rhBMP2/ACS u istoj dozi, a slična situacija je i kod primjene veće doze od 20 μg (Slika 13B). Observacije na 3D rekonstrukcijama potvrđene su mikroCT analizom (Slika 13A).



Slika 13 Novonastala ektopična kost 7 dana nakon potkožne ugradnje. (A) 3D rekonstrukcija novonastale ektopične kosti (crvena boja) primjenom osteoinduktivnih implantata rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC; kolagen (ACS) koji je nosač za rhBMP2 još uvijek je prisutan u velikoj količini u osteoinduktivnim implantatima (bijela boja). (B) Kvantifikacija koštanog volumena (mm^3) novonastale ektopične kosti primjenom implantata rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC u dozama od 5 i 20 μg . Podatci su prikazani kao kutijasti dijagram (*engl. Box and Whisker plot*) s rasponom od minimalne do maksimalne vrijednosti unutar pokusne skupine, medijanom te p vrijednostima (Kruskal-Wallis test s *post-hoc* testom po Dunnu) koje su označene na grafovima *(P \leq 0.05), ** (P \leq 0.01), *** (P \leq 0.001).

Dan 14

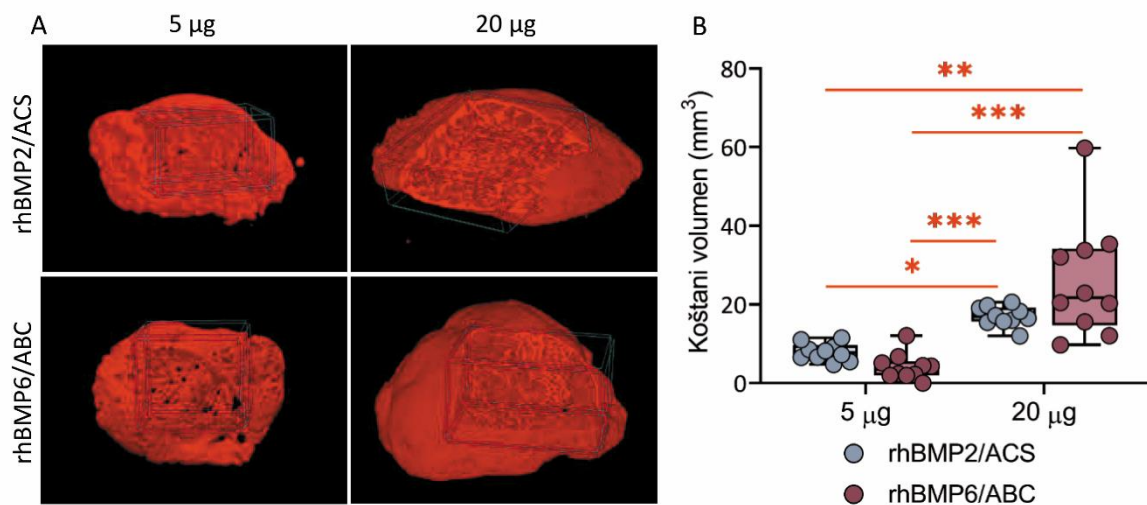
U periodu između sedmog i četrnaestog dana dolazi do intenzivne osifikacije te je 14. dan bila prisutna značajna količina kosti u svim implantatima. U rhBMP2/ACS implantatima i dalje su prisutne određene količine kolagena kao nosača, a na slikama 3D rekonstrukcije vide se područja okoštavanja na perifernim dijelovima implantata koje je intenzivnije kod primjene veće doze rhBMP2 (Slika 14A). Osteoinduktivni implantati rhBMP6/ABC u dozi od 20 μg doveli su do stvaranja najveće količine koštanog volumena (Slika 14B).



Slika 14 Novonastala ektopična kost 14 dana nakon potkožne ugradnje. (A) 3D rekonstrukcija novonastale ektopične kosti (crvena boja) primjenom osteoinduktivnih implantata rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC; kolagen (ACS) koji je nosač za rhBMP2 još uvijek je prisutan u osteoinduktivnim implantatima (bijela boja). (B) Kvantifikacija koštanog volumena (mm^3) novonastale ektopične kosti primjenom implantata rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC u dozama od 5 i 20 μg . Podatci su prikazani kao stupčasti dijagram (*engl. Bar plot*), sa srednjom vrijednosti, standardnom devijacijom te p vrijednostima (dvosmjerna analiza varijance (ANOVA) s *post-hoc* testom po Tukey-Krameru) koje su označene na grafovima - * ($P \leq 0.05$), ** ($P \leq 0.01$), *** ($P \leq 0.001$).

Dan 35

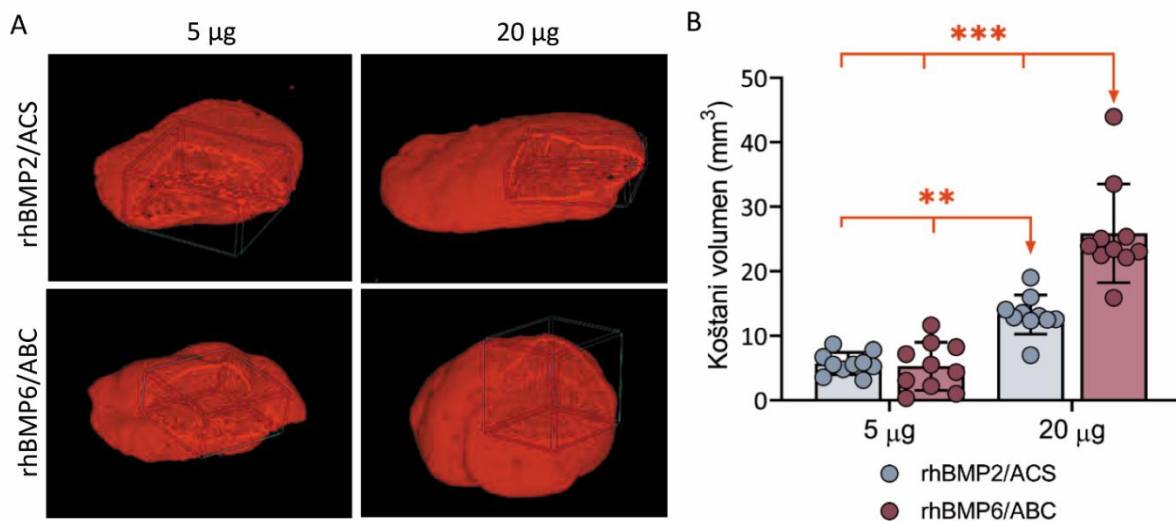
35. dan nakon potkožne ugradnje u aksilarnu regiju štakora, osteoinduktivni implantati koji su stvorili najviše kosti bili su oni s korištenih 20 μg rekombinantnog proteina, bez obzira o primijenjenom osteoinduktivnom sustavu, rhBMP2/ACS ili rhBMP6/ABC (Slika 15B). Na 3D presjecima vidljivo je kako novonastala ektopična kost prisutna u svim pokusnim skupinama, a morfološki izgleda gotovo jednako, s naglašenom kortikalnom kosti i trabekulama u unutrašnjosti. Također, na 3D presjecima na izdvojenim implantatima rhBMP2/ACS nema prisutnog kolagenoskog nosača (Slika 15A).



Slika 15 Novonastala ektopična kost 35 dana nakon potkožne ugradnje. (A) 3D rekonstrukcija novonastale ektopične kosti (crvena boja) primjenom osteoinduktivnih implantata rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC. (B) Kvantifikacija koštanog volumena (mm^3) novonastale ektopične kosti primjenom implantata rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC u dozama od 5 i 20 μg . Podatci su prikazani kao kutijasti dijagram (engl. Box and Whisker plot) s rasponom od minimalne do maksimalne vrijednosti unutar pokusne skupine, medijanom te p vrijednostima (Kruskal-Wallis test s post-hoc testom po Dunnu) koje su označene na grafovima - *(P \leq 0.05), ** (P \leq 0.01), *** (P \leq 0.001).

Dan 50

50. dan nakon potkožne ugradnje, novonastala ektopična kost prikazana na 3D rekonstrukcijama, prisutna je u svim pokusnim skupinama, a morfološki izgleda gotovo jednako, s naglašenom kortikalnom kosti i trabekulama u unutrašnjosti (Slika 16A). Osteoinduktivni implantati rhBMP6/ABC u dozi od 20 μg doveli su do stvaranja najvećeg koštanog volumena, dok je rhBMP2/ACS bio superiorniji u odnosu na skupine s korištenom dozom od 5 μg (Slika 16B).

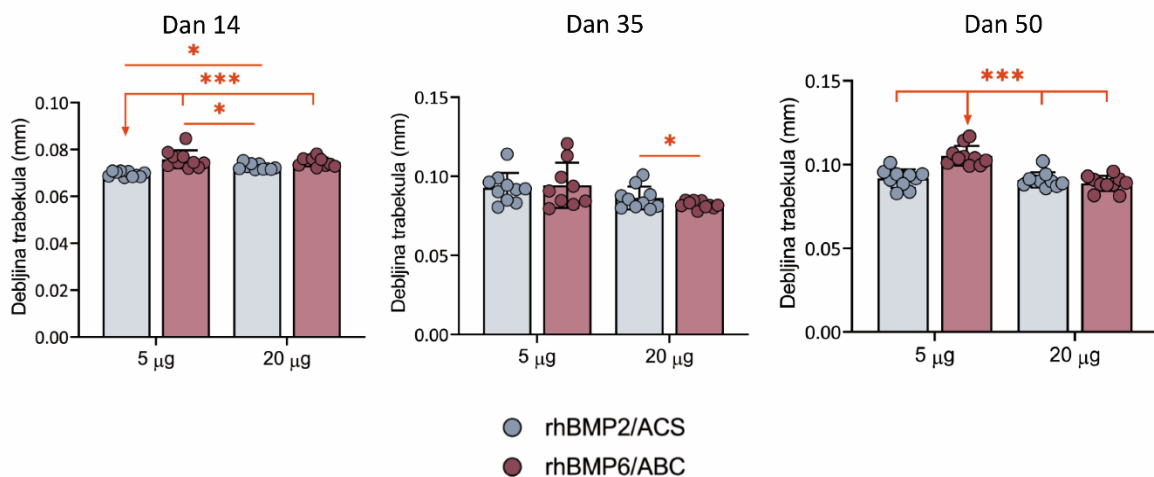


Slika 16 Novonastala ektopična kost 50 dana nakon potkožne ugradnje. (A) 3D rekonstrukcija novonastale ektopične kosti (crvena boja) primjenom osteoinduktivnih implantata rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC. (B) Kvantifikacija koštanog volumena (mm^3) novonastale ektopične kosti primjenom implantata rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC u dozama od 5 i 20 μg . Podatci su prikazani kao stupčasti dijagram (*engl. Bar plot*), sa srednjom vrijednosti, standardnom devijacijom te p vrijednostima (dvosmjerna analiza varijance (ANOVA) s *post-hoc* testom po Tukey-Krameru) koje su označene na grafovima - *($P \leq 0.05$), **($P \leq 0.01$), ***($P \leq 0.001$).

Trabekularni parametri

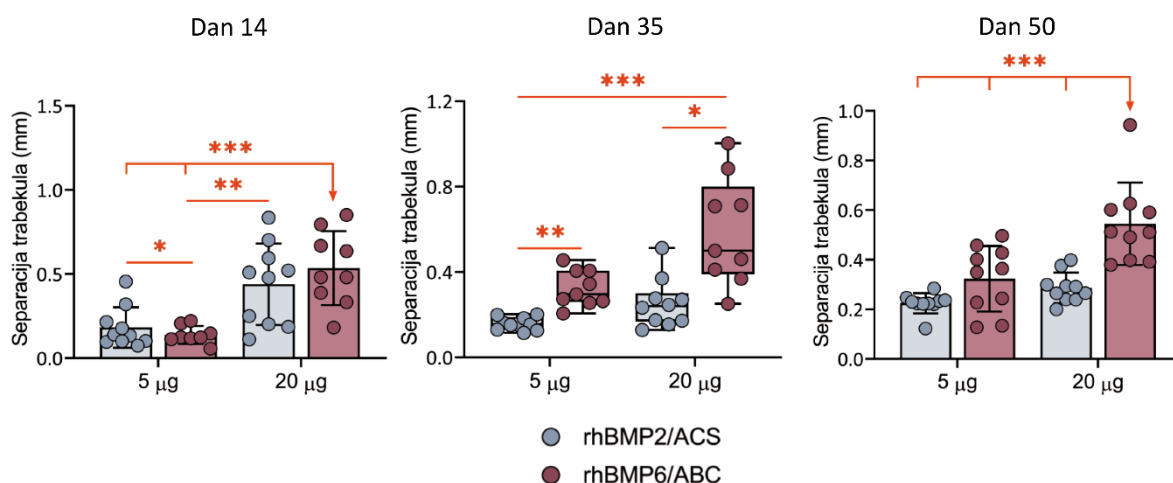
Osim koštanog volumena koji je glavni parametar mikroCT analize, mjereni su i trabekularni parametri kosti koji uključuju debljinu, separaciju i broj trabekula. Trabekularni parametri nisu mjereni 7. dan nakon potkožne ugradnje s obzirom na to da je formacija kosti tek u početku (endohondralna osifikacija) te sukladno tome trabekule još nisu formirane.

14. dana nakon potkožne ugradnje, najtanje trabekule bile su prisutne u rhBMP2/ACS u dozi od 5 μ g u odnosu na druge pokusne skupine. Debljina trabekula 35. dan nakon potkožne ugradnje raste u odnosu na 14. dan, a 50. dan nakon ugradnje najdeblje trabekule su prisutne kod rhBMP6/ABC s primjenjenom dozom od 5 μ g (Slika 17).



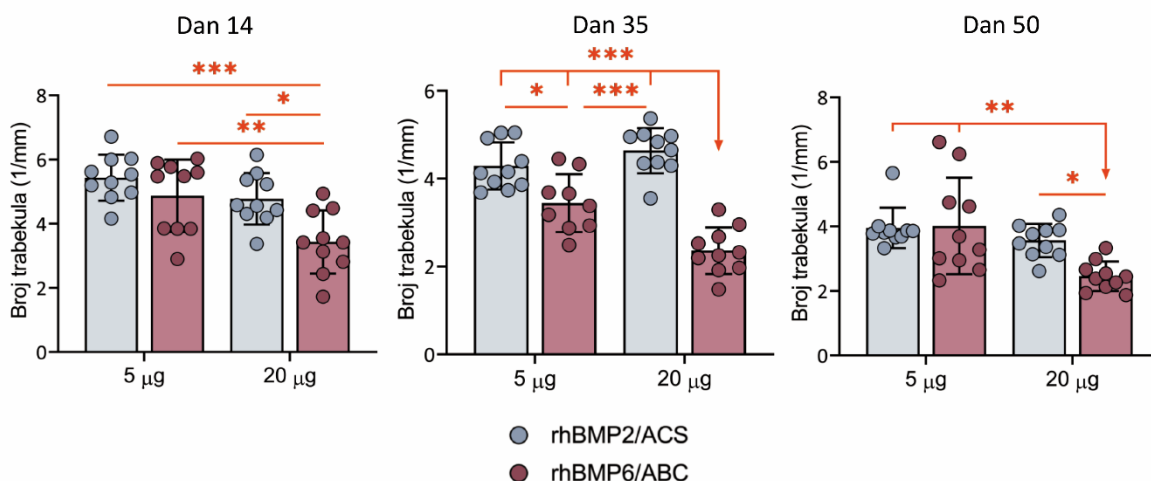
Slika 17 Debljina trabekula u novonastaloj ektopičnoj kosti 14., 35., i 50. dan nakon potkožne ugradnje u aksilarnu regiju štakora. Podatci su prikazani kao stupčasti dijagram (*engl. Bar plot*), sa srednjom vrijednosti, standardnom devijacijom te p vrijednostima (dvosmjerna analiza varijance (ANOVA) s *post-hoc* testom po Tukey-Krameru) koje su označene na grafovima - *($P \leq 0.05$), **($P \leq 0.01$), ***($P \leq 0.001$).

Separacija trabekula, odnosno udaljenost između njih mjerena je 14., 35., i 50. dan nakon potkožne ugradnje u aksilarnu regiju štakora. Separacija trabekula četrnaestog dana nakon ugradnje najveća je kod implantata u kojima je korištena doza od 20 μg , a 35. dan i 50. dan najveća je u rhBMP6/ABC u dozi od 20 μg po implantatu (Slika 18).



Slika 18 Separacija trabekula u novonastaloj ektopičnoj kosti 14., 35., i 50. dan nakon potkožne ugradnje u aksilarnu regiju štakora. Podatci su prikazani kao stupčasti ili kutijasti dijagram - srednja vrijednost sa standardnom devijacijom ili medijan sa rasponom od minimalne do maksimalne vrijednosti unutar pokusne skupine te p vrijednostima (dvosmjerna analiza varijance (ANOVA) s post-hoc testom po Tukey-Krameru ili Kruskal-Wallis s post-hoc testom po Dunnu) koje su označene na grafovima - *($P \leq 0.05$), **($P \leq 0.01$), ***($P \leq 0.001$).

Broj trabekula u novonastaloj ektopičnoj kosti mjeran je 14., 35. i 50. dan nakon potkožne ugradnje. Četrnaest dana nakon ugradnje, najmanji broj trabekula bio je prisutan u implantatima rhBMP6/ABC u dozi od 20 μg , kao i 35. te 50. dan (Slika 19).

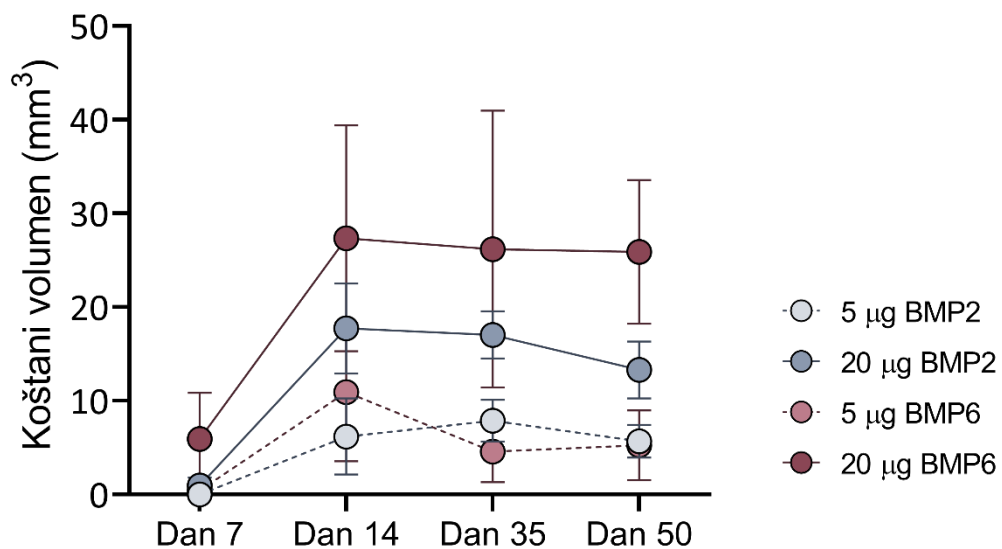


Slika 19 Broj trabekula u novonastaloj ektopičnoj kosti 14., 35., i 50. dan nakon potkožne ugradnje u aksilarnu regiju štakora. Podatci su prikazani kao stupčasti dijagram (engl. Bar plot), sa srednjom vrijednosti, standardnom devijacijom te p vrijednostima (dvosmjerna analiza varijance (ANOVA) s post-hoc testom po Tukey-Krameru) koje su označene na grafovima - *($P \leq 0.05$), **($P \leq 0.01$), ***($P \leq 0.001$).

Koštani volumen i trabekularni parametri u vremenu

Koštani volumen i trabekularni parametri ektopične kosti nastale primjenom osteoinduktivnih implantata, rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC, u dozama od 5 i 20 μg bio je promatran u nekoliko vremenskih točaka – 7., 14., 35. i 50. dan nakon potkožne ugradnje u aksilarnu regiju štakora.

Sedam dana nakon ugradnje, koštani volumen (mm^3) ne razlikuje se unutar pokusnih skupina, a proces okoštavanja je u početnoj fazi. Između 7. i 14. dana dolazi do intenzivne osifikacije te je 14. dana bila prisutna značajna količina kosti u svim implantatima u odnosu na 7. dan, a najveća količina novostvorene ektopične kosti bila prisutna kod rhBMP6/ABC u dozi od 20 μg . Koštani volumen 14. dana dolazi do svog maksimuma u svim pokusnim skupinama osim u rhBMP2/ACS u dozi od 5 μg u kojem maksimum postiže 35. dan, a nakon toga koštani volumen 35. odnosno 50. dan nakon ugradnje ostaje nepromijenjen u svim pokusnim skupinama (Slika 20). U konačnici, rhBMP6/ABC u dozi od 20 μg stvorio je najviše kosti prilikom potkožne ugradnje u aksilarnu regiju štakora mjeren u vremenskim točkama 14., 35. i 50. dana nakon ugradnje (Tablica 5, 6).



Slika 20 Koštani volumen (mm^3) novonastale ektopične kosti ugradnjom osteoinduktivnih implantata, rhBMP2/ACS (plava boja) i rhBMP6/ABC (crvena boja) u dozama od 5 i 20 μg u aksilarnu regiju štakora. Podatci su pokazani kao točke koje predstavljaju srednju vrijednost uz standardnu devijaciju, a pokusne skupine u vremenu povezane su ravnim (20 μg) odnosno isprekidanim (5 μg) linijama.

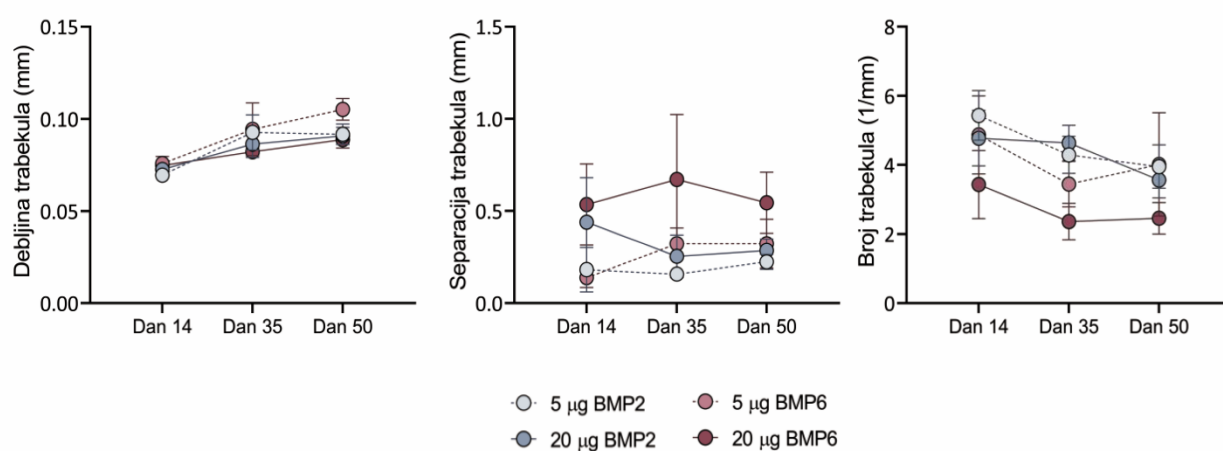
Tablica 5 Prikaz značajnosti i P vrijednosti za koštani volumen novonastale ektopične kosti primjenom osteoinduktivnih implantata, rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC u dozama od 5 i 20 µg po danima. Vrijednosti su analizirane dvosmjernom analizom varijance s odgovarajućim *post-hoc* testom po Tukey-Krameru.

Koštani volumen (mm ³) – pokusne skupine u danu			
Tukey-Kramerov višestruki test usporedbe	Značajno?	Oznaka	P
Dan 7			
5 µg BMP2 vs. 20 µg BMP2	Ne	-	0,99
5 µg BMP2 vs. 5 µg BMP6	Ne	-	>0,99
5 µg BMP2 vs. 20 µg BMP6	Ne	-	0,13
20 µg BMP2 vs. 5 µg BMP6	Ne	-	>0,99
20 µg BMP2 vs. 20 µg BMP6	Ne	-	0,26
5 µg BMP6 vs. 20 µg BMP6	Ne	-	0,17
Dan 14			
5 µg BMP2 vs. 20 µg BMP2	Da	***	<0,001
5 µg BMP2 vs. 5 µg BMP6	Ne	-	0,31
5 µg BMP2 vs. 20 µg BMP6	Da	***	<0,001
20 µg BMP2 vs. 5 µg BMP6	Ne	-	0,06
20 µg BMP2 vs. 20 µg BMP6	Da	**	0,003
5 µg BMP6 vs. 20 µg BMP6	Da	***	<0,001
Dan 35			
5 µg BMP2 vs. 20 µg BMP2	Da	**	0,005
5 µg BMP2 vs. 5 µg BMP6	Ne	-	0,51
5 µg BMP2 vs. 20 µg BMP6	Da	***	<0,001
20 µg BMP2 vs. 5 µg BMP6	Da	***	<0,001
20 µg BMP2 vs. 20 µg BMP6	Da	**	0,005
5 µg BMP6 vs. 20 µg BMP6	Da	***	<0,001
Dan 50			
5 µg BMP2 vs. 20 µg BMP2	Da	*	0,03
5 µg BMP2 vs. 5 µg BMP6	Ne	-	>0,99
5 µg BMP2 vs. 20 µg BMP6	Da	***	<0,001
20 µg BMP2 vs. 5 µg BMP6	Da	*	0,02
20 µg BMP2 vs. 20 µg BMP6	Da	***	<0,001
5 µg BMP6 vs. 20 µg BMP6	Da	***	<0,001

Tablica 6 Prikaz značajnosti i P vrijednosti za koštani volumen novonastale ektopične kosti primjenom osteoinduktivnih implantata, rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC u dozama od 5 i 20 µg kroz vrijeme. Vrijednosti su analizirane dvosmjernom analizom varijance s odgovarajućim *post-hoc* testom po Tukey-Krameru.

Koštani volumen (mm ³) – pokusne skupine kroz vrijeme			
Tukey-Kramerov višestruki test usporedbe	Značajno?	Oznaka	P
5 µg BMP2			
Dan 7 vs. Dan 14	Ne	-	0,11
Dan 7 vs. Dan 35	Da	*	0,02
Dan 7 vs. Dan 50	Ne	-	0,16
Dan 14 vs. Dan 35	Ne	-	0,92
Dan 14 vs. Dan 50	Ne	-	>0,99
Dan 35 vs. Dan 50	Ne	-	0,85
20 µg BMP2			
Dan 7 vs. Dan 14	Da	***	<0,001
Dan 7 vs. Dan 35	Da	***	<0,001
Dan 7 vs. Dan 50	Da	***	<0,001
Dan 14 vs. Dan 35	Ne	-	>0,99
Dan 14 vs. Dan 50	Ne	-	0,37
Dan 35 vs. Dan 50	Ne	-	0,52
5 µg BMP6			
Dan 7 vs. Dan 14	Da	***	<0,001
Dan 7 vs. Dan 35	Ne	-	0,51
Dan 7 vs. Dan 50	Ne	-	0,28
Dan 14 vs. Dan 35	Ne	-	0,06
Dan 14 vs. Dan 50	Ne	-	0,16
Dan 35 vs. Dan 50	Ne	-	0,98
20 µg BMP6			
Dan 7 vs. Dan 14	Da	***	<0,001
Dan 7 vs. Dan 35	Da	***	<0,001
Dan 7 vs. Dan 50	Da	***	<0,001
Dan 14 vs. Dan 35	Ne	-	0,97
Dan 14 vs. Dan 50	Ne	-	0,95
Dan 35 vs. Dan 50	Ne	-	>0,99

Trabekularni parametri mjereni su za sve vremenske točke promatranja osim 7. dana nakon ugradnje, s obzirom na to da je formacija kosti tek u začetku pa trabekule još nisu formirane. Debljina trabekula (mm) u vremenu odnosno 14., 35. i 50. dan nakon ugradnje raste u svim pokusnim skupinama. Udaljenost između trabekula (mm) najveća je u rhBMP6/ABC u dozi od 20 μ g, a najmanja udaljenost je između rhBMP2/ACS u dozi od 5 μ g, što odgovara proporcijama veličine odnosno koštanom volumenu novonastale ektopične kosti. Udaljenost odnosno separacija trabekula unutar pokusnih skupina kroz vrijeme ostaje ista. Suprotno parametru debljine trabekula, broj trabekula (1/mm) u vremenu opada, pri čemu je broj trabekula najmanji u rhBMP6/ABC u dozi od 20 μ g (Slika 21).



