

Proteomska analiza bioloških tekućina pacijenata s progresivnom osificirajućom fibrodisplazijom i pacijenata s koštanim prijelomima

Hrkač, Stela

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:105:867071>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-31**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Stela Hrkač

**Proteomska analiza bioloških tekućina pacijenata s progresivnom osificirajućom
fibrodisplazijom i pacijenata s koštanim prijelomima**

Diplomski rad



Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je pri Katedri za anatomiju i kliničku anatomiju i Odjelu za proteomiku Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta u Zagrebu pod vodstvom prof.dr.sc. Lovorke Grgurević i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2020./2021.

Popis kratica korištenih u radu:

ALK2 – kinaza 2 nalik aktivinu (engl. *activine-like kinase 2*)

AVCR1 – receptor tipa 1 za aktivin A (engl. *activin A receptor, type 1*)

BMP – koštani morfogenetski protein (engl. *bone morphogenetic protein*)

COX-2 – ciklooksigenaza 2 (engl. *cyclooxygenase 2*)

ELISA – enzimski imunokemijski analiza (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

EV – ekstracelularne vezikule (engl. *extracellular vesicles*)

FOP – progresivna osificirajuća fibrodisplazija (lat. *fibrodysplasia ossificans progressiva*)

G-CSF – faktor koji stimulira kolonije granulocita (engl. *granulocyte colony-stimulating factor*)

GM-CSF – faktor koji stimulira kolonije granulocita i makrofaga (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

HO – heterotopna osifikacija

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high pressure liquid chromatography*)

IFN γ – interferon gama

IGF-1 – inzulinu sličan faktor rasta 1 (engl. *insulin-like growth factor 1*)

iNOS – inducibilna sintaza dušičnog oksida (engl. *inducible nitric oxide synthase*)

IL – interleukin

LC-MS – tekućinska kromatografija i spektrometrija masa (engl. *liquid chromatography–mass spectrometry*)

MCP – monocitni kemoatraktantni protein (engl. *monocyte chemoattractant protein*)

M-CSF – faktor koji stimulira koloniju makrofaga (engl. *macrophage colony-stimulating factor*)

MIG – monokin induciran (interferonom) gama (engl.

mRNK – glasnička ribonukleinska kiselina

MS – spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*)

OPG – osteoprotegerin

PDGF – trombocitni faktor rasta (engl. *platelet-derived growth factor*)

PLA2 – fosfolipaza A2 tip 2 (engl. *phospholipase A2*)

RANKL – receptor aktivator nuklearnog faktora kapa B ligand (engl. *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*)

RANTES – proupalni kemokin ligand 5 (engl. *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*)

SDS-PAGE – poliakrilamidna gel-elektroforeza s natrijevim dodecil sulfatom (engl. *sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis*)

TGF- β – transformirajući faktor rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*)

TNF- α – faktor tumorske nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*)

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)

Sadržaj:

| | |
|---|----|
| Sažetak..... | |
| Summary..... | |
| 1. Uvod..... | 1 |
| 1.1. Koštani prijelomi i cijeljenje kosti..... | 1 |
| 1.2. Progresivna osificirajuća fibrodisplazija..... | 2 |
| 1.3. Citokini..... | 4 |
| 1.4. Ekstracelularne vezikule | 5 |
| 1.5. Proteomska analiza | 7 |
| 2. Hipoteza..... | 10 |
| 3. Ciljevi rada..... | 11 |
| 4. Ispitanici i metode | 12 |
| 4.1. Ispitanici..... | 12 |
| 4.2. Uzorci krvne plazme | 14 |
| 4.3. Metode | 15 |
| 4.4. Analiza podataka | 19 |
| 5. Rezultati..... | 21 |
| 5.1. Rezultati analize citokina iz krvne plazme..... | 21 |
| 5.2. Rezultati analize proteina iz ekstracelularnih vezikula krvne plazme | 30 |
| 6. Rasprava | 35 |
| 7. Zaključci | 41 |
| 8. Zahvale | 42 |
| 9. Literatura | 43 |
| 10. Životopis..... | 52 |

Sažetak

Proteomska analiza bioloških tekućina pacijenata s progresivnom osificirajućom fibrodisplazijom i pacijenata s koštanim prijelomima

Stela Hrkač

Uvod: Progresivna osificirajuća fibrodisplazija (FOP) rijetka je genetska bolest koju karakteriziraju skeletalne malformacije i epizode egzacerbacije (engl. *flare-ups*) koje uzrokuju progresivnu heterotopnu osifikaciju (HO) mišića i vezivnog tkiva. Koštani prijelom je prekid kontinuiteta strukture kosti, nakon kojeg slijedi složeni proces koštanog cijeljenja u koji su uključeni brojni biološki procesi. Proteomska analiza bioloških tekućina pacijenata s FOP-om i koštanim prijelomima omogućuje njihovu usporedbu i potencijalno bolje razumijevanje bioloških procesa uključenih u HO i fiziološko koštano cijeljenje.

Cilj: Cilj ovog istraživanja bio je analizirati citokine iz krvne plazme i proteine izolirane iz ekstracelularnih vezikula (EV) kako bi se usporedila relativna ekspresija citokina i funkcija proteina iz EV-a koji su uključeni u fiziološko koštano cijeljenje (poslije prijeloma) i patološku HO u FOP-u.

Ispitanici i metode: U istraživanje su uključeni: ispitanici s FOP-om (N=3), s prijelomom duge kosti (N=20) i kontrolna skupina zdravih ispitanika (N=10). Krvni uzorci vađeni su u FOP i kontrolnoj skupini u jednoj vremenskoj točki, dok su ispitanicima s prijelomom vađeni u dvije vremenske točke – prva vremenska točka bila je između 1. i 6., a druga između 7. i 21. dana poslije prijeloma. Analizirana je relativna ekspresija 23 citokina plazme koristeći panel protutijela na ljudske citokine te su rezultati prikazani kao faktor promjene (engl. *fold change*) u usporedbi s kontrolnom skupinom. EV iz plazme izolirane su ultracentrifugiranjem i analizirane tekućinskom kromatografijom-spektrometrijom masa (engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS) te bioinformatičkom analizom.

Rezultati: Uočena je izražena razlika u relativnoj ekspresiji citokina između analiziranih skupina. Rezultati FOP pacijenta s *flare-up*-om pokazuju zamjetan porast relativne ekspresije 21 citokina, dok su relativne ekspresije IL-3 i IL-8 povišene kod svih FOP ispitanika. Citokini MCP-1 i RANTES pokazuju najveći porast u svim ispitivanim skupinama. Analiza EV proteina iz skupine s koštanim prijelomom pokazuje najveći relativni udio proteina uključenih u biološke procese i signalne puteve (BMP, TGF- β , Wnt, VEGF, PDGF, IGF-1 i citokinima posredovani putevi) koji su važni za koštano remodeliranje i cijeljenje, u usporedbi s ostalim skupinama.

Zaključak: Nađene su izražene razlike u ekspresiji citokina između FOP pacijenata (s *flare-up*-om i bez) i pacijenata s koštanim prijelomom, kao i funkcionalne razlike EV proteina između ispitivanih skupina. Proteinski sadržaj EV izoliranih od ispitanika s FOP-om ne pokazuje odstupanja od ostalih skupina koja bi upućivala na njihovu važnost u patofiziologiji FOP-a. Istraživanja poput ovog omogućuju bolje razumijevanje patofiziologije FOP-a i koštanog remodeliranja koje je ključno za razvoj novih terapijskih opcija za ovu izrazito tešku bolest.

Ključne riječi: ekstracelularne vezikule, citokini, FOP, cijeljenje koštanog prijeloma

Summary

Proteomic analysis of biological fluids of fibrodysplasia ossificans progressiva patients and patients with bone fractures

Stela Hrkač

Introduction: Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) is a rare genetic disease which is characterized by skeletal malformations and episodic disease flare-ups which cause progressive heterotopic ossification (HO) of skeletal muscles and connective tissue. A bone fracture is a break in the continuity of bone structure, which is followed by the complex process of bone healing, which involves numerous biological processes. Proteomic analysis of biological fluids from patients with FOP and bone fractures enables their comparison and a possible better understanding of biological processes involved in HO and physiological bone healing.

Aim: The aim of this study was to analyse plasma derived cytokines and proteins isolated from extracellular vesicles (EVs) in order to compare cytokine expression and functions of EV proteins which are involved in physiological bone healing (after fracture) and pathologic HO in FOP.

Participants and methods: The study included participants with FOP (N=3), patients with long bone fractures (N=20) and a healthy control group (N=10). Plasma samples used were obtained from FOP patients and healthy participants at a single timepoint and at two timepoints in participants with bone fractures – the first timepoint was from day 1 to day 6 and the second was from day 7 to day 21 after fracture occurrence. Relative expression of 23 plasma cytokines was analysed using a human cytokine antibody array and results were expressed as fold changes compared to the control group. Plasma EVs were isolated by ultracentrifugation and their protein content was analysed using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and bioinformatics.

Results: There was a marked difference in relative cytokine expression between the studied groups. The FOP patient with a flare-up showed marked increase in 21 cytokines, whereas a change of IL-3 and IL-8 was observed in all FOP patients. Cytokines MCP-1 and RANTES show the biggest fold change in all studied groups. EV proteins from the fracture group showed the biggest relative ratio of proteins involved in biological processes and signaling pathways (BMP, TGF- β , Wnt, VEGF, PDGF, IGF-1 and cytokine mediated pathways) important for bone remodeling and healing compared to the other groups.

Conclusion: There are marked differences in cytokine expression between FOP patients (with and without flare-ups) and patients with bone fractures, as well as functional differences of EV proteins between the fracture and control group. The EV protein content of FOP patients did not show differences from the other groups which would indicate their importance in FOP pathophysiology. Studies like this grant further insight into FOP pathophysiology and bone remodeling which are needed to develop treatment options for this debilitating disease.

Key-words: extracellular vesicles, cytokines, FOP, fracture healing

1. Uvod

Progresivna osificirajuća fibrodizplazija (lat. *fibrodysplasia ossificans progressiva*, FOP) predstavlja izuzetno tešku i rijetku bolest za koju ne postoji specifična i učinkovita terapija (1). Metode proteomskih istraživanja omogućuju otkrivanje i usporedbu specifičnih proteinskih profila bolesti, uključujući i istraživanje citokina i ekstracelularnih vezikula (engl. *extracellular vesicles*, EVs) koji predstavljaju važne komponente međustanične signalizacije i imaju značajne uloge u koštanom metabolizmu i procesu koštanog cijeljenja (2–6). U literaturi se nalaze podaci o potencijalnom značaju citokina u nastanku i progresiji heterotopnih osifikacija (HO) u bolesti FOP, ali se ne nalazi niti jedno istraživanje koje obuhvaća proteomsku analizu i usporedbu krvne plazme pacijenata s koštanim prijelomom (fiziološki proces okoštavanja) s plazmom pacijenata s FOP-om (patološko okoštavanje) (7). Da bi se učinio korak naprijed k otkrivanju potencijalnih terapijskih pristupa potrebna su daljnja istraživanja kako bi se u potpunosti razjasnili složeni patofiziološki mehanizmi FOP-a te njegove sličnosti i razlike s fiziološkim procesom okoštavanja.

1.1. Koštani prijelomi i cijeljenje kosti

Koštani prijelom je prekid strukturnog kontinuiteta kosti s određenim stupnjem ozljede pripadajućih mekotkivnih struktura. Nakon prijeloma slijedi proces primarnog ili sekundarnog koštanog cijeljenja. Sekundarno koštano cijeljenje je proces koji se može podijeliti na četiri djelomično preklapajuće faze: a) faza hematoma (faza upale), b) formiranje fibrokartilaginoznog (mekog) kalusa, c) stvaranje koštanog (tvrdog) kalusa i d) koštana pregradnja (engl. *bone remodeling*) (8–11).

Hematom na mjestu prijeloma nastaje ozljedom krvnih žila na mjestu ozljede koje opskrbljuju kost i periost, nakon čega se hematom zgrušava i stvara privremeni okvir za cijeljenje (12). Uz stvaranje hematoma, zbog ozljede dolazi i do aktivacije urođene imunosti i izlučivanja proupanih citokina kao što je TNF- α i interleukini (IL-1, IL-6, IL-11, IL-23) te koštanih morfogenetskih proteina (engl. *bone morphogenetic proteins*, BMPs) (13,14). Izlučeni citokini na mjesto ozljede privlače makrofage, monocite i limfocite koji sudjeluju u koštanom cijeljenju tako što uklanjaju nekrotično tkivo i luče faktore rasta kao što su vakularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) koji stimuliraju daljnji proces cijeljenja (14). Faza hematoma traje prvih nekoliko dana nakon prijeloma. Faza formiranja fibrokartilaginoznog kalusa nastavlja se na fazu hematoma tako što izlučeni VEGF dovodi do angiogeneze te unutar krvnog ugruška dolazi do stvaranja granulacijskog tkiva bogatog

fibrinom (11). Izlučene molekule BMP-a uzrokuju diferencijaciju mezenhimalnih matičnih stanica u stanice fibroblasta, hondroblasta i osteoblasta, što uzrokuje stvaranje hrskavičnog tkiva (hondrogenezu) i posljedično nastanak fibrokartilaginoznog tkiva bogatog hijalinom (15). Istovremeno osteoprogenitorske stanice u području periosta stvaraju sloj primarnog koštanog tkiva. Fibrokartilaginozni kalus se postupno počinje resorbirati i kalcificirati, odnosno počinje enhondralno okoštavati. Unutar novonastalog tkiva dolazi do daljnje diferencijacije stanica u hondroblaste, hondroklaste, osteoblaste i osteoklaste te dolazi do daljnjeg stvaranja primarnog koštanog tkiva (16). U tom razdoblju izraženo je lučenje faktora rasta kao što su BMP i TGF- β molekule (17). Faza koštane pregradnje počinje otprilike tri do četiri tjedna nakon prijeloma i time se djelomično preklapa s prethodnom fazom (10). Koštana pregradnja (engl. *bone remodeling*) podrazumijeva kontinuiranu migraciju osteoblasta i osteoklasta na mjesto ozljede i stvaranja ravnoteže između koštane izgradnje, za koju su zaduženi osteoblasti i koštane razgradnje koju vrše osteoklasti (11). Tijekom ove faze dolazi do pretvaranja središnjeg dijela kalusa u kompaktnu kost, dok rubne dijelove kalusa zamjenjuje lamelarna kost (16). Resorpcijom mineraliziranog hrskavičnog tkiva, kao i stvaranjem primarnog koštanog tkiva uvelike upravljaju faktor koji stimulira koloniju makrofaga (engl. *macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF), receptor aktivator nuklearnog faktora kapa B ligand (RANKL), TNF- α i osteoprotegerin (OPG). Proces koštane pregradnje traje mjesecima (ili čak godinama) i u konačnici završava ponovnim uspostavljanjem normalne koštane strukture (16).

1.2. Progresivna osificirajuća fibrodisplazija

Progresivna osificirajuća fibrodisplazija (lat. *fibrodysplasia ossificans progressiva*, FOP), iznimno je rijetka i teška genetska bolest obilježena progresivnim heterotopnim okoštavanjem (HO). Prvi put je opisana prije više od 250 godina i od tada predstavlja jedan od najvećih misterija medicine. Izuzetno je rijetka i pogađa populaciju s učestalošću od 1: 2 000 000. Glavna klinička obilježja ove bolesti su progresivno heterotopno okoštavanje vezivnog tkiva i skeletalne malformacije (18). Pacijenti s FOP-om imaju karakteristične skeletalne malformacije koje mogu biti uočljive već od rođenja i ranog djetinjstva. Najlakše uočljiva malformacija je deformacija nožnog palca koji je atipično kratak i ima deformaciju u obliku haluksa valgusa (lat. *hallux valgus*). Također se mogu naći uvećani dorzalni dijelovi cervikalnih kralježaka, kratak palac na ruci zbog male prve metatarzalne kosti, kratak i širok vrat bedrene kosti i proksimalni osteohondromi goljenične kosti (1). Tijek bolesti karakteriziran je vremenski odijeljenim periodima aktivacije i egzacerbacije bolesti (engl. *flare-ups*) koji se javljaju već od prvog desetljeća života. Tijekom perioda aktivacije bolesti

dolazi do nastanka bolnih otekline mekog tkiva koje pokazuju klasične znakove upale i događa se transformacija vezivnih tkiva (kao što su aponeuroze, fascije, ligamenti, tetive, skeletni mišići) u kost (18,19). Heterotopična kost u FOP-u nastaje mehanizmom enhondralnog okoštavanja te dovodi do progresivne nepokretnosti i invaliditeta pacijenata. Histopatološki, rezultat HO-a je zrela lamelarna kost koja nastaje infiltracijom vezivnog tkiva T i B limfocitima, mastocitima i mononuklearnim stanicama, što su obilježja prve, upalne faze, nakon koje slijedi fibroproliferativna reakcija s angiogenezom i neovaskularizacijom. Zatim dolazi do avaskularne kondenzacije u hrskavicu te ponovne faze revaskularizacije i osteogeneze (20,21).

Mala tkivna trauma, kao što su intramuskularne injekcije, zamor mišića, blagi udarci, padovi i virusne bolesti mogu pokrenuti aktivaciju bolesti pretvaranje zahvaćenog tkiva u kost (18,22,23). Nepokretnost pacijenata je progresivna i kumulativna te je većina pacijenata s FOP već u trećem desetljeću života primorana koristiti invalidska kolica te im je potrebna doživotna pomoć za svakodnevne aktivnosti (18). Srednja dob preživljenja je 45 godina, a smrt često nastupa kao posljedica torakalne insuficijence nastale zbog okoštavanja interkostalnih i paravertebralnih mišića, ankiloze kostovertebralnih zglobova te progresivnog deformiteta kralježnice (24). Unatoč brojnim istraživanjima, još uvijek ne postoji specifična i definitivna terapija za ovu tešku bolest (1).

Veliki napredak u istraživanju i razumijevanju ove teške bolesti bilo je otkriće ključne genske mutacije. Dokazano je da je u gotovo svih pacijenata s klasičnom kliničkom slikom FOP-a prisutna aktivirajuća mutacija gena za receptor tipa I za aktivin A (ACVR1), poznat i kao kinaza 2 nalik aktivinu (ALK2). ACVR1 je receptor za koštani morfogenetski protein BMP tipa 1, koji pripada superobitelji transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF- β). BMP molekule induciraju HO u skeletnim mišićima *in vivo* i iniciraju diferencijaciju mioblasta u osteoblaste, a navedena mutacija izaziva pojačan učinak receptora što izaziva pojačanu staničnu signalnu kaskadu BMP-a koja je važna za okoštavanje tkiva (1,25). U patofiziologiji HO-a izrazito je važna upala, odnosno kompleksna uloga imunološkog sustava. Istraživanja su pokazala da u nastanku i progresiji HO-a važnu ulogu imaju prirođena i stečena imunost te upalni citokini (7). Brojni citokini su implicirani kao potencijalno važni za patogenezu HO-a, primjerice faktor tumorske nekroze alfa (TNF- α), monocitni kemoatratantni protein 1 (MCP-1) te interleukini 1 beta, 3, 5, 6, 7 i 8 (IL-1 β , IL-3, IL-5 i IL-6, IL-7, IL-8) (25–27). Malobrojna su istraživanja proučavala razine citokina specifične za FOP te rezultati ukazuju na to da su u pacijenata s FOP-om tijekom aktivacije bolesti (engl. *flare-up*) povišene razine određenih citokina koji bi mogli imati ključne uloge u njihovoj inicijaciji i progresiji (28–30).