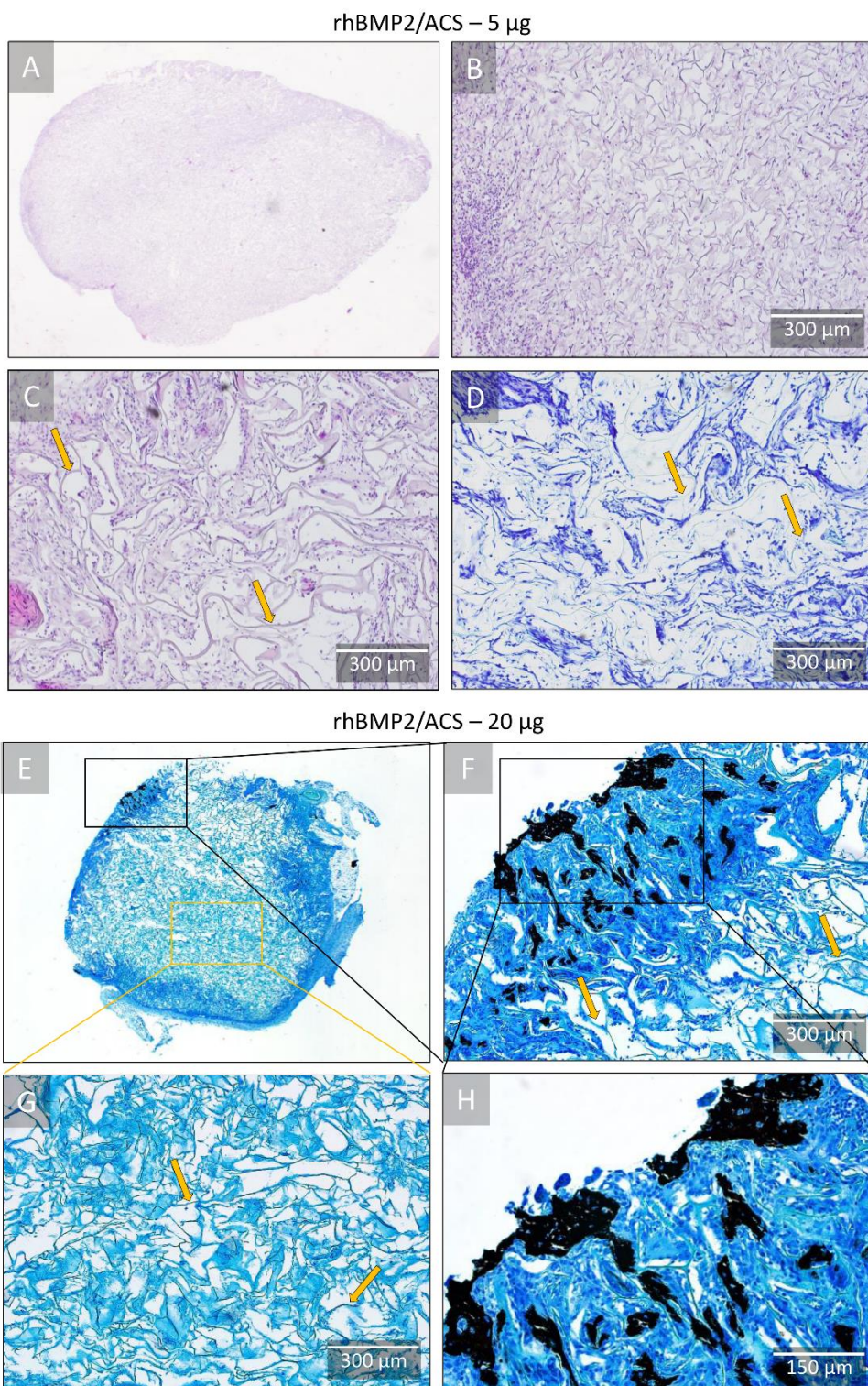
Slika 21 Trabekularni parametri novonastale ektopične kosti ugradnjom osteoinduktivnih implantata, rhBMP2/ACS (plava boja) i rhBMP6/ABC (crvena boja) u dozama od 5 i 20 μ g u aksilarnu regiju štakora. Podatci su pokazani kao točke koji predstavljaju srednju vrijednost uz standardnu devijaciju, a pokusne skupine u vremenu povezane su ravnim (20 μ g) odnosno isprekidanim (5 μ g) linijama.

5.3.2.2.Histološka analiza

Dan 7

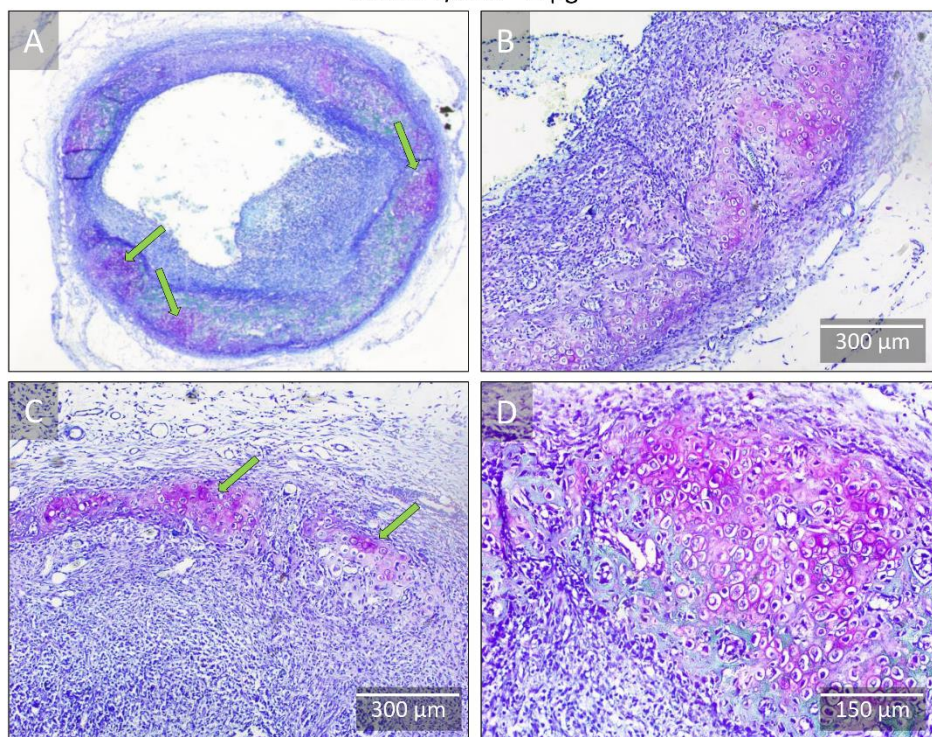
Sedam dana nakon potkožne ugradnje u aksilarnu regiju štakora, u implantatima rhBMP2/ACS u dozi od 5 μ g nije primijećena osifikacija (Slika 22, A-D), a na histološkim preparatima vidljiva su kolagenska vlakna koja su kolonizirale Osx i Sox-9 pozitivne stanice na periferiji implantata (Slika 24, A-B; Slika 25, A-B). Na histološkim preparatima implantata rhBMP2/ACS u dozi od 20 μ g vidljive su sitne zone osifikacije (Slika 22, E-H), odnosno mineralizacije, a kolonizirane stanice između kolagenskih vlakana su kao i kod implantata s primijenjenom manjom dozom, pozitivne na Osx i na Sox-9, ali u puno većem broju (Slika 24, C-D; Slika 25, C-D).

Implantati rhBMP6/ABC u dozama od 5 i 20 μ g pokazuju puno veće zone endohondralne osifikacije u perifernim dijelovima implantata u odnosu na rhBMP2/ACS implantate (Slika 23). Histološki preparati rhBMP6/ACS u dozi od 5 μ g pokazuju najveći broj Osx pozitivnih stanica (Slika 24, E-F). U implantatima u kojima je primijenjena veća doza rhBMP6 ima manje pozitivnih stanica na periferiji gdje su već u velikom broju diferencirani hondrociti (Sox-9 pozitivne) (Slika 24H; Slika 25, G-H), dok se u unutrašnjosti preparata nalazi veći broj Osx pozitivnih stanica. Kolagen tipa II lokaliziran je između hondrocita na rhBMP6/ABC preparatima (Slika 26, A-D).

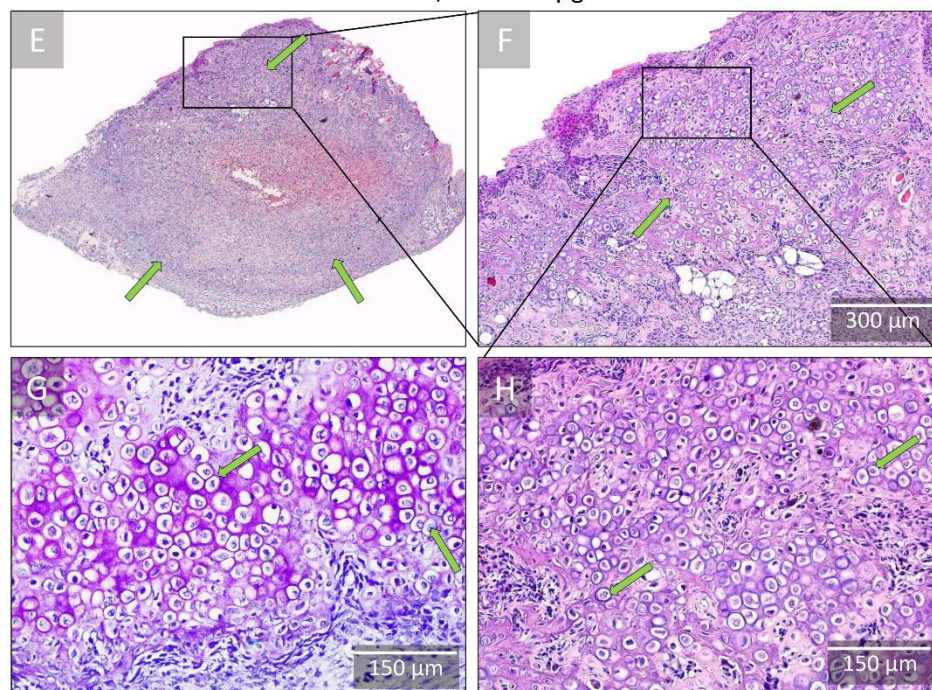


Slika 22 Histologija osteoinduktivnih implantata rhBMP2/ACS u dozi od 5 (A-D) i 20 (E-H) μ g sedam dana nakon potkožne ugradnje. U implantatima rhBMP2/ACS u dozi od 5 μ g (A-D) nije primijećena osifikacija, a na histološkim preparatima vidljiva su kolagenska vlakna među kojima su se kolonizirale stanice na periferiji. U implantatima gdje je primijenjena veća doza (20 μ g) (E-H) vidljive su zone osifikacije (crni kvadrat) na periferiji, a kolagenska vlakna unutar implanata (žuti kvadrat). Histološki preparati su obojeni hemalaun-eozinom (A-C), toluidinskim plavilom (D) te po Von Kossi (E-H). Kolagenska vlakna označena su žutim strelicama. Mjerila su označena u donjem desnom kutu.

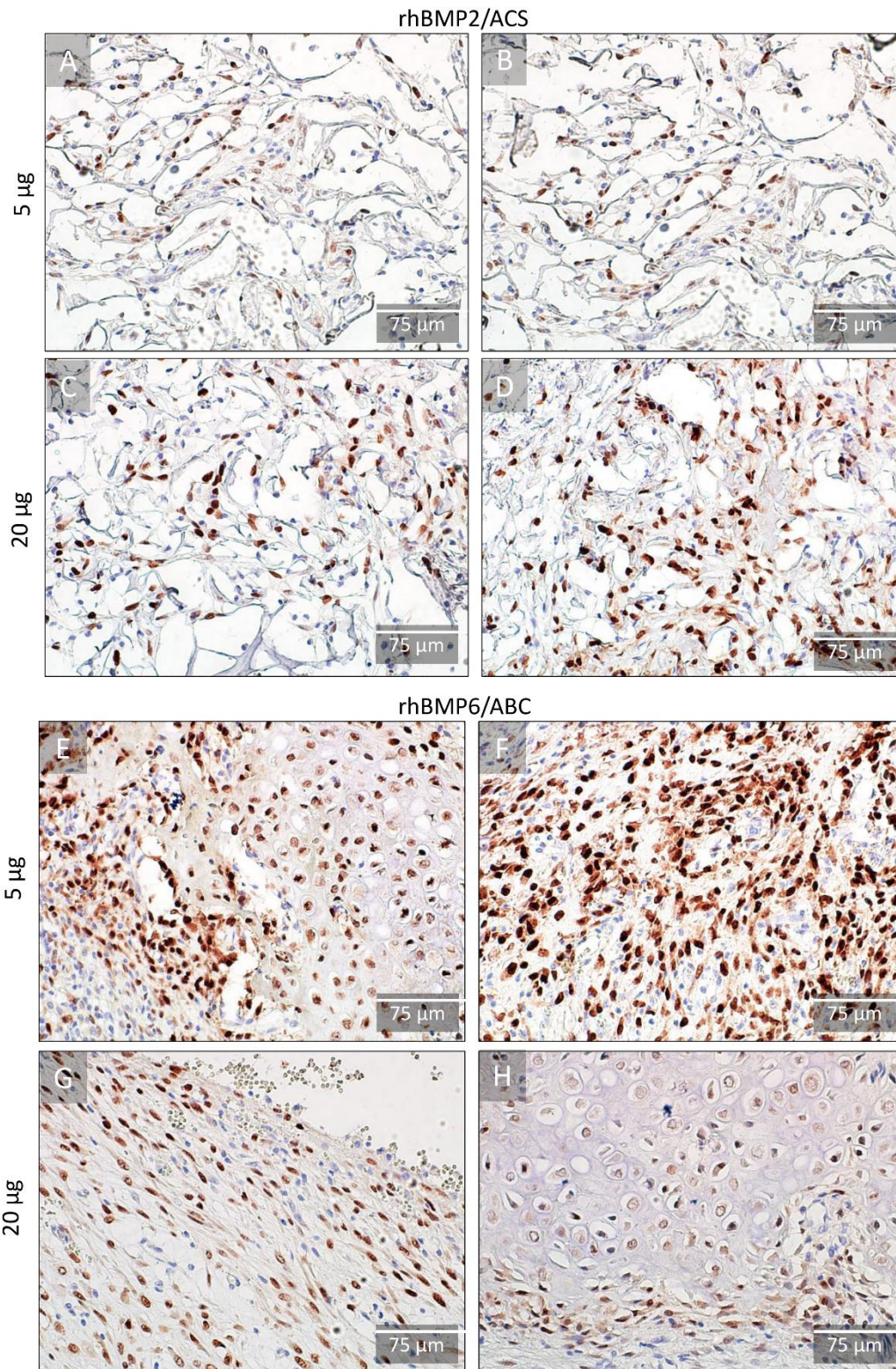
rhBMP6/ABC – 5 μg



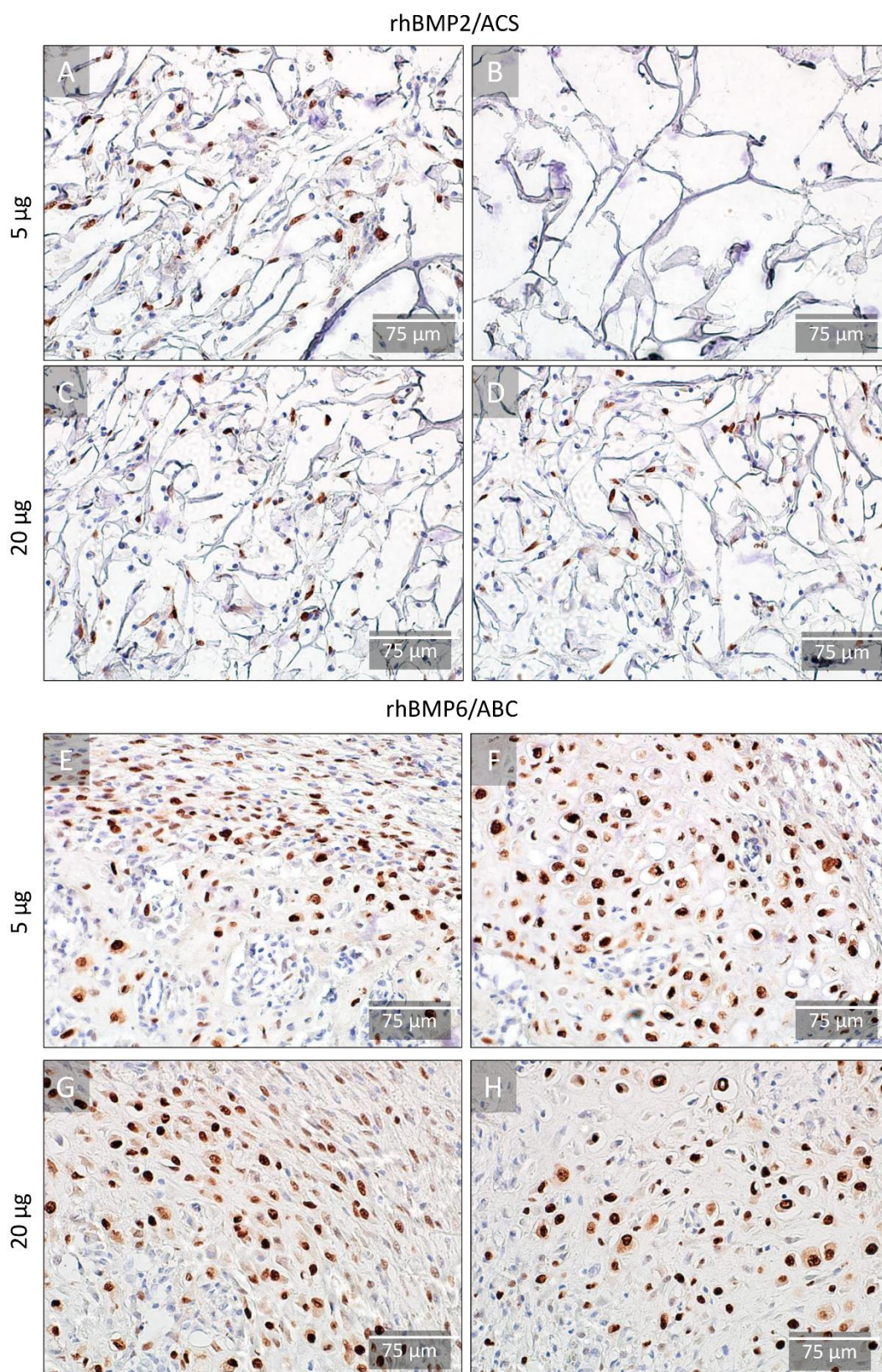
rhBMP6/ABC – 20 μg



Slika 23 Histologija osteoinduktivnih implantata rhBMP6/ABC u dozi od 5 (A-D) i 20 (E-H) μg sedam dana nakon potkožne ugradnje. U implantatima rhBMP6/ABC u dozi od 5 μg (A-D) vidljive su zone endohondralne osifikacije (zelene strelice). U implantatima gdje je primijenjena veća doza (20 μg) (E-H) vidljive su velike zone endohondralne osifikacije (crni kvadrat) i hondrociti (zelene strelice). Histološki preparati su obojeni toluidinskim plavilom (A-D,G) i hemalaun-eozinom (E,F,H). Mjerila su označena u donjem desnom kutu.

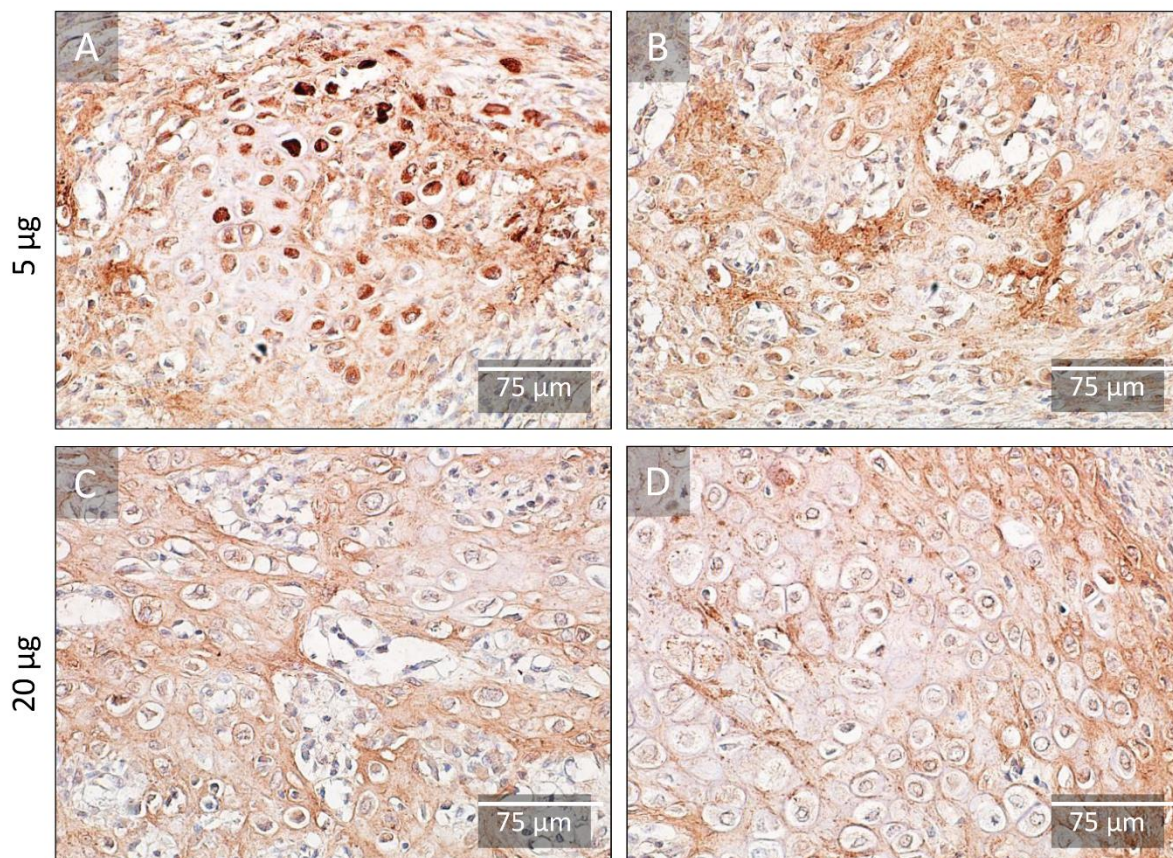


Slika 24 Imunolokalizacija Osterix-a u osteoinduktivnim implantatima rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC u dozama od 5 i 20 µg sedam dana nakon ugradnje. U rhBMP2/ACS implantatima u obje doze prisutne su stanice pozitivne na Osterix. U implantatima rhBMP6/ABC u dozi od 5 µg (E,F) vidljiva je intenzivna imunolokalizacija Osterix-a, kao i kod 20 µg u unutrašnjosti implantata (G) i nešto slabije na periferiji gdje su već diferencirani hondrociti (H). Na imunohistokemijskim preparatima kao kontrastno bojenje upotrijebljen je hematoksilin. Mjerila su označena u donjem desnom kutu.



Slika 25 Imunolokalizacija Sox-9 u osteoinduktivnim implantatima rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC u dozama od 5 i 20 µg sedam dana nakon ugradnje. U rhBMP2/ACS implantatima s obje doze u manjem broju prisutne su stanice pozitivne na Sox-9. U implantatima rhBMP6/ABC u dozi od 5 i 20 µg (E,F,G,H) vidljiva je intenzivna imunolokalizacija Sox-9. Na imunohistokemijskim preparatima kao kontrastno bojenje upotrijebljen je hematoksilin. Mjerila su označena u donjem desnom kutu.

rhBMP6/ABC

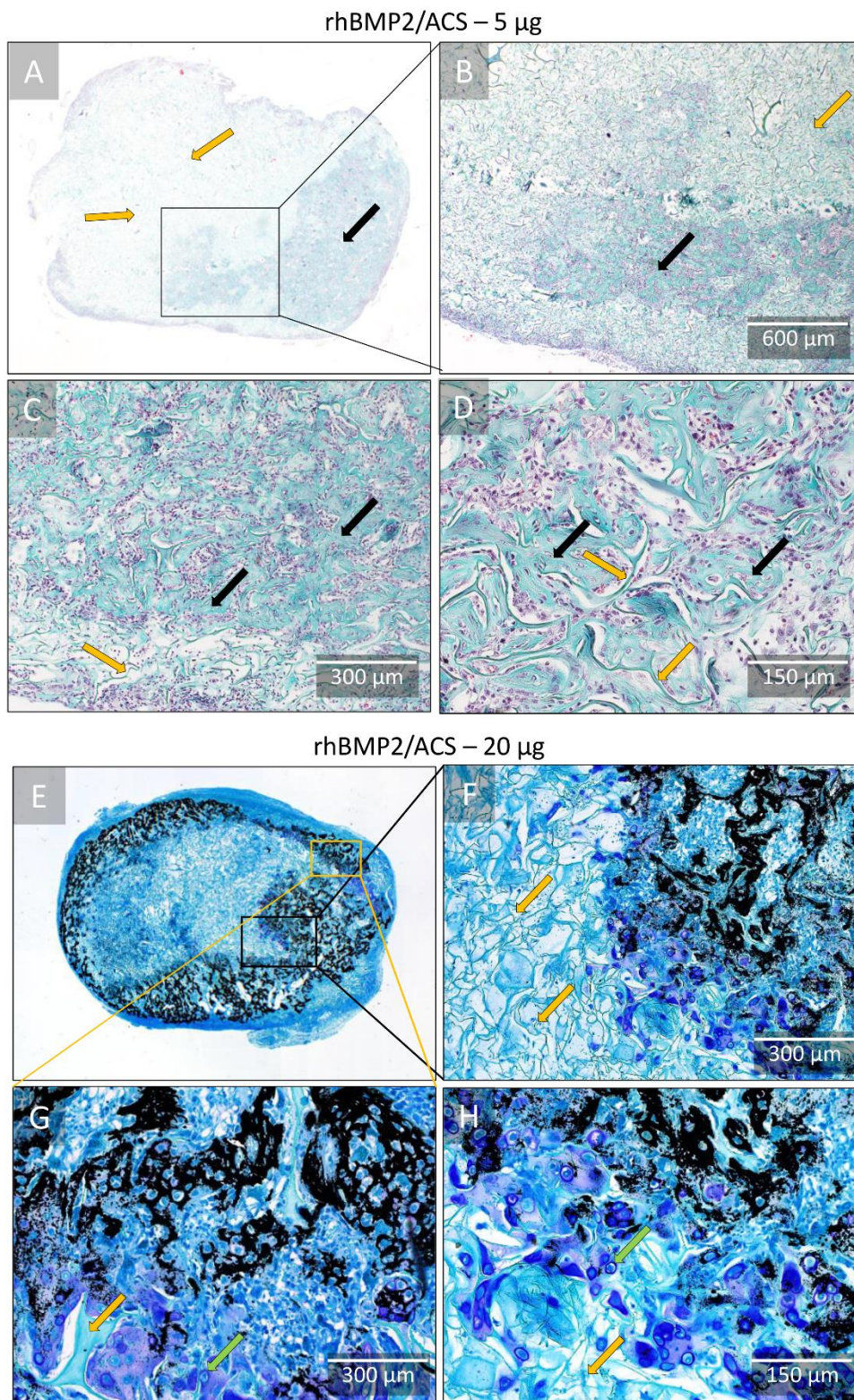


Slika 26 Imunolokalizacija kolagena tipa 2 u osteoinduktivnim implantatima rhBMP6/ABC u dozama od 5 i 20 µg sedam dana nakon ugradnje. U implantatima rhBMP6/ABC kolagen tipa II lokaliziran je između hondrocita. Mjerila su označena u donjem desnom kutu.

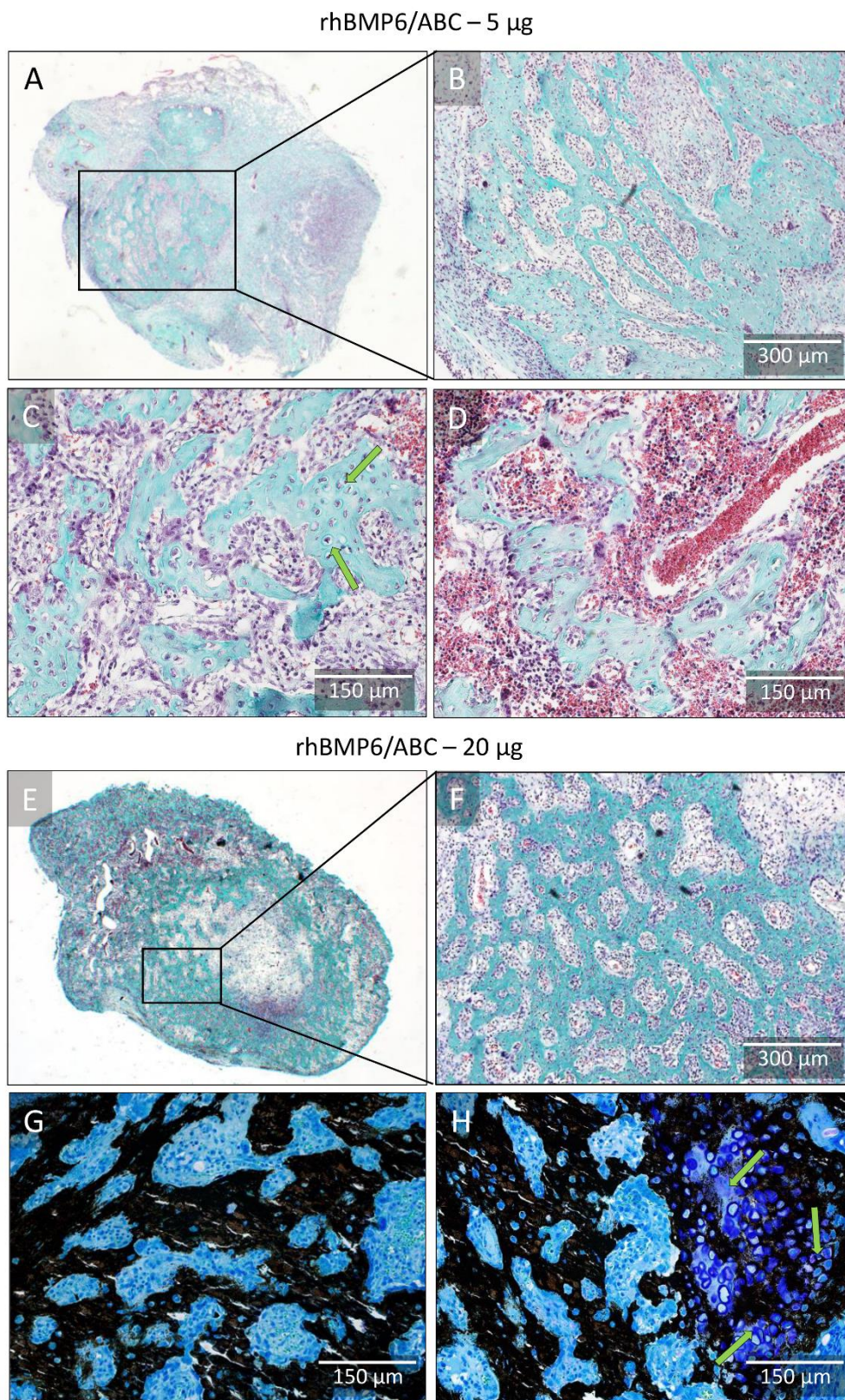
Dan 14

Četnaest dana nakon potkožne ugradnje, novostvorena kost bila je prisutna u svim osteoinduktivnim implantatima bez obzira na korištenu vrstu osteoinduktivnih implantata i dozu. Na rhBMP2/ACS implantatima u dozi od 5 μg vidljive su zone endohondralne osifikacije (Slika 27, A-D), i kolagenska vlakna među kojima su kolonizirane Osterix (Slika 29, A-B) i Sox-9 (Slika 30, A-B) pozitivne stanice. U rhBMP2/ACS implantatima s primijenjenom većom dozom, vidljive su velike zone endohondralne osifikacije na periferiji, gdje su vidljivi jasno diferencirani hondrociti između kojih je jasno vidljiv proces mineralizacije (Slika 27, E-H). Neosificirani dio kolagenskog nosača nalazi se unutar implantata gdje se između vlakana nalaze Osterix (Slika 29, C-D) i Sox-9 (Slika 30, C-D) pozitivne stanice.