1.3. Citokini

Citokini su raznolika kategorija malih proteina (~6–32 kDa) koja uključuje interleukine, limfokine, kemokine te čimbenike rasta, angiogeneze i fibrogeneze. Temeljna zadaća im je ostvarivanje kemijskih komunikacija među stanicama (8). Prema strukturnim i funkcijskim svojstvima te njihovim receptorima, citokini se razvrstavaju u osam skupina: hematopoetini, interferoni, skupina faktora tumorske nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- α), interleukin 1 (IL-1) skupina, α (CXC)-kemokinska skupina, β (CC)-kemokinska skupina, skupina faktora rasta podrijetlom iz trombocita (engl. *platelet-derived growth factor*, PDGF) te skupina transformirajućeg faktora rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*, TGF- β). Uz načelne razlike, pokazuju sličnost sustavu endokrinih peptidnih hormona te djeluju preko pripadnih membranskih receptora i tako ostvaruju lokalne i dalekometne učinke (8). Citokinsko lučenje nije konstitutivno, već ga pokreću brojni podražaji i nokse, kao što su hipoksija i nekroza tkiva, mehanička trauma, imunosni i autoinflamatorni procesi, tumorske bolesti, ijtrogeni uzroci i drugi (8). Gotovo sve stanice s jezgrom imaju sposobnost njihove sinteze i izlučivanja, međutim dominantno ih proizvode pomagački limfociti T i makrofagi (31). Citokini mogu djelovati na stanice koje su ih izlučile (autokrino djelovanje), na stanice u blizini (parakrino djelovanje) i na udaljene stanice (endokrino djelovanje) te mogu djelovati stimulacijski i inhibicijski (31). Uloge citokina su brojne: regulatori su regeneracijskih, reparacijskih i cjelidbenih procesa, odgovora na infekciju, imunih odgovora i upale (8).

Njihov doprinos etiopatogenezi raznih stanja i bolesti karakteriziran je svojstavima citokinskog odgovora: pleotropnost (pojedini citokin ima više vrsta ciljnih stanica i učinaka), redundantnost (više citokina ima istu funkciju), visoka potentnost te kaskadno, mrežno i križno djelovanje (8). Po funkciji možemo ih podijeliti i na skupinu citokina koji potiču upalu - proupalni (proinflamatorni) te protuupalni (antiinflamatorni) citokini koji smanjuju upalni odgovor i promoviraju cijeljenje (32). S obzirom na moguću dihotomnu ulogu nekih citokina, podjela na pro- i protuupalne temelji se na tome aktiviraju li, ili suprimiraju gene važne za sintezu proupalnih molekula kao što su fosfolipaza A2 tip 2 (PLA2), ciklooksigenaza 2 (COX-2) i inducibilna sintetaza dušičnog oksida (iNOS). Među najvažnije proupalne citokine spadaju interleukini 1, 6, 8, 12, 18 (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 i IL-18) i TNF, a u protuupalne spadaju interleukini 4, 10, 11, 13 (IL-4, IL-10, IL-11, IL-13), TGF β te antagonist receptora za IL-1 (32–34). Citokini su važni u patogenezi mnogih bolesti te više od 130 citokina ima stanovitu etiopatogenetsku ulogu u medicini (8). Posebno su važni u mehanizmima upalnog oštećenja

tkiva u bolestima kao što su reumatoidni artritis, multipla skleroza, upalna bolest crijeva i psorijaza (34).

1.4. Ekstracelularne vezikule

Vanstanični prostor višestaničnih organizama osim raznih metabolita, iona, proteina i polisaharida, sadrži i mnoštvo vezikula omeđenih membranom, koje se nazivaju ekstracelularne (ili vanstanične) vezikule (engl. *extracellular vesicles*, EV/EVs) (35). Sekretija EV-a prisutna je u svim oblicima organizama, od prokariota do eukariota, te u brojnim vrstama tumorskih i ne-tumorskih stanica. Nađeni su u više bioloških tekućina kao što su krvna plazma, slina, amnionska i cerebrospinalna tekućina (36). U skupinu EV-a spadaju egzosomi, mikrovezikule (engl. *microvesicles*) i apoptotska tijela (35). Vrste EV-a se razlikuju po veličini i mehanizmu nastanka, pri čemu su egzosomi najmanji i imaju promjer 50-100 nm, mikrovezikule su promjera 100-1000 nm, a najveća su apoptotska tijela promjera 1000-5000 nm, iako u literaturi postoje različite definicije točnih raspona veličine po skupinama (37). Ekstracelularne vezikule mogu nastati različitim mehanizmima koji su specifični za pojedinu skupinu EV-a: egzosomi nastaju egzocitozom multivezikularnih tjelešaca, mikrovezikule pupanjem stanične membrane, a apoptotska tijela nastaju otpuštanjem *bleb*-ova iz stanica tijekom apoptoze (35).

EV dugo su smatrane intertnim staničnim *debris*-om (otpadom), međutim istraživanja su pokazala da EV predstavljaju važan način međustanične komunikacije. Membranozna struktura EV-a omogućuje im transport molekula vezanih za njihovu membranu i raznih biološki aktivnih molekula unutar njihovog citosola, kao što su membranski receptori, proteini, mRNK, mikro RNK te organele (38). EV među stanicama mogu transportirati komponente specifičnih staničnih puteva, uključujući i proteinaze, citokine te faktore rasta. Glavni mehanizmi interakcije EV-a sa stanicama uključuju površinske molekule (koje ulaze u interakciju s ciljnim stanicama i aktiviraju ih putem receptora), fuziju EV s ciljnim stanicama te otpuštanje sadržaja EV-a (engl. *cargo releasing*) (6). Molekularni transport putem EV-a može utjecati na koordinaciju staničnih reakcija, kontrolu genske ekspresije i proteomskog profila ciljne stanice, promjenu maturacije i diferencijacije stanica te aktivaciju molekularnih puteva (6).

Zbog svog raznolikog sadržaja i uloge u međustaničnoj komunikaciji, EV su postali predmetom brojnih biomedicinskih istraživanja, uključujući i proteomska (39). Analiza EV-a predstavlja izazov zbog nedovoljno razvijenih metoda njihove međusobne diferencijacije na egzosome, mikrovezikule i apoptotska tijela pri izolaciji (4). Za egzosome i mikrovezikule

standardnom metodom izolacije smatra se ultracentrifugiranje, dok za apoptotska tijela još nema univerzalne metode izolacije (35). Predmetom proteomskih istraživanja EV-a je prvenstveno njihov proteinski sadržaj, koji se iz vezikula može ekstrahirati na više načina, kao što su liza EV puferima ili soniciranje. Izolirani se proteini zatim liziraju i pročišćuju te analiziraju spektrometrijom masa (36,40). EV odražavaju fiziološko stanje stanice ili organizma njihovog podrijetla što ih čini veoma zanimljivim za biomedicinska istraživanja, a MS analiza proteinskog sadržaja EV-a mogla bi dovesti do otkrića biomarkera bolesti (36). Istraživanja su pokazala da EV pružaju perspektivu u istraživanjima malignih tumora, neuroloških, kardiometaboličkih, infektivnih, autoimunih i drugih bolesti (41–43). EV su se također pokazali kao izrazito važni za koštani metabolizam i cijeljenje prijeloma jer se luče iz stanica uključenih u koštano cijeljenje, kao što su osteoblasti, osteoklasti, endotelne stanice i mezenhimalne matične stanice, koje međusobno komuniciraju, promoviraju i induciraju procese ključne za koštano cijeljenje (6,44).

1.5. Proteomska analiza

1.5.1. Proteomika

Proteomika je grana biomedicinske znanosti koja se definira kao sustavno proučavanje strukture i uloge proteoma, uključujući i varijacije u zdravih i bolesnih. Proteom je skup svih proteina u organizmu, a cilj proteomike jest odrediti cjelokupni komplement proteina koje proizvodi stanica, tkivo ili organizam pri različitim uvjetima (2,45). U pojedinim se staničnim vrstama tijekom rasta i diferencijacije i kao odaziv na vanjske poticaje sintetiziraju različiti proteini, a budući da ljudsko tijelo sadržava na tisuće vrsta stanica, od kojih svaka sadržava na tisuće proteina, proteom pruža izvanredne mogućnosti za biomedicinska istraživanja (45). Proteomika nadopunjuje ostale "omike" (engl. *-omics*), kao što su genomika i transkriptomika, kako bi se proširilo znanje o identifikaciji, strukturi i funkciji određenih proteina. Proteomska istraživanja nalaze široku ulogu u biomedicini, tako što se mogu koristiti za detekciju dijagnostičkih markera, kandidata za proizvodnju cjepiva, razumijevanje mehanizama patogenosti i interpretaciju funkcionalnih proteinskih signalnih puteva u različitim bolestima (2). S obzirom na to da su proteini efektori bioloških funkcija i da njihove razine ne ovise samo o odgovarajućim razinama glasničke RNK (mRNK), već i o translaciji, proteomika se može smatrati najrelevantnijim skupom podataka za karakterizaciju biološkog sustava (46).

1.5.2. Metode proteomske analize

Da bi se mogla precizno ispitivati fizikalna i funkcionalna svojstva proteina, potrebni su proteini i peptidi visoke čistoće. Izolacija određenog proteina veliki je izazov i može biti potrebno više uzastopnih tehnika pročišćavanja (purifikacije) (45). Konvencionalne tehnike purifikacije proteina se temelje na kromatografiji, kao što su kromatografija na ionskom izmjenjivaču, afinitetna kromatografija, kromatografija isključenjem prema veličini čestica te reverzno-fazna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) (2,45).

Za analizu manjeg broja pojedinačnih proteina, mogu se koristiti konvencionalne metode kao što su enzimski imunokemijska analiza (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA) ili *Western blot* (47,48). Za razdvajanje složenih proteinskih uzoraka mogu se koristiti tehnike elektroforeze, a najčešće korištena je metoda poliakrilamidne gel-elektroforeze s natrijevim dodecil sulfatom (engl. *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) (45,49). U složenije metode proteomske analize se također ubrajaju upotreba proteinskih *microarray*-a, Edmanovog sekvencioniranja i

spektrometrije masa (engl. *mass spectrometry*, MS) (50–52). Razvojem sve naprednijih tehnologija s mogućnošću kompleksne analize velikog broja proteina, stvara se velika količina proteomskih informacija, zbog čega bioinformatika u proteomici ima izrazitu važnost. Stvorene su bioinformatičke baze podataka (kao što je *UniProt*) koje omogućuju pohranu velike količine podataka i olakšavaju analizu istih (53). Različiti bioinformatički programi koriste se za analizu proteinskih motiva i domena, predviđanje 3D strukture, analize podataka dobivene MS-om i slično (2).

U proteomskim istraživanjima postoji više pristupa analizi strukture proteina, od kojih je možda najrašireniji “*bottom-up*” pristup koji podrazumijeva karakterizaciju proteina analizom peptida dobivenih iz proteina putem proteolize. Kada se “*bottom-up*” pristup koristi na mješavini proteina, taj pristup se naziva “*shotgun*” proteomika, jer postupak nalikuje na pucanj iz sačmarice (engl. *shotgun*), pri kojem nastaju brojni manji fragmenti iz jednog većeg (54,55). *Shotgun* proteomika omogućuje indirektnu analizu proteina putem peptida koji su nastali proteolitičkom digestijom proteina i podvrgnuti analizi tekućinskom kromatografijom i spektrometrijom masa (engl. *liquid chromatography–mass spectrometry*, LC-MS) (56). Standardni “*bottom-up*” eksperiment uključuje: ekstrakciju proteina iz uzorka, frakcioniranje kako bi se uklonili kontaminanti i proteini koji nisu od interesa, digestija proteina, separacija mješavine peptida radi homogenizacije te analiza pomoću MS-a (57). Identifikacija proteina je omogućena pridruživanjem peptidnih sekvenci pripadajućim proteinima pomoću bioinformatičke analize. Osim “*bottom-up*” pristupa, postoje i “*top-down*” metoda koja analizira intaktne proteine te hibridna “*middle-down*” strategija koja analizira veće peptide nastale ograničenom proteinskom digestijom. U usporedbi s *shotgun* pristupom, koji se može univerzalno primijeniti za analizu proteina, “*top-down*” metoda ima određena ograničenja, iako ima prednost u analizi posttranslacijskih modifikacija i proteinskih izoformi (54).

1.5.3. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa jedna je od središnjih metoda analize u proteomici i predstavlja osnovnu metodu za određivanje slijeda u proteinima i peptidima. Omogućuje razlikovanje molekula na temelju njihove mase i može odrediti male fizikalne promjene u proteinima koje su nastale tijekom životnog ciklusa stanice ili organizma. Osnovni mehanizam funkcioniranja MS-a uključuje prevođenje uzorka u plinsku fazu, i to u vakuumu, u uvjetima koji pogoduju protoniranju te se nabijaju pozitivnim nabojem. Električno polje ubrzava katione kroz magnetno polje koje ih otklanja do sudara s detektorom, a magnetne sile koje su potrebne za otklon pojedinog iona bilježe se. Za ione istog naboja ta je sila razmjerna njihovoj masi; što je

veća masa iona, potrebno je jače magnetno polje za usmjeravanje prema detektoru (45).

U posljednjem desetljeću došlo je do ubrzanog unaprijeđenja rezolucije, točnosti, senzitivnosti i mogućnosti snimanja spektrometara masa u analizi proteina (54). Udruživanje instrumenata masenih spektrometara s visokoučinkovitim metodama kromatografije i elektroforeze omogućilo je brzu kvalitativnu i kvantitativnu analizu velikog broja proteina iz relativno malih uzoraka biološkog materijala (58). U “*bottom-up*” proteomici najčešće je korištena kombinirana metoda tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (LC-MS), a posebno je učinkovita tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) (59).

2. Hipoteza

Postoji izražena razlika u profilu citokina i proteina iz ekstracelularnih vezikula krvne plazme između skupina pacijenata s prijelomom dugih kostiju, pacijenata s progresivnom osificirajućom fibrodisplazijom te kontrolne skupine zdravih ispitanika.

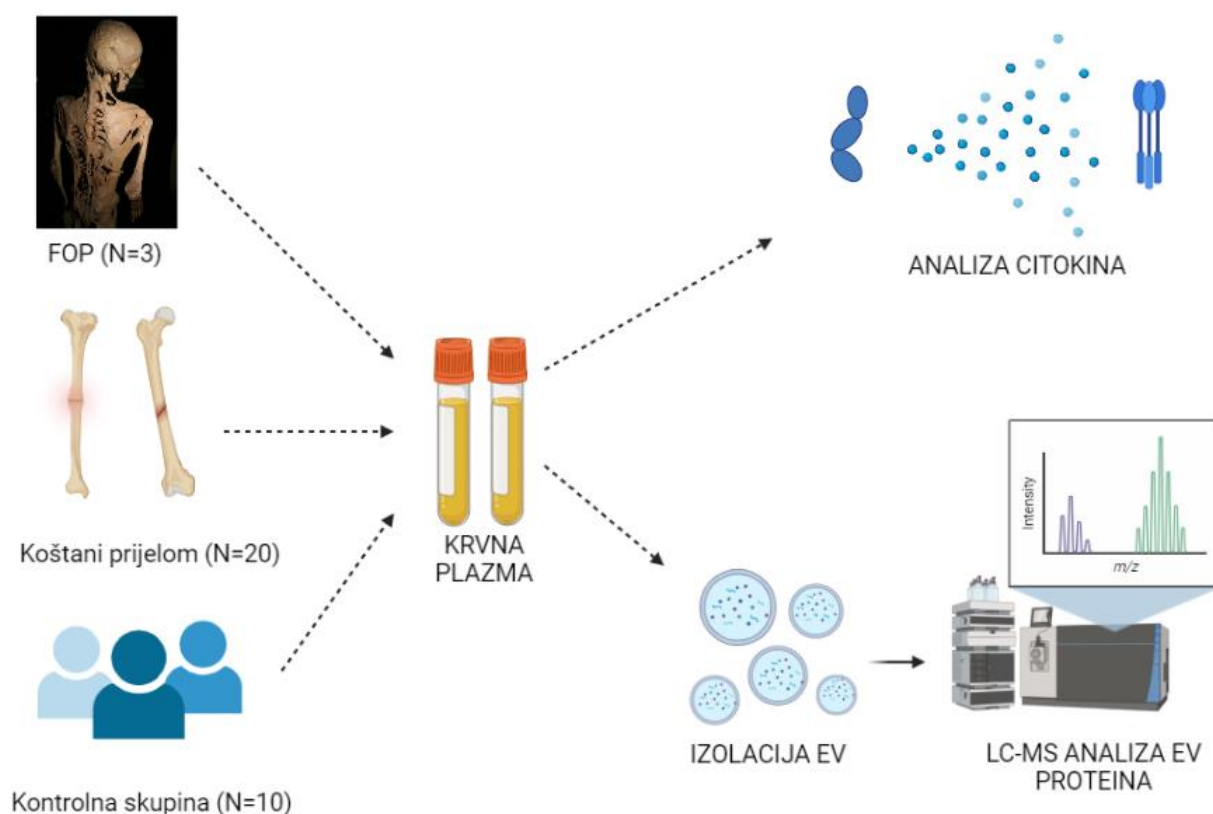
3. Ciljevi rada

1. Analizirati i usporediti razine citokina plazme između skupina pacijenata s prijelomom duge kosti, pacijenata s FOP-om i kontrolne skupine zdravih ispitanika.
2. Izolirati proteine iz ekstracelularnih vezikula plazme pacijenata s prijelomima duge kosti, pacijenata s FOP-om i kontrolne skupine zdravih ispitanika.
3. Analizirati i usporediti karakteristike i funkcije proteina iz ekstracelularnih vezikula skupine pacijenata s prijelomom duge kosti, pacijenata s FOP-om i kontrolne skupine zdravih ispitanika.

4. Ispitanici i metode

4.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno više skupina ispitanika: pacijenti s FOP-om (N=3), pacijenti s prijelomom duge kosti (N=20) te skupina zdravih ispitanika (N=10) koji su služili kao kontrolna skupina (Slika 1). Eksperimentalni dio istraživanja proveden je na Odjelu za proteomiku pri Centru za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Uzimanje uzoraka i skrb o pacijentima provedena je u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice pri Klinici za traumatologiju i Klinici za reumatologiju, fizikalnu medicinu i rehabilitaciju. Istraživanje je odobrilo kliničko Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice (Ur. broj: 251-29-11-20-01-5). Svi ispitanici upoznati su s istraživanjem te su prije uzimanja uzoraka potpisali obrazac za informirani pristanak pacijenta o sudjelovanju u istraživanju.



Slika 1. Grafički prikaz skupina ispitanika te postupaka i metoda analize.

4.1.1. Ispitanici s prijelomom duge kosti

U istraživanje je uključeno ukupno 20 uzastopnih pacijenata s prijelomima dugih kostiju koji su liječeni na Klinici za traumatologiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u razdoblju od 1. siječnja do 31. ožujka 2021. godine. Probir pacijenata izvršen je prateći uključne i isključne kriterije.

Uključni kriteriji:

1. Potpisan informirani pristanak
2. Dob između 18 i 65 godina
3. Klinička i radiološka verifikacija prijeloma
4. Prijelom nadlaktične, palčane, lakatne, bedrene, goljenične ili lisne kosti

Isključni kriteriji:

1. Teška upalna stanja ili maligna bolest
2. Aktivne infekcije
3. Imunokompromitirani pacijenti, npr. pacijenti za koje se zna da su serološki pozitivni za virus humane imunodeficijencije (HIV)
4. Pacijenti koji boluju od osteoporoze
5. Pacijenti stariji od 65 godina

U ispitavanje su uključeni ispitanici s prijelomima nadlaktične, palčane, lakatne, bedrene, goljenične ili lisne kosti, koje zbog svoje pripadnosti u skupinu dugih kostiju omogućavaju razlikovanje metafiznih i dijafiznih prijeloma, te zato što približno odgovaraju modelima koštanih prijeloma korištenih u velikom broju postojećih istraživanja (60). Pacijenti su podijeljeni u dvije dodatne skupine s obzirom na koštanu lokaciju prijeloma: skupina pacijenata s prijelomom dijafize, u kojoj je bilo 12 ispitanika, te skupinu pacijenata s prijelomom metafize duge kosti u kojoj je bilo 8 ispitanika. Svakom pacijentu uzeta su ukupno dva uzorka koji su odgovarali dvjema vremenskim točkama: prva vremenska točka određena je od 1. (dan nastanka prijeloma) do 6. dana poslije nastanka prijeloma, a druga od 7. do 21. dana nakon nastanka prijeloma. Sveukupno, uzorci su analizirani u 4 odvojene skupine: a) prijelomi metafize u prvoj vremenskoj točki, b) prijelomi dijafize u prvoj vremenskoj točki, c) prijelomi metafize u drugoj vremenskoj točki te d) prijelomi dijafize u drugoj vremenskoj točki. Ispitanici su dobi od 25 do 63 godina, 16 pacijenata je liječeno kirurškim (80%), a 4

konzervativnim metodama liječenja (20%). Među ispitanicima bilo je 12 muškaraca (60%) i 8 žena (40%).

4.1.2. Ispitanici s FOP-om

U istraživanje je uključeno troje pacijenata koji boluju od progresivne osificirajuće fibrodisplazije koji se liječe pri Klinici za reumatologiju, fizikalnu medicinu i rehabilitaciju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice. Dvoje pacijenata dalo je po jedan uzorak za vrijeme remisije bolesti, odnosno u razdoblju bez egzacerbacije, dok je jedan pacijent dao uzorak krvi tijekom egzacerbacije bolesti (*flare-up*). Uzroci su uzeti pri dolascima pacijenata na redovne kontrolne i dijagnostičke preglede ili prilikom liječenja na Klinici.

Uključni kriteriji:

1. Potpisan informirani pristanak
2. Klinički verificirana bolest

Isključni kriteriji:

1. Maligne ili druge životnougrožavajuće bolesti
2. Imunokompromitirani pacijenti, npr. pacijenti za koje se zna da su serološki pozitivni za virus humane imunodeficijencije (HIV)

4.1.3. Kontrolna skupina zdravih ispitanika

Kao kontrolna skupina zdravih ispitanika u istraživanje je uključeno 10 zdravih dobrovoljaca. U kontrolnoj skupini svi ispitanici su bili ženskog spola i dobi od 22 do 67 godina. Isključni kriteriji su bili aktivne infekcije, maligne ili druge životno-ugrožavajuće bolesti te imunokompromitiranost.

4.2. Uzorci krvne plazme

Pacijentima su vađeni uzorci krvi postupkom venepunkcije te je pri svakom vađenju uzeto po 10mL krvi. Krv je inicijalno pohranjivana u vakuetama volumena 5mL koje sadrže natrijev citrat u koncentraciji od 3.8% kako bi se postigao omjer krvi i antikoagulansa 1:9. Uzorci krvi pohranjeni su na temperaturi od +4°C do postupka izolacije plazme koji je rađen maksimalno 24 sata nakon uzimanja uzorka krvi, ili prije. Iz uzoraka krvi izolirana je plazma postupkom centrifugiranja silom 1.5 rcf (engl. *relative centrifugal force*) u trajanju od 15 minuta. Dobiveni uzorci plazme alikvotirani su u volumenima od 1mL i pohranjeni na temperaturi od -80°C do daljnje analize. Pri uzimanju uzoraka od pacijenata koji boluju od

FOP-a, posebna je pažnja pridavana maksimalnim mjerama opreza te su uzorci uzimani preko nježnog *baby sistema* kako ne bi došlo do oštećenja te potencijalne naknadne osifikacije.

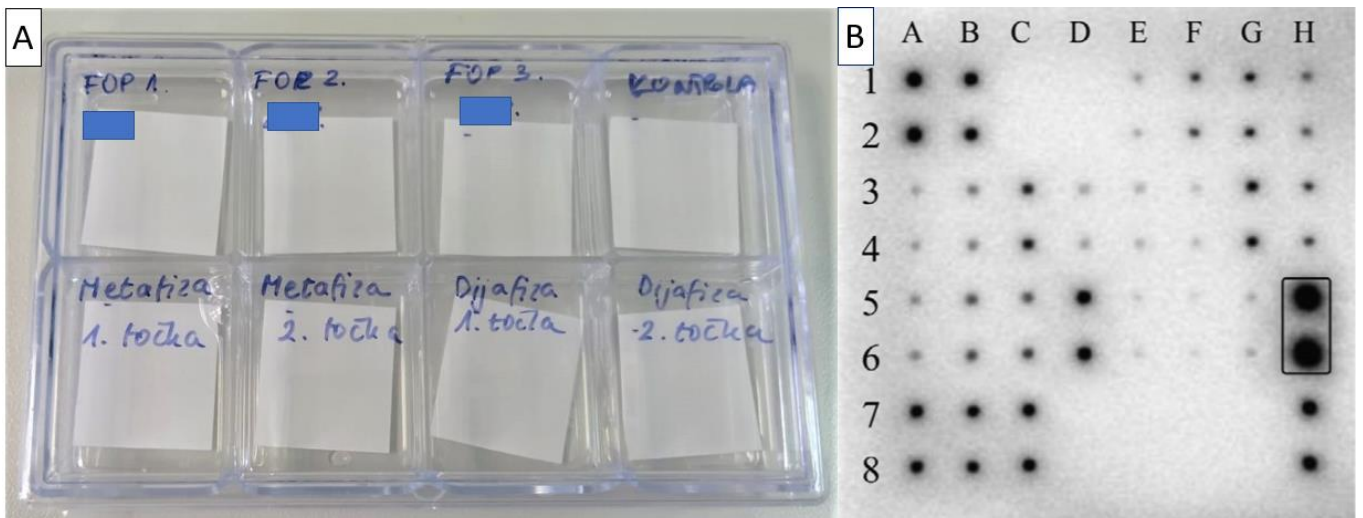
4.3. Metode

Uzorci plazme dobiveni od različitih skupina pacijenata analizirani su pomoću više proteomskih metoda kako bi se analizirala razina citokina i uspješno izolirali ekstracelularni vezikuli te analizirali proteini koji se u njima nalaze. Grafički prikazi koji opisuju ispitanike i metode napravljeni su pomoću programa *BioRender* (61).

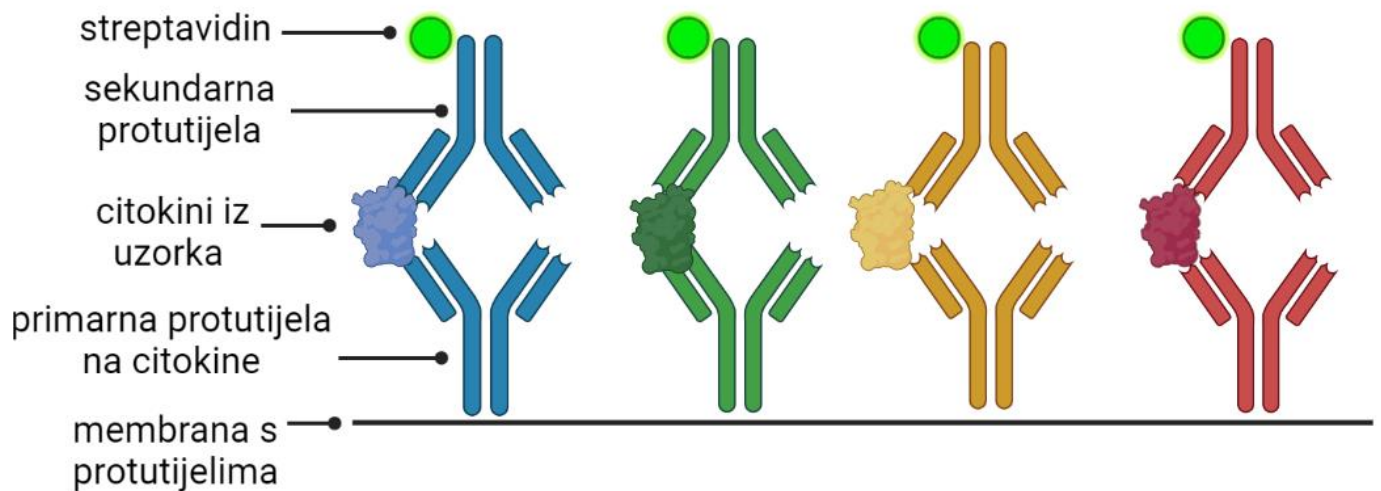
4.3.1. Analiza citokina iz krvne plazme

Analiza je provedena na 8 različitih uzoraka (Slika 2), odnosno na pojedinačnim uzorcima ili skupinama uzoraka sjedinjenih u uniformni skupni volumen uzorka (engl. *sample pool*). Pacijenti s prijelomima podijeljeni su u 4 skupine koje su odvojeno analizirane: a) prijelomi metafize u prvoj vremenskoj točki (N=10), b) prijelomi dijafize u prvoj vremenskoj točki (N=6), c) prijelomi metafize u drugoj vremenskoj točki (N=10), d) prijelomi dijafize u drugoj vremenskoj točki (N=6). Uzorci pacijenata s FOP-om analizirani su zasebno (N=3), dok su uzorci zdravih ispitanika sačinjavali jednu skupinu (N=10). Od svakog uzorka odvojen je odgovarajući dio volumena, ovisno o broju ispitanika u skupini kako bi zajedno sačinjavali uniformni skupni volumen uzorka (engl. *sample pool*) od 333.35 μ L plazme kojem je dodano 666.65 μ L pufera kako bi se dobio uzorak ukupnog volumena 1mL koji je predviđen za analizu.

Kako bi se odredila razina različitih citokina u uzorcima plazme, korištena je metoda analize panela citokina pomoću komercijalnog protokola (engl. *human cytokine antibody array*, #ab133996 proizvođača Abcam) koji omogućuje analizu 23 različita citokina i naknadnu kvantifikaciju njihovih razina. Metoda analize se bazira na principu membrane koja sadrži panel s protutijelima na određene citokine, na koju se dodaje uzorak koji se inkubira kako bi se omogućilo vezanje citokina iz uzorka za protutijela (Slika 3). Nakon ispiranja suviška uzorka, dodaju se protutijela na citokine obilježena biotinom koja se inkubiraju i vezuju za citokine na membrani te se suvišak ponovno ispiru. Slijedi korak inkubacije sa spojem streptavidin-HRP (konjugat s *horseradish* peroksidazom) koji se vezuje za biotin te omogućuje detekciju kemiluminiscencije pomoću posebne CCD kamere (Slika 3). Dobivene slike prikazuju intenzitet detektirane kemiluminiscencije za svaki citokin u duplikatima, uključujući i pozitivne i negativne kontrole s kojima se pojedinačni intenzitet za svaki citokin uspoređuje, što omogućuje daljnju analizu i kvantifikaciju rezultata (Slika 2).



Slika 2. A/ fotografija 8 membrana citokinskih panela s odgovarajućim uzorcima (inicijali pacijenata redaktirani radi poštivanja tajnosti podataka); B/ slika membrane nakon očitavanja rezultata CCD kamerom.



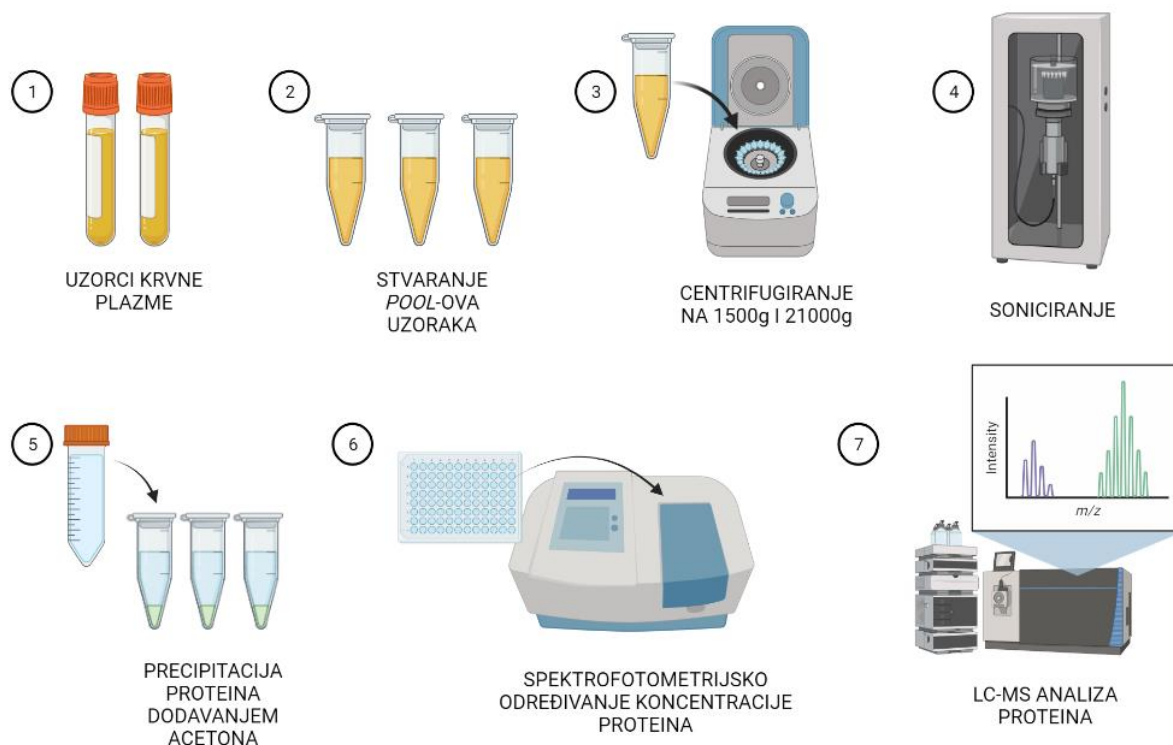
Slika 3. Grafički prikaz metode analize citokina pomoću membrane koja sadrži panel s primarnim protutijelima na citokine.

4.3.2. Analiza ekstracelularnih vezikula (EV) iz krvne plazme

4.3.2.1. Izolacija EV iz krvne plazme i izolacija njihovog proteinskog sadržaja

Za izolaciju i analizu EV uzeti su uzorci krvne plazme od ukupno 33 ispitanika te su uzorci podijeljeni i analizirani u pet skupina: a) ispitanici s prijelomima kosti u području metafize u drugoj vremenskoj točki (N=12), b) ispitanici s prijelomima kosti u području dijafize u drugoj vremenskoj točki (N=8) c) ispitanik s FOP-om za vrijeme *flare-up*-a (N=1), d) ispitanici s FOP-om za vrijeme remisije (N=2) te e) kontrolna skupina zdravih ispitanika (N=10). Uzorci iz svake skupine analizirani su na način da je iz svakog uzorka uzet jednak volumen plazme kako bi se stvorilo pet *pool*-ova uzorka ukupnog volumena 3mL (po jedan za svaku skupinu).

Pri postupku izolacije EV-a iz krvne plazme uzorci su prvo centrifugirani 15 minuta na nižoj brzini od 1,500 x g kako bi se uklonile stanične nečistoće i trombociti. Dobiveni supernatant izdvojen je i centrifugiran 35 minuta na višoj brzini od 21,000 x g kako bi vezikule ostale na dnu tube u obliku taloga (engl. *pellet*) (Slika 4). Nakon što je odstranjen supernatant, talog s vezikulama je resuspendiran u fosfatnom puferu kako bi se pročistio, a zatim je ponovljen korak centrifugiranja na visokoj brzini i talog je ponovno resuspendiran u puferu. Kako bi se razložila membrana vezikula i oslobodio njihov proteinski sadržaj, uzorci su podvrgnuti postupku liziranja pomoću sonikacije, odnosno primjenom energije ultrazvučnih valova pomoću sonikatora (Slika 4). Uzorci su sonicirani 5 minuta te su za to vrijeme stajali u ledu. Kako bi se izolirali proteini oslobođeni sonikacijom, precipitirani su dodavanjem acetona ohlađenog na -80°C te su nakon sat vremena inkubacije na temperaturi od -80°C centrifugirani na 16,000 x g, nakon čega se jasno vidljivi proteini nalaze u sedimentu. Supernatant je uklonjen te je, nakon evaporacije ostatka acetona, proteinski sediment resuspendiran u otopini 8M uree. Kako bi se utvrdila količina izoliranih vezikularnih proteina, svakom uzorku je određena koncentracija proteina pomoću komercijalnog protokola (*BIORAD DC™ Protein Assay protocol*) te su rezultati dobiveni pomoću spektrofotometra (*SpectraMax i3x - Molecular Devices LLC.*) očitavanjem na valnoj duljini od 750nm (Slika 4). Spektrofotometrijski rezultati analizirani su u računalnom programu *Soft Max Pro 7.0.3. Software (Molecular Devices LLC.)*



Slika 4. Grafički prikaz glavnih koraka izolacije EV iz plazme i analize njihovog proteinskog sadržaja.

4.3.2.2. Priprema izoliranih proteina za LC-MS analizu

Prije analize proteina potrebno je pripremiti uzorke za LC-MS što uključuje digestiju proteina na peptide te purifikaciju i koncentraciju peptida. Za postupak digestije proteina korišten je *FASP Protein Digestion Kit (FFPE)* (*Expedeon - Abcam*). Kako bi se proteini denaturirali, proteinskom talogu dobivenom u koraku izolacije proteina iz EV, dodana je otopina 8M uree te je uzorak centrifugiran pri brzini od 14000g uz upotrebu filtera koji propušta proteine manje od 10kDa. Taj je postupak ponovljen dva puta, nakon čega je filtrat koji se sastoji od otopine uree i manjih proteina odstranjen. Uzorku je dodan spoj uree i jodoacetamida kako bi se spriječilo upostavljanje tercijarne strukture proteina te je još tri puta proveden postupak centrifugiranja uz dodavanje uree i amonijevog bikarbonata pri zadnjem centrifugiranju. Kako bi se proteini razgradili na peptide, uzorku je dodana otopina amonijevog bikarbonata i tripsina u omjeru 50:1 te je kratko vorteksiran. Da bi se spriječilo isparavanje uzorka, vrh epruvete zaštićen je parafilmom te je uzorak inkubiran preko noći na 37 °C. Uzorak je ponovno centrifugiran tri puta uz dodavanje amonijevog bikarbonata i natrijevog klorida kako bi se dobio filtrat koji sadrži pročišćene triptičke peptide. Uzorak je zakiseljen do pH 2,5-3 dodavanjem 20% octene kiseline. Dobiveni triptički peptidi pročišćeni su od zaostalih soli (amonijevog bikarbonata i natrijevog klorida) koje ometaju ionizaciju peptida u masenom

spektrometru. Uz pročišćavanje peptidi su istovremeno koncentrirani, kako bi se učinkovitije nanijeli na tekućinski kromatograf. Uzorci s peptidima su dodatno pročišćeni i koncentrirani centrifugiranjem u nastavcima pipete u koje je uglavljen material C18 (da bi se dobili *StageTips*). Peptidi su zatim eluirani s materijala C18 pomoću otopina A (0.5% octena kiselina) i B (acetonitril i otopina A) u mikrotitarsku pločicu s 96 jažica. Centrifugiranjem na vakuum-centrifugi tijekom pri 30 °C i 200 g je uparen zaostali acetonitril i konačno, uzorcima je dodana otopina A.