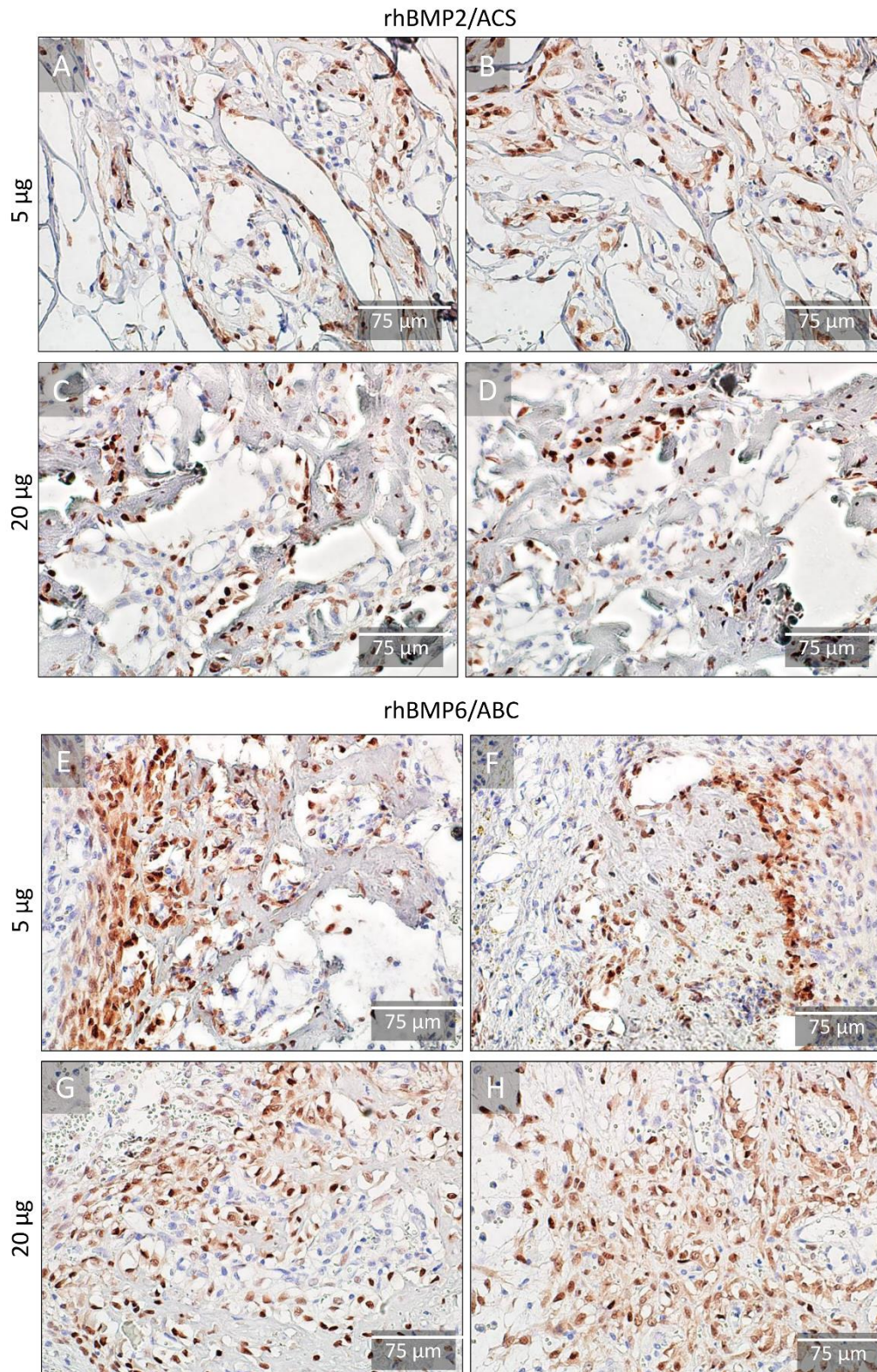
Histološki preparati rhBMP6/ABC u dozi od 5 μg nakon 14 dana pokazuju jasno vidljive zone endohondralne osifikacije i razvoj koštanih trabekula (Slika 28, A-D). Također vidljiva je intenzivna imunolokalizacija Osterix-a (Slika 29, E-F), kao i kod 20 μg u unutrašnjosti implantata (Slika 29, G-H). Novonastala ektopična kost primjenom rhBMP6/ABC u dozi od 20 μg karakterizirana je gustom mrežom trabekula (Slika 28, E-H), ali na nekim dijelovima implantata vidljiv je i dalje proces endohondralne osifikacije (Sox-9 pozitivne stanice) (Slika 30, G-H). Također, na nekim implantatima vidljiv je i nastanak kortikalne kosti, međutim ona nije bila jasno diferencirana u svim implantatima. Novonastala ektopična kost bila je prokrvljena brojnim krvnim žilama, bez obzira na primijenjenu dozu rhBMP6 (Slika 28D).



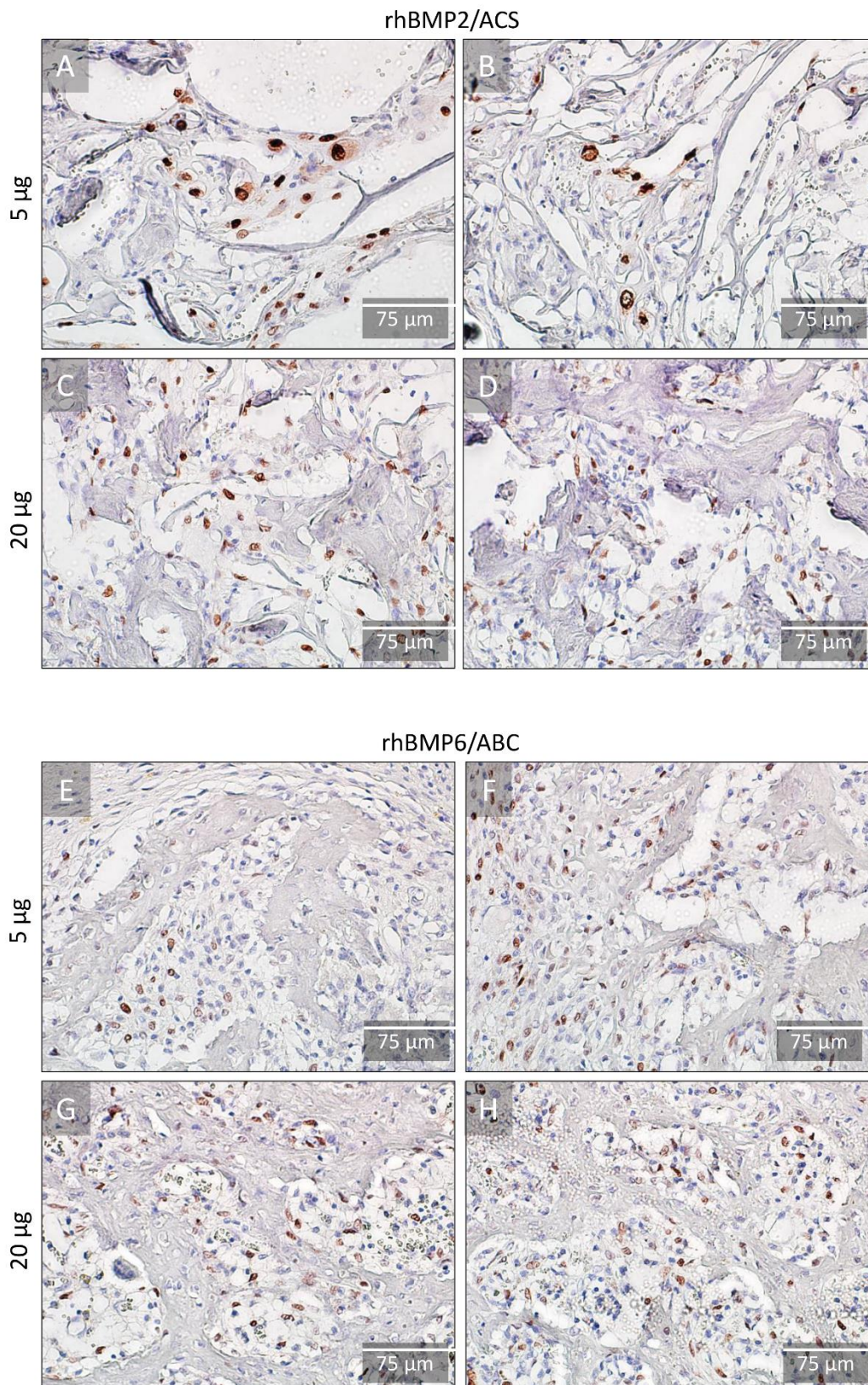
Slika 27 Histologija osteoinduktivnih implantata rhBMP2/ACS u dozi od 5 (A-D) i 20 (E-H) μg četrnaest dana nakon potkožne ugradnje. U implantatima rhBMP2/ACS u dozi od 5 μg (A-D) vidljiva je lokalizirana zona osifikacije (crni kvadrat i strelice) te neosificirana kolagenska vlakna (žute strelice). U implantatima gdje je primijenjena veća doza (20 μg) (E-H) vidljive su velike zone osifikacije na periferiji implantata i kolagenska vlakna unutar implanata. Histološki preparati su obojeni po Goldneru (A-D), te po Von Kossi (E-H). Kolagenska vlakna označena su žutim, a hondrociti zelenim strelicama. Mjerila su označena u donjem desnom kutu.



Slika 28 Histologija osteoinduktivnih implantata rhBMP6/ABC u dozi od 5 (A-D) i 20 (E-H) μg četrnaest dana nakon potkožne ugradnje. U implantatima rhBMP6/ABC u dozi od 5 μg (A-D) vidljiva je lokalizirana zona endohondralne osifikacije (crni kvadrat) te su vidljive krve žile (D). U implantatima gdje je primijenjena veća doza (20 μg) (E-H) vidljive su velike zone osifikacije na periferiji implantata i hondrociti (zelene strelice). Histološki preparati su obojeni po Goldneru (A-F), te po Von Kossi (G,H). Mjerila su označena u donjem desnom kutu.



Slika 29 Imunolokalizacija Osterix-a u osteoinduktivnim implantatima rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC u dozama od 5 i 20 µg četrnaest dana nakon ugradnje. rhBMP2/ACS implantatima u obje doze prisutne su stanice pozitivne na Osterix. U implantatima rhBMP6/ABC u dozi od 5 µg (E,F) vidljiva je intenzivna imunolokalizacija Osterix-a, kao i kod 20 µg u unutrašnjosti implantata (G). Na imunohistokemijskim preparatima kao kontrastno bojenje upotrijebljen je hematoksilin. Mjerila su označena u donjem desnom kutu.

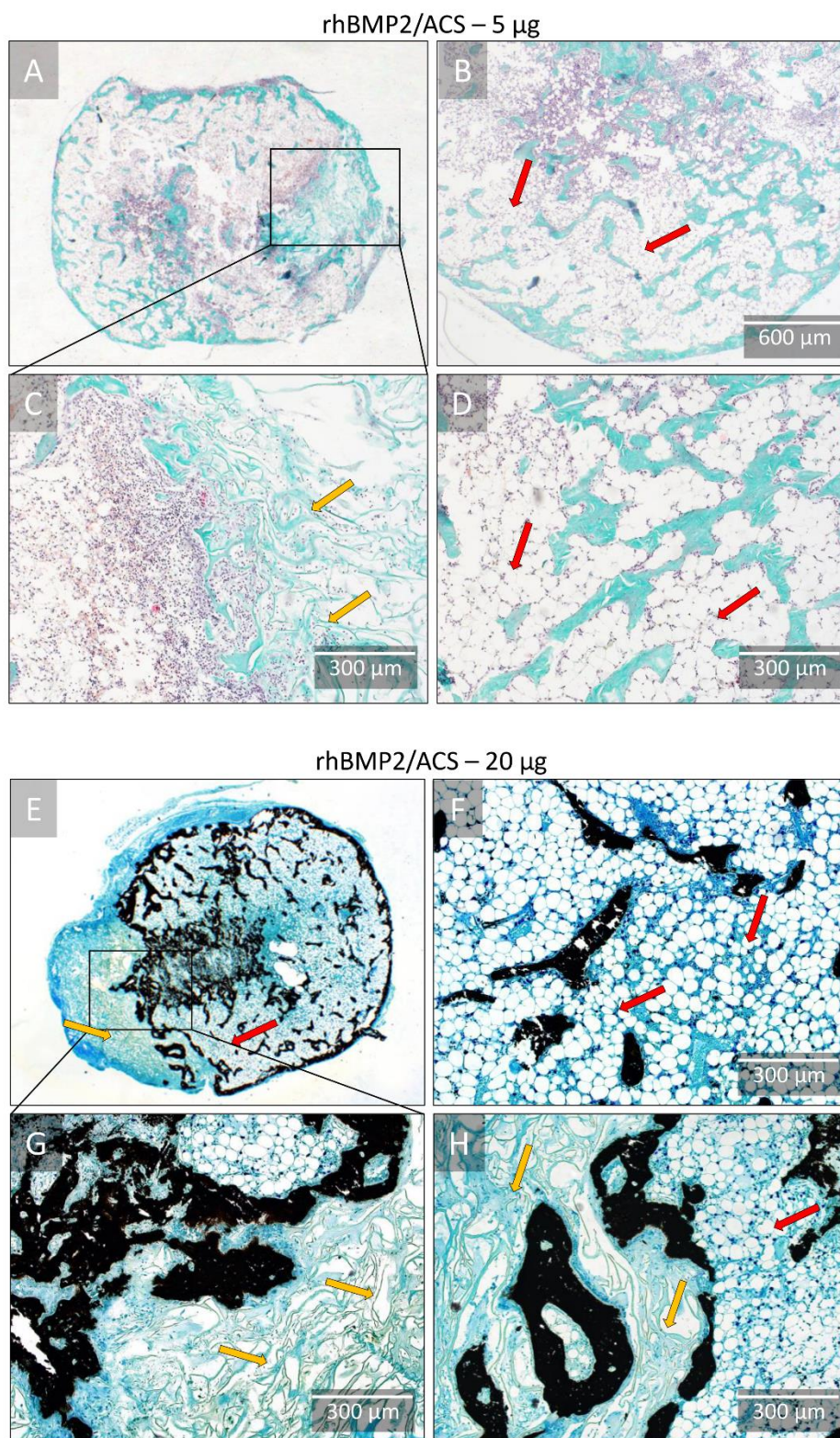


Slika 30 Imunolokalizacija Sox-9 u osteoinduktivnim implantatima rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC u dozama od 5 i 20 µg četrnaest dana nakon ugradnje. Najintenzivnija lokalizacija Sox-9 vidljiva je u rhBMP2/ACS implantatima u dozi od 5 µg. Na imunohistokemijskim preparatima kao kontrastno bojenje upotrijebljen je hematoksilin. Mjerila su označena u donjem desnom kutu.

Dan 35 i 50

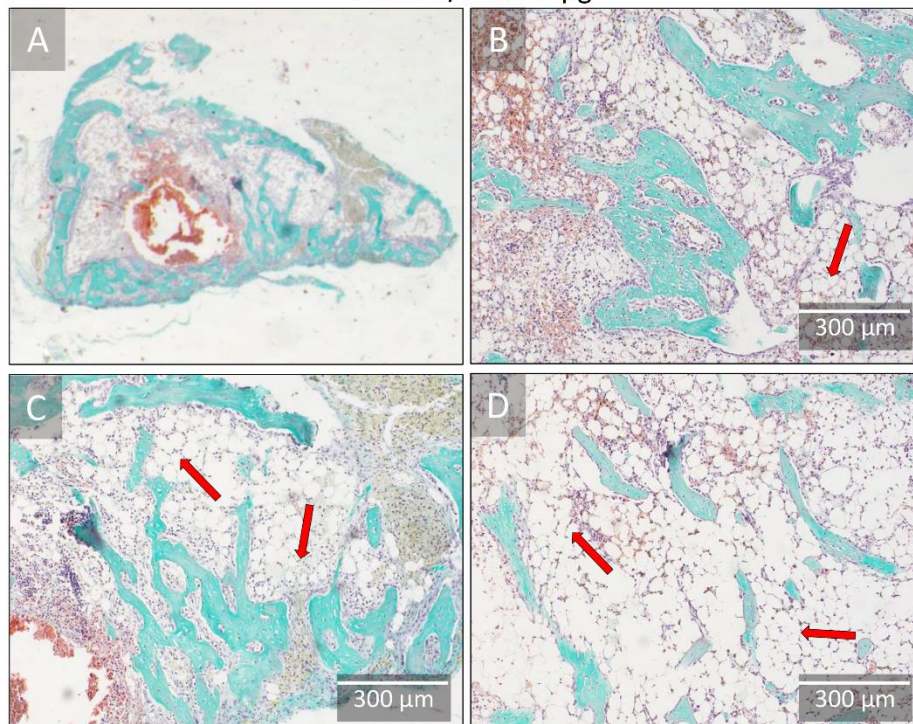
Nakon 35 (Slika 31,32) i 50 dana (Slika 33,34) od potkožne ugradnje u aksilarnu regiju štakora, novonastala ektopična kost morfološki izgleda relativno slično bez obzira na primijenjeni osteoinduktivni implantat (rhBMP2/ACS ili rhBMP6/ABC) ili dozu (5 ili 20 μ g). Postoji značajna histološka razlika u odnosu na dan 14. od potkožne ugradnje, a to je da su adipociti postali predominantne stanice u novostvorenoj ektopičnoj kosti (Slika 31-34).

Za novonastalu ektopičnu kost primjenom osteoinduktivnih implantata, tipične su jasno definirane koštane trabekule između koji se nalazi koštana srž s predominacijom adipocita. Na pojedinim segmentima implantata rhBMP2/ACS i dalje su prisutni neosificirani dijelovi kolagenskog nosača (Slika 31, E,G;H), čak i 50 dana nakon potkožne ugradnje u aksilarnu regiju (Slika 33B). Također, na svim implantatima vidljiva je i kortikalna kost, koja je u odnosu na dan 14 sada jasno definirana i poprilično zadebljana (Slika 33,34). Novonastala ektopična kost bila je prokrvljena brojnim krvnim žilama, neovisno o primijenjenom osteoinduktivnom implantatu i dozi.

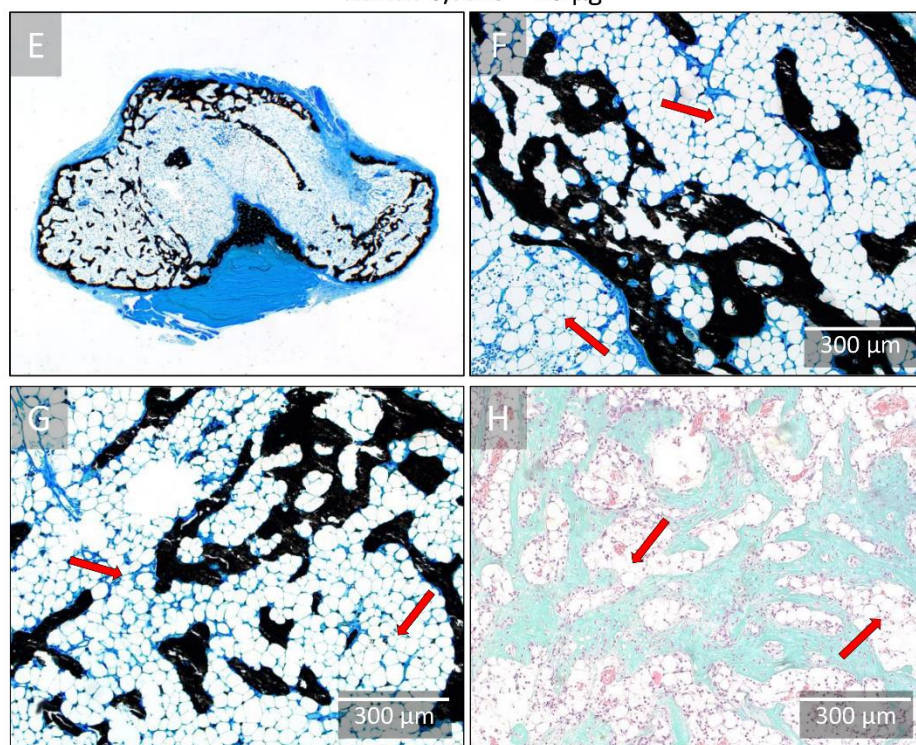


Slika 31 Histologija osteoinduktivnih implantata rhBMP2/ACS u dozi od 5 (A-D) i 20 μ g (E-H) 35 dana nakon potkožne ugradnje. U svim implantatima vidljive su jasno definirane koštane trabekule između koji se nalazi koštana srž, odnosno adipociti. Na nekim segmentima implantata i dalje su prisutni neosificirani dijelovi kolagenskog nosača (crni kvadrat), a kortikalna kost prisutna je na svim implantatima. Histološki preparati su obojeni po Goldneru (A-D), te po Von Kossi (E-H). Kolagenska vlakna označena su žutim, a adipocitno tkivo crvenim strelicama. Mjerila su označena u donjem desnom kutu.

rhBMP6/ABC – 5 μg

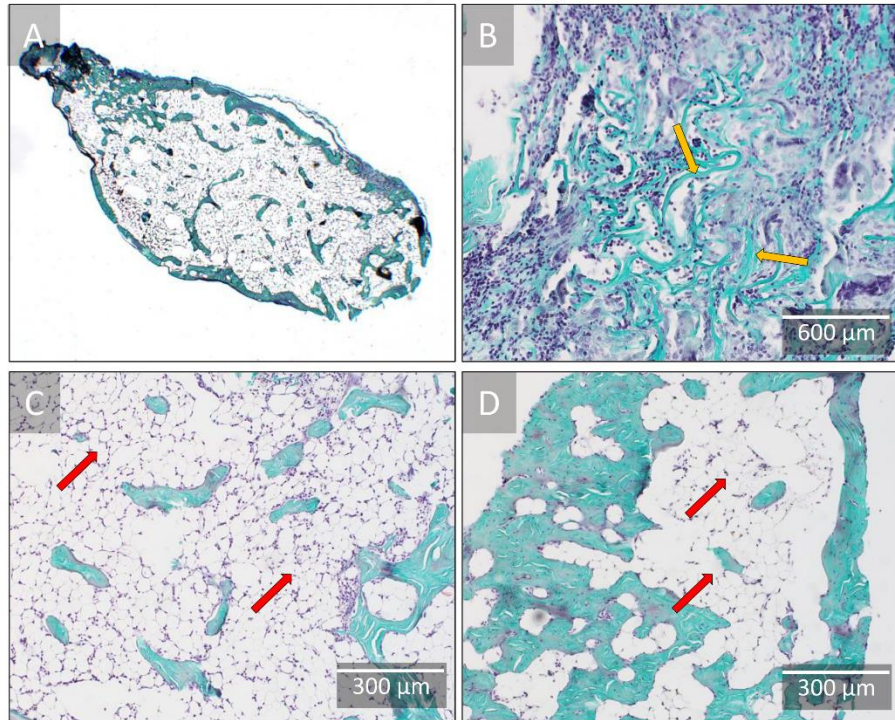


rhBMP6/ABC – 20 μg

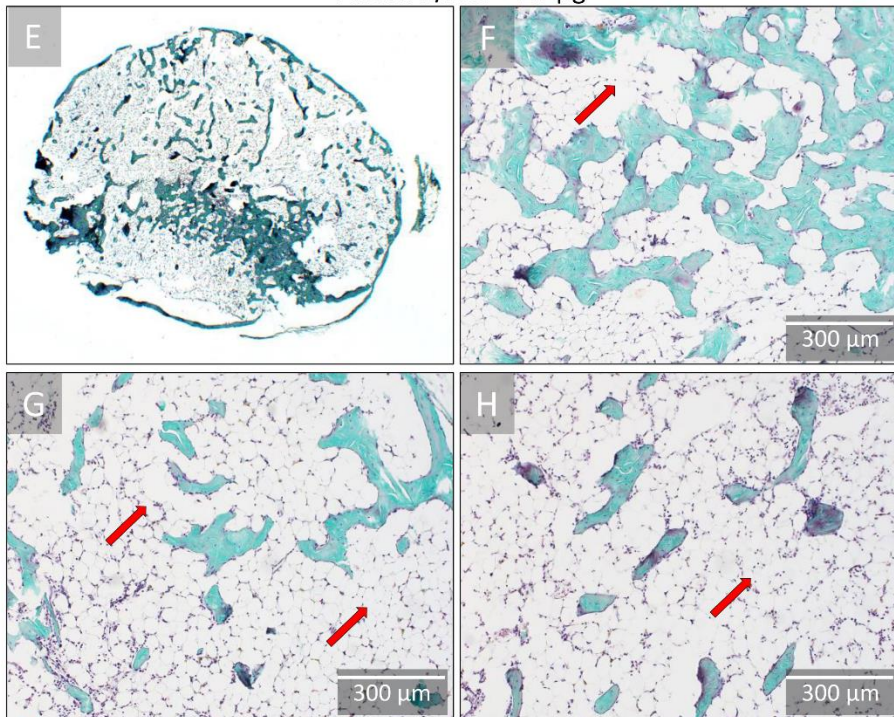


Slika 32 Histologija osteoinduktivnih implantata rhBMP6/ABC u dozi od 5 (A-D) i 20 (E-H) μg 35 dana nakon potkožne ugradnje. U svim implantatima vidljive su jasno definirane koštane trabekule između koji se nalazi koštana srž, odnosno adipociti (crvene strelice). Kortikalna kost prisutna je na svim implantatima. Histološki preparati su obojeni po Goldneru (A-D,H), te po Von Kossi (E-G). Mjerila su označena u donjem desnom kutu.

rhBMP2/ACS – 5 μg

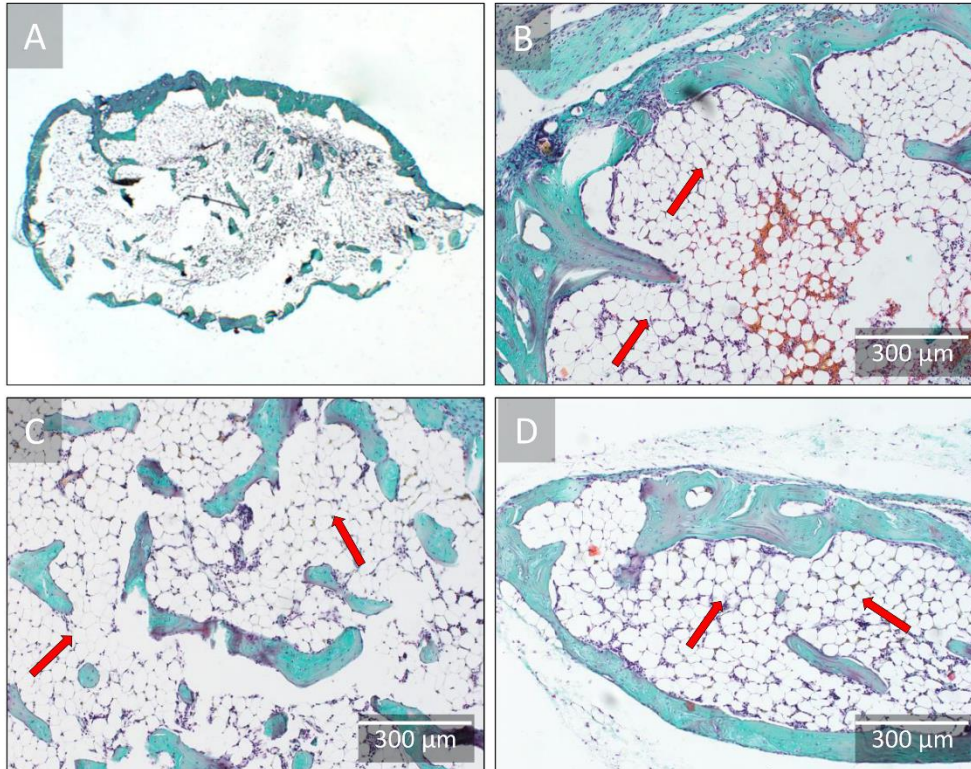


rhBMP2/ACS – 20 μg

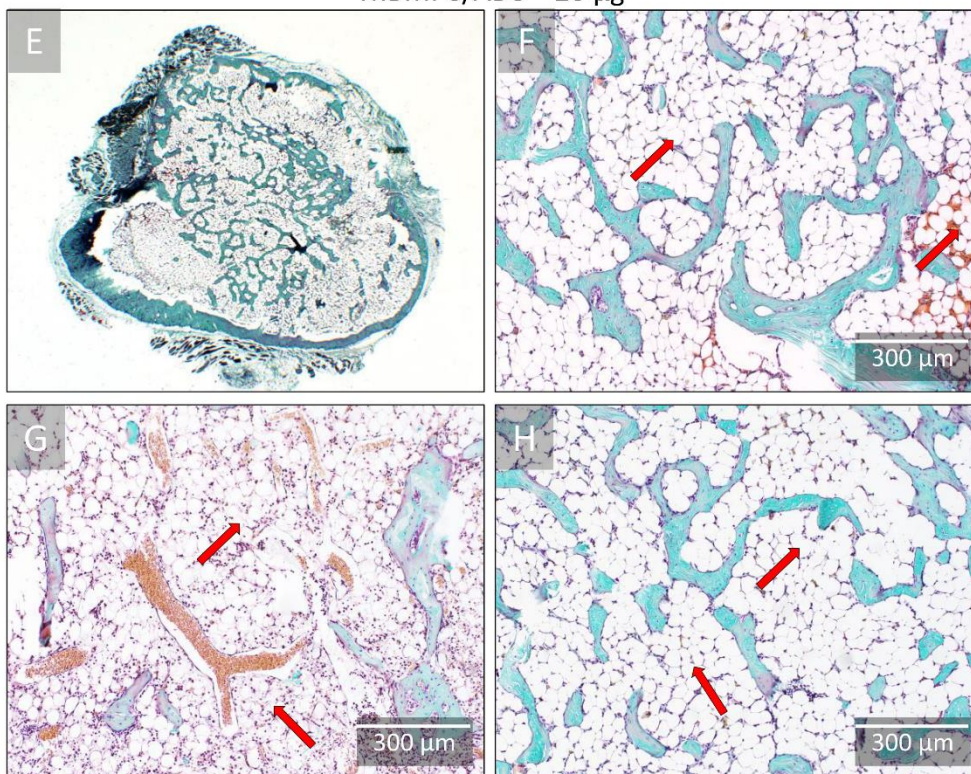


Slika 33 Histologija osteoinduktivnih implantata rhBMP2/ACS u dozi od 5 (A-D) i 20 (E-H) μg pedeset dana nakon potkožne ugradnje. U svim implantatima vidljive su jasno definirane koštane trabekule između koji se nalazi koštana srž, odnosno adipociti (crvene strelice). Na nekim segmentima implantata i dalje su prisutni neosificirani dijelovi kolagenskog nosača (žute strelice), a jasno definirana kortikalna kost prisutna je na svim implantatima. Histološki preparati su obojeni po Goldneru (A-H). Kolagenska vlakna označena su žutim, a adipocitno tkivo crvenim strelicama. Mjerila su označena u donjem desnom kutu.

rhBMP6/ABC – 5 μg



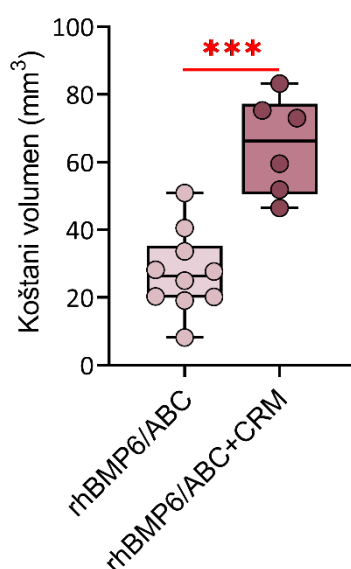
rhBMP6/ABC – 20 μg



Slika 34 Histologija osteoinduktivnih implantata rhBMP6/ABC u dozi od 5 (A-D) i 20 (E-H) μg pedeset dana nakon potkožne ugradnje. U svim implantatima vidljive su jasno definirane koštane trabekule između koji se nalazi koštana srž, odnosno adipociti (crvene strelice), a jasno definirana kortikalna kost prisutna je na svim implantatima. Histološki preparati su obojeni po Goldneru (A-H). Mjerila su označena u donjem desnom kutu.