4.3.2.3. Analiza peptida pomoću tekućinske kromatografije – masene spektrometrije (LC – MS)

Peptidi dobiveni u prethodnim koracima prvo prolaze kroz postupak tekućinske kromatografije pri kojem se dodatno pročišćavaju i koncentriraju prolaskom kroz kromatograf (*HPLC ThermoScientific UltiMate 3000*) s kolonom od materijala C18 dužine 15cm bez predkolone. Upotrijebljen je gradijent od 120 minuta uz protok od 300 µL/min te je modificiran da se bolje razdvoje polarniji peptidi. Zatim se peptidi sekvencioniraju u masenom spektrometru (*LTQ Orbitrap Discovery, Thermo Fisher Scientific*), a dobiveni podaci obrađuju se bioinformatičkim programom *MaxQuant (Max-Planck-Institute of Biochemistry)* kako bi se izdvojile biološki relevantne informacije.

4.4. Analiza podataka

4.4.1. Podatci dobiveni analizom citokina iz krvne plazme

Rezultati, dobiveni CCD kamerom u obliku slika, analizirani su pomoću *Chemi Doc (BIORAD)* sustava za prikaz prateći upute proizvođača. Korekcija pozadinskih i kvantifikacija fluorescentnih signala provedena je pomoću softvera *ImageJ 1.52a* (62). Tim postupcima dobivena je kvantifikacija signala za svaki pojedini citokin u svim uzorcima, koji odgovara njihovoj relativnoj ekspresiji u usporedbi s pozitivnim i negativnim kontrolama. Ekspresije citokina analizirane su pomoću metoda deskriptivne statistike. Vrijednosti relativne ekspresije citokina po skupinama uzoraka prikazane su kao faktor promjene (engl. *fold change*) u usporedbi s vrijednostima dobivenima za zdravu kontrolnu skupinu. Za analizu i slikovni prikaz podataka korišten je računalni program Excel. Za stvaranje prikaza u obliku toplinske mape (engl. *heatmap*) korišten je na internetu slobodno dostupni računalni program *MORPHEUS* (63).

4.4.2. Podatci dobiveni analizom proteina izoliranih iz EV pomoću LC-MS

Analizom masene spektrometrije i bioinformatičkom obradom dobivaju se biološki relevantne informacije u obliku naziva identificiranih proteina, imena pripadajućih gena i broj identificiranih peptida i intenzitet pripadajućeg proteina. Što je veći broj identificiranih peptida, veća je vjerojatnost da se u izvornom uzorku zaista nalazi upravo taj protein. Za analizu podataka o dobivenim proteinima korišten je slobodno dostupni računalni program *FunRich* 3.1.3. koji omogućava unos podataka o identificiranim proteinima u obliku njihovih identifikacijskih kratica (engl. *protein ID*) (64). Usporedbom unesenih podataka s bazama podataka (kao što je *UniProt*) program omogućava dodatnu analizu obogaćivanjem podataka o genima (engl. *gene enrichment analysis*) koja nudi prikaz brojnih podataka o identificiranim proteinima, kao što su pripadajuće stanične funkcije, signalni putevi, biološki procesi i slično. Identifikacija raznih bioloških procesa i staničnih puteva te relativna kvantifikacija uključenih proteina, omogućava međusobnu usporedbu analiziranih skupina i donošenje zaključaka o relativnoj promjeni profila i funkcijama proteina iz ekstracelularnih vezikula.

5. Rezultati

5.1. Rezultati analize citokina iz krvne plazme

Analizirani citokini, njihova funkcijska pripadnost skupini proupalnih ili protuupalnih citokina i glavne funkcije prikazani su u Tablici 1. Vrijednosti relativne ekspresije 23 citokina iz plazme prikazane su kao faktor promjene (engl. *fold change*) u usporedbi s vrijednostima dobivenima za kontrolnu skupinu zdravih dobrovoljaca i grafički prikazane u obliku kutijastih dijagrama (engl. *box and whisker plot*) te su svi rezultati prikazani numerički u Tablici 2.

5.1.1. Rezultati analize citokina iz krvne plazme pacijenata s prijelomom u području metafize kosti

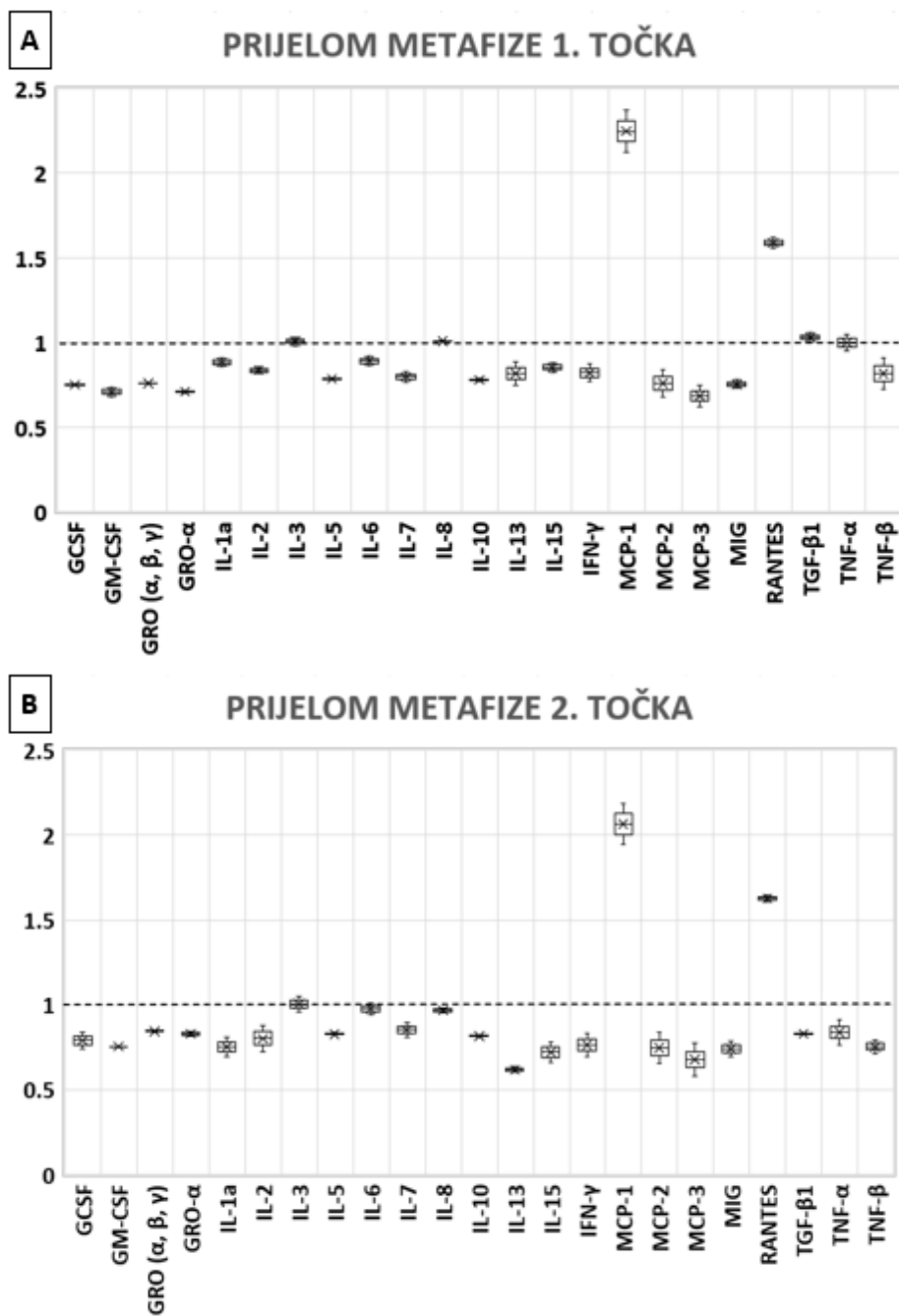
Analizom rezultata dobivenih od uzoraka skupine pacijenata s prijelomom kosti u području metafize uočena je izražena razlika u relativnoj ekspresiji citokina usporedbi s kontrolnom skupinom. Najznačanija razlika uočena je za MCP-1 (monocitni kemoatratantni protein 1) čiji je faktor promjene iznosio 2.25 (± 0.19) u prvoj vremenskoj točki, a 2.07 (± 0.17) u drugoj vremenskoj točki; odnosno relativna ekspresija proupalnog citokina MCP-1 je veća za čak 125% u prvoj, i 107% u drugoj točki. Značajna razlika je također uočena za proupalni kemokin ligand 5 (RANTES) čiji je faktor promjene iznosio 1.59 (± 0.05) u prvoj te 1.63 (± 0.033) u drugoj vremenskoj točki. Također je uočljivo da većina analiziranih citokina u obje vremenske točke - 17 u prvoj i 18 u drugoj (od ukupno 23) - pokazuje relativnu ekspresiju nižu od razina detektiranih u kontrolnoj skupini, ukoliko se nižom razinom smatraju sva sniženja od 10% ili više (Slika 5). Citokin s najnižom razinom ekspresije u prvoj točki je proupalni MCP-3 s relativnom ekspresijom 0.68 (± 0.09), što ukazuje na sniženje od 32%; u drugoj točki najnižu razinu ekspresije ima protuupalni citokin IL-13 i ona je iznosila 0.62 (± 0.02).

Tablica 1. Prikaz analiziranih citokina, njihovih naziva, pripadnosti pro- ili protuupalnoj skupini citokina i dio njihovih osnovnih funkcija. Citokini čije su skupine označene zvjezdicom (*), osim funkcije koja ih svrstava u skupinu, mogu imati i dihotomnu funkciju (proupalno i protuupalno djelovanje) ili nemaju jasno naznačenu pripadnost u literaturi.

| | IME CITOKINA | SKUPINA | FUNKCIJA |
|-----|---|--------------|---|
| 1. | Faktor koji stimulira koloniju granulocita (GCSF) | proupalni* | stimulacija razvoja granulocita (regulacija neutrofila) (65) |
| 2. | Faktor koji stimulira koloniju granulocita i makrofaga (GM-CSF) | proupalni* | dominantna uloga u proliferaciji, diferencijaciji, preživljenju i funkciji mijeloidnih stanica (66) |
| 3. | Rastom regulirani onkogen (GRO (α , β , γ)) | proupalni* | kemotaktičko i angiogeno djelovanje (67,68) |
| 4. | Rastom regulirani onkogen alfa (GRO α / CXCL1) | proupalni | privlači neutrofile na mjesto upale; proangiogen (67,68) |
| 5. | Interleukin 1 alfa (IL-1 α) | proupalni | amplifikacija imunskog odgovora u prirođenoj imunosti; aktivacija limfocita; stimulacija produkcije prostaglandina (69) |
| 6. | Interleukin 2 (IL-2) | proupalni | pokretanje proliferacije limfocita CD4 (34) |
| 7. | Interleukin 3 (IL-3) | proupalni* | reguliranje rasta i diferencijacije hematopoetskih stanica; aktivacija neutrofila i makrofaga (70) |
| 8. | Interleukin 5 (IL-5) | protuupalni | promocija rasta, diferencijacije i aktivacije eozinofila (34) |
| 9. | Interleukin 6 (IL-6) | proupalni* | amplifikacija imunskog odgovora u prirođenoj imunosti; stimulacija sazrijevanja limfocita B (34) |
| 10. | Interleukin 7 (IL-7) | proupalni | razvoj i homeostaza limfocita T (34) |
| 11. | Interleukin 8 (IL-8) | proupalni* | aktivacija i privlačenje limfocita T i neutrofila, proangiogen (71) |
| 12. | Interleukin 10 (IL-10) | protuupalni* | inhibicija transkripcijskog faktora NF- κ B (34) |
| 13. | Interleukin 13 (IL-13) | protuupalni* | inhibira proizvodnju TNF, IL-1 β ; indukcija promjene izotipa IgE (34) |
| 14. | Interleukin 15 (IL-15) | proupalni | pokretanje proliferacije limfocita CD4 (34) |
| 15. | Interferon gama (IFN- γ) | proupalni | potiče Th1 polarizaciju, povećava citotoksičnost (34) |
| 16. | Monocitni kemoatratantni protein 1 (MCP-1/CCL2) | proupalni | privlači monocite, memorijske T stanice i dendritičke stanice na mjesta upale (72) |
| 17. | Monocitni kemoatratantni protein 2 (MCP-2 /CCL8) | proupalni | privlači mastocyte, granulocite, monocite i limfocite T na mjesta upale (73) |
| 18. | Monocitni kemoatratantni protein 3 (MCP-3 /CCL7) | proupalni | privlači mastocyte, granulocite, monocite i limfocite T na mjesta upale (73) |
| 19. | Monokin induciran (interferonom) gama (MIG/CXCL9) | proupalni | privlači citotoksične limfocite i makrofage na mjesta upale (74) |
| 20. | Kemokin (C-C motif) ligand 5 (RANTES/CCL5) | proupalni | privlači limfocite T i granulocite na mjesto upale, aktivira leukocite (75) |
| 21. | Transformirajući faktor rasta beta 1 (TGF- β 1) | protuupalni* | inhibicija stanica prirođene imunosti (makrofaga, NK stanica, mastocita); inhibicija proliferacije limfocita T (34) |
| 22. | Faktor tumorske nekroze alfa (TNF α) | proupalni | stimulira odgovor akutne faze i fagocitozu, kemoatraktant neutrofila (34) |
| 23. | Faktor tumorske nekroze beta (TNF β / LT- α) | proupalni | regulacija prirođene imunosti, citotoksični učinak (34) |

Tablica 2. Vrijednosti prosječnog faktora promjene (engl. *fold change*) i standardne devijacije za ispitane citokine po analiziranim skupinama. Faktor promjene je izražen prema razini kontrolne skupine.

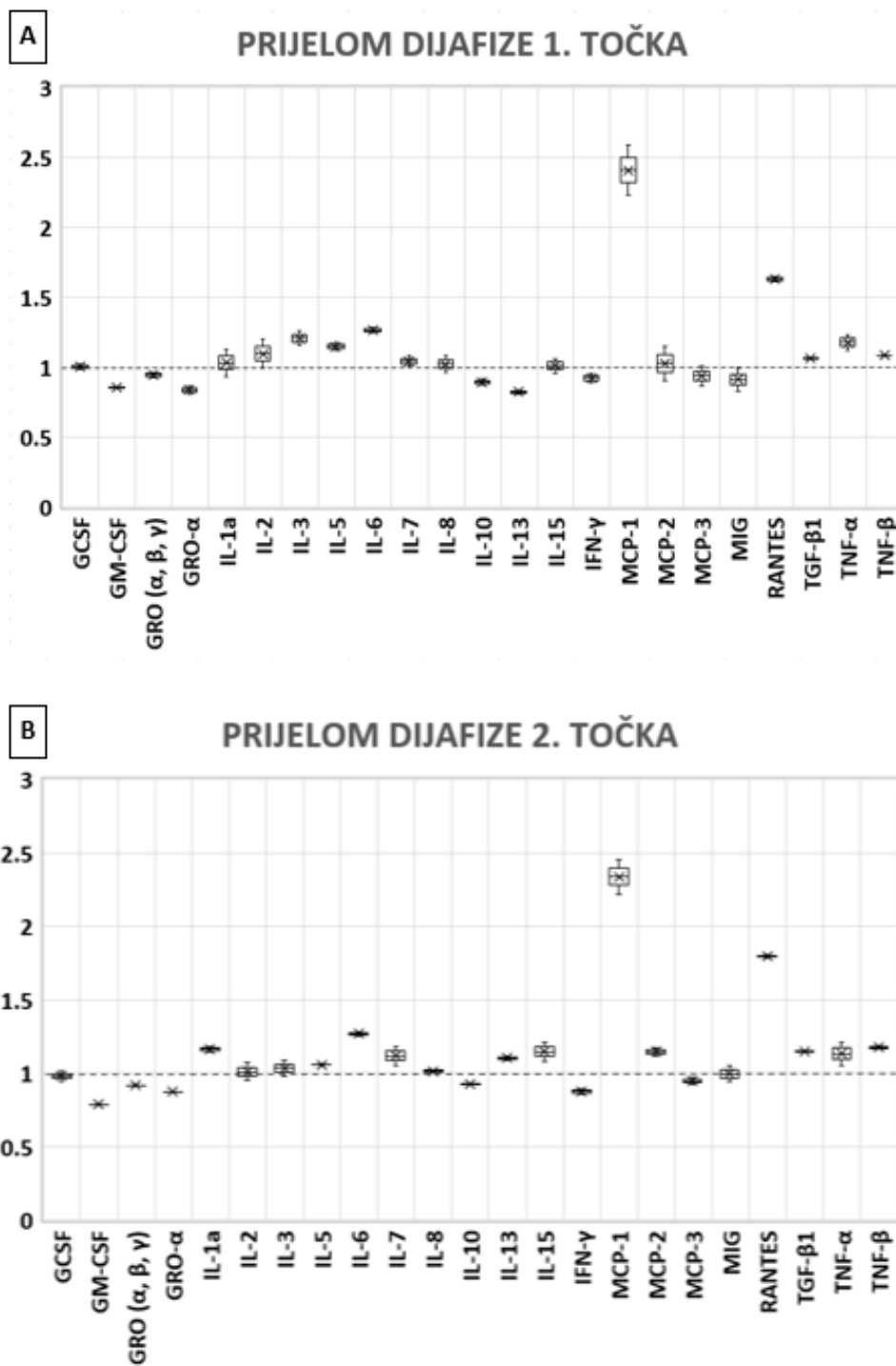
| | FOP <i>flare-up</i> | FOP 1 | FOP 2 | DIJAFIZA 1. TOČKA | DIJAFIZA 2. TOČKA | METAFAZA 1. TOČKA | METAFAZA 2. TOČKA |
|--|-------------------------------|--------------|--------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| GCSF | 1.42 ±0 | 0.81 ±0.02 | 0.65 ±0.03 | 1 ±0.03 | 0.98 ±0.05 | 0.75 ±0.01 | 0.79 ±0.07 |
| GM-CSF | 1.23 ±0.03 | 0.73 ±0.01 | 0.65 0.02 | 0.85 ±0.01 | 0.79 ±0.01 | 0.71 ±0.04 | 0.75 ±0 |
| GRO (α, β, γ) | 0.99 ±0 | 0.97 ±0.01 | 0.76 ±0.03 | 0.95 ±0.03 | 0.92 ±0 | 0.76 ±0 | 0.84 ±0.01 |
| GRO-α | 1.15 ±0.11 | 1.12 ±0.03 | 0.87 ±0.01 | 0.84 ±0.04 | 0.87 ±0 | 0.71 ±0.01 | 0.83 ±0.02 |
| IL-1a | 1.59 ±0.02 | 1.04 ±0.19 | 0.91 ±0.01 | 1.03 ±0.14 | 1.16 ±0.02 | 0.88 ±0.04 | 0.75 ±0.08 |
| IL-2 | 1.81 ±0 | 1.03 ±0.15 | 0.95 ±0.07 | 1.1 ±0.15 | 1.01 ±0.08 | 0.84 ±0.03 | 0.8 ±0.11 |
| IL-3 | 1.55 ±0.06 | 1.09 ±0.07 | 1.09 ±0.05 | 1.21 ±0.07 | 1.03 ±0.08 | 1.01 ±0.04 | 1.01 ±0.06 |
| IL-5 | 1.56 ±0.02 | 0.8 ±0.03 | 0.75 ±0.02 | 1.15 ±0.04 | 1.06 ±0.01 | 0.78 ±0.01 | 0.83 ±0.01 |
| IL-6 | 1.73 ±0.04 | 1.01 ±0.07 | 0.86 ±0 | 1.26 ±0.03 | 1.27 ±0.02 | 0.89 ±0.04 | 0.98 ±0.05 |
| IL-7 | 1.52 ±0.11 | 0.87 ±0.04 | 0.83 ±0.07 | 1.04 ±0.05 | 1.12 ±0.09 | 0.8 ±0.04 | 0.85 ±0.06 |
| IL-8 | 1.35 ±0.1 | 1.06 ±0.03 | 1.3 ±0.06 | 1.02 ±0.08 | 1.02 ±0.01 | 1.01 ±0 | 0.97 ±0.02 |
| IL-10 | 1.14 ±0.02 | 0.94 ±0.07 | 0.84 ±0.02 | 0.89 ±0.03 | 0.93 ±0 | 0.78 ±0.01 | 0.81 ±0.01 |
| IL-13 | 1.93 ±0.05 | 0.89 ±0.1 | 0.85 ±0.08 | 0.82 ±0.02 | 1.1 ±0.02 | 0.82 ±0.1 | 0.62 ±0.02 |
| IL-15 | 1.56 ±0.28 | 0.99 ±0.04 | 0.96 ±0.06 | 1.01 ±0.08 | 1.15 ±0.09 | 0.85 ±0.04 | 0.72 ±0.08 |
| IFN-γ | 1.4 ±0.24 | 0.9 ±0.07 | 0.83 ±0.09 | 0.92 ±0.05 | 0.88 ±0.03 | 0.82 ±0.07 | 0.76 ±0.1 |
| MCP-1 | 2.3 ±0.15 | 2.02 ±0.2 | 2.14 ±0.19 | 2.41 ±0.25 | 2.34 ±0.17 | 2.25 ±0.18 | 2.07 ±0.17 |
| MCP-2 | 1.51 ±0.16 | 0.82 ±0.07 | 0.88 ±0.1 | 1.03 ±0.18 | 1.15 ±0.04 | 0.76 ±0.11 | 0.75 ±0.13 |
| MCP-3 | 0.98 ±0.06 | 0.66 ±0.06 | 0.65 ±0.06 | 0.94 ±0.1 | 0.95 ±0.04 | 0.68 ±0.09 | 0.68 ±0.13 |
| MIG | 1.11 ±0.09 | 0.77 ±0.07 | 0.68 ±0.03 | 0.91 ±0.11 | 0.99 ±0.08 | 0.76 ±0.04 | 0.74 ±0.07 |
| RANTES | 1.75 ±0.08 | 1.37 ±0.06 | 1.89 ±0.04 | 1.63 ±0.03 | 1.8 ±0.01 | 1.59 ±0.05 | 1.63 ±0.03 |
| TGF-β1 | 1.89 ±0.08 | 0.93 ±0.13 | 0.96 ±0.01 | 1.06 ±0.01 | 1.15 ±0.01 | 1.03 ±0.04 | 0.83 ±0.01 |
| TNF-α | 1.29 ±0.16 | 0.99 ±0.14 | 1.08 ±0.11 | 1.18 ±0.08 | 1.13 ±0.11 | 1 ±0.07 | 0.84 ±0.1 |
| TNF-β | 1.14 ±0.11 | 0.76 ±0.06 | 0.87 ±0.07 | 1.08 ±0.01 | 1.18 ±0.02 | 0.82 ±0.13 | 0.75 ±0.06 |



Slika 5. Prikazi relativne ekspresije citokina kao faktor promjene (engl. *fold change*) nasuprot kontrolne skupine prikazani u obliku *box and whisker plot*-a. Graf A/ pacijenti s prijelomom metafize u prvoj vremenskoj točki; Graf B/ pacijenti s prijelomom metafize u drugoj vremenskoj točki. Apscisa – analizirani citokini; ordinata – relativna promjena nasuprot kontrolne skupine. Isprekidana crta označava referentnu razinu citokina kontrolne skupine.

5.1.2. Rezultati analize citokina iz krvne plazme pacijenata s prijelomom u području dijafize kosti

Analiza relativne ekspresije citokina u skupini pacijenata s prijelomom u području dijafize kosti pokazuje zamjetnu razliku u više citokina. Najizraženija razlika, slično kao i u skupini pacijenata s prijelomom metafize, uočljiva je u proupalnim citokinima MCP-1 i RANTES (Slika 6). Faktor promjene za relativnu ekspresiju MCP-1 u prvoj točki iznosio je 2.41 (± 0.25), a u drugoj 2.34 (± 0.17); za RANTES te vrijednosti su iznosile 1.63 (± 0.03) u prvoj te 1.8 (± 0.01) u drugoj vremenskoj točki. Za razliku od većinski sniženih vrijednosti za ostale citokine u skupini s prijelomom metafize, u ovoj skupini može se uočiti blagi porast relativne ekspresije još 7 citokina u prvoj vremenskoj točki: IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, TNF α i TNF- β , ukoliko se zamjetnim porastom smatraju povećanja od 5% ili više (Slika 6). U drugoj vremenskoj točki porast od 5% ili više pokazuje čak 10 citokina: IL-1a, IL-5, IL-6, IL-7, IL-13, IL-15, MCP-2, TGF- β 1, TNF- α i TNF- β .



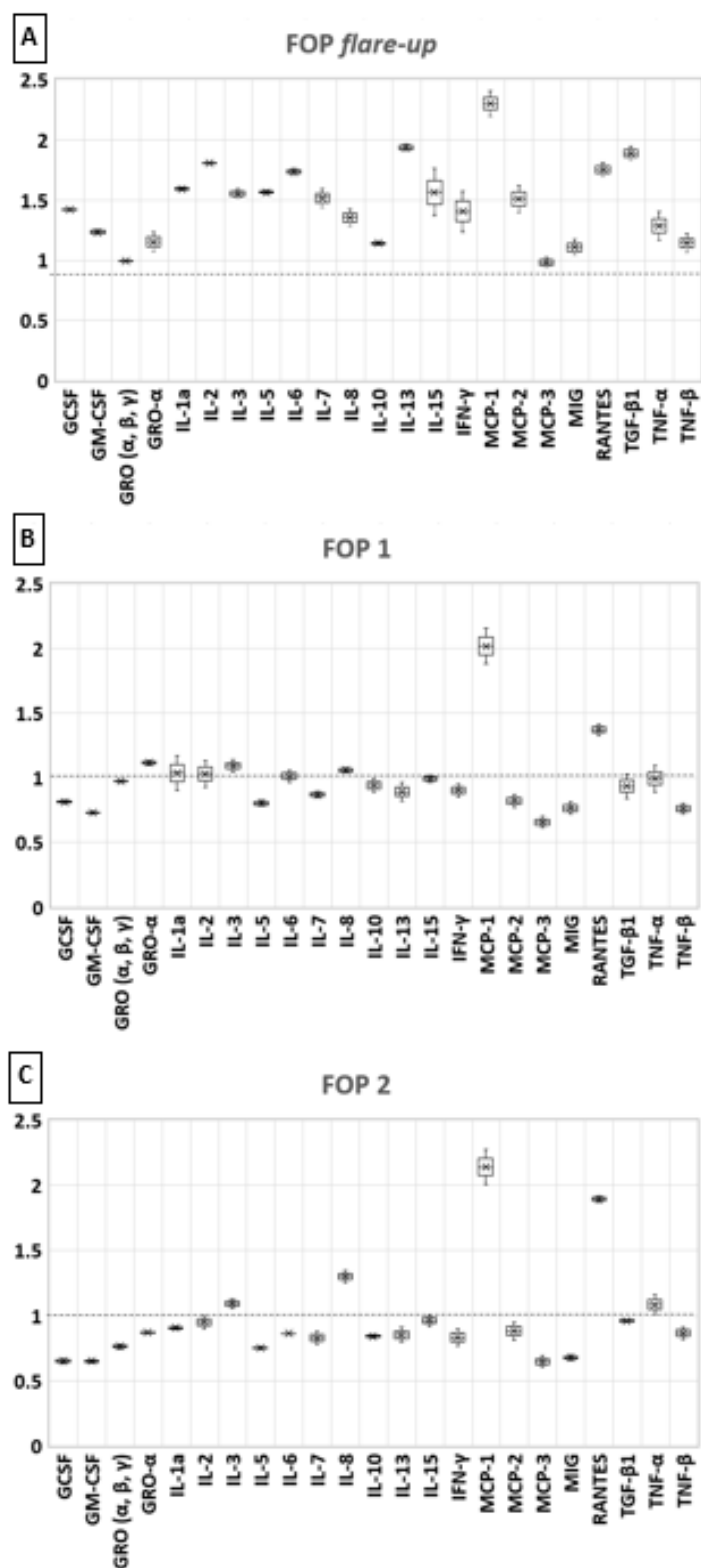
Slika 6. Prikazi relativne ekspresije citokina kao faktor promjene (engl. *fold change*) nasuprot kontrolne skupine prikazani u obliku *box and whisker plot*-a. Graf A/ pacijenti s prijelomom dijafize u prvoj vremenskoj točki; Graf B/ pacijenti s prijelomom dijafize u drugoj vremenskoj točki. Apscisa – analizirani citokini; ordinata – relativna promjena nasuprot kontrolne skupine. Isprekidana crta označava referentnu razinu citokina kontrolne skupine.

5.1.3. Rezultati analize citokina iz krvne plazme pacijenata s FOP

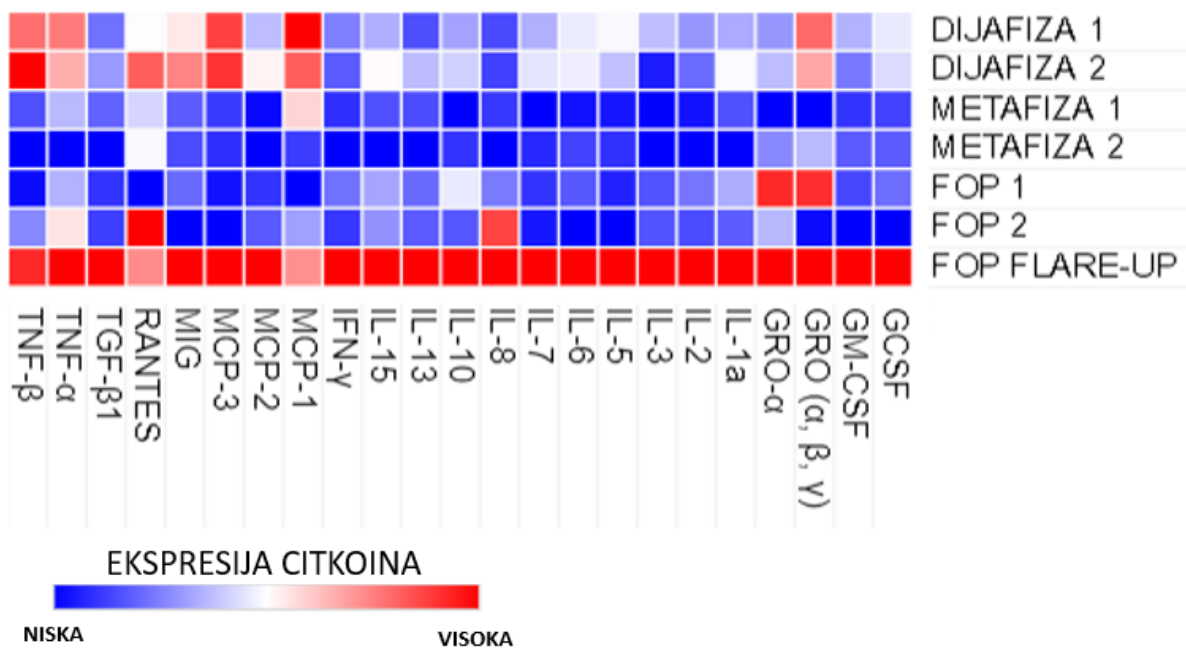
U citokinskom profilu pacijenta koji je za vrijeme uzimanja uzoraka bio u fazi egzacerbacije bolesti FOP, uočljiva su zamjetna odstupanja većeg broja citokina (Slika 7). Vidljivo je da niti jedan od analiziranih citokina ne pokazuje sniženje relativne ekspresije nasuprot kontrolne skupine, a povećanu ekspresiju pokazuje čak 21 citokin (od ukupno 23), ukoliko povećanjem smramo porast za 10% ili više. Analogno skupinama s prijelomom kosti, najveće odstupanje u razini relativne ekspresije pokazuje proupalni citokin MCP-1, čiji faktor promjene iznosi $2.3 (\pm 0.15)$, odnosno pokazuje povećanje od 130% nasuprot razine kontrolne skupine. Također, uz MCP-1, povećanja veća od 50% pokazuju još i proupalni citokini IL-1a, IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-15, MCP-2, RANTES te protuupalni IL-5, IL-13 i TGF- β 1. Među njima se posebno ističu razine IL-13 i TGF- β 1, čije su razine ekspresije pokazale gotovo dvostruko povećanje (faktori promjene 1.93 ± 0.05 i 1.89 ± 0.08).

Rezultati analize citokinskog profila pacijenata s FOP-om koji su za vrijeme uzorkovanja bili bez egzacerbacije bolesti (*flare-up*) pokazuju znatno manje povišenih razina relativne ekspresije te su one sličnije vrijednostima dobivenima u skupinama s prijelomom kosti. Najizraženija promjena vidljiva je za proupalni citokin MCP-1 čiji je faktor promjene iznosio $2.02 (\pm 0.2)$ kod jednog, a $2.14 (\pm 0.19)$ kod drugog pacijenta. Drugi citokin koji je pokazao zamjetnu promjenu je RANTES, s vrijednostima faktora promjene $1.37 (\pm 0.06)$ kod jednog te $1.89 (\pm 0.04)$ kod drugog pacijenta. Detaljnijom analizom rezultata za prvog pacijenta s FOP-om (Slika 7, graf B) uočljivo je da još 3 citokina pokazuju povećanje od 5% ili više, a to su proupalni GRO- α , IL-3 i IL-8. Razine ekspresije ostalih citokina su snižene ili odgovaraju kontrolnim razinama; najznačajnije sniženje pokazuje MCP-3 s faktorom promjene $0.66 (\pm 0.06)$. Drugi pacijent s FOP-om (Slika 7, graf C) također osim već navedenih MCP-1 i RANTES, povećanje od 5% ili više pokazuju još 3 proupalna citokina: IL-3, IL-8 i TNF- α . Većina citokina (17 od 23) pokazuje sniženje faktora promjene za 5% ili više, a među njima sniženje 25% ili više pokazuju citokini GCSF, GM-CSF, IL-5, MCP-3 i MIG.

Za ilustrativnu usporedbu razina relativne ekspresije citokina među analiziranim skupinama nasuprot razina kontrolne skupine, korištena je tzv. toplinska mapa (engl. *heatmap*), koja je dobivena korištenjem prosječnih vrijednosti faktora promjene (engl. *average fold*) za citokine pojedine skupine. Na prikazu je jasno vidljivo da rezultati koji pripadaju FOP pacijentu s egzacerbacijom (*flare-up*) odstupaju od svih ostalih analiziranih uzoraka i pokazuju veće razine ekspresije gotovo svih analiziranih citokina (Slika 8).



Slika 7. Prikazi relativne ekspresije citokina kao faktor promjene (engl. *fold change*) nasuprot kontrolne skupine prikazani u obliku *box and whisker plot*-a. Graf A/ – pacijent s FOP u vrijeme *flare up*-a, grafovi B/ i C/ – pacijenti s FOP-om u vrijeme bez *flare up*-a. Apscisa – analizirani citokini; ordinata – relativna promjena nasuprot kontrolne skupine. Isprekidana crta označava referentnu razinu citokina kontrolne skupine.



Slika 8. Prikaz relativne ekspresije citokina u obliku toplinske mape (engl. *heatmap*) koja prikazuje odstupanje razine citokina od razine u kontrolne skupine. Stupci odgovaraju pojedinom analiziranom citokinu, a redovi analiziranim skupinama. Crvena boja označava visoku ekspresiju pojedinog citokina, a plava nisku.

5.2. Rezultati analize proteina iz ekstracelularnih vezikula krvne plazme

5.2.1. Rezultati izolacije ekstracelularnih vezikula i njihovog proteinskog sadržaja iz krvne plazme

Postupkom izolacije EV-a iz krvne plazme te izdvajanja njihovog proteinskog sadržaja, dobivena je koncentracija proteina 0.291 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (ukupno 21 μg izoliranih EV proteina) iz uzorka plazme kontrolne skupine; iz uzoraka plazme ispitanika s prijelomom metafize dobivena je koncentracija proteina 0.041 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (ukupno 3 μg izoliranih EV proteina) te 0.039 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (ukupno 3 μg izoliranih EV proteina) iz skupine s prijelomom dijafize. Iz uzoraka plazme pacijenta s FOP-om za vrijeme *flare-up*-a dobivena je koncentracija EV proteina od 0.95 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (ukupno 95 μg izoliranih EV proteina), a iz skupine FOP za vrijeme remisije 1.272 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (ukupno 127 μg izoliranih EV proteina).

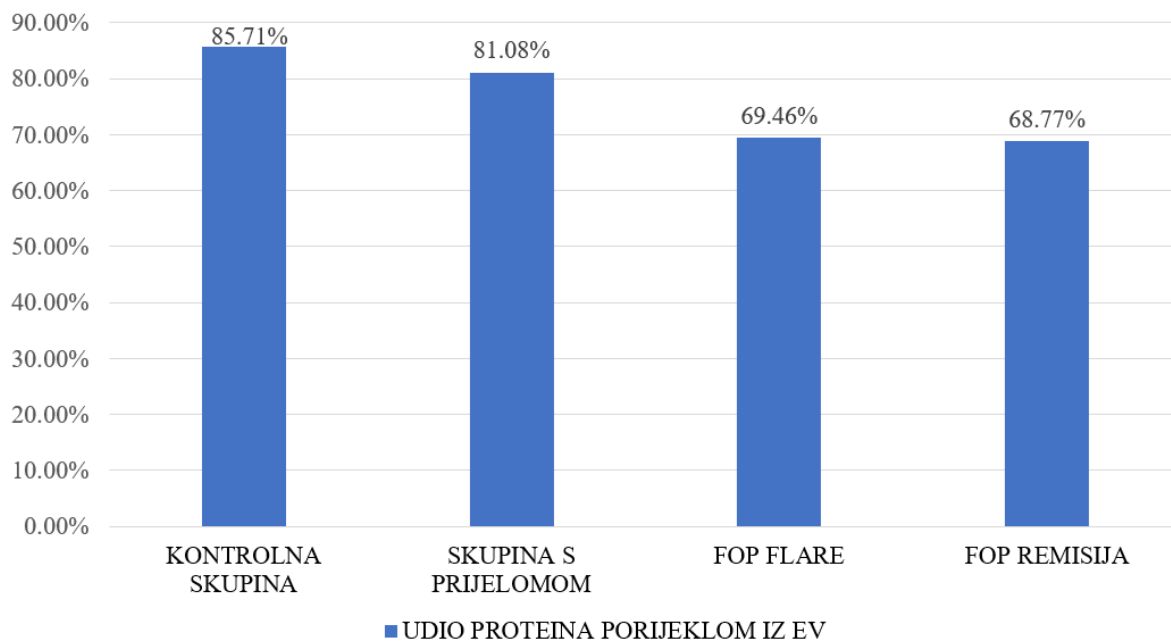
Analizom izoliranih peptida LC-MS-om i bioinformatičkom analizom, dobiveno je ukupno 47 različitih proteina iz skupina pacijenata s prijelomom kosti, od kojih je 39 detektirano u skupini ispitanika s prijelomom metafize, a 41 u skupini ispitanika s prijelomom dijafize. Od ukupno 47 detektiranih proteina, 31 protein je zajednički dvjema skupinama. Iz uzoraka plazme pacijenta s FOP-om za vrijeme *flare-up*-a identificirana su 323, a iz skupine FOP za vrijeme remisije 317 proteina. U kontrolnoj skupini detektirana su 32 proteina.