5.3.3. Usporedba rhBMP2 i rhBMP6 na istom nosaču u tri različite doze (Pokus 3)

U naredno opisanim pokusima korišten je matriks otporan na kompresiju (*engl. Compression Resistant Matrix, CRM*) u obliku granulirane sintetičke keramike, raspona veličina od 500 do 1700 μm , a koja je po kemijskom sastavu bifazična, odnosno kombinacija hidroksiapatita i β – trikalcij fosfata u omjeru 20/80. Dodatkom CRM-a u autologni krvni ugrušak, osim što se poboljšavaju biomehanička svojstva (173), postiže se i veći prinos novonastalog koštanog volumena u odnosu na ishodišnu formulaciju – rhBMP6/ABC (Slika 35) (161).



Slika 35 Dodatak CRM-a (granulirana bifazična sintetička keramika u rasponu veličine od 500 do 1700 μm) nosaču autolognog krvnog ugruška povećava prinos novostvorenog koštanog volumena. Podatci su prikazani kao kutijasti dijagram (*engl. Box and Whisker plot*) sa rasponom od minimalne do maksimalne vrijednosti unutar pokusne skupine, medijanom te p vrijednostima (nespareni t-test s Welchovom korekcijom) koje su označene na grafovima *($P \leq 0.05$), **($P \leq 0.01$), ***($P \leq 0.001$).

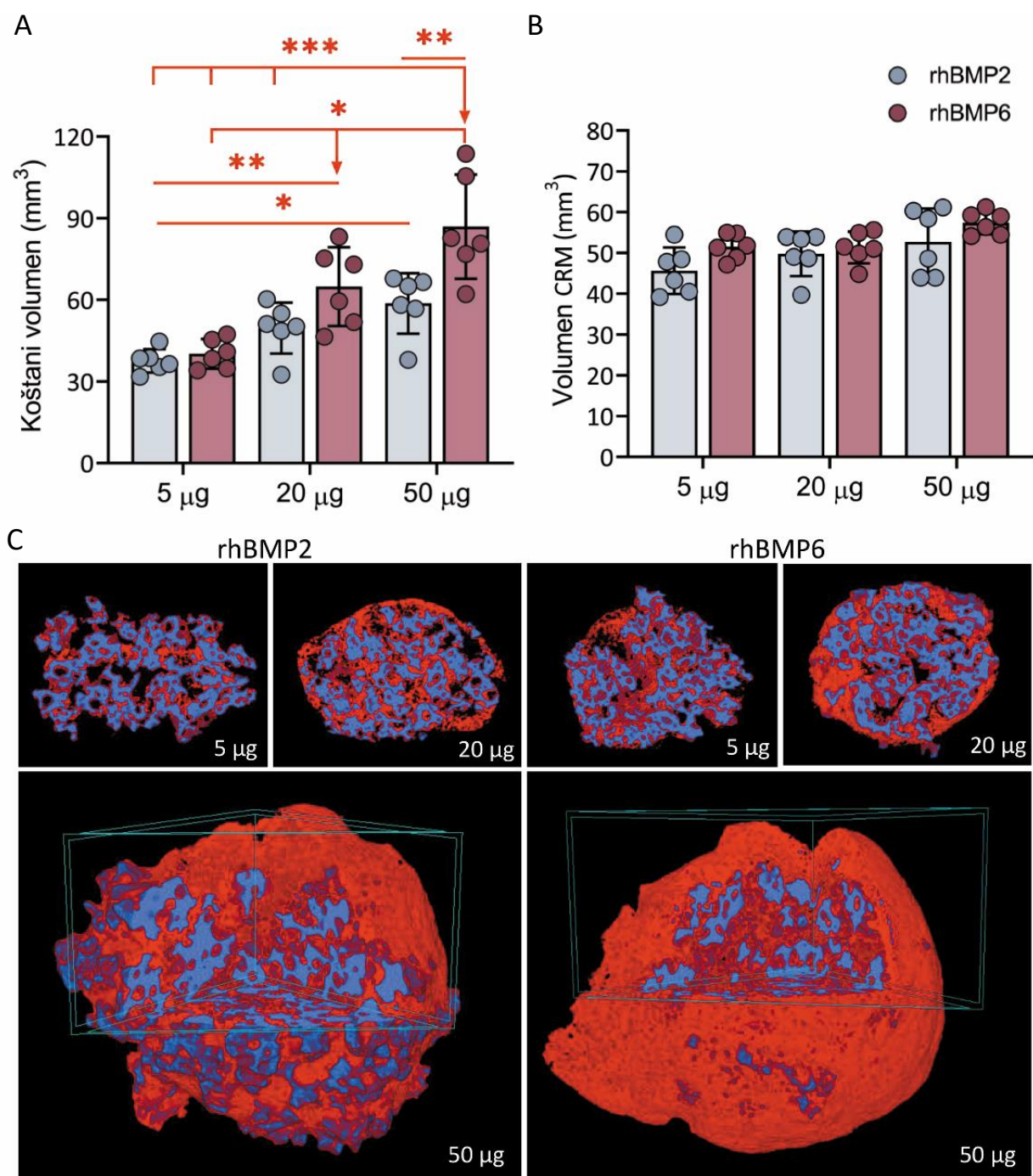
5.3.3.1. MikroCT analiza

U cilju ispitivanja učinkovitosti osteoinduktivnih proteina rhBMP2 i rhBMP6, osteoinduktivni implantati formulirani su u tri različite doze (5, 20 i 50 μg) na jednakom nosaču koji se sastoji of 500 μL autolognog krvnog ugruška kojem je dodano 100 mg CRM-a. Novonastala ektopična kost, zajedno s biokeramičkim česticama, tvori cjelinu odnosno koštano-keramičku strukturu (161). Novostvorene koštano-keramičke strukture evaluirane su

mikroCT analizom četrnaest dana nakon potkožne implantacije u aksilarnu regiju štakora. Osim toga, za sve eksperimentalne skupine napravljene su 3D rekonstrukcije implantata.

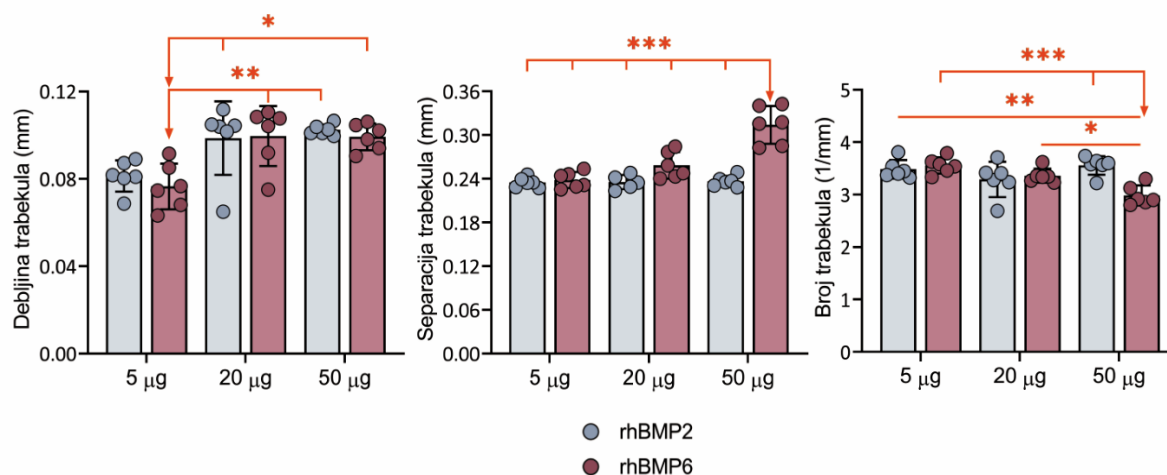
Najmanja količina novostvorene kosti nastala je primjenom doze od 5 μg , bez obzira na korišteni osteoinduktivni protein (Slika 36A). U dozi od 5 μg , nije postojala razlika između rhBMP2 i rhBMP6 u novonastalom koštanom volumenu u sklopu koštano-keramičke strukture. Primjenom osteoinduktivnog implantata rhBMP6/ABC+CRM u dozi od 20 μg nastalo je značajno više kosti u odnosu na manju dozu (5 μg), bez obzira na primijenjeni protein, za razliku od rhBMP2/ABC+CRM u dozi od 20 μg gdje to nije bio slučaj. U dozi od 20 μg , nije postojala razlika između rhBMP2 i rhBMP6 u novonastalom koštanom volumenu. Najveća količina novostvorene kosti nastala je primjenom osteoinduktivnih implantata rhBMP6/ABC+CRM u dozi od 50 μg (Slika 36A). U najvećoj dozi (50 μg), rhBMP6 je bio superiorniji u odnosu na rhBMP2. Volumen CRM-a je u svim pokusnim skupinama bio jednak (Slika 36B).

Na 3D rekonstrukcijama (Slika 36C) prikazana je novostvorena kost (crvena boja) i keramičke čestice (plava boja) u sklopu koštano-keramičke strukture nastale četrnaest dana nakon potkožne ugradnje u aksilarnu regiju štakora. Jasno je vidljivo kako primjenom najmanje doze (5 μg) nastaje najmanje koštanog volumena, dok je najveća količina novostvorene kosti nastala primjenom osteoinduktivnih implantata rhBMP6/ABC+CRM u dozi od 50 μg . Novonastala koštano-keramička struktura primjenom osteoinduktivnih implantata rhBMP6/ABC+CRM u dozi od 50 μg karakterizirana je diferenciranom kortikalnom kosti, a novostvorena kost se većim dijelom nalazila između keramičkih čestica, a manjim dijelom u porama unutar čestica (Slika 36C).



Slika 36 Novonastala ectopična kost 14 dana nakon potkožne ugradnje primjenom osteoinduktivnih implantata s rhBMP2 ili rhBMP6 u različitim dozama (5, 20, 50 μg) na nosaču koji se sastoji od autolognog krvnog ugruška (ABC) i sintetičke keramike (CRM). (A) Kvantifikacija koštanog i (B) CRM volumena (mm³) primjenom implantata u dozama od 5, 20 i 50 μg. Podatci su prikazani kao stupčasti dijagram (*engl. Bar plot*), sa srednjom vrijednosti, standardnom devijacijom te P vrijednostima (dvosmjerna analiza varijance (ANOVA) s *post-hoc* testom po Tukey-Krameru) koje su označene na grafovima - *(P ≤ 0.05), ** (P ≤ 0.01), *** (P ≤ 0.001). (C) 3D rekonstrukcija novonastale ectopične kosti (crvena boja) i keramičkih čestica (plava boja) primjenom osteoinduktivnih implantata s rhBMP2 ili rhBMP6 u rasponu doza na jednakim nosačima.

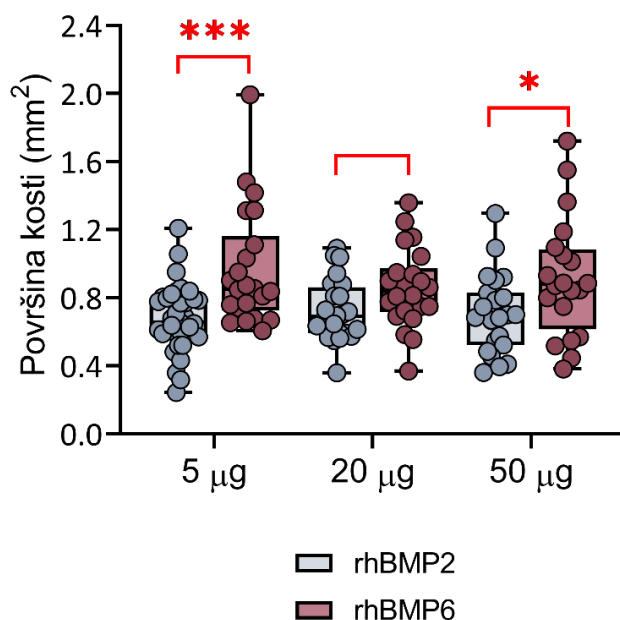
Osim koštanog volumena koji je glavni parametar mikroCT analize, mjereni su i trabekularni parametri kosti koji uključuju debljinu, separaciju i broj trabekula. 14. dana nakon potkožne ugradnje, najtanje trabekule bile su prisutne u koštano-keramičkim strukturama gdje je primijenjena najmanja doza (5 μg) rhBMP6 (Slika 37). Razlika u debljini trabekula nastalih primjenom doze od 20 odnosno 50 μg (rhBMP2 ili rhBMP6) nije se razlikovala unutar pokusnih skupina. Separacija trabekula, odnosno udaljenost između njih, najveća je u koštano-keramičkoj strukturi nastaloj primjenom implantata rhBMP6/ABC+CRM u dozi od 50 μg (Slika 37). Broj trabekula najmanji je u koštano-keramičkoj strukturi nastaloj primjenom rhBMP6/ABC+CRM kojima je korištena doza od 50 μg (Slika 37). Međutim, važno je spomenuti da se mikroCT analizom ne može ustvrditi distinkcija između koštanih trabekula koja nastaju između keramičkih čestica i novostvorene kosti na površini čestica.



Slika 37 Kvantifikacija trabekularnih parametara (debljina, separacija i broj trabekula) novonastale ektopične kosti 14 dana nakon potkožne ugradnje primjenom osteoinduktivnih implantata s rhBMP2 ili rhBMP6 u različitim dozama (5, 20, 50 μg) na nosaču koji se sastoji od autolognog krvnog ugruška (ABC) i sintetičke keramike (CRM). Podatci su prikazani kao stupčasti dijagram (*engl. Bar plot*) sa srednjom vrijednosti, standardnom devijacijom te P vrijednostima (dvosmjerna analiza varijance (ANOVA) s *post-hoc* testom po Tukey-Krameru) koje su označene na grafovima - *(P \leq 0.05), ** (P \leq 0.01), *** (P \leq 0.001).

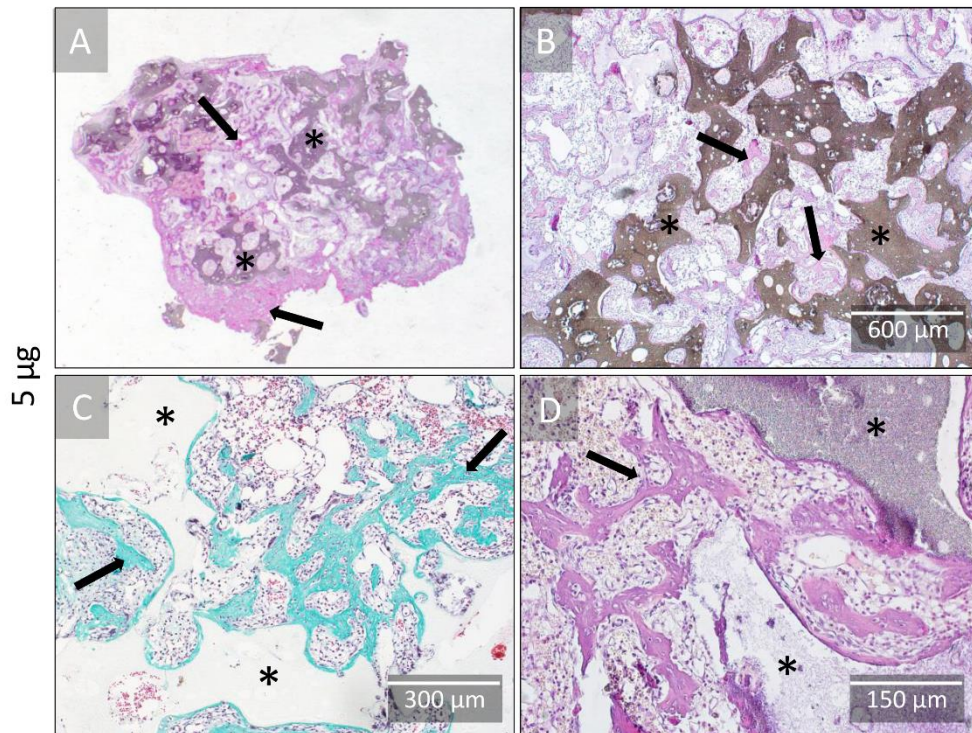
5.3.3.2. Histomorfometrijska i histološka analiza

Četnaest dana nakon potkožne ugradnje, novostvorena kost bila je prisutna u svim osteoinduktivnim implantatima odnosno koštano-keramičkim strukturama nastalih primjenom rhBMP2 i rhBMP6 na istom nosaču koji se sastoji od autolognog krvnog ugruška s dodatkom sintetičke keramike bez obzira na primijenjenu dozu. Histomorfometrijska analiza pokazala je kako je rhBMP6 superiorniji u odnosu na rhBMP2 u dozama od 5 i 50 μg , međutim nije bilo razlike u dozi od 20 μg (Slika 38). Na histološkim preparatima implantata, neovisno o korištenom osteoinduktivnom proteinu i dozi, novostvorena kost prisutna je u obliku trabekula između keramičkih čestica, ali i na njihovoj površini. U novostvorenim koštano-keramičkim strukturama (Slika 39-41), novonastala kost bila je okružena koštanom srži u kojoj se nalazi vrlo malen broj adipocita, te su bile prisutne brojne novostvorene krvne žile. U osteoinduktivnim implantatima gdje je primijenjena doza od 5 μg , kortikalna kost još nije jasno definirana (Slika 39). Kortikalna kost, koja okružuje novonastalu koštano-keramičku strukturu, bila je najprominentnija u osteoinduktivnim implantatima gdje je primijenjen rhBMP6 u dozi od 50 μg (Slika 41E).

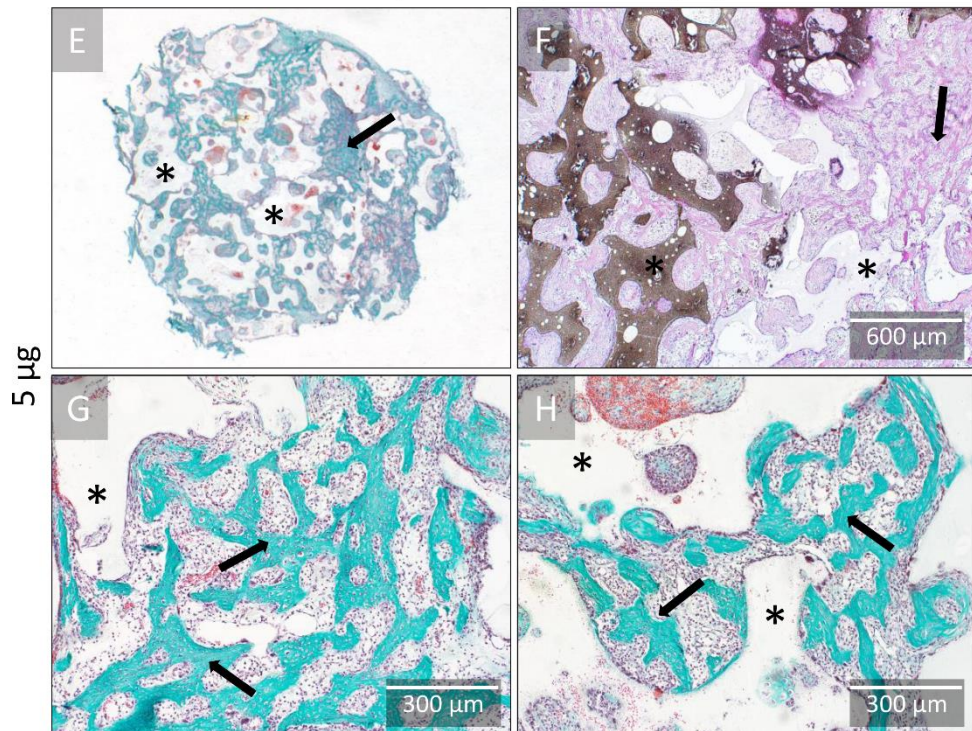


Slika 38 Histomorfometrijska analiza novonastale ektopične kosti 14 dana nakon potkožne ugradnje primjenom osteoinduktivnih implantata s rhBMP2 ili rhBMP6 u različitim dozama (5, 20, 50 μg) na nosaču koji se sastoji od autolognog krvnog ugruška (ABC) i sintetičke keramike (CRM). Analizirani histološki preparati obojani po Goldneru i slikani na 10x povećanju.

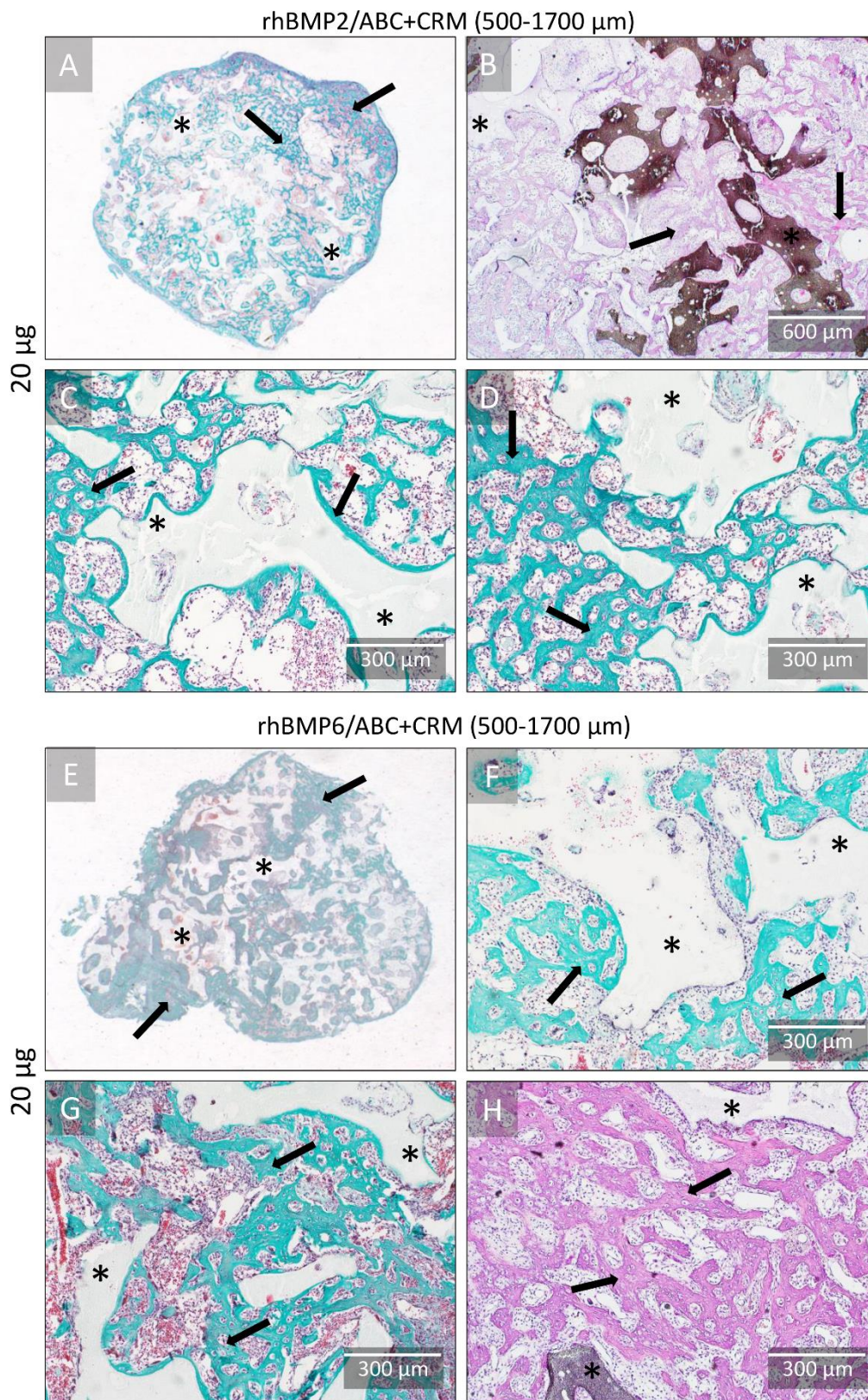
rhBMP2/ABC+CRM (500-1700 μm)



rhBMP6/ABC+CRM (500-1700 μm)

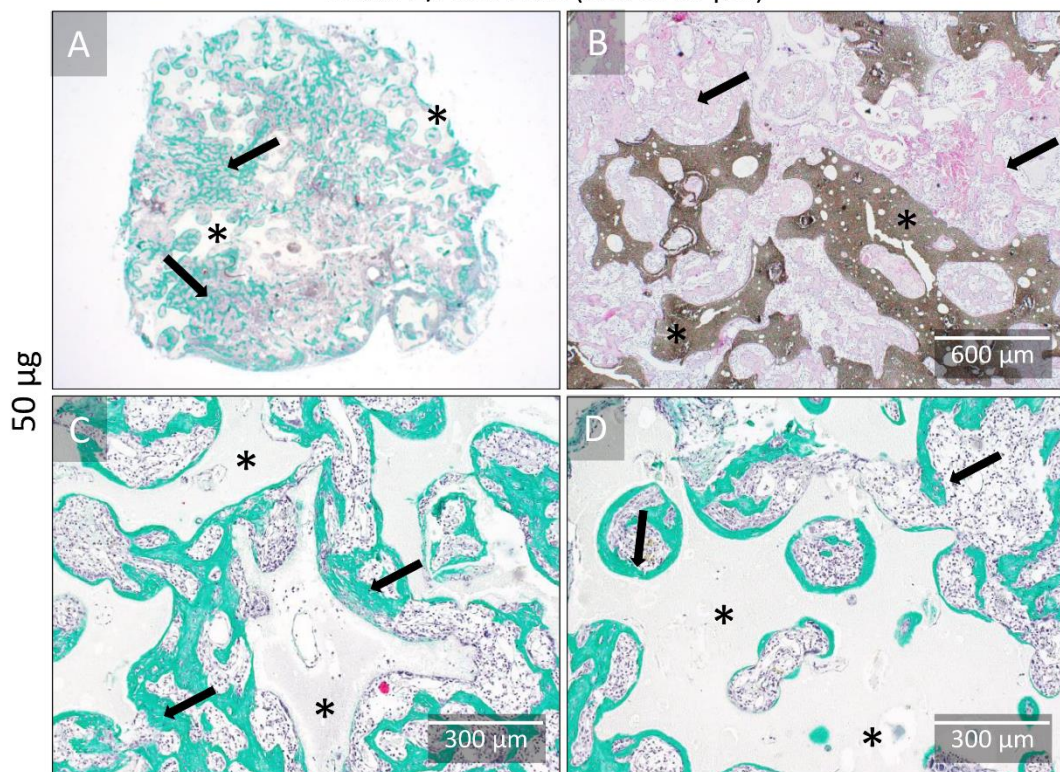


Slika 39 Histologija koštano-keramičkih struktura nastalih primjenom rhBMP2 i rhBMP6 u dozi od 5 μg na istom nosaču koji se sastoji od autolognog krvnog ugruška i sintetičke keramike četrnaest dana nakon potkožne ugradnje. Histološki preparati su obojeni hemalaun-eozinom (A,B;D,F) te po Goldneru (C,E,G,H). Novostvorena kost označena je crnim strelicama, a keramičke čestice asteriskom. Mjerila su označena u donjem desnom kutu.