5.2.2. Rezultati analize proteinskog sadržaja ekstracelularnih vezikula

Podatci o detektiranim proteinima analizirani su u računalnom programu *FunRich* 3.1.3. i podijeljeni su u četiri skupine za analizu: ispitanici s prijelomom kosti (detektirani proteini iz skupine metafiznih i dijafiznih prijeloma analizirani su zajedno), ispitanici s bolešću FOP – pacijent za vrijeme *flare-up*-a i skupina pacijenata za vrijeme remisije, te kontrolna skupina. Dobiveni rezultati prikazani su pomoću stupčastih (engl. *bar chart*) grafikona na kojima je kompariran relativni udio detektiranih proteina iz četiriju skupina. Relativni udio identificiranih proteina iz ispitivanih skupina koji je uključen u pojedini ispitivani parametar izražen je postotkom. Identificirani proteini mogu istovremeno biti dio više bioloških funkcija i staničnih puteva i mogu se preklapati. Analizirano je i uspoređeno više parametara u objema skupinama: stanični odjeljak kojem pripadaju detektirani proteini, biološki procesi te stanični signalni putevi u koje su uključeni detektirani proteini.

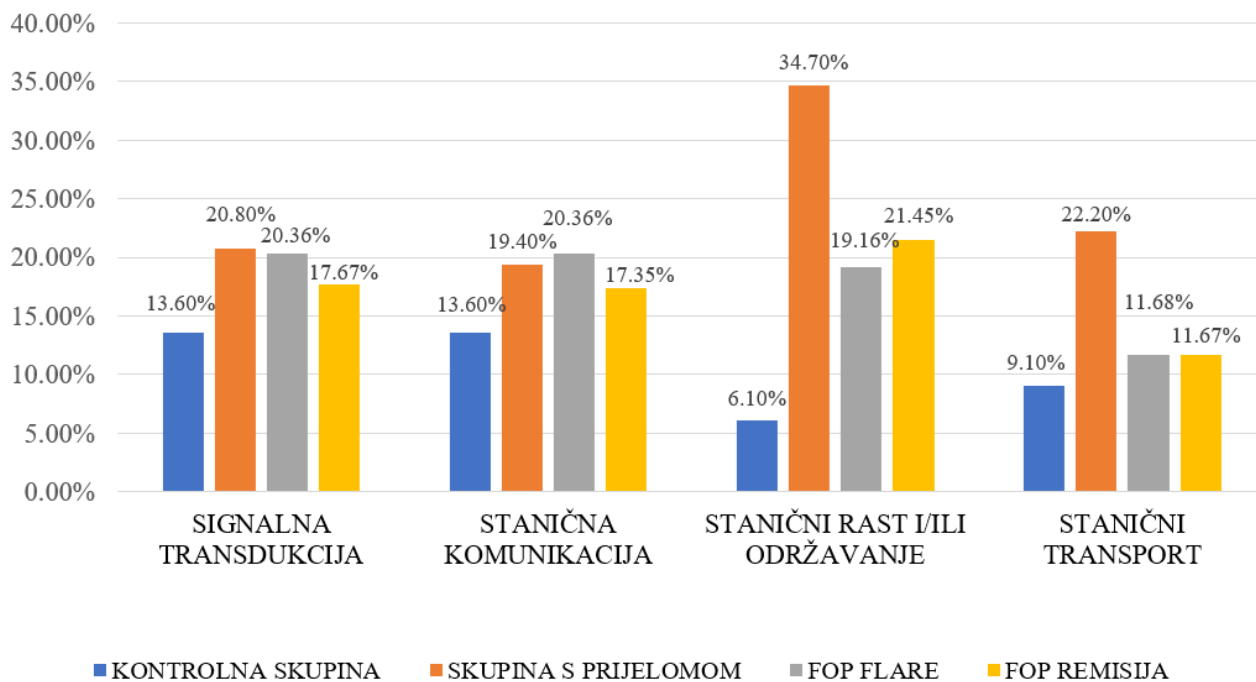
Za detektirane proteine je analizirano iz kojeg staničnog odjeljka potječu i ustanovljeno je da 81.08% proteina dobivenih analizom skupine s koštanim prijelomom, 69.46% iz skupine

FOP s *flare-up*-om, 68.77% u skupini FOP u remisiji te 85.71% proteina kontrolne skupine potječe iz ekstracelularnih vezikula (Slika 9). Navedeni rezultat potvrđuje uspješnost postupka izolacije EV-a i njihovog proteinskog sadržaja.



Slika 9. Stupčasti grafikon (engl. *bar chart*) prikazuje postotak zastupljenosti detektiranih proteina u ekstracelularnim vezikulima za kontrolnu skupinu, skupinu s koštanim prijelomom, skupinu FOP s *flare-up*-om te FOP u remisiji.

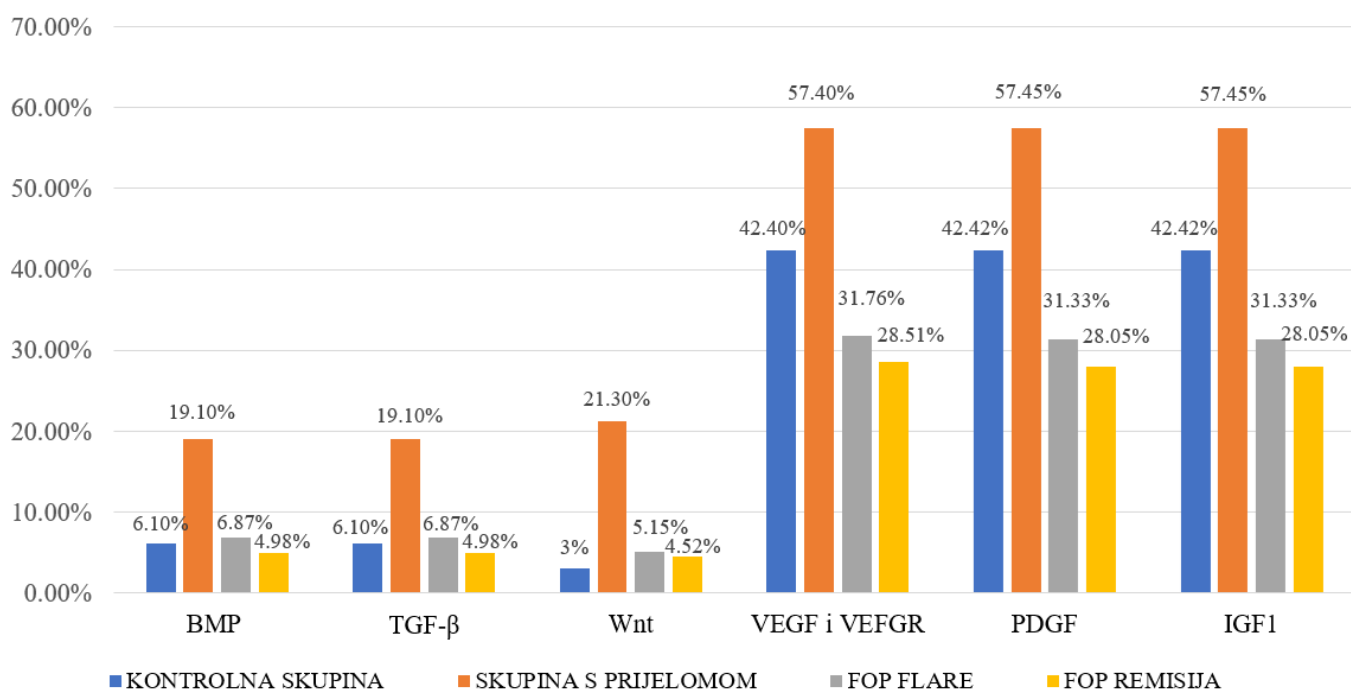
Analizirani su biološki procesi u koje su uključeni identificirani proteini iz ekstracelularnih vezikula i njihov relativni udio unutar pojedinih procesa uspoređen je između ispitivanih skupina (Slika 10). Za analizu odabrani su biološki procesi koji su važni za pregradnju koštanog tkiva (engl. *remodeling*): signalna transdukcija, stanična komunikacija, stanični rast i/ili održavanje i stanični transport. Uočeno je da u 3 od 4 analizirane funkcije najveći relativni udio pokazuju identificirani proteini iz skupine ispitanika s koštanim prijelomom (Slika 10). Za funkcije signalne transdukcije i stanične komunikacije nisu uočljive značajne razlike među skupinama pacijenata. Kontrolna skupina pokazuje najmanji relativni udio proteina za sve ispitivane funkcije. Najizraženija razlika nađena je u biološkoj funkciji staničnog rasta i/ili održavanja gdje je vidljivo da je u kontrolnoj skupini uključeno tek 6.1% identificiranih proteina, dok je u skupini s koštanim prijelomima taj udio iznosio čak 34.7% (Slika 10).



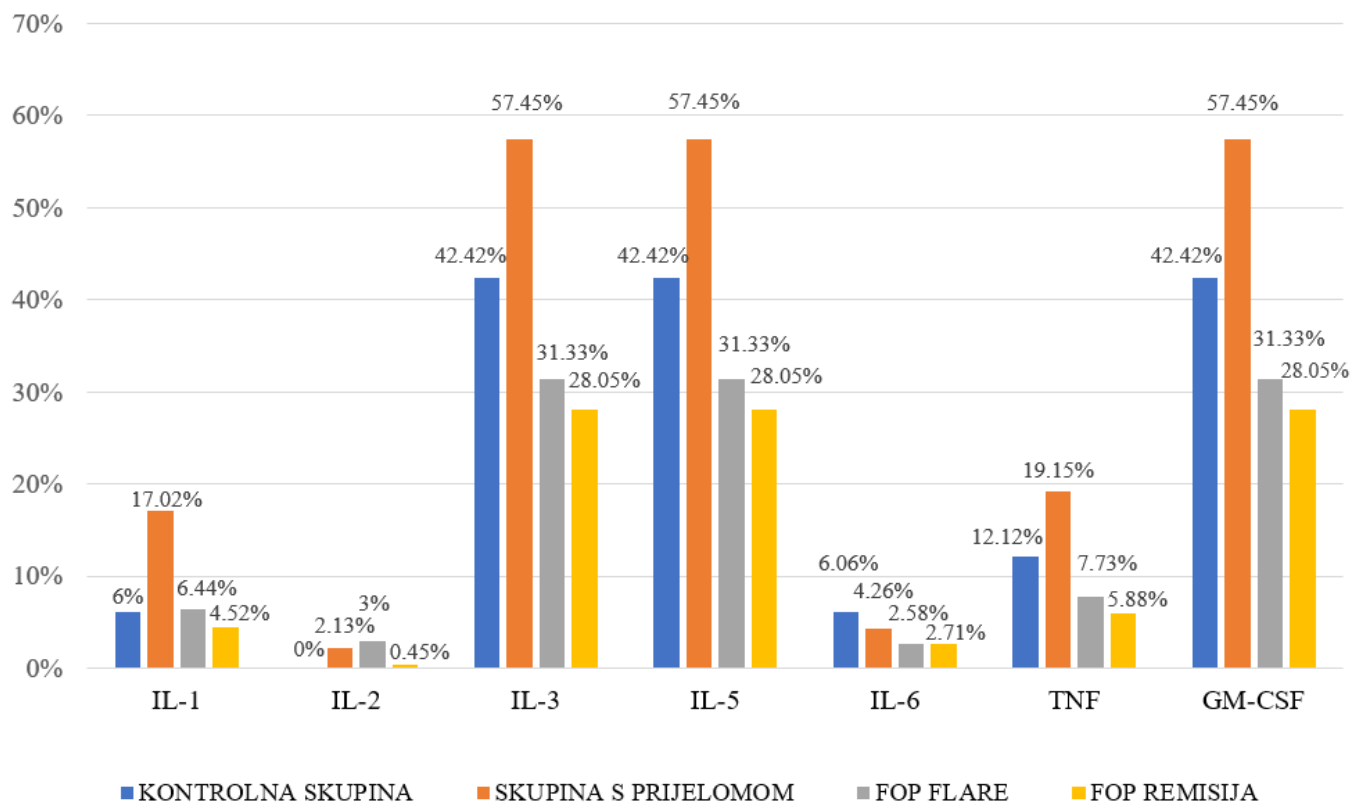
Slika 10. Stupčasti grafik (engl. *bar chart*) prikazuje stanične biološke procese relevantne za koštani metabolizam u kontrolnoj skupini, skupini s koštanim prijelomom, skupini FOP s *flare-up*-om te FOP skupini u remisiji. Postotak predstavlja relativni udio identificiranih proteina uključenih u pojedine stanične procese; neki su proteini uključeni u više staničnih procesa i preklapaju se.

Također je analizirana uključenost identificiranih proteina u stanične signalne puteve i uspoređen je relativni udio proteina između skupina. Analizirani signalni putevi podijeljeni su u dvije skupine: signalni putevi važni i specifični za koštani metabolizam te signalni putevi odabranih citokina (koji su ujedno bili uključeni i u citokinsku analizu plazme). Za analizu signalnih puteva posebne važnosti za koštani metabolizam izdvojeni su: signalni put koštanog morfogenetskog proteina (BMP), transformirajućeg faktora rasta beta (TGF- β), vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF i VEGFR), trombocitnog faktora rasta (engl. platelet-derived growth factor, PDGF), inzulinu sličnog faktora rasta 1 (engl. insulin-like growth factor 1, IGF-1) te Wnt signalni put. Uočeno je da u svim analiziranim signalnim putevima najveći relativni udio imaju proteini identificirani u skupini s koštanim prijelomom, a najizraženija je razlika vidljiva u Wnt signalnom putu, gdje relativni udio proteina iznosi 3% u kontrolnoj te 21.3% u skupini s koštanim prijelomom (Slika 11). Skupine s FOP-om ne pokazuju izraženija odstupanja od kontrolne skupine za signalne puteve BMP, TGF- β i Wnt, dok su udjeli EV proteina u signalnim putevima VEGF, PDGF i IGF1 niži nego u kontrolnoj skupini i skupini s prijelomom (Slika 11). Te su razlike posebno izražene usporedbom skupine FOP u remisiji sa

skupinom s koštanim prijelomom. Međusobnom usporedbom dvaju FOP skupina, uočljivo je da udio proteina u svim signalnim putevima viši u pacijenta s FOP *flare-up*-om (Slika 11). Sličan obrazac rezultata dobiven je i analizom signalnih puteva citokina IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, TNF, GM-CSF te IFN γ . Usporedbom među skupinama vidljivo je da u skupini s koštanim prijelomom proteini imaju najveći relativni udio u signalnim putevima svih analiziranih citokina osim IL-6, gdje prednjači kontrolna skupina (Slika 12). Udjelom su u svim skupinama najzastupljeniji signalni putevi IL-3, IL-5 i GM-CSF, a najmanje zastupljeni su proteini signalnih puteva IL-2 i IL-6 (Slika 12). Skupine s FOP-om pokazuju udjele proteina niže od skupine s prijelomom i od kontrolne skupine u signalnim putevima IL-3, IL-5, IL-6, TNF i GMCSF (Slika 12). Komparacijom dvije skupine s FOP-om vidljivo je da je udio proteina u citokinskim signalnim putevima niži u skupini u remisiji za većinu signalnih puteva: IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, TNF i GM-CSF (Slika 12).



Slika 11. Stupčasti grafik (engl. *bar chart*) prikazuje stanične signalne puteve relevantne za koštani metabolizam u kontrolnoj skupini, skupini s koštanim prijelomom, skupini FOP s *flare-up*-om te FOP skupini u remisiji. Postotak predstavlja relativni udio identificiranih proteina uključenih u pojedine signalne puteve; neki su proteini uključeni u više signalnih puteva i preklapaju se.



Slika 12. Stupčasti grafikon (engl. *bar chart*) prikazuje stanične signalne puteve posredovane citokinima u kontrolnoj skupini, skupini s koštanim prijelomom, skupini FOP s *flare-up*-om te FOP skupini u remisiji. Postotak predstavlja relativni udio identificiranih proteina uključenih u pojedine signalne puteve; neki su proteini uključeni u više signalnih puteva i preklapaju se.

6. Rasprava

Progresivna osificirajuća fibrodisplazija je izuzetno teška i rijetka bolest koju karakterizira progresivna HO mekih tkiva, što pacijentima postupno smanjuje pokretljivost i kvalitetu života te u konačnici progredira do potpune nepokretnosti i preuranjene smrti zbog povezanih komplikacija (18). Unatoč dugogodišnjem istraživanju, točan mehanizam HO-a nije poznat te samim time još uvijek ne postoji specifična i učinkovita terapija (1). Istraživanja su pokazala da citokini imaju potencijalno veliku važnost u nastanku i progresiji HO, međutim u literaturi zasad nema istraživanja koja tumače potencijalne razlike patološkog okoštavanja u FOP-u i fiziološkog okoštavanja koje se događa pri sanaciji koštanog prijeloma koristeći metode proteomske analize (7). Cilj provedenog istraživanja bio je iskoristiti mogućnosti proteomske analize bioloških tekućina, koje uključuju analizu citokina i EV-a, kako bi se pokušale identificirati i potencijalno objasniti sličnosti i razlike tih komponenata u ispitanika s FOP-om i ispitanika s koštanim prijelomima u fazi cijeljenja. Krvna plazma, zbog relativno lake dostupnosti i širokog raspona eksperimentalnih mogućnosti, određena je kao biološka tekućina izbora (76).

Rezultati ispitivanja razine 23 citokina u krvnoj plazmi pokazala su izražene razlike u citokinskim profilima ispitivanih skupina. Uspoređujući relativne ekspresije citokina s razinom kontrolne skupine, uočavamo da ispitanik s FOP-om tijekom *flare-up*-a pokazuje najizraženije promjene. Vrijednost relativne ekspresije čak 21 citokina pokazala je povišenu relativnu ekspresiju, što bi moglo ukazivati na izrazitu pobudu urođene i stečene imunosti u razdoblju stvaranja HO-a (77). Primjetni su obrasci propagacije i upalnih i protuupalnih procesa koji se očituju povećanjem relativne ekspresije upalnih (IL-1a, IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-15, MCP-2, RANTES) te protuupalnih (IL-5, IL-13 i TGF- β 1) citokina, što je u skladu sa samoregulacijskim svojstvom citokinskog odgovora koji se sastoji od proupalnog dijela na koji se nadovezuje (uz djelomično preklapanje) i protuupalni dio, iako je vidljivo da u ovom slučaju izrazito prevladava proupalna komponenta (8). Navedeni rezultati se uvelike poklapaju s rezultatima postojećih istraživanja, u kojima su zabilježene izražene elevacije IL-1 β i RANTES, te povišena vrijednost G-CSF za vrijeme FOP *flare-up*-a. Također, studija Barrueta i sur. nalazi povišene razine IL-3, IL-7 i IL-8 u pacijenata s FOP-om (27,29,30). Porast relativne ekspresije citokina TGF- β 1 od gotovo 90% (*fold change* 1.89 \pm 0.08) mogao bi biti direktan pokazatelj HO, s obzirom na postojeće dokaze da su njegove razine povišene u serumu pacijenata s HO te da inhibicija TGF- β 1 smanjuje progresiju HO u životinjskom modelu. Također, TGF- β 1 je važan regulator hondrogene diferencijacije, koja je ključan korak u procesu enhondralne osifikacije koja se odvija pri HO (78,79). Rezultati citokinske analize za

ispitanike s FOP-om u stanju remisije (bez *flare-up-a*) pokazuju da im je zajednički porast IL-3 i IL-8, koji unatoč tome što relativna povećanja iznose između 5 i 30%, odskoču od ostalih citokina koji su pretežito blizu kontrolnih vrijednosti ili snižene. Navedeni porast nalazimo i u ispitanika s *flare-up-om* te rezultatima Barrueta i sur. koji su također detektirali elevacije navedenih citokina (27). Nasuprot tome, u istraživanju Hildebrand i sur. nisu našli značajnih razlika u razinama proupalnih citokina između FOP pacijenata i kontrolne skupine (28). U istraživanju ozljedom izazvane HO, povišene razine IL-3 u ozlijeđenih povezane su s nastankom HO (80). Također, IL-3 predstavlja hematopoetski citokin važan za razvoj mijeloičnih stanica važnih u patogenezi FOP-a (7,8).

Ispitanici s koštanim prijelomom su za potrebe citokinske analize praćeni kroz vremenski period od 1. do 21. dana poslije prijeloma, tijekom kojeg su im uzeti uzorci u dvije vremenske točke, kako bi se identificirale moguće različitosti u citokinskom profilu između početne (upalne) faze koštanog cijeljenja i faze formiranja fibroartilaginoznog (mekog) kalusa (10). Najizraženiji porast relativne koncentracije u obje skupine s koštanim prijelomima (u objema vremenskim točkama) pokazali su citokini MCP-1 i RANTES. Dokazano je da MCP-1 ima važnu ulogu u regulaciji osteoklastogeneze i samim time je važan u koštanom remodeliranju, kao i RANTES, koji djeluje kao kemoatraktant za osteoblaste (81,82). Njihov izražen porast u obe vremenske točke mogao bi sugerirati njihovu ključnu ulogu u početnim fazama fiziološkog koštanog cijeljenja. Uspoređujući rezultate ispitanika iz FOP skupina s onima iz skupina s koštanim prijelomom, vidljivo je da je izražen porast MCP-1 i RANTES zajednički svim ispitivanim skupinama. Uz njegove već navedene uloge, povišene razine MCP-1 povezane su i sa pojavnošću HO (83).

Analizirani uzorci pacijenata s koštanim prijelomima podijeljeni su i prema vrsti (lokaciji) koštanog prijeloma na prijelome metafize i prijelome dijafize kosti, kako bi se mogle analizirati eventualne razlike u njihovim citokinskim profilima u različitim vremenskim točkama. Očekivana promjena profila citokina između dvije vremenske točke (faze cijeljenja) uočena je u skupini s prijelomom dijafize, gdje je uočena razlika u broju i vrsti citokina čija je ekspresija povišena, dok takva uočljiva razlika nije uočena u skupinama s prijelomom metafize. U prvoj vremenskoj točki za prijelome dijafize povišenje relativne ekspresije uočeno je za 9, a u drugoj točki za 12 citokina. Većina povišenih citokina funkcionalno su pretežito upalni citokini (Tablica 1.), što je u skladu s postojećom literaturom koja početnu fazu koštanog cijeljenja smatra upalnom fazom tijekom koje se luče proupalni citokini (8,9,84). Iako bi se mogao očekivati veći broj proupalnih citokina u prvoj nego u drugoj vremenskoj točki, do uočene razlike u rezultatima je moglo doći zbog djelomičnog preklapanja faza cijeljenja koje

nisu oštro vremenski odijeljene, kao i zbog terapijskih i kirurških intervencija koje se nisu uvijek odvijale prvi dan prijeloma te su samim time mogle utjecati na tijek ciljenja i ekspresiju citokina (10,85). Razmatrajući dobivene rezultate te opće i specifične uloge citokina, može se pretpostaviti da je više citokina uključeno u patofiziologiju HO kod FOP-a, od kojih su neki (poglavito MCP-1 i RANTES) važni i u fiziološkom procesu okoštavanja, dok su drugi, primjerice IL-1, IL-3, IL-8 i TGF- β 1 potencijalno specifični i ključni za upalni proces i patološko okoštavanje u FOP-u.

Brojna istraživanja pokazala su važnost citokina i EV- a kao ključnih komponenata u koštanom metabolizmu i procesu koštanog cijeljenja, zbog čega su odabrani kao jedan od glavnih elemenata istraživanja u uzorcima krvne plazme (2–6). Analiza proteinskog sadržaja EV iz krvne plazme doprinosi razumijevanju uloge EV u koštanom metabolizmu i promjena kojima podliježu ovisno o stanju organizma iz kojeg potječu. Zbog raznolikosti njihovog sadržaja i bioloških funkcija, EV izazivaju rastući interes u biomedicinskim istraživanjima (86). Izolacija proteina iz EV i bioinformatička analiza poslije LC-MS rezultirala je identifikacijom različitog broja proteina koji je, s obzirom na ispitivane skupine, iznosio između 32 i 323 identificirana proteina. U usporedbi s rezultatima iz drugih istraživanja, koji opisuju od 92 do više stotina identificiranih proteina, taj broj je u pojedinim analiziranim skupinama relativno malen. Međutim, treba uzeti u obzir da su velike razlike mogle nastati zbog toga što su u tim istraživanjima za izolaciju EV korištene stanične kulture, dok je analiza EV iz krvne plazme Gidlöfa i sur. dala mnogo sličniji rezultat (92 proteina) (36,87,88).

Zbog varijabilnosti podataka o njihovoj veličini i pouzdanim metodama analize, uspješna izolacija EV iz bioloških tekućina i analiza njihovog proteinskog sadržaja predstavlja značajan izazov (36,89). Stoga je u ispitivanje uključena i analiza udjela identificiranih proteina koji su porijeklom iz EV, kako bi se minimizirala mogućnost da su analizirani proteini porijeklom iz drugog staničnog odjeljka. Rezultati te analize pokazuju da je među identificiranim proteinima između 68.77% (u skupini FOP u remisiji) i čak 85.71% (u kontrolnoj skupini) porijekla iz EV, što ukazuje na ispravnost postupaka njihove izolacije iz krvne plazme i omogućuje daljnju funkcionalnu analizu proteina. Za analizu proteina iz EV pomoću LC-MS odabrani su uzorci ispitanika s koštanim prijelomima iz druge vremenske točke (razdoblje između 7. i 21. dana poslije prijeloma), zbog pretpostavke da će u navedenom vremenskom periodu doći do tranzicije koštanog cijeljenja iz početne (upalne) faze u fazu stvaranja mekog kalusa, a samim time i do pojačanog lučenja faktora rasta i diferencijacije koji su određeni kao molekule interesa za analizu (9,90).

Identificirani proteini su analizirani s obzirom na udio koji je uključen u stanične

processe signalne transdukcije, stanične komunikacije, staničnog rasta i/ili održavanja i staničnog transporta. Navedeni procesi su odabrani kao mogući globalni pokazatelji dinamike stanične aktivnosti koja potencijalno odražava promjene koštanog metabolizma (90). Rezultati su pokazali da je u većini proučavanih procesa najveći udio proteina iz skupine s koštanim prijelomom, što pokazuje da se lokalna promjena na mjestu prijeloma potencijalno može odraziti na razini krvne plazme, odnosno sadržaja EV-a. Najizraženija razlika je vidljiva u parametru staničnog rasta i/ili održavanja, gdje je udio uključenih proteina u kontrolnoj skupini 6.1%, a u skupini s koštanim prijelomom čak 34.7%. Rezultati za FOP skupine ukazuju na to da se, u usporedbi s kontrolnom skupinom, nalaze veći relativni udjeli proteina u svim ispitivanim procesima te da se najveća promjena događa u sastavu EV proteina koji su uključeni u stanični rast i/ili održavanje. Međusobnom usporedbom dvaju FOP skupina vidljivo je da u ovim ispitivanim parametrima nema izražene razlike između ispitanika tijekom *flare-up*-a i remisije. Navedeno se može usporediti s rezultatima istraživanja koja su pokazala da promjene fizioloških i patoloških stanja (uključujući i koštano remodeliranje) mogu utjecati na oslobađanje i sadržaj EV- a (91,92). Rezultati drugih istraživanja pokazuju da EV-i tijekom koštanog cijeljenja prenose brojne faktore rasta važne za koštano remodeliranje, osteogenezu i angiogenezu, što bi moglo objasniti razliku u udjelu proteina važnih za stanični rast (6).

Provedena je i analiza udjela identificiranih proteina koji su uključeni u stanične puteve važne u cijeljenju prijeloma i enhondralnom okoštavanju. Za analizu su odabrani signalni putevi BMP, TGF- β , Wnt, VEGF, PDGF i IGF-1, koji se u literaturi navode kao ključni u navedenim procesima (10,90,93). Također se BMP, TGF- β i Wnt signalni putevi specifično navode kao podležeci u procesima heterotopne osifikacije, kao što je to u FOP-u (94). Istraživanja su također pokazala da bi i VEGF, PDGF i IGF-1 signalni putevi mogli imati važne uloge u heterotopnoj osifikaciji (95–97). Rezultati su pokazali da je udio proteina uključenih u sve navedene signalne puteve najveći u skupini s koštanim prijelomom. Istraživanja se višestruko poklapaju s navedenim rezultatima, navodeći da su u EV porijeklom iz aktiviranih mezenhimalnih matičnih stanica identificirani Wnt, TGF, PDGF i BMP signalni putevi te da EV porijeklom iz osteoblasta promoviraju diferencijaciju stromalnih stanica koštane srži u osteoblaste putem Wnt signalnog puta (98–100). Također, istraživanje Kim i sur. je pokazalo da EV porijeklom iz trombocita moduliraju proliferaciju i funkcije endotelnih stanica putem VEGF signalnog puta, a Nahar i sur. zaključuju da su EV u koštanim pločama rasta prenosioci BMP i VEGF molekula (101,102). Unatoč dokazima o važnosti ovih signalnih puteva i EV-a u procesima fiziološkog koštanog cijeljenja i patološke HO, u skupinama s FOP-om nije uočljiv izražen porast u udjelu proteina ovih signalnih puteva nasuprot kontrolne skupine. Relativni

udjeli proteina za BMP, TGF- β i Wnt signalne puteve usporedivi s razinama u kontrolnoj skupini, dok su te razine za VEGF, PDGF i IGF-1 čak i niže nego u kontrolnoj skupini. Usporedbom dviju FOP skupina, uočljivo je da je udio proteina u svim signalnim putevima neznatno veći u ispitanika s *flare-up*-om, što ukazuje na mogućnost modifikacije proteinskog sadržaja EV u tim uvjetima. S obzirom na nedostatak literature o ulozi i sastavu EV u patofiziologiji FOP-a, iz ovih se rezultata može pretpostaviti da unatoč njihovoj potencijalno ključnoj ulozi u HO-u, ispitivani signalni putevi u FOP-u ne djeluju putem EV-a na način koji bi bio u značajnoj mjeri različit od zdravih pojedinaca. Iz svega navedenog, može se zaključiti da proteinski sadržaj EV ima ulogu u signalnim putevima važnim za koštani metabolizam i da se lokalno patofiziološko stanje prijeloma može odraziti na zastupljenost ključnih proteina EV, što se odražava razlikom između kontrolne i skupine s prijelomom, dok se u pacijenata s FOP-om ne uočava povećanje nasuprot kontrolne skupine.

Osim signalnih puteva vezanih za koštani metabolizam, analizirani su i signalni putevi posredovani citokinima te su za analizu odabrani određeni citokini koji su analizirani i u plazmatskom određivanju citokinskog profila. Analize signalnih puteva citokina s najvećim faktorom promjene (npr. MCP-1 i RANTES) nisu provedene zbog ograničenih mogućnosti korištenog računalnog programa. Za sve analizirane signalne puteve citokina, osim IL-2 i IL-6, uočena je najveća zastupljenost proteina u skupini s prijelomom. Nadalje, usporede li se rezultati analize proteina EV-a s analizom citokinskog profila plazme, može se uočiti blago povišena relativna ekspresija citokina IL-2, IL-3, IL-5, IL-6 i TNF α u skupini s prijelomom dijafize koja se potencijalno odrazila i u sastavu proteina EV. Udio proteina u FOP skupinama uglavnom je usporediv s razinama kontrolne skupine. Međutim, međusobnom usporedbom FOP skupina vidljiv je veći udio signalnih puteva citokina IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, TNF i GM-CSF u ispitanika s *flare-up*-om, što se može usporediti s rezultatima citokinske analize plazme gdje je također vidljiv porast tih citokina u FOP *flare-up*-u nasuprot remisije. Istraživanja su pokazala da se citokini mogu lučiti i putem EV-a te da se njihove razine u plazmi u različitim stanjima i bolestima mogu odražavati i u sastavu EV-a (103). S obzirom na to da su brojni citokini važni za proces cijeljenja prijeloma te da je dokazano da EV mogu sudjelovati u signalizaciji posredovanoj citokinima, pa čak biti i put njihova izlučivanja, može se zaključiti da uočene razlike odražavaju sudjelovanje identificiranih EV proteina u koštanom cijeljenju signalnim putevima posredovanim citokinima (6,14,84,103). Također, može se zaključiti da rezultati nisu pokazali da EV proteini imaju ključnu ulogu u staničnoj signalizaciji u FOP pacijenata, unatoč izraženoj razlici koja je vidljiva u plazmatskoj razini citokina. Međutim, iz

rezultata se može pretpostaviti da se sastav EV proteina mijenja tijekom faza egzacerbacije bolesti nasuprot faza remisije.

Pri donošenju potencijalnih zaključaka, nužno je istaknuti i nedostatke ovog istraživanja. Nedostatak predstavlja relativno malen broj ispitanika, poglavito broj ispitanika s FOP-om, koji je zbog iznimne rijetkosti bolesti (1:2,000,000) posebno ograničen. Također, problem u analizi rezultata pacijenata s FOP-om je potencijalni utjecaj medikamentozne i radioterapije koja se primjenjuje i, između ostalog, može odražavati na razine citokina (104). U ispitanika s koštanim prijelomima koji su prije uzimanja uzoraka liječeni operativno, također se ne mogu isključiti potencijalni utjecaji na razini krvne plazme (85). Promjene i razlike koje su uočene na razini plazmatskih citokina i EV proteina trebaju se ispitati na većim uzorcima i pouzdanim kvantitativnim metodama analize kako bi se mogla ustvrditi statistička značajnost uočenog.

Prednost provedenog istraživanja predstavlja korištenje više proteomskih metoda analize krvne plazme, koja je uključivala analizu ekspresije relativno velikog broja citokina te analizu pomoću LC-MS-a, koja omogućuje detaljne analize proteinskih profila bioloških tekućina (58). Provedeno istraživanje učinilo je korak naprijed u pronalasku i standardizaciji odgovarajućih protokola za izolaciju i analizu EV, koja i dalje predstavlja velik izazov u biomedicinskim istraživanjima (105). Istraživanja koja se bave rijetkim bolestima, a poglavito FOP-om, unatoč tome što su relativno malobrojna, predstavljaju važan korak naprijed prema razumijevanju i potencijalnom liječenju ove teške bolesti (18). Navedeno se odražava u činjenici da unatoč opsežnom pretraživanju dostupne literature, nije pronađeno ni jedno istraživanje koje je koristilo metode i slične ispitivane skupine pacijenata obuhvaćene ovim istraživanjem.

7. Zaključci

Provedenim istraživanjem napravljena je proteomska analiza krvne plazme ispitanika s FOP-om i ispitanika s koštanim prijelomom te su analizirani dobiveni rezultati iz kojih se može zaključiti:

1. Citokinski profil ispitanika s FOP-om pokazuje različitu relativnu ekspresiju citokina od ispitanika s koštanim prijelomom, pri čemu je veći faktor promjene u velikom broju citokina posebno izražen kod ispitanika u fazi egzacerbacije bolesti (engl. *flare-up*), tijekom koje dolazi do HO-a.
2. U svim ispitivanim skupinama izražen je visok faktor promjene relativne ekspresije citokina MCP-1 i RANTES u usporedbi s kontrolnom skupinom, dok su IL-1, IL-3, IL-8 i TGF- β 1 potencijalno specifični i ključni za upalni proces i patološko okoštavanje u FOP-u.
3. Proteinski sadržaj EV-a izoliranih iz krvne plazme razlikuje se između analiziranih skupina s obzirom na relativni udio proteina uključen u pojedine stanične biološke procese i signalne puteve.
4. Proteinski sadržaj EV-a ima ulogu u signalnim putevima važnim za koštani metabolizam te se lokalno patofiziološko stanje koštanog prijeloma potencijalno može odraziti na funkciju proteina u EV-u.
5. Proteinski sadržaj EV-a izoliranih od ispitanika s FOP-om ne pokazuje odstupanja od ostalih skupina koja bi upućivala na njihovu važnost u patofiziologiji FOP-a.

8. Zahvale

Zahvalu prvenstveno dugujem svojoj mentorici prof.dr.sc. Lovorki Grgurević na ogromnoj podršci i pomoći koju mi kontinuirano i nesebično pruža, kao i na vremenu i trudu uloženom u izradu ovog rada, bez kojeg on uistinu ne bi bio moguć. Osim toga, zahvalna sam joj na tome što me kroz zajednički rad podučila znanstvenom načinu razmišljanja te važnosti znatiželje, upornosti i integriteta u znanosti i životu.

Veliku zahvalu dugujem i dr.sc. Ruđeru Novaku na pomoći, savjetima i podršci koje mi je pružio u izvedbi eksperimentalnog dijela rada i analizi podataka, bez kojih ovaj rad također ne bi bio moguć.

Želim zahvaliti i dr.sc. Tomislavu Vlahoviću i osoblju Klinike za traumatologiju KBC-a Sestre milosrdnice kao i prof.dr.sc. Simeonu Graziju na pomoći i suradnji pri uključivanju pacijenata u istraživanje i prikupljanju uzoraka. Veliko hvala svim pacijentima koji su velikodušno pristali sudjelovati u ovom istraživanju.

Zahvaljujem i svojim prijateljima i kolegama Grguru Salaju i Jošku Bilandžiću na pomoći pri prikupljanju uzoraka, analizi podataka i kontinuiranoj podršci.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na svakodnevnoj podršci i ljubavi koju mi pružaju te na svemu što su učinili da se šestogodišnji studij pretvori u najljepše moguće razdoblje.