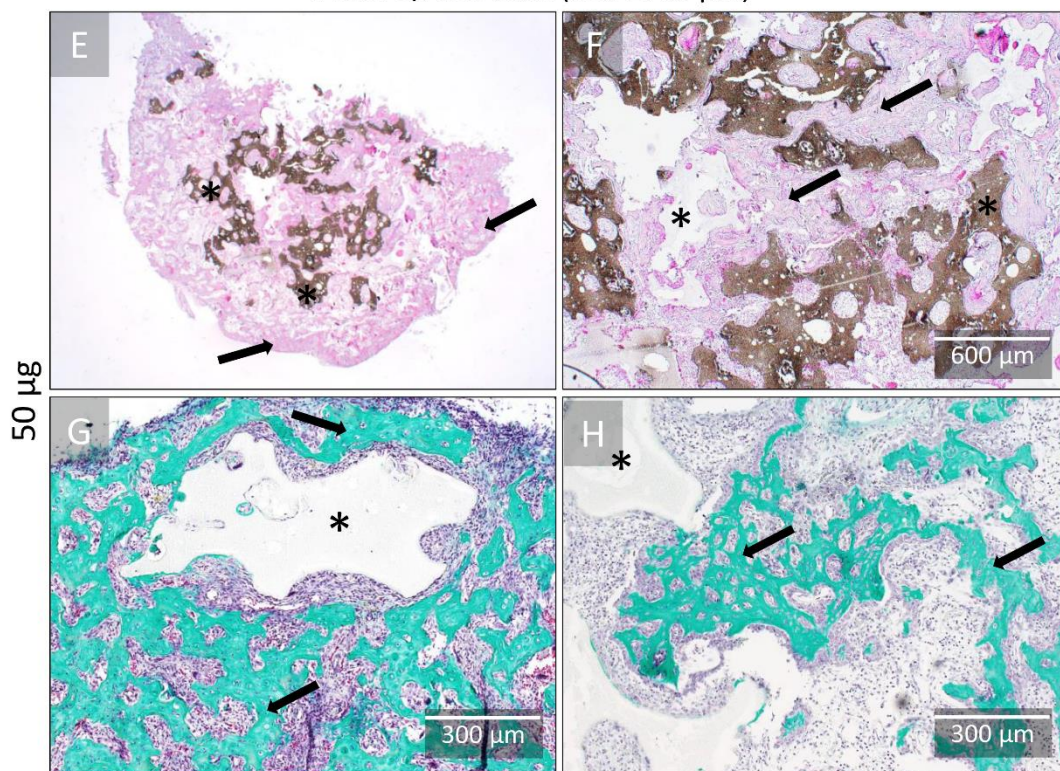


Slika 40 Histologija koštano-keramičkih struktura nastalih primjenom rhBMP2 i rhBMP6 u dozi od 20 μg na istom nosaču koji se sastoji od autolognog krvnog ugruška i sintetičke keramike četrnaest dana nakon potkožne ugradnje. Histološki preparati su obojeni hemalaun-eozinom (B,H) te po Goldneru (A,C-G). Novostvorena kost označena je crnim strelicama, a keramičke čestice asteriskom. Mjerila su označena u donjem desnom kutu.

rhBMP2/ABC+CRM (500-1700 μm)



rhBMP6/ABC+CRM (500-1700 μm)



Slika 41 Histologija koštano-keramičkih struktura nastalih primjenom rhBMP2 i rhBMP6 u dozi od 50 μg na istom nosaču koji se sastoji od autolognog krvnog ugruška i sintetičke keramike četrnaest dana nakon potkožne ugradnje. Histološki preparati su obojeni hemalaun-eozinom (B,E,F) te po Goldneru (A,C,D,G,H). Novostvorena kost označena je crnim strelicama, a keramičke čestice asteriskom. Mjerila su označena u donjem desnom kutu.

6. RASPRAVA

Koštani morfogenetski proteini predstavljaju veliki potencijal kao terapija za regeneraciju kostiju zbog svojih dobrih osteoinduktivnih svojstava. Međutim, takve potentne molekule zahtijevaju dobar nosač koji mora imati zadovoljavajuće karakteristike koje uključuju biokompatibilnost odnosno neimunogenost, mogućnost za dobru vaskularizaciju i celularizaciju, te jednostavnu i ekonomičnu proizvodnju. Osim toga, od esencijalne važnosti je posjedovanje adekvatnog profila otpuštanja osteoinduktivnih molekula kako bi se izbjegle nuspojave poput heterotopične osifikacije te kako bi se postiglo optimalno cijeljenje. Trenutno, na tržištu postoji samo jedan proizvod koji kao aktivnu supstancu koristi koštani morfogenetski protein – INFUSE™ Bone Graft (Medtronic, TN, SAD), koji se sastoji od rekombinantnog humanog koštanog morfogenetskog proteina 2 (rhBMP2) na nosaču kolagenske spužvice. INFUSE™ Bone Graft odobren je za postizanje anteriorne interkorporalne fuzije kralježnice, liječenje nesraslih prijeloma i za oralne maksilofacijalne rekonstrukcije (128). Međutim, kroz primjenu u “*off-label*” indikacijama poput posteriorne i transforaminalne interkorporalne fuzije kralježnice, posterolateralne spinalne fuzije te anteriorne cervikalne diskektomije i fuzije pojavile su se brojne nuspojave koje uključuju heterotopičnu osifikaciju, disfagiju, radikulitis te kompresiju živčanih korijena (128, 132). Navedene nuspojave posljedice su korištenja suprafizioloških doza rhBMP2, te neadekvatnog nosača odnosno kolagenske spužvice koja ne pruža zadovoljavajuću retenciju rhBMP2 te nema dobra biomehanička svojstva (166). Također, s obzirom da je ksenogenog podrijetla, postoji potencijalni rizik za imunološku reakciju i prijenos bolesti kao što je primjerice goveđa spongiformna encefalopatija (*engl. Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE*) (160, 178-184). S obzirom na veliku potrebu za razvojem boljih terapijskih rješenja za regeneraciju kostiju, proveden je velik broj pretkliničkih istraživanja u sklopu kojih su testirane brojne formulacije i različiti materijali u svojstvu nosača za koštane morfogenetske proteine. OSTEOGROW je novo terapijsko rješenje za regeneraciju kosti koje se trenutno testira u kliničkim ispitivanjima, a sastoji se od rekombinantnog humanog koštanog morfogenetskog proteina 6 i nosača u formi autolognog krvnog ugruška (62). Sigurnost i efikasnost ovog terapijskog proizvoda ispitani su u indikacijama frakture distalnog radijusa (63) i visoke osteotomije tibije (64), a funkcionalnost se trenutno ispituje u indikaciji posterolateralne spinalne fuzije uz dodatak koštanog alografta kao matriksa otpornog na kompresiju.

6.1. *In vitro* dinamika otpuštanja

U prvom dijelu ove disertacije ispitivana je *in vitro* dinamika otpuštanja rhBMP2 s kolagenske spužvice odnosno rhBMP6 iz autolognog krvnog ugruška. Adekvatni profil otpuštanja esencijalna je karakteristika dobrog nosača za osteoinduktivne molekule kako bi se u konačnici postiglo optimalno cijeljenje kosti bez neželjenih nuspojava poput heterotopične osifikacije, oticanja i upale na mjestu ugradnje (137-139). S druge strane, postoji potreba za različitim profilima stope otpuštanja osteoinduktivnih proteina ovisno o tipu prijeloma ili indikaciji.

Velik broj studija bavio se ispitivanjem dinamike otpuštanja osteoinduktivnih BMP molekula s različitih nosača, među kojima je najdetaljnije ispitana dinamika otpuštanja rhBMP2 s kolagenske spužvice kao nosača s obzirom da je takva formulacija jedina komercijalno dostupna BMP terapija za regeneraciju kostiju (185-193). Kao i većina studija koja se bavila ispitivanjem dinamike otpuštanja rhBMP2, ova serija pokusa također pokazuje da je dinamika otpuštanja rhBMP2 s kolagenske spužvice karakterizirana naglim inicijalnim otpuštanjem (*engl. "burst release"*). Naime, prilikom inicijalnog ispiranja, te nakon 1h, otpustilo se 39,05% odnosno 63,63% sveukupne količine rhBMP2 s nosača. Zatim slijedi sporija dinamika otpuštanja gdje se u konačnici nakon 72h u medij otpusti 84,99% sveukupne količine rhBMP2 s kolagenskog nosača. Ovi rezultati ukazuju na neadekvatan obrazac dinamike otpuštanja koji kod kliničkih primjena potencijalno može utjecati na nastanak neželjenih nuspojava. Literaturni podaci ukazuju na relativno visoko vezivanje rhBMP2 na kolagen pri pH vrijednostima između 5.2 i 6.5 odnosno 0.1-0.2 mg rhBMP2 po miligramu kolagena, što je objašnjeno razlikama u izoelektričnim točkama dvaju proteina u interakciji, odnosno kolagena i rhBMP2 (147, 148). Laub i sur. (194) s druge strane afinitetnom kromatografijom pokazuju da rhBMP2 ne pokazuje stehiometrijsko vezanje visokog afiniteta za kolagen odnosno 10^{-3} do 10^{-4} mol rhBMP2/mol kolagena. S druge strane, za dinamiku otpuštanja rhBMP6 iz autolognog krvnog ugruška nije uočeno naglo otpuštanje u inicijalnim vremenskim točkama kao kod rhBMP2 s kolagenske spužvice. Naime, prilikom inicijalnog ispiranja (vremenska točka 0h), te nakon 1h, otpustilo se 6,10% odnosno 10,25% sveukupne količine rhBMP6 iz krvog ugruška, dok se kumulativno kroz 72h otpustilo svega 15,00%. Ovakva dinamika otpuštanja može se objasniti dobrim vezivanjem rhBMP6 s proteinima plazme unutar fibrinske mreže.

Cilj *in vitro* studija je simulacija *in vivo* uvjeta, ali uz reducirane okolišne faktore koji mogu utjecati na ishod (147, 195). Međutim, često *in vitro* studije ne mogu u potpunosti

simulirati *in vivo* uvjete. Točnije, potkožnom ugradnjom osteoinduktivni implantati nisu izloženi velikom protoku tjelesne tekućine, dok kretanje pokusne životinje može mehanički utjecati na otpuštanje. S druge strane, u *in vitro* uvjetima, kako bi se mogla kvantificirati količina otpuštenog proteina, osteoinduktivni implantati stavljaju se u određeni volumen medija, u ovom slučaju 1 mL, što je značajno više tekućine u odnosu na *in vivo* uvjete. Takvi uvjeti konkretno imaju utjecaj na kolagensku spužvicu, koja u takvoj količini medija nabubri što posljedično može utjecati na stopu otpuštanja. Također, kompresija koja je prisutna prilikom *in vivo* uvjeta, najčešće nije simulirana u pokusima otpuštanja.

Većina studija koje se bave istraživanjem dinamike otpuštanja terapijskih proteina s odgovarajućih nosača primjenjuju metode detekcije radioaktivnim obilježavanjem ili primjenom imunisorbentnih testova za detekciju (*engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA*). Svaka od navedenih metoda, ima svoje prednosti i mane. Naime, u slučaju radioaktivnog obilježavanja, potreban je zadovoljavajuć prostor i educirano osoblje za rukovanje radioaktivnim materijalima. Osim toga, radioaktivno obilježavanje nije izvedivo za finalnu karakterizaciju proizvoda, s obzirom da može dovesti do promjena proteina što u konačnici može rezultirati promjenama u interakciji protein-nosač (195). Imunosorbentne metode, s druge strane nisu u mogućnosti uvijek detektirati BMP molekule, s obzirom na to da lako agregiraju i podliježu konformacijskim promjenama u fiziološkim uvjetima (144, 186, 196, 197). Iako su spomenute promjene najčešće reverzibilne u *in vivo* uvjetima, one mogu biti dovoljne da se BMP molekule ne mogu detektirati odgovarajućim protutijelima. Osim toga, uzimanje homogenih uzoraka takvih otopina je praktički nemoguće zbog slabe topljivosti BMP molekula odnosno zbog stvaranja agregata pri fiziološkom ili lužnatom pH (138, 196, 198). Također, bitna stavka je i osjetljivost ELISA metode koja se oslanja na specifične karakteristike interakcija između antitijela i antigena. Naime, u ovoj seriji pokusa ispitivanja dinamike otpuštanja rhBMP2 odnosno rhBMP6 s njihovih nosača, pokazalo se da korišteni setovi kemikalija za ELISA-u nemaju jednaku osjetljivost prema ispitivanim proteinima. Naime, set kemikalija za ELISA-u za rhBMP2 pokazao se mnogo osjetljivijim za detekciju otpuštenog rhBMP2 (0,9-125 ng/mL) u odnosu na set kemikalija za rhBMP6 (>31,25 ng/mL). S obzirom da su oba osteoinduktivna implantata formulirana kako bi konačna doza rhBMP2 odnosno rhBMP6 bila 1 µg po implantatu, postavlja se pitanje kakvoće detekcije niskih koncentracija rhBMP6 otpuštenog iz krvnog ugruška. Naime, u slučaju otpuštanja rhBMP2 s kolagenske spužvice, uzorke je bilo potrebno razrijeđivati kako bi se mogla očitati apsorbancija odnosno indirektno koncentracija otpuštenog rhBMP2, dok s druge strane, rhBMP6 u dozi od 1 µg po

implantatu je potencijalno premala doza za raspon osjetljivosti korištenog ELISA seta za kemikalije. U daljnjim ispitivanjima, valjalo bi ispitati otpuštanje jednog od navedenih proteina sa oba nosača kako bi se izbjegla varijabilnost osjetljivosti setova kemikalija za ELISA-u.

Druga bitna stavka istraživanja dinamike otpuštanja je sastav medija u kojima se ispituje količina otpuštenog. U cilju što bolje simulacije tjelesne tekućine, koriste se brojni puferi i mediji koji se koriste pri uzgoju staničnih linija, posebice otopine soli puferirane s fosfatom i/ili karbonatom koje sadrže fiziološke anione, kao što su kloridi ili sulfati, u cilju postizanja adekvatne osmolalnosti i pH vrijednosti (145, 147, 195, 199). U optimizacijskim pokusima, između ostalog, kao medij za istraživanje dinamike otpuštanja rhBMP2 s kolagenske spužvice, odnosno rhBMP6 iz autolognog krvnog ugruška koristio se DMEM, međutim pokazano je da pri njegovom korištenju nije bilo moguće detektirati ispitivane osteoinduktivne proteine. Glavni nedostatak korištenja DMEM-a kao medija je što on kao puferi sustav koristi natrij bikarbonat (3.7 g/L) i stoga zahtijeva okolinu od 5-10% CO₂ za održavanje fiziološkog pH. Problem se javlja kod skladištenja uzoraka na -20°C gdje nema dotoka CO₂ pa takvi uvjeti direktno utječu na pH, odnosno pH iz neutralnog prelazi u lužnato, a takvi uvjeti imaju negativan utjecaj na topljivost proteina s obzirom na njegovu izoelektričnu točku od 8.2. S obzirom da protein u uzorku postaje slabo topiv dolazi do agregacije, pa je količinu prisutnog rhBMP2 u uzorku nemoguće detektirati. Geiger i sur. (147, 195) pokazali su kako topljivost rhBMP2 uvelike ovisi o ionskoj jakosti odnosno koncentraciji fosfata u mediju koji se koristi za ispitivanje dinamike otpuštanja. Naime, niska koncentracija fosfata (9.6 mM) u Dulbeccovom PBS-u rezultirala je znatnom precipitacijom rhBMP2, dok je u izotoničnom Soerensenovom puferu s visokom koncentracijom fosfata (140 mM) rhBMP2 bio potpuno topiv pri pH vrijednosti 7.4 (195) (Geiger PhD). Prema tome, važno je u obzir uzeti da medij u kojem se ispituje dinamika otpuštanja ima odgovarajuć pH i ionsku jakost. Osim toga, važan je odabir materijala od kojeg je napravljeno laboratorijsko posuđe u kojem se provodi pokus otpuštanja. Naime, prilikom provođenja pokusa postoji mogućnost adherencije ispitivanog proteina na površinu laboratorijskog posuđa, pa je stoga ključno odabrati adekvatan materijal kako bi se smanjila pogreška prilikom provođenja pokusa (145, 200-203). U ovom pokusu ispitivanja dinamike otpuštanja korištene su ploče s 24 jažice koje na polistirenskoj površini imaju kovalentno vezan sloj hidrogela koji učinkovito minimizira apsorpciju proteina.

U cilju što bolje simulacije *in vivo* uvjeta može se koristiti serum (humani ili goveđi) (204) ili dodatak albumina goveđeg seruma odgovarajućem puferu (205, 206). Osim toga, albumin se pokazao kao svojevrsni protektant u cilju spriječavanja agregacije proteina (207), a

Surenderman i sur. (145) pokazali su kako dodatak albumina poboljšava topljivost rhBMP2 te da utječe na njegovo elektroforetsko ponašanje. Nekoliko studija pokazalo je da rhBMP2 ima visok afinitet za vezanje na pozitivno i negativno nabijene površine te hidrofobne površine (208, 209). Takvi naboji prisutni su na samom proteinu, pa postoji tendencija da molekule rhBMP2 međusobno stupaju u interakciju u određenim okolišnim uvjetima i na taj način stvaraju agregate. Međutim, afinitet vezanja na dodani albumin čini se dovoljno visokim da u određenoj mjeri spriječi samointerakciju rhBMP2 molekula. Interakcija rhBMP2 i albumina mogla bi biti posljedica hidrofobnih i ionskih interakcija s obzirom na to da rhBMP2 i albumin imaju suprotan neto naboj pri fiziološkoj pH vrijednosti (145, 208, 210). U konačnici, kao medij za ispitivanje dinamike otpuštanja rhBMP2 i rhBMP6 odabran je 100 mM Soerensonov pufer (195), a s obzirom na pozitivna svojstva albumina, izabranom mediju dodan je albumin govedjeg seruma (1%), u cilju spriječavanja nastanka agregata.

6.2. Karakterizacija stanica koje sudjeluju u ranoj osteogenezi i upalnom odgovoru

U drugom dijelu ove disertacije po prvi put napravljena je serija eksperimenata potkožne ugradnje u aksilarnu regiju štakora kako bi se međusobno usporedila dva osteoinduktivna sustava, komercijalno dostupni rhBMP2 na kolagenskoj spužvici te novi osteoinduktivni lijek koji se trenutno ispituje u kliničkim ispitivanjima, rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku kao nosaču. U cilju evaluacije stvaranja ektopične kosti pod utjecajem rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC korišten je ektopični model nastanka kosti odnosno potkožna ugradnja osteoinduktivnih implantata u aksilarnu regiju štakora. Ektopični modeli nastanka kosti iskazuju apsolutni osteoinduktivni kapacitet ispitivanog materijala zbog relativnog nedostatka stimulacije od strane koštanih citokina, koštanotvornih i matičnih stanica koje formiraju kost. Između ostalog, ovakvi modeli relativno su izolirani od mehaničkog utjecaja na kost koji može inicirati događaje koji dovode do formiranja kosti odnosno mehanotransdukcije. Prema tome, ektopični modeli mogućavaju u velikoj mjeri kontrolirani *in vivo* eksperiment stvaranja kosti (168).

Prvi dio serije pokusa potkožne ugradnje bavio se ispitivanjem staničnih populacija koje sudjeluju u ranoj osteogenezi (24 odnosno 72 h nakon potkožne ugradnje) ektopičnog koštanog tkiva primjenom spomenutih osteoinduktivnih implantata, pri čemu je protočnom citometrijom analiziran udio limfoidnih, mijeloidnih i mezenhimalnih staničnih populacija. Osteoinduktivni implantati odnosno koštani nadomjesci dobiveni tkivnim inženjerstvom mogu biti različitog sastava. Nakon implantacije, prisutnost biomaterijala i/ili neautolognih stanica često može pojačati upalni odgovor i na kraju utjecati na ishod procesa cijeljenja prijeloma. Prilikom kirurškog zahvata potrebnog za ugradnju osteoinduktivnih implantata na mjesto implantacije, integritet tkiva postaje narušen. Posljedično, čak i ako je materijal od kojeg je nosač osteoinduktivnih proteina napravljen definiran kao biokompatibilan, sama implantacija može potaknuti imunološki odgovor koji utječe na proces cijeljenja prijeloma (211). U vrlo ranom periodu nakon implantacije, dolazi do adsorpcije specifičnih proteina na površinu implanta što u konačnici rezultira nastankom provizornog matriksa pretežno fibrinskog sastava koji se formira oko biomaterijala (212-214). Kao i kod cijeljenja prijeloma, prve stanice koje se pojavljuju na mjestu implantacije su neutrofili (212-215). Neutrofili su sposobni za fagocitozu i razgradnju stranih supstanci, mrtvih stanica te izlučuju signalne molekule za regrutiranje makrofaga na mjesto ozljede. Populaciju CD11b⁺Gr-1⁺ čine granulociti, većinom neutrofili, te klasični monociti, makrofagi, neki tipovi dendritičkih stanica i MDSC (*engl. Myeloid-derived suppressor cells, MDSC*) (216). Mijeloidna populacija, odnosno populacija koja izražava GR⁺CD11b⁺ fenotip bila je u značajno većem broju prisutna u rhBMP2/ACS nego u

rhBMP6/ABC implantatima nakon 24h odnosno 72h. Ovakvi rezultati ukazuju da je kolagen kao nosač ipak izazvao jači odgovor imunskog sustava, u odnosu na krvni ugrušak koji je autolognog podrijetla. Kolagenska spužvica (*engl. Absorbable Collagen Sponge, ACS*) napravljena je od goveđeg kolagena tipa I izoliranog iz Ahilove tetive (87, 217-219). Čisti kolagen uglavnom je inertan, međutim problem predstavljaju nečistost odnosno kontaminacija drugim ne-kolageneskim komponentama poput stanica i ostataka stanica, artefakti koji su nastali „*cross-linking*“ reakcijama korištenjem agenasa poput glutaraldehida ili formaldehida, ali i njegove razgradne komponente (217-223). Osim navedenih nedostataka, problem predstavlja i prisutnost određenih epitopa (telopektidi) na kolagenu tipa I koji mogu izazvati reakciju imunološkog sustava (220). S druge strane, autologni krvni ugrušak je permisivan nosač sličan gelu u kojem je glavna komponenta fibrin koji je isprepleten u hidratiziranu vlaknastu mrežu, unutar koje su zarobljene krvne stanice (224, 225). Eritrociti (*engl. Red Blood cells, RBC*) predstavljaju najzastupljeniju vrstu stanica u krvnom ugrušku kao nosaču (226). Eritrociti imaju istaknutu ulogu u modulaciji urođene imunosti (212, 224, 227). Primjerice, eritrociti mogu potaknuti imunološku aktivaciju kada dođe do upale ili oksidativnog stresa, dok oksidirani ili ostarjeli eritrociti izazivaju diferencijaciju dendritičkih stanica (*engl. Dendritic cells, DC*) induciranih lipopolisaharidom u potpuno zreli fenotip, što je u suprotnosti s funkcijom zdravih eritrocita (224, 228). Također, rezidentni makrofagi imaju tendenciju za uklanjanje starih ili oštećenih eritrocita, dok hemoglobin i hem oslobođeni iz eritrocita induciraju polarizaciju makrofaga na proupalni fenotip (M1) koji luče proupalne citokine (224, 229). Osim toga, oksidirani odnosno ostarjeli eritrociti mogu poboljšati proliferaciju i preživljenje T-limfocita (230, 231). Važno je spomenuti da sami koštani morfogenezni proteini su vrlo slabo imunogeni, s obzirom da nisu animalnog podrijetla već da su proizvedeni rekombinantnom tehnologijom (232). Nadalje, velik broj studija sugerira kako su koštani morfogenezni proteini vrlo brzo nestaju iz cirkulacije tako da je njihova sistemska prisutnost zanemariva (63, 64, 217, 233-235).

Uloga T-limfocita u homeostazi kosti može biti pozitivna i negativna, ovisno o kojoj subpopulaciji je riječ (236). Primjerice, pomoćni T-limfociti 17 (Th17) imaju važnu ulogu u resorpciji kosti lučeći IL-17 koji je potentni stimulator RANKL ekspresije, dok Th1 i Th2 primarno inhibiraju maturaciju osteoklasta putem lučenja IFN- γ i IL-4 (237-239). Također, poznato je da regulatorni T-limfociti (Treg) izlučuju anti-inflamatorne citokine poput IL-4, IL-10 i TGF- β koji suprimiraju osteoklastogenezu (238). S druge strane, B-limfociti su involvirani u modulaciju ravnoteže između koštane depozicije i resorpcije s obzirom na to da su ove stanice

glavni izvor osteoprotegerina (236, 240). Međutim, malo je poznato o ulozi T-limfocita i B-limfocita u ranoj osteogenezi izazvanoj osteoinduktivnim implantatima. Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako je udio limfoidnih staničnih populacija, odnosno T-limfocita (CD3⁺) i B-limfocita (B220⁺) prisutan u značajno većem broju kod osteoinduktivnih implantata koji se sastoje od rhBMP6 i autolognog krvnog ugruška u odnosu na rhBMP2 na kolagenskoj spužvici (rhBMP2/ACS), 24h i 72h nakon potkožne ugradnje u aksilarnu regiju kod štakora. T-limfociti i B-limfociti imaju važnu ulogu u signalizaciji prilikom upalne faze i ponovo u fazi mineralizacije. El Khassawna i sur. (241) pokazali su kako T-limfociti i B-limfociti igraju važnu ulogu u mineralizaciji kosti prilikom endohondralnog okoštavanja. Naime, pokazano je kako u limfopeničnim RAG1^{-/-} miševima dolazi do bržeg stvaranja koštanog kalusa u odnosu na WT miševe, što direktno upućuje na ulogu T-limfocita i B-limfocita u osteogenezi. Međutim, takvi koštani kalusi su čvršći i lomljiviji s manjom sposobnošću savijanja u odnosu na WT miševe. To ukazuje na utjecaj T-limfocita i B-limfocita na organizaciju i formiranje koštanog matriksa, a time i njihovu ulogu u određivanju kvalitete kosti odnosno elastičnosti koja omogućuje da kost apsorbira sile pri udaru, čime se sprječava nastanak prijeloma. Cheng i sur. (242) pokazali su da je u štakorskom modelu kritičnog defekta femura povećana sistemska prisutnost T-limfocita i B-limfocita koji pozitivno koreliraju, a dok MDSC (*engl. Myeloid-derived suppressor cells, MDSC*) negativno koreliraju s cijeljenjem kosti.

Nadalje, rezultati ovog istraživanja pokazali su da ne postoji razlika u udjelu mezenhimalnih staničnih populacija (CD44) u obje pokusne skupine nakon 24h odnosno 72h. S druge strane, rani (CD90) i usmjereni (CD140a) progenitori, u većem broju su prisutni kod rhBMP6/ABC nego u rhBMP2/ACS implantatima 24h nakon ugradnje. Međutim, nakon 72h broj ranih i usmjerenih progenitora opada i ne postoji značajna razlika između pokusnih skupina, odnosno rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC implantata. Ovakvi rezultati ukazuju da je autologni krvni ugrušak kao nosač permissivniji u odnosu na kolagensku spužvicu, te da progenitorske stanice lakše penetriraju u nosač i brže započinju osteogenezu. Ova hipoteza potvrđena je 7. dana nakon ugradnje gdje je na histološkim implantatima rhBMP2/ACS još nije vidljiva osifikacija, za razliku od rhBMP6/ABC implantata. Ambrosi i sur. (243) pokazali su kako izolirane specifične ne-hematopoetske (CD45⁻) i ne-endotelijalne (CD31⁻) populacije mogu biti nadalje podijeljene prema ekspresiji Sca1 (*engl. Stem cell antigen 1, Sca1*) antigena. U ovom istraživanju korišten je CD90 antigen, koji je karakterističan za štakorske mezenhimalne matične stanice (244, 245), dok je Sca1 isključivo eksprimiran u mišjim mezenhimalnim matičnim stanicama. Nadalje, pokazali su da CD45⁻CD31⁻Sca1⁺ stanična

populacija pokazuje visoku adipogenost, uz ograničeni osteohondrogeni potencijal. S druge strane, CD45⁻CD31⁻Sca1⁻ stanična populacija nije bila adipogena, već izrazito osteohondrogena. Zatim je stanična populacija fenotipa CD45⁻CD31⁻Sca1⁺ podijeljena prema ekspresiji antigena CD24 koji determinira daljnju diferencijaciju prema adipocitnoj lozi. Naime, CD24⁺ stanice stvaraju populaciju CD24⁻ stanica koje izražavaju kasne markere adipogeneze, odnosno gubitkom ekspresije CD24 antigena adipocitni progenitori postaju dodatno posvećeni lozi adipocita, stvarajući CD24⁻ preadipocite (246, 247). Stanična populacija CD45⁻CD31⁻Sca1⁺CD24⁺ pokazala je izrazitu homogenost multipotentnog fenotipa, gdje su se takve stanice u uzgoju uspjele diferencirati u sve 3 loze – adipocite, osteoblaste i hondrocite. U ovom istraživanju, stanične populacije fenotipa CD45⁻CD31⁻CD90⁺CD24⁻ smatraju se adipogenim progenitorima (*engl. Adipogenic Progenitors, APC*) i u najvećem broju prisutni su u rhBMP2/ACS implantatima, 24h nakon potkožne ugradnje. Međutim, nakon 72h nema značajne razlike u broju adipogenih progenitora kod rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC implantata. S druge strane matične stanice (*engl. Early Multipotent Progenitors, EMP*), koje izražavaju CD90⁺CD24⁺ fenotip, u najvećem broju prisutne su u rhBMP6/ABC implantatima 24h nakon ugradnje. Nakon 72h, nema značajne razlike u broju multipotentnih progenitora kod rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC implantata. Nadalje, u testiranim osteoinduktivnim implantatima, rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC, nakon 24h odnosno 72h, ne postoji razlika u broju osteohondrogenih progenitora koji izražavaju stanični fenotip CD90⁻CD140a⁺. Ambrosi i sur. (243) pokazali su kako povećani broj adipogenih progenitora utječe na smanjenje mineralne koštane gustoće (*engl. Bone Mineral Density, BMD*) na mjestu prijeloma nakon transplantacije adipogenih populacija u odnosu na kontrolu. S druge strane, transplantacijom multipotentnih progenitora (*engl. Early Multipotent Progenitors, EMP*) staničnog fenotipa CD45⁻CD31⁻Sca1⁺CD24⁺ i osteohondrogenim progenitorima (*engl. Osteochondroprogenitors, OCP*) fenotipa CD45⁻CD31⁻Sca1⁻ nastale su hondrogene i osteogene strukture. Prema tomu, ova zapažanja ukazuju na negativnu regulativnu ulogu adipogenih progenitora tijekom cijeljenja prijeloma odnosno regeneracije kosti.

6.3. Usporedba rhBMP2 na kolagenskoj spužvici i rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku

Drugi dio serije pokusa potkožne ugradnje u aksilarnu regiju štakora bio je usmjeren prema istraživanju dinamike nastanka ektopične kosti izazvane osteoinduktivnim implantatima rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC u vremenu. Veliki broj istraživanja proveden je na miševima i štakorima pri čemu su ispitivani različiti osteoinduktivni implantati koji sadrže koštane morfogenetske proteine (157, 248-267). Međutim, većina provedenih istraživanja bila je usmjerena na procjenu osteoinduktivnosti pojedinih implantata u jednoj vremenskoj točki te je mali broj objavljenih radova u kojima se ispitivao sam tijekom indukcije ektopičnog koštanog tkiva u više vremenskih točaka. U ovom istraživanju se po prvi puta uspoređuje sam tijekom indukcije ektopičnog koštanog tkiva u više vremenskih točaka primjenom komercijalno dostupnog rhBMP2 na kolagenskoj spužvici i novog osteoinduktivnog lijeka za regeneraciju kostiju, rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku kao nosaču. Prva spoznaja ovog istraživanja je da korištenje doze od 20 µg, bez obzira o primjenjenom osteoinduktivnom proteinu, stvara veću količinu koštanog volumena u odnosu na dozu od 5 µg, u bilo kojoj danoj vremenskoj točki. Također, u osteoinduktivnim implantatima rhBMP2/ACS u dozi od 5 µg, pedeset dana nakon potkožne ugradnje i dalje su vidljivi dijelovi kolagenskog nosača. Prema tome, važno je spomenuti da se kolagenski nosač na ektopičnom mjestu odnosno u aksilarnoj regiji štakora sporije razgrađuje u odnosu na autologni krvni ugrušak. Naime, kolagenski nosač je bio prisutan u nekim implantatima čak i do 50. dana, dok se autologni krvni ugrušak razgradio već nakon 14. dana od potkožne ugradnje.

Druga glavna spoznaja je da osifikacija kasni kod primjene rhBMP2 na kolagenskoj spužvici u odnosu na rhBMP6 u autolognom ugrušku. Naime, gusta kolagenska mreža usporava ulazak specifičnog miljea stanica, pa je samim time proces osifikacije odgođen. S druge strane, krvni ugrušak je permeabilni biokompatibilni nosač koji zbog svoje čvrste, ali dovoljno propusne fibrinske mreže omogućuje penetraciju progenitornih stanica pri čemu instantno započinje proces osteogeneze. Iako ne postoji statistički značajna razlika u koštanom volumenu između eksperimentalnih skupina 7. dan nakon potkožne ugradnje, rezultati histološke analize rhBMP6/ABC implantata jasno pokazuju velike zone endohondralne osifikacije u odnosu na rhBMP2/ACS implantate. Doduše, iako još nema endohondralne osifikacije unutar rhBMP2/ACS implantata, na histološkim presjecima vidljiva je relativno velika infiltracija stanica koje su pozitivne na Sox-9, koji je ključni faktor transkripcije u diferencijaciji

hondrocita i razvoju hrskavice (268), te Osterix koji je bitan transkripcijski čimbenik za diferencijaciju osteoblasta i mineralizaciju kosti (269).

Promatrajući nastanak ektopične kosti kroz vrijeme, uočeno je da bez obzira na primijenjeni implantat i dozu, novonastala kost nastaje endohondralnom osifikacijom. Naime, u navedenim nosačima, kolagenskoj spužvici i autolognom krvnom ugrušku, pod djelovanjem rhBMP2 odnosno rhBMP6, dolazi do kondenzacije mezenhimalnih stanica koje diferenciraju u hondrocite koji oko sebe stvaraju hrskavični ekstracelularni matriks. Hondrociti tada prelaze u hipertrofični oblik, dramatično povećavajući svoj volumen, istovremeno izlučujući ekstracelularni matriks koji u konačnici postaje mineraliziran. Hipertrofični hondrociti tada odumiru, pri čemu ostaje hrskavični ekstracelularni matriks u kojeg penetriraju krvne žile dovodeći osteoklaste i druge prekursorske koštane stanice. Osteoklasti djelomično uklanjaju matriks hrskavice, a diferencirajući osteoblasti koriste ostatke hrskavičnog matriksa kao kalup za stvaranje ektopične kosti. U kasnijim vremenskim točkama promatranja, dolazi do stvaranja kosti koja se sastoji od zadebljane kortikalne kosti na periferiji te trabekula okruženih koštanom srži u sredini, u kojoj se od 35. dana nadalje dominantno nalaze adipociti. Pretežito adipogena novonastala koštana struktura nema zadovoljavajuća biomehanička svojstva, odnosno dominacija adipocitne koštane srži često je povezana sa smanjenjem koštane mase što rezultira povećanim rizikom od prijeloma (270, 271) (Mackie 2008, Vluc 2018). U našim istraživanjima (174) smo pokazali kako se dominacija adipogene koštane srži može spriječiti dodatkom bisfosfonata, konkretno zoledronatne kiseline. Naime, pokazali smo da dodatkom zoledronata (intravenski) četrnaest dana od potkožne ugradnje, da su broj i debljina trabekula, ali i kortikalna kost povećani u odnosu na kontrolu ili kada je intravenska doza zoledronata primijenjena 35 dana od potkožne ugradnje.

Iako je novonastala ektopična kost morfološki vrlo slična, bez obzira na primijenjeni osteoinduktivni sustav, važno je za spomenuti da je u konačnici rhBM6/ABC stvorio najviše kosti u svim promatranim vremenskim točkama. Osim navedenih prednosti autolognog krvnog ugruška u odnosu na kolagensku spužvicu kao nosač za osteoinduktivne proteine, potencijalno objašnjenje superiornosti rhBMP6/ABC leži u inhibiciji spomenutih osteoinduktivnih proteina. Naime, Song i sur. (51) pokazali su da je rhBMP6 rezistentniji na noggin te potentniji u promicanju diferencijacije kulture osteoblasta *in vitro* te u indukciji regeneracije kosti *in vivo* u usporedbi s rhBMP7 paralogom. Utvrđeno je da noggin ima kritičnu ulogu u regulaciji negativne povratne sprege za rhBMP7, ali ne i za rhBMP6. Razlog tomu je što su prolin odnosno glutamat na poziciji 60 zrele domene rhBMP2 odnosno rhBMP7 u rhBMP6

zamjenjeni lizinom koji je ključan za rezistenciju rhBMP6 na noggin. Iz drugog aspekta, Mizrahi i sur. (272) pokazali su kako mezenhimalne matične stanice dobivene iz koštane srži (*engl. Bone-marrow derived mezenhimal stem cells, BMSC*) i svinjskog adipoznog tkiva (*engl. Porcine adipose tissue mezenhimal stem cells, ASC*) nukleofecirane s rhBMP6 imaju bolji *in vitro* osteogeni potencijal u odnosu na BMSC nukleofecirane s rhBMP2. Također, ovaj trend je potvrđen u *in vivo* uvjetima gdje su se obje vrste mezenhimalnih matičnih stanica nukleofecirane s rhBMP6 pokazale učinkovitije u stvaranju kosti *de novo* nego nukleofecirane s rhBMP2. Postoji nekoliko predloženih mehanizama koji mogu objasniti superiornost rhBMP6 nad rhBMP2 u indukciji osteogeneze. Nekoliko studija ukazalo je da rhBMP2 i rhBMP6 spadaju pod različitu podobitelj BMP molekula, a te podobitelji se međusobno razlikuju u transdukciji signala. Naime, različite kombinacije serina/treonin kinaznih receptora tipa I i II omogućavaju različite signale koje rezultiraju specifičnim staničnim događajima (273-275).

6.4. Usporedba rhBMP2 i rhBMP6 na istom nosaču u tri različite doze

Treći dio serije pokusa potkožne ugradnje u aksilarnu regiju štakora bavio se ispitivanjem učinkovitosti osteoinduktivnih proteina rhBMP2 i rhBMP6, pri čemu su osteoinduktivni implantati formulirani u tri različite doze (5, 20 i 50 μg) na jednakom nosaču koji se sastoji od autolognog krvnog ugruška kojem je dodan matriks otporan na kompresiju u obliku biokompatibilnih, sintetičkih keramičkih čestica u rangu veličine 500 – 1700 μm . Novonastala koštano-keramička struktura ispitana je 14 dana nakon potkožne ugradnje. U ovom pokusu, gdje je korišten jednak nosač za oba ispitivana osteoinduktivna proteina, rhBMP6 pokazao se superiornijim u odnosu na rhBMP2 u dozi od 50 μg . Ovi rezultati ukazuju na već diskutirana istraživanja vezana za inhibiciju osteoinduktivnih proteina nogginom koji ima kritičnu ulogu u regulaciji negativne povratne sprege (51, 272-275). Također, važno je spomenuti da proces osifikacije osteoinduktivnih implantata s dodatkom keramičkih čestica izgleda drugačije u odnosu na sam autologni krvni ugrušak kao nosač. Naime, u rhBMP6/ABC implantatima, kost isključivo nastaje endohondralnom osifikacijom gdje u konačnici nastaje predominantna kortikalna kost na periferiji pri čemu je središnji dio ispunjen trabekulama koje su pretežito omeđene adipocitnom koštanom srži. Dodatkom keramičkih čestica, kortikalna kost i većina novonastale kosti između keramičkih čestica nastaje endohondralnom osifikacijom, dok dio kosti na površini keramičkih čestica nastaje najvećim dijelom intramembranoznom osifikacijom (276).

U cilju poboljšanja biomehaničkih svojstava autolognog krvnog ugruška potreban je dodatak matriksa otpornog na kompresiju. Biokompatibilne sintetske keramike mogu biti građene od različitih spojeva kalcijevog fosfata; najčešće su građene od hidroksiapatita ili β -trikalcij fosfata. Glavna razlika između hidroksiapatita i β -trikalcij fosfata je u njihovoj stopi resorbabilnosti (277, 278). Naime, hidroksiapatit je puno otporniji na resorpciju u odnosu na β -trikalcij fosfat. U cilju regulacije resorpcije sintetske keramike, razvijena je takozvana bifazična keramika koja se sastoji od različitih omjera hidroksiapatita i β -trikalcij fosfata koji ovise o željenoj dugovječnosti biokeramike nakon ugradnje u organizam (256, 279). Željena stopa resorpcije ovisit će o indikaciji u kojoj se keramika primijenjuje. U indikaciji posterolateralne spinalne fuzije (*engl. Posterolateral Spinal Fusion, PLF*) gdje su poželjne karakteristike tvrdoća i dugovječnost novostvorene kosti zbog potrebite potpore transverzalnih nastavaka, hidroksiapatit je potencijalno bolja opcija (280). S druge strane, ukoliko je riječ o segmentalnim defektima dugih kostiju koji spadaju među najzahtjevnija stanja u ortopediji (281), nužno je da stopa resorpcije bude brža kako bi se medularni kanal brže premostio u cilju potpune

regeneracije i funkcionalnosti kosti, pa je stoga β -trikalcij fosfat potencijalno bolja opcija. Primjerice, Pećin i sur. (169) primjenili su rhBMP6 dodan u autolognu krv s biokeramičkim česticama građenim od β -trikalcij fosfata s rasponom veličine 500-1700 μm za tretman segmentalnog defekta humerusa veličine 3 cm koji je nastao kao posljedica pogotka metkom. Prvobitno je segmentalni defekt tretiran vanjskim fiksatorom, ali s obzirom na to da nakon 3 mjeseca nije bilo cijeljenja, odobrena je primjena nove osteoinduktivne terapije u cilju izbjegavanja amputacije prednjeg uda. Nakon 16 mjeseci praćenja, segmentalni defekt je u potpunosti premošten što je vidljivo na rendgenskim i CT snimkama.

Zaključno, ovo istraživanje pokazalo je kako rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku superiorniji u odnosu na rhBMP2 na goveđoj kolagenskoj spužvici kao nosaču prvenstveno zbog rezistencije na noggin, ali i zbog brojnih prednosti autolognog krvnog ugruška kao nosača. Naime, krvni ugrušak s inherentnom biokompatibilnošću može se učinkovito metabolizirati *in vivo* bez stvaranja nepoznatih ili toksičnih nusproizvoda. Također, u seriji pokusa dinamike otpuštanja pokazano je kako apsorbirajuća kolagenska spužvica nema zadovoljavajući profil otpuštanja koji kod kliničkih primjena potencijalno može utjecati na nastanak neželjenih nuspojava. Osim toga, pokazano je da u ranoj osteogenezi izazvanom primjenom rhBMP6/ABC sudjeluje više matičnih stanica (*engl. Early Multipotent Progenitors, EMP*) u odnosu na rhBMP2/ACS, dok s druge strane, adipoprogenitori su u većoj mjeri bili prisutni u rhBMP2/ACS. Primjenom oba osteoinduktiva implantata novonastala kost isključivo nastaje endohondralnom osifikacijom, pri čemu u konačnici nastaje koštana struktura s prominentnom kortikalnom kosti na periferiji, dok se u centralnom dijelu nalaze trabekule omeđene pretežito adipocitnom koštanom srži. Također, bitna spoznaja je da se s dodatkom matriksa otpornog na kompresiju, u ovom slučaju bifazične biokeramike, poboljšavaju biomehanička svojstva krvog ugruška kao nosača te da se povećava prinos koštanog volumena. Osim toga, dodatkom biokeramičkih čestica, mijenja se proces osifikacije; kortikalna kost i dobar dio novonastale kosti između čestica nastaje endohondralnom osifikacijom, dok kost na površini čestica nastaje intramembranoznom osifikacijom.

7. ZAKLJUČCI

Oba osteoinduktivna sustava inducirala su stvaranje ektopične kosti, međutim rekombinantni humani koštani morfogenetski protein 6 (rhBMP6) primijenjen u autolognom krvnom ugrušku kao nosaču, pokazao se kao superiorniji u odnosu na rekombinantni humani koštani morfogenetski protein 2 na goveđoj kolagenskoj spužvici kao nosaču koji je komercijalno odobren kao terapija za cijeljenje kosti čime je potvrđena hipoteza istraživanja. Provedbom istraživanja ostvareni su postavljeni opći i specifični ciljevi te su sukladno tome doneseni zaključci prikazani u nastavku.

- C2C12-BRE-Luc stanični esej potvrdio je aktivnost oba osteoinduktivna proteina, rhBMP2 i rhBMP6, koji su korišteni u svim daljnjim pokusima.
- *In vitro* pokusi dinamike otpuštanja pokazali su kako se kroz 72h kumulativno otpusti više rhBMP2 s kolagenske spužvice (85%) nego rhBMP6 iz autolognog krvnog ugruška (15%).
- Udio limfoidnih staničnih populacija, odnosno T-limfocita (CD3⁺) i B-limfocita (B220⁺) prisutan je u značajno većem broju u rhBMP6/ABC implantatima u odnosu na rhBMP2/ACS implantate, 24h i 72h nakon potkožne ugradnje u aksilarnu regiju kod štakora.
- Mijeloidna populacija, odnosno populacija koja izražava GR⁺CD11b⁺ fenotip bila je u značajno većem broju prisutna u rhBMP2/ACS implantatima nego u rhBMP6/ABC implantatima nakon 24h odnosno 72h.
- Udio mezenhimalnih staničnih populacija (CD44⁺) između testiranih osteoinduktivnih implantata bio jednak, međutim daljnjim sortiranjem pokazano je da su adipoprogenitori u najvećem broju bili prisutni u rhBMP2/ACS implantatima, dok su matične stanice u najvećem broju prisutne u rhBMP6/ABC implantatima 24h nakon ugradnje, dok nakon 72h nije bilo značajne razlike.
- Korištenje doze od 20 µg, bez obzira o primijenjenom osteoinduktivnom proteinu, stvara veću količinu koštanog volumena u odnosu na dozu od 5 µg, u bilo kojoj danoj vremenskoj točki.
- Kolagenska spužvica na ektopičnom mjestu odnosno u aksilarnoj regiji štakora sporije se razgrađuje u odnosu na autologni krvni ugrušak.
- Proces osifikacije kasni prilikom primjene rhBMP2/ACS u odnosu na rhBMP6/ABC implantate. Razlog tomu je gusta kolagenska mreža koja usporava ulazak specifičnog

miljea stanica, pa je samim time proces osifikacije odgođen u odnosu na krvni ugrušak koji zbog svoje čvrste, ali dovoljno propusne fibrinske mreže omogućuje penetraciju progenitornih stanica pri čemu instantno započinje proces osteogeneze.

- Bez obzira na primijenjeni osteoinduktivni implantat (rhBMP2/ACS ili rhBMP6/ABC) i dozu (5 i 20 μg), novonastala kost nastaje isključivo endohondralnom osifikacijom gdje u konačnici nastaje predominantna kortikalna kost na periferiji pri čemu je središnji dio ispunjen trabekulama koje su pretežito omeđene adipocitnom koštanom srži.
- Osteoinduktivni implantat rhBMP6/ABC u dozi od 20 μg stvorio je najviše kosti u svim promatranim vremenskim točkama.
- U dozi od 50 μg , rhBMP6 pokazao se superiornijim u odnosu na rhBMP2 kada je njihova potentnost testirana na jednakim nosačima koji se sastoje od autolognog krvnog ugruška i bifazične keramike u rangu veličina čestica od 500 do 1700 μm .
- Proces osifikacije osteoinduktivnih implantata s dodatkom keramičkih čestica izgleda drugačije u odnosu na sam autologni krvni ugrušak kao nosač. Kortikalna kost i većina novonastale kosti između keramičkih čestica nastaje endohondralnom osifikacijom, dok dio kosti na površini keramičkih čestica nastaje najvećim dijelom intramembranoznom osifikacijom.
- Dodatkom sintetičkih biokeramika kao matriksa otpornog na kompresiju poboljšavaju se biomehanička svojstva autolognog krvnog ugruška.

8. SAŽETAK

Usporedba dinamike nastajanja ektopične kosti primjenom koštanog morfogenetskog proteina 2 na nosaču kolagenske spužvice i koštanog morfogenetskog proteina 6 u autolognom krvnom ugrušku

U cilju razvoja boljih terapijskih rješenja za regeneraciju kostiju, razvijen je novi osteoinduktivni sustav koji se sastoji od rhBMP6 i nosača u formi autolognog krvnog ugruška, koji je novo terapijsko rješenje za regeneraciju kosti koje se trenutno testira u kliničkim ispitivanjima. U sklopu ovog rada istražena je biologija i vremenski tijek ektopičnog stvaranja koštanog tkiva pod utjecajem rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku (ABC) kao nosaču koji je uspoređen sa zlatnim standardom za cijeljenje kostiju, rhBMP2 na nosaču kolagenske spužvice (ACS), pri čemu su oba osteoinduktivna sustava ispitana na modelu potkožne ugradnje implantata u aksilarnu regiju štakora. Također, u seriji *in vitro* pokusa dinamike otpuštanja pokazano je kako apsorbirajuća kolagenska spužvica nema zadovoljavajući profil otpuštanja. U cilju ispitivanja staničnih populacija koje sudjeluju u ranoj osteogenezi (24h i 72h nakon potkožne ugradnje) koja je inducirana spomenutim osteoinduktivnim sustavima analiziran je udio limfoidnih, mijeloidnih i mezenhimalnih staničnih populacija. Adipoprogenitori su u najvećem broju bili prisutni u rhBMP2/ACS implantatima, dok su matične stanice u najvećem broju prisutne u rhBMP6/ABC implantatima. Nadalje, superiornost rhBMP6/ABC u odnosu na rhBMP2/ACS dokazana je u eseju potkožne ugradnje, gdje je u svim promatranim vremenskim točkama najveću količinu novostvorene kosti inducirao rhBMP6/ABC u dozi od 20 µg. Primijećeno je da se kolagenska spužvica kao nosač na ektopičnom mjestu sporije razgrađuje u odnosu na autologni krvni ugrušak. Posljedično, proces osifikacije je odgođen prilikom primjene rhBMP2/ACS zbog guste kolagenske mreže koja usporava ulazak progenitornih stanica, pa je samim time proces osifikacije odgođen u odnosu na krvni ugrušak. U cilju ispitivanja efikasnosti korištenih rekombinantnih proteina, rhBMP2 i rhBMP6, njihov osteoinduktivni potencijal ispitan je na jednakom nosaču koji se sastoji od autolognog krvnog ugruška i bifazične keramike u rangu veličine čestica od 500 do 1700 µm u tri različite doze (5, 20, 50 µg), pri čemu se rhBMP6 pokazao superiornijim u odnosu na rhBMP2 u dozi od 50 µg. Potencijalni razlog tomu je već dokazana superiornost rhBMP6 na inhibiciju nogginom. Osim toga, dodatkom biokompatibilne keramike u svojstvu matriksa otpornog na kompresiju poboljšavaju se biomehanička svojstva implantata, te je proces osifikacije osteoinduktivnih implantata s dodatkom keramičkih čestica drugačiji u odnosu na krvni ugrušak sam.

9. SUMMARY

Comparison of the dynamics of ectopic bone formation using bone morphogenetic protein 2 on a collagen sponge carrier and bone morphogenetic protein 6 in an autologous blood coagulum; Natalia Ivanjko, 2022.

In order to develop a better therapeutic solutions for bone regeneration, a new osteoinductive device has been developed consisting of rhBMP6 and autologous blood coagulum as a carrier, which is currently being tested in clinical trials as a new therapeutic solution for bone repair and regeneration. Part of this research was focused on the investigation of the biology and time course of ectopic bone formation induced by rhBMP6 in autologous blood coagulum (ABC) and compared with the gold standard for bone healing, rhBMP2 on absorbable collagen sponge (ACS), where both osteoinductive devices were evaluated in the rat subcutaneous assay. Also, in a series of *in vitro* experiments release dynamics of both osteoinductive devices was tested showing that absorbable collagen sponge does not have a satisfactory release profile. In order to examine the cell populations involved in early osteogenesis (24h and 72h after subcutaneous implantation) induced by the aforementioned osteoinductive devices, the number of lymphoid, myeloid and mesenchymal cell populations were analyzed. Adipoprogenitors were most abundant in rhBMP2/ACS implants, while mesenchymal stem cells were predominately present in rhBMP6/ABC implants. Furthermore, the superiority of rhBMP6/ABC over rhBMP2/ACS was demonstrated in a rat subcutaneous assay, where at all observed time points, the largest amount of newly formed bone was induced by rhBMP6 / ABC at a dose of 20 µg. It has been observed that the absorbable collagen sponge as a carrier at the ectopic site degrades more slowly compared to the autologous blood coagulum. Consequently, the ossification process is delayed when rhBMP2/ACS is used due to the dense collagen meshwork that slows down the entry of progenitor cells, and thus the ossification process is delayed in comparison to the blood coagulum. In order to test the efficacy of the recombinant proteins used, rhBMP2 and rhBMP6, their osteoinductive potential was tested on an equal scaffold consisting of autologous blood coagulum and biphasic ceramics in the particle size range of 500 to 1700 µm in three different doses (5, 20, 50 µg), where rhBMP6 was superior to rhBMP2 at a dose of 50 µg. A potential reason for this is already proven resistance of rhBMP6 to noggin inhibition. Also, the addition of biocompatible ceramics as a compression-resistant matrix improves the biomechanical properties of implants, and the process of ossification of osteoinductive implants with the addition of ceramic particles is different compared to the blood coagulum itself.

10. POPIS LITERATURE

1. Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, Sogayar MC, Taga R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38:1463-1473, doi: 10.1590/s0100-879x2005001000003.
2. Luyten FP, Cunningham NS, Vukicevic S, Paralkar V, Ripamonti U, Reddi AH. Advances in osteogenin and related bone morphogenetic proteins in bone induction and repair. *Acta Orthop Belg.* 1992;58 Suppl 1:263-267, doi:
3. Lacroix P. The elementary mechanisms of endochondral ossification. *Arch Biol (Liege).* 1945;56:351-382.
4. Grgurevic L, Pecina M, Vukicevic S, Marshall R. Urist and the discovery of bone morphogenetic proteins. *Int Orthop.* 2017;41:1065-1069, doi: 10.1007/s00264-017-3402-9.
5. Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res.* 1971;50:1392-1406, doi: 10.1177/00220345710500060601.
6. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965;150:893-899, doi: 10.1126/science.150.3698.893.
7. Katagiri T, Watabe T. Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8, doi: 10.1101/cshperspect.a021899.
8. Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP, i sur. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:9484-9488, doi: 10.1073/pnas.85.24.9484.
9. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, i sur. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* 1988;242:1528-1534, doi: 10.1126/science.3201241.

10. Shu DY, Lovicu FJ. Insights into Bone Morphogenetic Protein-(BMP-) Signaling in Ocular Lens Biology and Pathology. *Cells*. 2021;10, doi: 10.3390/cells10102604.
11. Gaggero E, Canalis E. Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord*. 2006;7:51-65, doi: 10.1007/s11154-006-9000-6.
12. Gaggero E, Gangji V, Canalis E. Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. *J Clin Invest*. 1998;102:2106-2114, doi: Doi 10.1172/Jci3459.
13. Carreira AC, Zambuzzi WF, Rossi MC, Astorino Filho R, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone Morphogenetic Proteins: Promising Molecules for Bone Healing, Bioengineering, and Regenerative Medicine. *Vitam Horm*. 2015;99:293-322, doi: 10.1016/bs.vh.2015.06.002.
14. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF-beta and the TGF-beta Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8, doi: 10.1101/cshperspect.a021873.
15. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16:251-263, doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.01.009.
16. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem*. 2010;147:35-51, doi: 10.1093/jb/mvp148.
17. Miyazono K. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000;11:15-22, doi: Doi 10.1016/S1359-6101(99)00025-8.
18. Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1998;9:49-61, doi: 10.1016/s1359-6101(97)00036-1.
19. Cheng HW, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85a:1544-1552, doi: Doi 10.2106/00004623-200308000-00017.

20. Canalis E, Economides AN, Gaggero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev.* 2003;24:218-235, doi: 10.1210/er.2002-0023.
21. Gumienny TL, Padgett RW. The other side of TGF-beta superfamily signal regulation: thinking outside the cell. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13:295-299, doi: 10.1016/S1043-2760(02)00615-X.
22. Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J Tissue Eng Regen Med.* 2008;2:1-13, doi: 10.1002/term.63.
23. Ge G, Hopkins DR, Ho WB, Greenspan DS. GDF11 forms a bone morphogenetic protein 1-activated latent complex that can modulate nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *Mol Cell Biol.* 2005;25:5846-5858, doi: 10.1128/MCB.25.14.5846-5858.2005.
24. Vukicevic S, Sampath TK. Bone Morphogenetic Proteins: Systems Biology Regulators. Switzerland: Springer International Publishing; 2017 str 445.
25. Rider CC, Mulloy B. Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *Biochem J.* 2010;429:1-12, doi: 10.1042/BJ20100305.
26. Innis CA, Shi J, Blundell TL. Evolutionary trace analysis of TGF-beta and related growth factors: implications for site-directed mutagenesis. *Protein Eng.* 2000;13:839-847, doi: 10.1093/protein/13.12.839.
27. Sherbet GV. Growth Factor Families. *Growth Factors and Their Receptors in Cell Differentiation, Cancer and Cancer Therapy*2011, str. 3-5.
28. Griffith DL, Keck PC, Sampath TK, Rueger DC, Carlson WD. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming

growth factor beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:878-883, doi: 10.1073/pnas.93.2.878.

29. Brown MA, Zhao Q, Baker KA, Naik C, Chen C, Pukac L, et al. Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J Biol Chem*. 2005;280:25111-25118, doi: 10.1074/jbc.M503328200.

30. Schreuder H, Liesum A, Pohl J, Kruse M, Koyama M. Crystal structure of recombinant human growth and differentiation factor 5: evidence for interaction of the type I and type II receptor-binding sites. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;329:1076-1086, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.02.078.

31. Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1998;9:49-61, doi: Doi 10.1016/S1359-6101(97)00036-1.

32. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997;390:465-471, doi: 10.1038/37284.

33. Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J*. 2000;19:1745-1754, doi: DOI 10.1093/emboj/19.8.1745.

34. Sebald W, Nickel J, Zhang JL, Mueller TD. Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction. *Biol Chem*. 2004;385:697-710, doi: Doi 10.1515/Bc.2004.086.

35. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003;425:577-584, doi: 10.1038/nature02006.

36. Hanyu A, Ishidou Y, Ebisawa T, Shimanuki T, Imamura T, Miyazono K. The N domain of Smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor-beta signaling. *J Cell Biol*. 2001;155:1017-1027, doi: 10.1083/jcb.200106023.

37. Wu M, Chen G, Li YP. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res.* 2016;4:16009, doi: 10.1038/boneres.2016.9.
38. Murakami G, Watabe T, Takaoka K, Miyazono K, Imamura T. Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell.* 2003;14:2809-2817, doi: 10.1091/mbc.e02-07-0441.
39. Edlund S, Bu S, Schuster N, Aspenstrom P, Heuchel R, Heldin NE, et al. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF-beta-activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase kinase 3. *Mol Biol Cell.* 2003;14:529-544, doi: 10.1091/mbc.02-03-0037.
40. Koganti P, Levy-Cohen G, Blank M. Smurfs in Protein Homeostasis, Signaling, and Cancer. *Front Oncol.* 2018;8:295, doi: 10.3389/fonc.2018.00295.
41. Ito Y, Miyazono K. RUNX transcription factors as key targets of TGF- β superfamily signaling. *Curr Opin Genet Dev.* 2003;13:43-47, doi: 10.1016/s0959-437x(03)00007-8.
42. Zhang Y, Chang CB, Gehling DJ, Hemmati-Brivanlou A, Derynck R. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:974-979, doi: DOI 10.1073/pnas.98.3.974.
43. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF-beta superfamily and Runx proteins. *Oncogene.* 2004;23:4232-4237, doi: 10.1038/sj.onc.1207131.
44. Rahman MS, Akhtar N, Jamil HM, Banik RS, Asaduzzaman SM. TGF-beta/BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Res.* 2015;3:15005, doi: 10.1038/boneres.2015.5.
45. Kumar S, Mahendra G, Ponnazhagan S. Determination of osteoprogenitor-specific promoter activity in mouse mesenchymal stem cells by recombinant adeno-associated virus transduction. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1731:95-103, doi: 10.1016/j.bbaexp.2005.08.007.