9. Literatura

1. Kitoh H. Clinical aspects and current therapeutic approaches for FOP. *Biomedicines*. 2020 Sep;8(9).
2. Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. Proteomics: Technologies and their applications. *J Chromatogr Sci*. 2017 Feb 1;55(2):182–96.
3. Kupcova Skalnikova H, Cizkova J, Cervenka J, Vodicka P. Advances in Proteomic Techniques for Cytokine Analysis: Focus on Melanoma Research. *Int J Mol Sci*. 2017 Dec;18(12).
4. Panfoli I, Santucci L, Bruschi M, Petretto A, Calzia D, Ramenghi LA, i sur. Microvesicles as promising biological tools for diagnosis and therapy. *Expert Rev Proteomics*. 2018 Oct 3;15(10):801–8.
5. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Barnes GL, Einhorn TA. Cytokines and fracture healing. *Curr Opin Orthop*. 2001;12(5):403–8.
6. Qiao Z, Greven J, Horst K, Pfeifer R, Kobbe P, Pape HC, i sur. Fracture Healing and the Underexposed Role of Extracellular Vesicle-Based Cross Talk. *Shock*. 2018 May;49(5):486–96.
7. Matsuo K, Chavez RD, Barruet E, Hsiao EC. Inflammation in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva and Other Forms of Heterotopic Ossification. *Curr Osteoporos Rep*. 2019 Dec;17(6):387–94.
8. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. *Patofiziologija*. Knjiga prva. 7. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 410–414, 599–600
9. Morgan EF, De Giacomo A, Gerstenfeld LC. Overview of skeletal repair (fracture healing and its assessment). *Methods Mol Biol*. 2014;1130:13–31.
10. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: Mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol*. 2015 Jan;11(1):45–54.
11. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol*. 2008;19(5):459–66.
12. Schell H, Duda GN, Peters A, Tsitsilonis S, Johnson KA, Schmidt-Bleek K. The haematoma and its role in bone healing. *J Exp Orthop*. 2017 Dec;4(1):5.

13. Hauser CJ, Zhou X, Joshi P, Cuchens MA, Kregor P, Devidas M, i sur. The immune microenvironment of human fracture/soft-tissue hematomas and its relationship to systemic immunity. *J Trauma - Inj Infect Crit Care*. 1997 May;42(5):895–904.
14. Schmidt-Bleek K, Schell H, Lienau J, Schulz N, Hoff P, Pfaff M, i sur. Initial immune reaction and angiogenesis in bone healing. *J Tissue Eng Regen Med*. 2014 Feb 1;8(2):120–30.
15. Dumic-Cule I, Peric M, Kucko L, Grgurevic L, Pecina M, Vukicevic S. Bone morphogenetic proteins in fracture repair. *Int Orthop*. 2018;42(11):2619–26.
16. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011 Jun;42(6):551–5.
17. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis P V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*. 2005 Dec 1;36(12):1392–404.
18. Kaplan FS, Le Merrer M, Glaser DL, Pignolo RJ, Goldsby RE, Kitterman JA, i sur. Fibrodysplasia ossificans progressiva. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008 Mar;22(1):191–205.
19. Kaplan FS, Chakkalakal SA, Shore EM. Fibrodysplasia ossificans progressiva: Mechanisms and models of skeletal metamorphosis. *DMM Dis Model Mech*. 2012 Nov;5(6):756–62.
20. Pignolo RJ, Suda RK, Kaplan FS. The fibrodysplasia ossificans progressiva lesion. *Clin Rev Bone Miner Metab*. 2005;3(3–4):195–200.
21. Gannon FH, Glaser D, Caron R, Thompson LDR, Shore EM, Kaplan FS. Mast cell involvement in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Hum Pathol*. 2001 Aug;32(8):842–8.
22. Scarlett RF, Rocke DM, Kantanie S, Patel JB, Shore EM, Kaplan FS. Influenza-like viral illnesses and flare-ups of fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;(423):275–9.
23. Lanchoney TF, Cohen RB, Rocke DM, Zasloff MA, Kaplan FS. Permanent heterotopic ossification at the injection site after diphtheria-tetanus-pertussis immunizations in children who have fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Pediatr*. 1995;126(5):762–4.
24. Kaplan FS, Glaser DL. Thoracic insufficiency syndrome in patients with fibrodysplasia

- ossificans progressiva. *Clin Rev Bone Miner Metab.* 2005;3(3–4):213–6.
25. Meyers C, Lisiecki J, Miller S, Levin A, Fayad L, Ding C, i sur. Heterotopic Ossification: A Comprehensive Review. *JBMR Plus.* 2019;3(4).
 26. Macias MP, Fitzpatrick LA, Brenneise I, McGarry MP, Lee JJ, Lee NA. Expression of IL-5 alters bone metabolism and induces ossification of the spleen in transgenic mice. *J Clin Invest.* 2001;107(8):949–59.
 27. Barruet E, Morales BM, Cain CJ, Ton AN, Wentworth KL, Chan T V., i sur. NF- κ B/MAPK activation underlies ACVR1-mediated inflammation in human heterotopic ossification. *JCI insight.* 2018 Nov;3(22).
 28. Hildebrand L, Gaber T, Kühnen P, Morhart R, Unterbörsch H, Schomburg L, i sur. Trace element and cytokine concentrations in patients with Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP): A case control study. *J Trace Elem Med Biol.* 2017;39:186–92.
 29. Grgurević L, Novak R, Trkulja V, Hamzić LF, Hrkač S, Grazio S, i sur. Elevated plasma RANTES in fibrodysplasia ossificans progressiva – A novel therapeutic target? *Med Hypotheses.* 2019;131(July).
 30. Haviv R, Moshe V, De Benedetti F, Prencipe G, Rabinowicz N, Uziel Y. Is fibrodysplasia ossificans progressiva an interleukin-1 driven auto-inflammatory syndrome? *Pediatr Rheumatol.* 2019 Dec;17(1):1–7.
 31. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27–37.
 32. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000 Aug 1;118(2):503–8.
 33. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 2000;117(4):1162–72.
 34. Abbas AK, Lichtmann AH, Pillai S. Stanična i molekularna imunologija. 8. izdanje. Batinić D, Lukinović-Škudar V, ur. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 208-209, 399–435, 493-495.
 35. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, i sur. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Aug;68(16):2667–88.
 36. Subedi P, Schneider M, Philipp J, Azimzadeh O, Metzger F, Moertl S, i sur. Comparison

- of methods to isolate proteins from extracellular vesicles for mass spectrometry-based proteomic analyses. *Anal Biochem.* 2019 Nov;584:113390.
37. Van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. Mattson MP, editor. *Pharmacol Rev.* 2012 Jul 1;64(3):676–705.
 38. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int.* 2010 Nov;78(9):838–48.
 39. Srivastava A, Amreddy N, Pareek V, Chinnappan M, Ahmed R, Mehta M, i sur. Progress in extracellular vesicle biology and their application in cancer medicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology.* 2020 Jul;12(4):e1621.
 40. Menck K, Bleckmann A, Schulz M, Ries L, Binder C. Isolation and characterization of microvesicles from peripheral blood. *J Vis Exp.* 2017;2017(119):e55057.
 41. Möller A, Lobb RJ. The evolving translational potential of small extracellular vesicles in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(12):697–709.
 42. Xu K, Liu Q, Wu K, Liu L, Zhao M, Yang H, i sur. Extracellular vesicles as potential biomarkers and therapeutic approaches in autoimmune diseases. *J Transl Med.* 2020 Nov;18(1):432.
 43. Shah R, Patel T, Freedman JE. Circulating Extracellular Vesicles in Human Disease. Vol. 379, *New England Journal of Medicine.* United States; 2018. p. 2179–81.
 44. Muraca M, Cappariello A. The role of extracellular vesicles (Evs) in the epigenetic regulation of bone metabolism and osteoporosis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):1–21.
 45. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. *Medicinska naklada. Harperova ilustrirana biokemija.* 28. izdanje. Lovrić J, Sertić J, ur. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 22-29, 165–172.
 46. Cox J, Mann M. Is Proteomics the New Genomics? *Cell.* 2007 Aug;130(3):395–8.
 47. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem.* 2005 Dec;51(12):2415–8.
 48. Mishra M, Tiwari S, Gomes A V. Protein purification and analysis: Next generation

- western blotting techniques. *Expert Rev Proteomics*. 2017 Nov;14(11):1037–53.
49. Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J Proteomics*. 2010 Oct;73(11):2064–77.
 50. Macbeath G. Protein microarrays and proteomics. *Nat Genet*. 2002 Dec;32(4S):526–32.
 51. Gevaert K, Vandekerckhove J. Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis*. 2000 Apr 1;21(6):1145–54.
 52. Sharon M, Robinson C V. The role of mass spectrometry in structure elucidation of dynamic protein complexes. *Annu Rev Biochem*. 2007 Jun 7;76(1):167–93.
 53. Apweiler R. The Universal Protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*. 2007/11/27. 2008 Jan;36(SUPPL. 1):D190–5.
 54. Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek MC, Yates JR. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem Rev*. 2013 Apr;113(4):2343–94.
 55. Yates JR. Mass spectrometry and the age of the proteome. *J Mass Spectrom*. 1998 Jan;33(1):1–19.
 56. Wu CC, MacCoss MJ. Shotgun proteomics: Tools for the analysis of complex biological systems. *Curr Opin Mol Ther*. 2002 Jun;4(3):242–50.
 57. Karpievitch Y V., Polpitiya AD, Anderson GA, Smith RD, Dabney AR. Liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics: Biological and technological aspects. *Ann Appl Stat*. 2010;4(4):1797–823.
 58. Ferguson PL, Smith RD. Proteome analysis by mass spectrometry. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2003;32:399–424.
 59. Boysen RI, Hearn MTW. High-Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins. *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry*. 2011. p. 167–210. (Major Reference Works; vol. 5).
 60. Li Y, Chen SK, Li L, Qin L, Wang XL, Lai YX. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *J Orthop Transl*. 2015;3(3):95–104.
 61. BioRender. [Internet]. 2021. Dostupno na: <https://biorender.com/>
 62. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image

- analysis. *Nat Methods*. 2012 Jul;9(7):671–5.
63. Morpheus [Internet]. 2021. Dostupno na: <https://software.broadinstitute.org/morpheus/>
 64. Fonseka P, Pathan M, Chitti S V., Kang T, Mathivanan S. FunRich enables enrichment analysis of OMICs datasets. *J Mol Biol*. 2021 May;433(11):166747.
 65. Roberts AW. G-CSF: A key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors*. 2005 Mar 1;23(1):33–41.
 66. Bhattacharya P, Budnick I, Singh M, Thirupathi M, Alharshawi K, Elshabrawy H, i sur. Dual Role of GM-CSF as a Pro-Inflammatory and a Regulatory Cytokine: Implications for Immune Therapy. *J Interferon Cytokine Res*. 2015/03/24. 2015 Aug;35(8):585–99.
 67. Ahuja SK, Murphy PM. The CXC Chemokines Growth-regulated Oncogene (GRO) α , GRO β , GRO γ , Neutrophil-activating Peptide-2, and Epithelial Cell-derived Neutrophil-activating Peptide-78 Are Potent Agonists for the Type B, but Not the Type A, Human Interleukin-8 Receptor*. *J Biol Chem*. 1996;271(34):20545–50.
 68. Caunt M, Hu L, Tang T, Brooks PC, Ibrahim S, Karpatkin S. Growth-Regulated Oncogene Is Pivotal in Thrombin-Induced Angiogenesis. *Cancer Res*. 2006 Apr 15;66(8):4125 LP – 4132.
 69. Dinarello CA, Wolff SM. The Role of Interleukin-1 in Disease. *N Engl J Med*. 1993 Jan 14;328(2):106–13.
 70. Frenzl G. Interleukin 3: from colony-stimulating factor to pluripotent immunoregulatory cytokine. *Int J Immunopharmacol*. 1992 Apr;14(3):421–30.
 71. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol*. 1993 May;64(5 Suppl):456–60.
 72. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *J Interf Cytokine Res*. 2009;29(6):313–25.
 73. Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1994 Oct;8(13):1055–60.
 74. Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, Puccini A, Berger MD, Soni S, i sur. CXCL9,

- CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy. *Cancer Treat Rev.* 2018 Feb;63:40–7.
75. Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol* [Internet]. 2001 Feb 1;22(2):83–7.
 76. Ignjatovic V, Geyer PE, Palaniappan KK, Chaaban JE, Omenn GS, Baker MS, i sur. Mass Spectrometry-Based Plasma Proteomics: Considerations from Sample Collection to Achieving Translational Data. *J Proteome Res.* 2019 Dec;18(12):4085–97.
 77. Convente MR, Wang H, Pignolo RJ, Kaplan FS, Shore EM. The Immunological Contribution to Heterotopic Ossification Disorders. *Curr Osteoporos Rep.* 2015 Apr;13(2):116–24.
 78. Wang X, Li F, Xie L, Crane J, Zhen G, Mishina Y, i sur. Inhibition of overactive TGF- β attenuates progression of heterotopic ossification in mice. *Nat Commun.* 2018 Feb;9(1):551.
 79. Sorkin M, Huber AK, Hwang C, Carson WF, Menon R, Li J, i sur. Regulation of heterotopic ossification by monocytes in a mouse model of aberrant wound healing. *Nat Commun.* 2020 Feb;11(1):722.
 80. Forsberg JA, Potter BK, Polfer EM, Safford SD, Elster EA. Do inflammatory markers portend heterotopic ossification and wound failure in combat wounds? *Clin Orthop Relat Res.* 2014 Sep;472(9):2845–54.
 81. Mulholland BS, Forwood MR, Morrison NA. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1/CCL2) Drives Activation of Bone Remodelling and Skeletal Metastasis. *Curr Osteoporos Rep.* 2019 Dec;17(6):538–47.
 82. Brylka LJ, Schinke T. Chemokines in Physiological and Pathological Bone Remodeling. *Front Immunol.* 2019;10:2182.
 83. Evans KN, Forsberg JA, Potter BK, Hawksworth JS, Brown TS, Andersen R, i sur. Inflammatory Cytokine and Chemokine Expression is Associated With Heterotopic Ossification in High-Energy Penetrating War Injuries. *J Orthop Trauma.* 2012 Nov;26(11):e204–13.
 84. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, i sur. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF- κ B ligand (osteoprotegerin ligand) and related

- proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2001 Jun 1;16(6):1004–14.
85. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery.* 2000 Feb;127(2):117–26.
 86. Roy S, Hochberg FH, Jones PS. Extracellular vesicles: the growth as diagnostics and therapeutics; a survey. *J Extracell Vesicles.* 2018;7(1):1438720.
 87. Gidlöf O, Evander M, Rezeli M, Marko-Varga G, Laurell T, Erlinge D. Proteomic profiling of extracellular vesicles reveals additional diagnostic biomarkers for myocardial infarction compared to plasma alone. *Sci Rep.* 2019;9(1):8991.
 88. Cvjetkovic A, Jang SC, Konečná B, Höög JL, Sihlbom C, Lässer C, i sur. Detailed Analysis of Protein Topology of Extracellular Vesicles-Evidence of Unconventional Membrane Protein Orientation. *Sci Rep.* 2016 Nov;6:36338.
 89. Ramirez MI, Amorim MG, Gadelha C, Milic I, Welsh JA, Freitas VM, i sur. Technical challenges of working with extracellular vesicles. *Nanoscale.* 2018 Jan;10(3):881–906.
 90. Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley JW, Ahn J, i sur. Cellular biology of fracture healing. *J Orthop Res.* 2019 Jan;37(1):35–50.
 91. Liu M, Sun Y, Zhang Q. Emerging Role of Extracellular Vesicles in Bone Remodeling. *J Dent Res.* 2018 Jul;97(8):859–68.
 92. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, i sur. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015;4(2015):1–60.
 93. Majidinia M, Sadeghpour A, Yousefi B. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. *J Cell Physiol.* 2018 Apr;233(4):2937–48.
 94. Kan C, Chen L, Hu Y, Ding N, Lu H, Li Y, i sur. Conserved signaling pathways underlying heterotopic ossification. *Bone.* 2018 Apr;109:43–8.
 95. Hsu J, Keenan M. Current review of heterotopic ossification. *J Orthop.* 2010;20:126–30.
 96. Hwang C, Marini S, Huber AK, Stepien DM, Sorkin M, Loder S, i sur. Mesenchymal VEGFA induces aberrant differentiation in heterotopic ossification. *Bone Res.*

- 2019;7:36.
97. Davies OG, Grover LM, Lewis MP, Liu Y. PDGF is a potent initiator of bone formation in a tissue engineered model of pathological ossification. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018 Jan;12(1):e355–67.
 98. Kim HS, Choi DY, Yun SJ, Choi SM, Kang JW, Jung JW, i sur. Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *J Proteome Res*. 2012 Feb;11(2):839–49.
 99. Cui Y, Luan J, Li H, Zhou X, Han J. Exosomes derived from mineralizing osteoblasts promote ST2 cell osteogenic differentiation by alteration of microRNA expression. *FEBS Lett*. 2016 Jan;590(1):185–92.
 100. Anderson JD, Johansson HJ, Graham CS, Vesterlund M, Pham MT, Bramlett CS, i sur. Comprehensive proteomic analysis of mesenchymal stem cell exosomes reveals modulation of angiogenesis via nuclear factor-kappaB signaling. *Stem Cells*. 2016 Mar;34(3):601–13.
 101. Kim HK, Song KS, Chung JH, Lee KR, Lee SN. Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. *Br J Haematol*. 2004 Feb;124(3):376–84.
 102. Nahar NN, Missana LR, Garimella R, Tague SE, Anderson HC. Matrix vesicles are carriers of bone morphogenetic proteins (BMPs), vascular endothelial growth factor (VEGF), and noncollagenous matrix proteins. *J Bone Miner Metab*. 2008;26(5):514–9.
 103. Aiello A, Giannessi F, Percario ZA, Affabris E. An emerging interplay between extracellular vesicles and cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2020 Feb;51:49–60.
 104. Hoff P, Rakow A, Gaber T, Hahne M, Sentürk U, Strehl C, i sur. Preoperative irradiation for the prevention of heterotopic ossification induces local inflammation in humans. *Bone*. 2013 Jul;55(1):93–101.
 105. Xu R, Greening DW, Zhu HJ, Takahashi N, Simpson RJ. Extracellular vesicle isolation and characterization: Toward clinical application. *J Clin Invest*. 2016;126(4):1152–62.

10. Životopis

Rođena sam 13. studenog 1996. godine i studentica sam 6. godine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U Puli sam završila osnovnu školu i opću gimnaziju. Nakon prve godine studija, u prosincu 2016. godine, dodijeljena mi je Dekanova nagrada, a za znanstvenoistraživački rad "Postnatalni razvoj i promjene gornje i donje čeljusti" 2018. godine nagrađena sam Rektorovom nagradom. Tijekom studija sudjelovala sam kao demonstrator u izvođenju nastave iz predmeta Anatomija i klinička anatomija i Klinička propedeutika te sam član vodstva Studentske sekcije za pedijatriju.

Od 2018. godine, pod mentorstvom prof. dr. sc. Lovorke Grgurević, volontiram na Odjelu za proteomiku pri Centru za translacijska i klinička istraživanja te sam koautor nekoliko znanstvenih radova i kongresnih sažetaka.

Područja interesa su mi interna medicina i translacijska istraživanja.

Engleski i njemački jezik poznajem na C1 razini, a talijanski jezik na B1 razini.