46. Celil AB, Hollinger JO, Campbell PG. Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling. *J Cell Biochem.* 2005;95:518-528, doi: 10.1002/jcb.20429.
47. Satija NK, Gurudutta GU, Sharma S, Afrin F, Gupta P, Verma YK, i sur. Mesenchymal stem cells: molecular targets for tissue engineering. *Stem Cells Dev.* 2007;16:7-23, doi: 10.1089/scd.2006.9998.
48. Groppe J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Kwiatkowski W, i sur. Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature.* 2002;420:636-642, doi: 10.1038/nature01245.
49. Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell.* 1996;86:599-606, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80133-6.
50. Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, Lecka-Czernik B, O'Brien CA, Economides AN, i sur. Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res.* 2000;15:663-673, doi: 10.1359/jbmr.2000.15.4.663.
51. Song K, Krause C, Shi S, Patterson M, Suto R, Grgurevic L, i sur. Identification of a key residue mediating bone morphogenetic protein (BMP)-6 resistance to noggin inhibition allows for engineered BMPs with superior agonist activity. *J Biol Chem.* 2010;285:12169-12180, doi: 10.1074/jbc.M109.087197.
52. Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massague J, i sur. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature.* 1999;401:480-485, doi: 10.1038/46794.
53. Zhang Y, Chang C, Gehling DJ, Hemmati-Brivanlou A, Derynck R. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:974-979, doi: 10.1073/pnas.98.3.974.

54. Hartigan N, Garrigue-Antar L, Kadler KE. Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1). Identification of the minimal domain structure for procollagen C-proteinase activity. *J Biol Chem.* 2003;278:18045-18049, doi: 10.1074/jbc.M211448200.
55. Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, Brusel M, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science.* 1996;271:360-362, doi: 10.1126/science.271.5247.360.
56. Marques G, Musacchio M, Shimell MJ, Wunnenberg-Stapleton K, Cho KW, O'Connor MB. Production of a DPP activity gradient in the early *Drosophila* embryo through the opposing actions of the SOG and TLD proteins. *Cell.* 1997;91:417-426, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80425-0.
57. Ruppert R, Hoffmann E, Sebald W. Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur J Biochem.* 1996;237:295-302, doi: DOI 10.1111/j.1432-1033.1996.0295n.x.
58. Irie A, Habuchi H, Kimata K, Sanai Y. Heparan sulfate is required for bone morphogenetic protein-7 signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;308:858-865, doi: 10.1016/s0006-291x(03)01500-6.
59. Takada T, Katagiri T, Ifuku M, Morimura N, Kobayashi M, Hasegawa K, i sur. Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem.* 2003;278:43229-43235, doi: 10.1074/jbc.M300937200.
60. Lin J, Patel SR, Cheng X, Cho EA, Levitan I, Ullenbruch M, i sur. Kielin/chordin-like protein, a novel enhancer of BMP signaling, attenuates renal fibrotic disease. *Nat Med.* 2005;11:387-393, doi: 10.1038/nm1217.
61. Brown A, Stock G, Patel AA, Okafor C, Vaccaro A. Osteogenic protein-1 : a review of its utility in spinal applications. *Biodrugs.* 2006;20:243-251, doi: 10.2165/00063030-200620040-00005.

62. Vukicevic S, Oppermann H, Verbanac D, Jankolija M, Popek I, Curak J, i sur. The clinical use of bone morphogenetic proteins revisited: a novel biocompatible carrier device OSTEOGROW for bone healing. *Int Orthop*. 2014;38:635-647, doi: 10.1007/s00264-013-2201-1.
63. Durdevic D, Vlahovic T, Pehar S, Miklic D, Oppermann H, Bordukalo-Niksic T, i sur. A novel autologous bone graft substitute comprised of rhBMP6 blood coagulum as carrier tested in a randomized and controlled Phase I trial in patients with distal radial fractures. *Bone*. 2020;140:115551, doi: 10.1016/j.bone.2020.115551.
64. Chiari C, Grgurevic L, Bordukalo-Niksic T, Oppermann H, Valentinitzsch A, Nemecek E, i sur. Recombinant Human BMP6 Applied Within Autologous Blood Coagulum Accelerates Bone Healing: Randomized Controlled Trial in High Tibial Osteotomy Patients. *J Bone Miner Res*. 2020;35:1893-1903, doi: 10.1002/jbmr.4107.
65. Argintar E, Edwards S, Delahay J. Bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Injury*. 2011;42:730-734, doi: 10.1016/j.injury.2010.11.016.
66. Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am*. 1995;77:940-956, doi: 10.2106/00004623-199506000-00016.
67. Bibbo C, Nelson J, Ehrlich D, Rougeux B. Bone morphogenetic proteins: indications and uses. *Clin Podiatr Med Surg*. 2015;32:35-43, doi: 10.1016/j.cpm.2014.09.005.
68. Crock HV. Anterior Lumbar Interbody Fusion - Indications for Its Use and Notes on Surgical Technique. *Clin Orthop Relat Res*. 1982:157-163.
69. Robinson BT, Metcalfe D, Cuff AV, Pidgeon TE, Hewitt KJ, Gibbs VN, i sur. Surgical techniques for autologous bone harvesting from the iliac crest in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015, doi: 10.1002/14651858.Cd011783.
70. Baldwin P, Li DJ, Auston DA, Mir HS, Yoon RS, Koval KJ. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *J Orthop Trauma*. 2019;33:203-213, doi: 10.1097/BOT.0000000000001420.

71. Shaw KA, Griffith MS, Shaw VM, Devine JG, Gloystein DM. Harvesting Autogenous Cancellous Bone Graft from the Anterior Iliac Crest. *JBJS Essent Surg Tech*. 2018;8:e20, doi: 10.2106/JBJS.ST.17.00068.
72. Mroz TE, Joyce MJ, Lieberman IH, Steinmetz MP, Benzel EC, Wang JC. The use of allograft bone in spine surgery: is it safe? *Spine J*. 2009;9:303-308, doi: 10.1016/j.spinee.2008.06.452.
73. Kim HJ, Buchowski JM, Zebala LP, Dickson DD, Koester L, Bridwell KH. RhBMP-2 is superior to iliac crest bone graft for long fusions to the sacrum in adult spinal deformity: 4- to 14-year follow-up. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013;38:1209-1215, doi: 10.1097/BRS.0b013e31828b656d.
74. Munns J, Park DK, Singh K. Role of osteogenic protein-1/bone morphogenetic protein-7 in spinal fusion. *Orthop Res Rev*. 2009;1:11-21, doi:
75. Djapic T, Kusec V, Jelic M, Vukicevic S, Pecina M. Compressed homologous cancellous bone and bone morphogenetic protein (BMP)-7 or bone marrow accelerate healing of long-bone critical defects. *Int Orthop*. 2003;27:326-330, doi: 10.1007/s00264-003-0496-z.
76. Cook SD, Dalton JE, Tan EH, Whitecloud TS, 3rd, Rueger DC. In vivo evaluation of recombinant human osteogenic protein (rhOP-1) implants as a bone graft substitute for spinal fusions. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1994;19:1655-1663, doi: 10.1097/00007632-199408000-00002.
77. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC, Whitecloud TS, 3rd. The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76:827-838, doi: 10.2106/00004623-199406000-00006.
78. Cook SD, Salkeld SL, Brinker MR, Wolfe MW, Rueger DC. Use of an osteoinductive biomaterial (rhOP-1) in healing large segmental bone defects. *J Orthop Trauma*. 1998;12:407-412, doi: 10.1097/00005131-199808000-00007.

79. Cook SD, Salkeld SL, Patron LP. Bone defect healing with an osteogenic protein-1 device combined with carboxymethylcellulose. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;75:137-145, doi: 10.1002/jbm.b.30271.
80. Salkeld SL, Patron LP, Barrack RL, Cook SD. The effect of osteogenic protein-1 on the healing of segmental bone defects treated with autograft or allograft bone. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83:803-816, doi: 10.2106/00004623-200106000-00001.
81. Magin MN, Delling G. Improved lumbar vertebral interbody fusion using rhOP-1: a comparison of autogenous bone graft, bovine hydroxylapatite (Bio-Oss), and BMP-7 (rhOP-1) in sheep. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26:469-478, doi: 10.1097/00007632-200103010-00009.
82. Cunningham BW, Shimamoto N, Seftor JC, Dmitriev AE, Orbegoso CM, McCarthy EF, i sur. Osseointegration of autograft versus osteogenic protein-1 in posterolateral spinal arthrodesis: emphasis on the comparative mechanisms of bone induction. *Spine J*. 2002;2:11-24, doi: 10.1016/s1529-9430(01)00170-x.
83. Bilic R, Simic P, Jelic M, Stern-Padovan R, Dodig D, van Meerdervoort HP, i sur. Osteogenic protein-1 (BMP-7) accelerates healing of scaphoid non-union with proximal pole sclerosis. *Int Orthop*. 2006;30:128-134, doi: 10.1007/s00264-005-0045-z.
84. Pecina M, Giltaij LR, Vukicevic S. Orthopaedic applications of osteogenic protein-1 (BMP-7). *Int Orthop*. 2001;25:203-208, doi: DOI 10.1007/s002640100262.
85. Pecina M, Haspl M, Jelic M, Vukicevic S. Repair of a resistant tibial non-union with a recombinant bone morphogenetic protein-7 (rh-BMP-7). *Int Orthop*. 2003;27:320-321, doi: 10.1007/s00264-003-0475-4.
86. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, i sur. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A Suppl 1:S151-158, doi:

87. Geesink RG, Hoefnagels NH, Bulstra SK. Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. *J Bone Joint Surg Br.* 1999;81:710-718, doi: 10.1302/0301-620x.81b4.9311.
88. Morison Z, Vicente M, Schemitsch EH, McKee MD. The treatment of atrophic, recalcitrant long-bone nonunion in the upper extremity with human recombinant bone morphogenetic protein-7 (rhBMP-7) and plate fixation: A retrospective review. *Injury.* 2016;47:356-363, doi: 10.1016/j.injury.2015.11.035.
89. Ekrol I, Hajducka C, Court-Brown C, McQueen MM. A comparison of RhBMP-7 (OP-1) and autogenous graft for metaphyseal defects after osteotomy of the distal radius. *Injury.* 2008;39:S73-S82, doi: 10.1016/s0020-1383(08)70018-4.
90. Bong MR, Capla EL, Egol KA, Sorkin AT, Distefano M, Buckle R, i sur. Osteogenic protein-1 (bone morphogenic protein-7) combined with various adjuncts in the treatment of humeral diaphyseal nonunions. *Bull Hosp Jt Dis.* 2005;63:20-23, doi:
91. Vaccaro AR, Whang PG, Patel T, Phillips FM, Anderson DG, Albert TJ, i sur. 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;8:457-465, doi: 10.1016/j.spinee.2007.03.012.
92. Vaccaro AR, Patel T, Fischgrund J, Anderson DG, Truumees E, Herkowitz H, i sur. A pilot safety and efficacy study of OP-1 putty (rhBMP-7) as an adjunct to iliac crest autograft in posterolateral lumbar fusions. *Eur Spine J.* 2003;12:495-500, doi: 10.1007/s00586-003-0561-8.
93. Vaccaro AR, Chiba K, Heller JG, Patel T, Thalgott JS, Truumees E, i sur. Bone grafting alternatives in spinal surgery. *Spine J.* 2002;2:206-215, doi: 10.1016/s1529-9430(02)00180-8.
94. Vaccaro AR, Patel T, Fischgrund J, Anderson DG, Truumees E, Herkowitz H, i sur. A 2-year follow-up pilot study evaluating the safety and efficacy of op-1 putty (rhbmp-7) as an adjunct to iliac crest autograft in posterolateral lumbar fusions. *Eur Spine J.* 2005;14:623-629, doi: 10.1007/s00586-004-0845-7.

95. Govender PV, Rampersaud YR, Rickards L, Fehlings MG. Use of osteogenic protein-1 in spinal fusion: literature review and preliminary results in a prospective series of high-risk cases. *Neurosurg Focus*. 2002;13:e4, doi: 10.3171/foc.2002.13.6.5.
96. Cook SD, Wolfe MW, Salkeld SL, Rueger DC. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *J Bone Joint Surg Am*. 1995;77:734-750, doi: 10.2106/00004623-199505000-00010.
97. White AP, Vaccaro AR, Hall JA, Whang PG, Friel BC, McKee MD. Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, nonunions and spinal fusion. *Int Orthop*. 2007;31:735-741, doi: 10.1007/s00264-007-0422-x.
98. Biswas D, Ray L, Halquist M. Development and Validation of a Stability-Indicating Method for Bone Morphogenetic Protein-2. *Rev Sep Sci*. 2019;1:3-16.
99. Boden SD, Moskovitz PA, Morone MA, Toribitake Y. Video-assisted lateral intertransverse process arthrodesis. Validation of a new minimally invasive lumbar spinal fusion technique in the rabbit and nonhuman primate (rhesus) models. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1996;21:2689-2697, doi: 10.1097/00007632-199611150-00020.
100. Boden SD, Martin GJ, Horton WC, Truss TL, Sandhu HS. Laparoscopic anterior spinal arthrodesis with rhBMP-2 in a titanium interbody threaded cage. *J Spinal Disord*. 1998;11:95-101, doi:
101. Boden SD, Martin GJ, Jr., Morone MA, Ugbo JL, Moskovitz PA. Posterolateral lumbar intertransverse process spine arthrodesis with recombinant human bone morphogenetic protein 2/hydroxyapatite-tricalcium phosphate after laminectomy in the nonhuman primate. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999;24:1179-1185, doi: 10.1097/00007632-199906150-00002.
102. David SM, Gruber HE, Meyer RA, Jr., Murakami T, Tabor OB, Howard BA, i sur. Lumbar spinal fusion using recombinant human bone morphogenetic protein in the canine. A comparison of three dosages and two carriers. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999;24:1973-1979, doi: 10.1097/00007632-199910010-00002.

103. Fischgrund JS, James SB, Chabot MC, Hankin R, Herkowitz HN, Wozney JM, i sur. Augmentation of autograft using rhBMP-2 and different carrier media in the canine spinal fusion model. *J Spinal Disord.* 1997;10:467-472, doi:
104. Hecht BP, Fischgrund JS, Herkowitz HN, Penman L, Toth JM, Shirkhoda A. The use of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) to promote spinal fusion in a nonhuman primate anterior interbody fusion model. *Spine.* 2000;25:107s-114s, doi: Doi 10.1097/00007632-200003151-00014.
105. Helm GA, Sheehan JM, Sheehan JP, Jane JA, Jr., diPierro CG, Simmons NE, i sur. Utilization of type I collagen gel, demineralized bone matrix, and bone morphogenetic protein-2 to enhance autologous bone lumbar spinal fusion. *J Neurosurg.* 1997;86:93-100, doi: 10.3171/jns.1997.86.1.0093.
106. Itoh H, Ebara S, Kamimura M, Tateiwa Y, Kinoshita T, Yuzawa Y, i sur. Experimental spinal fusion with use of recombinant human bone morphogenetic protein 2. *Spine.* 1999;24:1402-1405, doi: Doi 10.1097/00007632-199907150-00003.
107. Martin GJ, Boden SD, Morone MA, Moskovitz YA. Posterolateral intertransverse process spinal arthrodesis with rhBMP-2 in a nonhuman primate: Important lessons learned regarding dose, carrier, and safety. *J Spinal Disord.* 1999;12:179-186, doi: Doi 10.1097/00002517-199906000-00001.
108. Minamide A, Kawakami M, Hashizume H, Sakata R, Tamaki T. Evaluation of carriers of bone morphogenetic protein for spinal fusion. *Spine.* 2001;26:933-939, doi: Doi 10.1097/00007632-200104150-00017.
109. Sandhu HS, Kanim LE, Kabo JM, Toth JM, Zeegen EN, Liu D, i sur. Effective doses of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in experimental spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976).* 1996;21:2115-2122, doi: 10.1097/00007632-199609150-00012.
110. Sandhu HS, Kanim LE, Toth JM, Kabo JM, Liu D, Delamarter RB, i sur. Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2 without decortication of

osseous elements. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1997;22:1171-1180, doi: 10.1097/00007632-199706010-00001.

111. Sandhu HS, Toth JM, Diwan AD, Seim HB, 3rd, Kanim LE, Kabo JM, i sur. Histologic evaluation of the efficacy of rhBMP-2 compared with autograft bone in sheep spinal anterior interbody fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2002;27:567-575, doi: 10.1097/00007632-200203150-00003.

112. Sidhu KS, Prochnow TD, Schmitt P, Fischgrund J, Weisbrode S, Herkowitz HN. Anterior cervical interbody fusion with rhBMP-2 and tantalum in a goat model. *Spine J*. 2001;1:331-340, doi: 10.1016/s1529-9430(01)00113-9.

113. Takahashi T, Tominaga T, Watabe N, Yokobori AT, Sasada H, Yoshimoto T. Use of porous hydroxyapatite graft containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 for cervical fusion in a caprine model. *J Neurosurg*. 1999;90:224-230, doi: DOI 10.3171/spi.1999.90.2.0224.

114. Zdeblick TA, Ghanayem AJ, Rapoff AJ, Swain C, Bassett T, Cooke ME, i sur. Cervical interbody fusion cages. An animal model with and without bone morphogenetic protein. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1998;23:758-765; discussion 766, doi: 10.1097/00007632-199804010-00002.

115. Burkus JK, Schuler TC, Gornet MF, Zdeblick TA. Anterior lumbar interbody fusion for the management of chronic lower back pain: current strategies and concepts. *Orthop Clin North Am*. 2004;35:25-32, doi: 10.1016/S0030-5898(03)00053-1.

116. McKay B, Sandhu HS. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spinal fusion applications. *Spine*. 2002;27:S66-S85, doi: 10.1097/00007632-200208151-00014.

117. McKay WF, Peckham SM, Badura JM. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). *Int Orthop*. 2007;31:729-734, doi: 10.1007/s00264-007-0418-6.

118. 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)*. 2002;27:2396-2408, doi: 10.1097/00007632-200211010-00015.
119. Burkus JK, Gornet MF, Dickman CA, Zdeblick TA. Anterior lumbar interbody fusion using rhBMP-2 with tapered interbody cages. *J Spinal Disord Tech*. 2002;15:337-349, doi: Doi 10.1097/00024720-200210000-00001.
120. Sciadini MF, Johnson KD. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Res*. 2000;18:289-302, doi: DOI 10.1002/jor.1100180218.
121. Bostrom M, Lane JM, Tomin E, Browne M, Berberian W, Turek T, i sur. Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. *Clin Orth Relat Res*. 1996:272-282, doi: Doi 10.1097/00003086-199606000-00034.
122. Schwartz ND, Hicks BM. Eight-centimeter segmental ulnar defect treated with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*. 2008;37:569-571.
123. Jones AL, Bucholz RW, Bosse MJ, Mirza SK, Lyon TR, Webb LX, i sur. Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects. A randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88:1431-1441, doi: 10.2106/JBJS.E.00381.
124. Swiontkowski MF, Aro HT, Donell S, Esterhai JL, Goulet J, Jones A, i sur. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures. A subgroup analysis of data combined from two prospective randomized studies. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88:1258-1265, doi: 10.2106/JBJS.E.00499.
125. Boyne PJ, Marx RE, Nevins M, Triplett G, Lazaro E, Lilly LC, i sur. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1997;17:11-25, doi:

126. Boyne PJ, Lilly LC, Marx RE, Moy PK, Nevins M, Spagnoli DB, i sur. De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63:1693-1707, doi: 10.1016/j.joms.2005.08.018.
127. Fiorellini JP, Howell TH, Cochran D, Malmquist J, Lilly LC, Spagnoli D, i sur. Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation. *J Periodontol.* 2005;76:605-613, doi: DOI 10.1902/jop.2005.76.4.605.
128. James AW, LaChaud G, Shen J, Asatrian G, Nguyen V, Zhang X, i sur. A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng Part B Rev.* 2016;22:284-297, doi: 10.1089/ten.TEB.2015.0357.
129. Hustedt JW, Blizzard DJ. The controversy surrounding bone morphogenetic proteins in the spine: a review of current research. *Yale J Biol Med.* 2014;87:549-561.
130. Epstein NE. Complications due to the use of BMP/INFUSE in spine surgery: The evidence continues to mount. *Surg Neurol Int.* 2013;4:S343-352, doi: 10.4103/2152-7806.114813.
131. Michiels I, Egberts J, Weidle P. Off-label Use of rhBMP-2 (InductOs) in Orthopaedic Surgery. *Tissue Eng Pt A.* 2009;15:O16-O16, doi:
132. El Bialy I, Jiskoot W, Reza Nejadnik M. Formulation, Delivery and Stability of Bone Morphogenetic Proteins for Effective Bone Regeneration. *Pharm Res.* 2017;34:1152-1170, doi: 10.1007/s11095-017-2147-x.
133. Dimar JR, 2nd, Glassman SD, Burkus JK, Pryor PW, Hardacker JW, Carreon LY. Clinical and radiographic analysis of an optimized rhBMP-2 formulation as an autograft replacement in posterolateral lumbar spine arthrodesis. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91:1377-1386, doi: 10.2106/JBJS.H.00200.

134. Simmonds MC, Brown JV, Heirs MK, Higgins JP, Mannion RJ, Rodgers MA, i sur. Safety and effectiveness of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for spinal fusion: a meta-analysis of individual-participant data. *Ann Intern Med.* 2013;158:877-889, doi: 10.7326/0003-4819-158-12-201306180-00005.
135. Carragee EJ, Chu G, Rohatgi R, Hurwitz EL, Weiner BK, Yoon ST, i sur. Cancer risk after use of recombinant bone morphogenetic protein-2 for spinal arthrodesis. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95:1537-1545, doi: 10.2106/JBJS.L.01483.
136. Kelly MP, Savage JW, Bentzen SM, Hsu WK, Ellison SA, Anderson PA. Cancer risk from bone morphogenetic protein exposure in spinal arthrodesis. *J Bone Joint Surg Am.* 2014;96:1417-1422, doi: 10.2106/JBJS.M.01190.
137. Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen Med.* 2008;2:81-96, doi: 10.1002/term.74.
138. Luca L, Rougemont AL, Walpoth BH, Gurny R, Jordan O. The effects of carrier nature and pH on rhBMP-2-induced ectopic bone formation. *J Control Release.* 2010;147:38-44, doi: 10.1016/j.jconrel.2010.06.011.
139. Luca L, Capelle MAH, Machaidze G, Arvinte T, Jordan O, Gurny R. Physical instability, aggregation and conformational changes of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *Int J Pharm.* 2010;391:48-54, doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.02.015.
140. Rosenberg AS. Effects of protein aggregates: An immunologic perspective. *Aaps J.* 2006;8:E501-E507, doi: DOI 10.1208/aapsj080359.
141. Hermeling S, Crommelin DJ, Schellekens H, Jiskoot W. Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. *Pharm Res.* 2004;21:897-903, doi: 10.1023/b:pham.0000029275.41323.a6.

142. Torosantucci R, Schoneich C, Jiskoot W. Oxidation of therapeutic proteins and peptides: structural and biological consequences. *Pharm Res.* 2014;31:541-553, doi: 10.1007/s11095-013-1199-9.
143. Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, i sur. Identification of Transforming Growth-Factor-Beta Family Members Present in Bone-Inductive Protein Purified from Bovine Bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:9843-9847, doi: DOI 10.1073/pnas.87.24.9843.
144. Schwartz DH. Development of an Aqueous Suspension of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2). München: LMU München; 2005.
145. Sundermann J, Zagst H, Kuntsche J, Watzig H, Bunjes H. Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) Aggregates Can be Solubilized by Albumin-Investigation of BMP-2 Aggregation by Light Scattering and Electrophoresis. *Pharmaceutics.* 2020;12, doi: 10.3390/pharmaceutics12121143.
146. Quaas B, Burmeister L, Li Z, Satalov A, Behrens P, Hoffmann A, i sur. Stability and Biological Activity of E. coli Derived Soluble and Precipitated Bone Morphogenetic Protein-2. *Pharm Res.* 2019;36:184, doi: 10.1007/s11095-019-2705-5.
147. Geiger M, Li RH, Friess W. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Adv Drug Del Rev.* 2003;55:1613-1629, doi: 10.1016/j.addr.2003.08.010.
148. Yu X, Suarez-Gonzalez D, Khalil AS, Murphy WL. How does the pathophysiological context influence delivery of bone growth factors? *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;84:68-84, doi: 10.1016/j.addr.2014.10.010.
149. Seeherman H, Wozney JM. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine & growth factor reviews.* 2005;16:329-345, doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.05.001.
150. Agrawal V, Sinha M. A review on carrier systems for bone morphogenetic protein-2. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2017;105:904-925, doi: 10.1002/jbm.b.33599.

151. Stokovic N, Ivanjko N, Maticic D, Luyten FP, Vukicevic S. Bone Morphogenetic Proteins, Carriers, and Animal Models in the Development of Novel Bone Regenerative Therapies. *Materials*. 2021;14:3513, doi: 10.3390/ma14133513.
152. Lee SH, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59:339-359, doi: 10.1016/j.addr.2007.03.016.
153. Lo KW, Ulery BD, Ashe KM, Laurencin CT. Studies of bone morphogenetic protein-based surgical repair. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64:1277-1291, doi: 10.1016/j.addr.2012.03.014.
154. Tan KJ, Liao S, Chan CK. Controlled release of recombinant human bone morphogenetic protein-7 in nanoscaffolds. *Nanomedicine (Lond)*. 2007;2:385-390, doi: 10.2217/17435889.2.3.385.
155. Krishnan L, Priddy LB, Esancy C, Li MT, Stevens HY, Jiang X, i sur. Hydrogel-based Delivery of rhBMP-2 Improves Healing of Large Bone Defects Compared With Autograft. *Clin Orthop Relat Res*. 2015;473:2885-2897, doi: 10.1007/s11999-015-4312-z.
156. Hou J, Wang J, Cao L, Qian X, Xing W, Lu J, i sur. Segmental bone regeneration using rhBMP-2-loaded collagen/chitosan microspheres composite scaffold in a rabbit model. *Biomed Mater*. 2012;7:035002, doi: 10.1088/1748-6041/7/3/035002.
157. Luca L, Rougemont AL, Walpoth BH, Boure L, Tami A, Anderson JM, i sur. Injectable rhBMP-2-loaded chitosan hydrogel composite: osteoinduction at ectopic site and in segmental long bone defect. *J Biomed Mater Res A*. 2011;96:66-74, doi: 10.1002/jbm.a.32957.
158. Yamamoto M, Takahashi Y, Tabata Y. Enhanced bone regeneration at a segmental bone defect by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel. *Tissue Eng*. 2006;12:1305-1311, doi: 10.1089/ten.2006.12.1305.

159. Murakami N, Saito N, Takahashi J, Ota H, Horiuchi H, Nawata M, i sur. Repair of a proximal femoral bone defect in dogs using a porous surfaced prosthesis in combination with recombinant BMP-2 and a synthetic polymer carrier. *Biomaterials*. 2003;24:2153-2159, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00041-3.
160. Namikawa T, Terai H, Suzuki E, Hoshino M, Toyoda H, Nakamura H, i sur. Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered by a synthetic polymer and beta-tricalcium phosphate in a rabbit model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30:1717-1722, doi: 10.1097/01.brs.0000172155.17239.fa.
161. Stokovic N, Ivanjko N, Erjavec I, Milosevic M, Oppermann H, Shimp L, i sur. Autologous bone graft substitute containing rhBMP6 within autologous blood coagulum and synthetic ceramics of different particle size determines the quantity and structural pattern of bone formed in a rat sutaneous assay. *Bone*. 2020;141:115654, doi: 10.1016/j.bone.2020.115654.
162. Habibovic P, Barralet JE. Bioinorganics and biomaterials: bone repair. *Acta Biomater*. 2011;7:3013-3026, doi: 10.1016/j.actbio.2011.03.027.
163. Barrere F, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomedicine*. 2006;1:317-332.
164. Tadashi K. Bioceramics and their clinical applications. Cambridge, England: Woodhead publishing limited; 2008 str 760.
165. Jeong J, Kim JH, Shim JH, Hwang NS, Heo CY. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomater Res*. 2019;23:4, doi: 10.1186/s40824-018-0149-3.
166. Ginebra MP, Espanol M, Maazouz Y, Bergez V, Pastorino D. Bioceramics and bone healing. *EFORT Open Rev*. 2018;3:173-183, doi: 10.1302/2058-5241.3.170056.

167. Peric M, Dumic-Cule I, Grcevic D, Matijasic M, Verbanac D, Paul R, i sur. The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. *Bone*. 2015;70:73-86, doi: 10.1016/j.bone.2014.07.010.
168. Scott MA, Levi B, Askarinam A, Nguyen A, Rackohn T, Ting K, i sur. Brief review of models of ectopic bone formation. *Stem Cells Dev*. 2012;21:655-667, doi: 10.1089/scd.2011.0517.
169. Pecin M, Stokovic N, Ivanjko N, Smajlovic A, Kreszinger M, Capak H, i sur. A novel autologous bone graft substitute containing rhBMP6 in autologous blood coagulum with synthetic ceramics for reconstruction of a large humerus segmental gunshot defect in a dog: The first veterinary patient to receive a novel osteoinductive therapy. *Bone Rep*. 2021;14:100759, doi: 10.1016/j.bonr.2021.100759.
170. Vukicevic S, Peric M, Oppermann H, Stokovic N, Ivanjko N, Erjavec I, i sur. Bone morphogenetic proteins: From discovery to development of a novel autologous bone graft substitute consisting of recombinant human BMP6 delivered in autologous blood coagulum carrier. *Rad CASA - Medical Sciences*. 2020;544:26-41, doi: 10.21857/mnlqgc5vgy.
171. Vukicevic S, Grgurevic L, Erjavec I, Pecin M, Bordukalo-Niksic T, Stokovic N, i sur. Autologous blood coagulum is a physiological carrier for BMP6 to induce new bone formation and promote posterolateral lumbar spine fusion in rabbits. *J Tissue Eng Regen Med*. 2020;14:147-159, doi: 10.1002/term.2981.
172. Grgurevic L, Oppermann H, Pecin M, Erjavec I, Capak H, Pauk M, i sur. Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 6 Delivered Within Autologous Blood Coagulum Restores Critical Size Segmental Defects of Ulna in Rabbits. *JBMR Plus*. 2019;3:e10085, doi: 10.1002/jbm4.10085.
173. Stokovic N, Ivanjko N, Milesevic M, Matic Jelic I, Bakic K, Rumenovic V, i sur. Synthetic ceramic macroporous blocks as a scaffold in ectopic bone formation induced by recombinant human bone morphogenetic protein 6 within autologous blood coagulum in rats. *Int Orthop*. 2020;45:1097-1107, doi: 10.1007/s00264-020-04847-9.

174. Stokovic N, Ivanjko N, Erjavec I, Breski A, Peric M, Vukicevic S. Zoledronate Bound to Ceramics Increases Ectopic Bone Volume Induced by rhBMP6 Delivered in Autologous Blood Coagulum in Rats. *Biomedicines*. 2021;9, doi: 10.3390/biomedicines9101487.
175. Stokovic N, Ivanjko N, Pecin M, Erjavec I, Karlovic S, Smajlovic A, i sur. Evaluation of synthetic ceramics as compression resistant matrix to promote osteogenesis of autologous blood coagulum containing recombinant human bone morphogenetic protein 6 in rabbit posterolateral lumbar fusion model. *Bone*. 2020;140:115544, doi: 10.1016/j.bone.2020.115544.
176. Grgurevic L, Erjavec I, Gupta M, Pecin M, Bordukalo-Niksic T, Stokovic N, i sur. Autologous blood coagulum containing rhBMP6 induces new bone formation to promote anterior lumbar interbody fusion (ALIF) and posterolateral lumbar fusion (PLF) of spine in sheep. *Bone*. 2020;138:115448, doi: 10.1016/j.bone.2020.115448.
177. Herrera B, Inman GJ. A rapid and sensitive bioassay for the simultaneous measurement of multiple bone morphogenetic proteins. Identification and quantification of BMP4, BMP6 and BMP9 in bovine and human serum. *BMC Cell Biol*. 2009;10:20, doi: 10.1186/1471-2121-10-20.
178. Al-Maawi S, Mota C, Kubesch A, James Kirkpatrick C, Moroni L, Ghanaati S. Multiwell three-dimensional systems enable in vivo screening of immune reactions to biomaterials: a new strategy toward translational biomaterial research. *J Mater Sci Mater Med*. 2019;30:61, doi: 10.1007/s10856-019-6263-5.
179. Butler D. Last chance to stop acid think on risks of xenotransplants. *Nature*. 1998;391:320-324, doi:
180. DeLustro F, Dasch J, Keefe J, Ellingsworth L. Immune responses to allogeneic and xenogeneic implants of collagen and collagen derivatives. *Clin Orthop Relat Res*. 1990:263-279, doi:
181. Sawada Y, Hokugo A, Nishiura A, Hokugo R, Matsumoto N, Morita S, i sur. A trial of alveolar cleft bone regeneration by controlled release of bone morphogenetic protein: an

experimental study in rabbits. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108:812-820, doi: 10.1016/j.tripleo.2009.06.040.

182. Siegle RJ, McCoy JP, Schade W, Swanson NA. Intra-dermal Implantation of Bovine Collagen - Humoral Immune-Responses Associated with Clinical Reactions. *Arch Dermatol.* 1984;120:183-187, doi: DOI 10.1001/archderm.120.2.183.

183. Widdowson JP, Picton AJ, Vince V, Wright CJ, Mearns-Spragg A. In vivo comparison of jellyfish and bovine collagen sponges as prototype medical devices. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2018;106:1524-1533, doi: 10.1002/jbm.b.33959.

184. Guidelines on Transmissible Spongiform Encephalopathies in relation to Biological and Pharmaceutical Products. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2003.

185. Brown KV, Li B, Guda T, Perrien DS, Guelcher SA, Wenke JC. Improving Bone Formation in a Rat Femur Segmental Defect by Controlling Bone Morphogenetic Protein-2 Release. *Tissue Eng Pt A.* 2011;17:1735-1746, doi: 10.1089/ten.tea.2010.0446.

186. Kisiel M, Klar AS, Ventura M, Buijs J, Mafina MK, Cool SM, i sur. Complexation and sequestration of BMP-2 from an ECM mimetic hyaluronan gel for improved bone formation. *PLoS One.* 2013;8:e78551, doi: 10.1371/journal.pone.0078551.

187. Jung T, Lee JH, Park S, Kim YJ, Seo J, Shim HE, i sur. Effect of BMP-2 Delivery Mode on Osteogenic Differentiation of Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2017;2017:7859184, doi: 10.1155/2017/7859184.

188. Yang HS, La WG, Cho YM, Shin W, Yeo GD, Kim BS. Comparison between heparin-conjugated fibrin and collagen sponge as bone morphogenetic protein-2 carriers for bone regeneration. *Experimental and Molecular Medicine.* 2012;44:350-355, doi: 10.3858/emm.2012.44.5.039.

189. Yang HS, La WG, Park J, Kim CS, Im GI, Kim BS. Efficient bone regeneration induced by bone morphogenetic protein-2 released from apatite-coated collagen scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2012;23:1659-1671, doi: 10.1163/092050611X589419.

190. Andrews S, Cheng A, Stevens H, Logun MT, Webb R, Jordan E, i sur. Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycan Scaffolds for Cell and Recombinant Protein-Based Bone Regeneration. *Stem Cells Transl Med.* 2019;8:575-585, doi: 10.1002/sctm.18-0141.
191. Cho TH, Kim IS, Lee B, Park SN, Ko JH, Hwang SJ. (*) Early and Marked Enhancement of New Bone Quality by Alendronate-Loaded Collagen Sponge Combined with Bone Morphogenetic Protein-2 at High Dose: A Long-Term Study in Calvarial Defects in a Rat Model. *Tissue Eng Part A.* 2017;23:1343-1360, doi: 10.1089/ten.TEA.2016.0557.
192. Bhakta G, Lim ZX, Rai B, Lin T, Hui JH, Prestwich GD, i sur. The influence of collagen and hyaluronan matrices on the delivery and bioactivity of bone morphogenetic protein-2 and ectopic bone formation. *Acta Biomater.* 2013;9:9098-9106, doi: 10.1016/j.actbio.2013.07.008.
193. Kim RY, Lee B, Park SN, Ko JH, Kim IS, Hwang SJ. Is Heparin Effective for the Controlled Delivery of High-Dose Bone Morphogenetic Protein-2? *Tissue Eng Part A.* 2016;22:801-817, doi: 10.1089/ten.TEA.2015.0537.
194. Laub M, Chatzinikolaidou M, Jennissen HP. Aspects of BMP-2 binding to receptors and collagen: Influence of cell senescence on receptor binding and absence of high-affinity stoichiometric binding to collagen. *Materialwiss Werkst.* 2007;38:1019-1026, doi: 10.1002/mawe.200700238.
195. Geiger M. Porous Collagen/Ceramic Composite Carriers for Bone Regeneration Using Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2). Erlangen, Germany: University of Erlangen-Nuremberg; 2001.
196. Luca L, Capelle MA, Machaidze G, Arvinte T, Jordan O, Gurny R. Physical instability, aggregation and conformational changes of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *Int J Pharm.* 2010;391:48-54, doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.02.015.
197. Kisiel M, Ventura M, George A, Hilborn J, Varghese OP. Critical Assessment of rhBMP-2 Mediated Bone Induction: an In Vitro and In Vivo Evaluation. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012;6:39-39, doi:

198. Piskounova S, Gedda L, Hulsart-Billström G, Hilborn J, Bowden T. Characterization of recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivery from injectable hyaluronan-based hydrogels by means of ¹²⁵I-radiolabelling. *J Tissue Eng Regen Med*. 2014;8:821-830, doi: 10.1002/term.1584.
199. Marques MRC, Loebenberg R, Almukainzi M. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. *Dissolution Technol*. 2011;18:15-28, doi: 10.14227/dt180311p15.
200. Sundermann J, Sydow S, Burmeister L, Hoffmann A, Menzel H, Bunjes H. ELISA- and Activity Assay-Based Quantification of BMP-2 Released In Vitro Can Be Biased by Solubility in "Physiological" Buffers and an Interfering Effect of Chitosan. *Pharmaceutics*. 2021;13, doi: 10.3390/pharmaceutics13040582.
201. Nel AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater*. 2009;8:543-557, doi: 10.1038/nmat2442.
202. Chen C, Loe F, Blocki A, Peng Y, Raghunath M. Applying macromolecular crowding to enhance extracellular matrix deposition and its remodeling in vitro for tissue engineering and cell-based therapies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63:277-290, doi: 10.1016/j.addr.2011.03.003.
203. Vroman L, Adams AL. Identification of rapid changes at plasma-solid interfaces. *J Biomed Mater Res*. 1969;3:43-67, doi: 10.1002/jbm.820030106.
204. Laffargue P, Fialdes P, Frayssinet P, Rtaimate M, Hildebrand HF, Marchandise X. Adsorption and release of insulin-like growth factor-I on porous tricalcium phosphate implant. *J Biomed Mater Res*. 2000;49:415-421, doi: 10.1002/(sici)1097-4636(20000305)49:3<415::aid-jbm15>3.0.co;2-z.
205. Fujioka K, Takada Y, Sato S, Miyata T. Novel Delivery System for Proteins Using Collagen as a Carrier Material - the Minipellet. *J Control Release*. 1995;33:307-315, doi: 10.1016/0168-3659(94)00107-6.

206. Zhu G, Mallery SR, Schwendeman SP. Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly (lactide- co-glycolide). *Nat Biotechnol.* 2000;18:52-57, doi: 10.1038/71916.
207. Finn TE, Nunez AC, Sunde M, Easterbrook-Smith SB. Serum albumin prevents protein aggregation and amyloid formation and retains chaperone-like activity in the presence of physiological ligands. *J Biol Chem.* 2012;287:21530-21540, doi: 10.1074/jbc.M112.372961.
208. Utesch T, Daminelli G, Mroginski MA. Molecular dynamics simulations of the adsorption of bone morphogenetic protein-2 on surfaces with medical relevance. *Langmuir.* 2011;27:13144-13153, doi: 10.1021/la202489w.
209. Marquetti I, Desai S. Molecular modeling the adsorption behavior of bone morphogenetic protein-2 on hydrophobic and hydrophilic substrates. *Chem Phys Lett.* 2018;706:285-294, doi: 10.1016/j.cplett.2018.06.015.
210. Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Aspects Med.* 2012;33:209-290, doi: 10.1016/j.mam.2011.12.002.
211. Franz S, Rammelt S, Scharnweber D, Simon JC. Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials.* 2011;32:6692-6709, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.078.
212. Anderson HL, Brodsky IE, Mangalmurti NS. The Evolving Erythrocyte: Red Blood Cells as Modulators of Innate Immunity. *J Immunol.* 2018;201:1343-1351, doi: 10.4049/jimmunol.1800565.
213. Longoni A, Knezevic L, Schepers K, Weinans H, Rosenberg A, Gawlitta D. The impact of immune response on endochondral bone regeneration. *NPJ Regen Med.* 2018;3:22, doi: 10.1038/s41536-018-0060-5.
214. Brown BN, Badylak SF. Biocompatibility and Immune Response to Biomaterials. *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation* 2014, str. 151-162.

215. Nimeri G, Majeed M, Elwing H, Ohman L, Wettero J, Bengtsson T. Oxygen radical production in neutrophils interacting with platelets and surface-immobilized plasma proteins: role of tyrosine phosphorylation. *J Biomed Mater Res A*. 2003;67:439-447, doi: 10.1002/jbm.a.10081.
216. Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun*. 2016;7:12150, doi: 10.1038/ncomms12150.
217. Hwang CJ, Vaccaro AR, Lawrence JP, Hong J, Schellekens H, Alaoui-Ismaili MH, et al. Immunogenicity of bone morphogenetic proteins. *J Neurosurg Spine*. 2009;10:443-451, doi: 10.3171/2009.1.SPINE08473.
218. Friess W, Uludag H, Foskett S, Biron R, Sargeant C. Characterization of absorbable collagen sponges as rhBMP-2 carriers. *Int J Pharm*. 1999;187:91-99, doi: Doi 10.1016/S0378-5173(99)00174-X.
219. Friess W, Uludag H, Foskett S, Biron R, Sargeant C. Characterization of absorbable collagen sponges as recombinant human bone morphogenetic protein-2 carriers. *Int J Pharm*. 1999;185:51-60, doi: Doi 10.1016/S0378-5173(99)00128-3.
220. Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004;71:343-354, doi: 10.1002/jbm.b.30096.
221. Zhang L, Niu X, Sun L, She Z, Tan R, Wang W. Immune response of bovine sourced cross-linked collagen sponge for hemostasis. *J Biomater Appl*. 2018;32:920-931, doi: 10.1177/0885328217744080.
222. Wong ML, Griffiths LG. Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation: antigen removal vs. decellularization. *Acta Biomater*. 2014;10:1806-1816, doi: 10.1016/j.actbio.2014.01.028.

223. Wei F, Liu S, Chen M, Tian G, Zha K, Yang Z, i sur. Host Response to Biomaterials for Cartilage Tissue Engineering: Key to Remodeling. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:664592, doi: 10.3389/fbioe.2021.664592.
224. Fan Q, Ma Q, Bai J, Xu J, Fei Z, Dong Z, i sur. An implantable blood clot-based immune niche for enhanced cancer vaccination. *Sci Adv.* 2020;6, doi: 10.1126/sciadv.abb4639.
225. Fan Q, Bai J, Shan H, Fei Z, Chen H, Xu J, i sur. Implantable blood clot loaded with BMP-2 for regulation of osteoimmunology and enhancement of bone repair. *Bioact Mater.* 2021;6:4014-4026, doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.04.008.
226. Han X, Wang C, Liu Z. Red Blood Cells as Smart Delivery Systems. *Bioconjug Chem.* 2018;29:852-860, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00758.
227. Buttari B, Profumo E, Rigano R. Crosstalk between red blood cells and the immune system and its impact on atherosclerosis. *Biomed Res Int.* 2015;2015:616834, doi: 10.1155/2015/616834.
228. Buttari B, Profumo E, Cuccu B, Straface E, Gambardella L, Malorni W, i sur. Erythrocytes from patients with carotid atherosclerosis fail to control dendritic cell maturation. *Int J Cardiol.* 2012;155:484-486, doi: 10.1016/j.ijcard.2011.12.068.
229. Hod EA, Zhang N, Sokol SA, Wojczyk BS, Francis RO, Ansaldi D, i sur. Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. *Blood.* 2010;115:4284-4292, doi: 10.1182/blood-2009-10-245001.
230. Antunes RF, Brandao C, Maia M, Arosa FA. Red blood cells release factors with growth and survival bioactivities for normal and leukemic T cells. *Immunol Cell Biol.* 2011;89:111-121, doi: 10.1038/icb.2010.60.
231. Arosa FA, Pereira CF, Fonseca AM. Red blood cells as modulators of T cell growth and survival. *Curr Pharm Des.* 2004;10:191-201, doi: 10.2174/1381612043453432.

232. Schellekens H. Immunogenicity of therapeutic proteins. *Nephrol Dial Transpl.* 2003;18:1257-1259, doi: 10.1093/ndt/gfg164.
233. Poynton AR, Lane JM. Safety profile for the clinical use of bone morphogenetic proteins in the spine. *Spine (Phila Pa 1976).* 2002;27:S40-48, doi: 10.1097/00007632-200208151-00010.
234. Valentin-Opran A, Wozney J, Csimma C, Lilly L, Riedel GE. Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Orthop Relat Res.* 2002:110-120.
235. Louis-Ugbo J, Kim HS, Boden SD, Mayr MT, Li RC, Seeherman H, i sur. Retention of I-125-labeled recombinant human bone morphogenetic protein-2 by biphasic calcium phosphate or a composite sponge in a rabbit posterolateral spine arthrodesis model. *J Orthop Res.* 2002;20:1050-1059, doi: 10.1016/S0736-0266(02)00011-6.
236. Pacifici R. Osteoimmunology and its implications for transplantation. *Am J Transplant.* 2013;13:2245-2254, doi: 10.1111/ajt.12380.
237. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, i sur. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med.* 2006;203:2673-2682, doi: 10.1084/jem.20061775.
238. Caetano-Lopes J, Canhao H, Fonseca JE. Osteoimmunology--the hidden immune regulation of bone. *Autoimmun Rev.* 2009;8:250-255, doi: 10.1016/j.autrev.2008.07.038.
239. Mori G, D'Amelio P, Faccio R, Brunetti G. The Interplay between the bone and the immune system. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:720504, doi: 10.1155/2013/720504.
240. Li Y, Toraldo G, Li A, Yang X, Zhang H, Qian WP, i sur. B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood.* 2007;109:3839-3848, doi: 10.1182/blood-2006-07-037994.

241. El Khassawna T, Serra A, Bucher CH, Petersen A, Schlundt C, Konnecke I, i sur. T Lymphocytes Influence the Mineralization Process of Bone. *Front Immunol.* 2017;8:562, doi: 10.3389/fimmu.2017.00562.
242. Cheng A, Vantucci CE, Krishnan L, Ruehle MA, Kotanchek T, Wood LB, i sur. Early systemic immune biomarkers predict bone regeneration after trauma. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 2021;118, doi: 10.1073/pnas.2017889118.
243. Ambrosi TH, Scialdone A, Graja A, Gohlke S, Jank AM, Bocian C, i sur. Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration. *Cell Stem Cell.* 2017;20:771-784 e776, doi: 10.1016/j.stem.2017.02.009.
244. Harting M, Jimenez F, Pati S, Baumgartner J, Cox C, Jr. Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2008;10:243-253, doi: 10.1080/14653240801950000.
245. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol.* 2009;132:533-546, doi: 10.1007/s00418-009-0629-6.
246. Berry R, Rodeheffer MS. Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nat Cell Biol.* 2013;15:302-308, doi: 10.1038/ncb2696.
247. Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell.* 2008;135:240-249, doi: 10.1016/j.cell.2008.09.036.
248. Kato M, Namikawa T, Terai H, Hoshino M, Miyamoto S, Takaoka K. Ectopic bone formation in mice associated with a lactic acid/dioxanone/ethylene glycol copolymer-tricalcium phosphate composite with added recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials.* 2006;27:3927-3933, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.03.013.

249. Roldan JC, Detsch R, Schaefer S, Chang E, Kelantan M, Waiss W, i sur. Bone formation and degradation of a highly porous biphasic calcium phosphate ceramic in presence of BMP-7, VEGF and mesenchymal stem cells in an ectopic mouse model. *J Craniomaxillofac Surg.* 2010;38:423-430, doi: 10.1016/j.jcms.2010.01.003.
250. Liang G, Yang Y, Oh S, Ong JL, Zheng C, Ran J, i sur. Ectopic osteoinduction and early degradation of recombinant human bone morphogenetic protein-2-loaded porous beta-tricalcium phosphate in mice. *Biomaterials.* 2005;26:4265-4271, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.035.
251. Bolander J, Ji W, Geris L, Bloemen V, Chai YC, Schrooten J, i sur. The combined mechanism of bone morphogenetic protein- and calcium phosphate-induced skeletal tissue formation by human periosteum derived cells. *Eur Cell Mater.* 2016;31:11-25, doi: 10.22203/ecm.v031a02.
252. Ji W, Kerckhofs G, Geeroms C, Marechal M, Geris L, Luyten FP. Deciphering the combined effect of bone morphogenetic protein 6 and calcium phosphate on bone formation capacity of periosteum derived cells-based tissue engineering constructs. *Acta Biomater.* 2018;80:97-107, doi: 10.1016/j.actbio.2018.09.046.
253. Hashimoto K, Kaito T, Furuya M, Seno S, Okuzaki D, Kikuta J, i sur. In vivo dynamic analysis of BMP-2-induced ectopic bone formation. *Sci Rep.* 2020;10:4751, doi: 10.1038/s41598-020-61825-2.
254. Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, Tsuruga E, Inoue M, Murata M, i sur. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res.* 1998;39:190-199, doi: 10.1002/(sici)1097-4636(199802)39:2<190::aid-jbm4>3.0.co;2-k.
255. Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J Biochem.* 1997;121:317-324, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021589.

256. Alam MI, Asahina I, Ohmamiuda K, Takahashi K, Yokota S, Enomoto S. Evaluation of ceramics composed of different hydroxyapatite to tricalcium phosphate ratios as carriers for rhBMP-2. *Biomaterials*. 2001;22:1643-1651, doi: 10.1016/s0142-9612(00)00322-7.
257. Vehof JW, Takita H, Kuboki Y, Spauwen PH, Jansen JA. Histological characterization of the early stages of bone morphogenetic protein-induced osteogenesis. *J Biomed Mater Res*. 2002;61:440-449, doi: 10.1002/jbm.10216.
258. Kim CS, Kim JI, Kim J, Choi SH, Chai JK, Kim CK, i sur. Ectopic bone formation associated with recombinant human bone morphogenetic proteins-2 using absorbable collagen sponge and beta tricalcium phosphate as carriers. *Biomaterials*. 2005;26:2501-2507, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.015.
259. Tazaki J, Murata M, Akazawa T, Yamamoto M, Ito K, Arisue M, i sur. BMP-2 release and dose-response studies in hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate. *Biomed Mater Eng*. 2009;19:141-146, doi: 10.3233/BME-2009-0573.
260. Tazaki J, Akazawa T, Murata M, Yamamoto M, Tabata Y, Yoshimoto R, i sur. BMP-2 Dose-response and Release Studies in Functionally Graded HAp. *Key Eng Mater*. 2006;309-311:965-968, doi: 10.4028/www.scientific.net/KEM.309-311.965.
261. Reves BT, Jennings JA, Bumgardner JD, Haggard WO. Osteoinductivity Assessment of BMP-2 Loaded Composite Chitosan-Nano-Hydroxyapatite Scaffolds in a Rat Muscle Pouch. *Materials (Basel)*. 2011;4:1360-1374, doi: 10.3390/ma4081360.
262. Park JC, So SS, Jung IH, Yun JH, Choi SH, Cho KS, i sur. Induction of bone formation by Escherichia coli-expressed recombinant human bone morphogenetic protein-2 using block-type macroporous biphasic calcium phosphate in orthotopic and ectopic rat models. *J Periodontal Res*. 2011;46:682-690, doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01390.x.
263. Bhakta G, Rai B, Lim ZX, Hui JH, Stein GS, van Wijnen AJ, i sur. Hyaluronic acid-based hydrogels functionalized with heparin that support controlled release of bioactive BMP-2. *Biomaterials*. 2012;33:6113-6122, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.05.030.

264. Strobel LA, Rath SN, Maier AK, Beier JP, Arkudas A, Greil P, i sur. Induction of bone formation in biphasic calcium phosphate scaffolds by bone morphogenetic protein-2 and primary osteoblasts. *J Tissue Eng Regen Med.* 2014;8:176-185, doi: 10.1002/term.1511.
265. Kisiel M, Martino MM, Ventura M, Hubbell JA, Hilborn J, Ossipov DA. Improving the osteogenic potential of BMP-2 with hyaluronic acid hydrogel modified with integrin-specific fibronectin fragment. *Biomaterials.* 2013;34:704-712, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.015.
266. Ma J, Yang F, Both SK, Prins HJ, Helder MN, Pan J, i sur. Bone forming capacity of cell- and growth factor-based constructs at different ectopic implantation sites. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103:439-450, doi: 10.1002/jbm.a.35192.
267. Mumcuoglu D, Fahmy-Garcia S, Ridwan Y, Nickel J, Farrell E, Kluijtmans SGJM, i sur. Injectable Bmp-2 Delivery System Based on Collagen-Derived Microspheres and Alginate Induced Bone Formation in a Time- and Dose-Dependent Manner. *Eur Cells Mater.* 2018;35:242-254, doi: 10.22203/eCM.v035a17.
268. Lefebvre V, Dvir-Ginzberg M. SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage. *Connect Tissue Res.* 2017;58:2-14, doi: 10.1080/03008207.2016.1183667.
269. Liu Q, Li M, Wang S, Xiao Z, Xiong Y, Wang G. Recent Advances of Osterix Transcription Factor in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:601224, doi: 10.3389/fcell.2020.601224.
270. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:46-62, doi: 10.1016/j.biocel.2007.06.009.
271. Veldhuis-Vlug AG, Rosen CJ. Clinical implications of bone marrow adiposity. *J Intern Med.* 2018;283:121-139, doi: 10.1111/joim.12718.

272. Mizrahi O, Sheyn D, Tawackoli W, Kallai I, Oh A, Su S, i sur. BMP-6 is more efficient in bone formation than BMP-2 when overexpressed in mesenchymal stem cells. *Gene Ther.* 2013;20:370-377, doi: 10.1038/gt.2012.45.
273. Jane JA, Jr., Dunford BA, Kron A, Pittman DD, Sasaki T, Li JZ, i sur. Ectopic osteogenesis using adenoviral bone morphogenetic protein (BMP)-4 and BMP-6 gene transfer. *Mol Ther.* 2002;6:464-470, doi: 10.1006/mthe.2002.0691.
274. Li JZ, Li H, Sasaki T, Holman D, Beres B, Dumont RJ, i sur. Osteogenic potential of five different recombinant human bone morphogenetic protein adenoviral vectors in the rat. *Gene Ther.* 2003;10:1735-1743, doi: 10.1038/sj.gt.3302075.
275. Lavery K, Swain P, Falb D, Alaoui-Ismaili MH. BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem.* 2008;283:20948-20958, doi: 10.1074/jbc.M800850200.
276. Stokovic N. Ectopic bone induction by osteoinductive device composed of recombinant human bone morphogenetic protein 6 (rhBMP6), autologous blood coagulum and biphasic bioceramics. School of Medicine: University of Zagreb; 2022.
277. Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CXF, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007;1:245-260, doi: 10.1002/term.24.
278. El-Ghannam A. Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. *Expert Rev Med Devices.* 2005;2:87-101, doi: 10.1586/17434440.2.1.87.
279. LeGeros RZ, Lin S, Rohanizadeh R, Mijares D, LeGeros JP. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2003;14:201-209, doi: 10.1023/a:1022872421333.

280. Stokovic N, Ivanjko N, Pecin M, Erjavec I, Smajlovic A, Milesevic M, i sur. Long-term posterolateral spinal fusion outcome in rabbits induced by rhBMP6 applied in autologous blood coagulum with synthetic ceramics. *Sci Rep.* 2022. *In press.*

281. Domic-Cule I, Pecina M, Jelic M, Jankolija M, Popek I, Grgurevic L, i sur. Biological aspects of segmental bone defects management. *Int Orthop.* 2015;39:1005-1011, doi: 10.1007/s00264-015-2728-4.

11. BIOGRAFIJA



Natalia Ivanjko rođena je 16. siječnja 1992. u Zagrebu, Hrvatska. U Zagrebu završava Osnovnu školu Gornje Vrapče 2006. godine, a zatim upisuje Gornjogradsku gimnaziju koju završava 2010. s odličnim uspjehom. Iste godine se upisuje na Prehrambeno – biotehnološki fakultet, preddiplomski studij Biotehnologija, a nakon toga upisuje diplomski studij Molekularne biotehnologije. Kroz fakultet aktivno sudjeluje u studentskim udrugama eSTUDENT, ProBioN, ali i kao član studentskog zbora Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta. Diplomski studij završava 2016. godine s odličnim uspjehom, a diplomirala je na temu “Priprava prirodnih eutektičnih otapala i njihova primjena u krioprotekciji stanične linije HEK 293T”.

Nakon završetka studija, zapošljava se na Medicinskom fakultetu u Zagrebu u sklopu Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu – podjedinica regenerativna medicina, a iste godine (2018.) upisuje i doktorski studij Biomedicine i zdravstva (Medicinski fakultet u Zagrebu) pod vodstvom i mentorstvom akademika Slobodana Vukičevića. Područja znanstvenog interesa kroz projekt profiliraju se ka koštanoj biologiji i tkivnom inženjerstvu koje uključuje razvoj novih osteoinduktivnih implantanata u cilju regeneracije kosti, a koji se sastoje iz od sintetičke keramike na bazi kalcij fosfata, koštanog morfogenetskog proteina 6 i autolognog krvnog ugruška. Kroz rad na projektu stječe znanja vezana uz rad na animalnim modelima za regeneraciju kostiju koji uključuju štakore, kuniće i ovce. Osim toga, razvija ekstenzivna znanja vezana za analizu slike koja uključuju mikroCT analizu i statičku histomorfometriju, a uz to i mnoge druge molekularno-biološke metode koje uključuju ELISA-u, Western Blot, protočnu citometriju, ali i rad na staničnim kulturama. U sklopu projekta surađivala je i u proizvodnji rekombinantnog humanog koštanog morfogenetskog proteina 6, koji uključuje “upstream” dio proizvodnog procesa.

Autor odnosno koautor je 7 radova koji su objavljeni u časopisima indeksiranim u Current Contents među kojima vrijedi istaknuti rad “*Autologous bone graft substitute containing rhBMP6 within autologous blood coagulum and synthetic ceramics of different particle size determines the quantity and structural pattern of bone formed in a rat subcutaneous assay*” na kojemu dijeli prvo autorstvo i koji je prikazan na naslovnici prestižnog časopisa Bone. Navedeni radovi su do sada citirani 71 puta (Google Scholar). Dobitnica je stipendije Nacionalnog programa stipendiranja L’Oreal-UNESCO „Za žene u znanosti“ 2022 godine.