

Primjena genske terapije i matičnih stanica u liječenju oštećenja hrskavice

Matolić Galic, Ivan

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:105:876755>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Matolić Galic

**Primjena genske terapije i matičnih stanica u liječenju oštećenja
hrskavice**

Diplomski rad



Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Frane Paića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2020/2021.

Kratice korištene u radu

ACI	– implantacija autolognih hondrocita
ECM	– ekstracelularni matriks
PCM	– pericelularni matriks
YLD	– godine proživljene s invaliditetom
TNF	– faktor tumorske nekroze
IL	– interleukin
MMP	– matrične metaloproteaze
BMI	– indeks tjelesne mase
NSAID	– nesteroidni protuupalni lijekovi
hES	– ljudske embrionalne matične stanice
ICM	– unutarnja stanična masa
MSC	– mezenhimalne matične stanice
iPSC	– inducirane pluripotentne matične stanice
N-CAM	– molekula adhezije živčanih stanica
TGF β	– transformirajući faktor rasta β
BMP	– koštani morfogenetski protein
IGF	– faktor rasta sličan inzulinu
PLA	– polilaktična kiselina
PGA	– poliglikolna kiselina
PLGA	– polilaktična-glikolna kiselina
PEI	– polietilenimin
rAAV	– rekombinantni adeno-povezani virus
WOMAC	– zapadni Ontario i McMaster sveučilište indeks osteoartritisa
VAS	– vizualna analogna skala (boli)
ODI	– Oswestry indeks invaliditeta
PGE ₂	– prostaglandin E ₂

Tablica sadržaja

Sažetak

Abstract

1. Uvod	1
2. Hrskavica	2
2.1. Zglobna hrskavica	3
2.2. Meniskusi	5
2.3. Intervertebralni diskovi	6
3. Oštećenja hrskavice	7
3.1. Osteoartritis	7
3.2. Ruptura meniskusa	9
3.3. Degenerativna bolest diska	10
4. Liječenje	11
4.1. Liječenje osteoartritisa	11
4.2. Liječenje ruptur meniskusa	13
4.3. Liječenje degenerativne bolesti diska	14
5. Matične stanice i hondrogeneza	15
5.1. Matične stanice	15
5.2. Hondrogeneza	18
6. Mehanizmi liječenja hrskavičnih defekata matičnim stanicama i genskom terapijom	20
6.1. Kokultura	20
6.2. Nosači matičnih stanica	21
6.3. Injiciranje matičnih stanica	23
6.4. Injiciranje egzosoma matičnih stanica	24
6.5. Genska terapija	25
7. Mogućnosti primjene matičnih stanica i genske terapije u odabranim patologijama hrskavice.	27
7.1. Matične stanice i genska terapija kao budućnost liječenja osteoartritisa	27
7.2. Primjena matičnih stanica i genske terapije kod patologije meniskusa	29
7.3. Primjena matičnih stanica i genske terapije kod degenerativne bolesti intervertebralnog diska	30
8. Zaključak	32
9. Zahvale	34
10. Popis literature	35
11. Životopis	46

Sažetak

„Primjena genske terapije i matičnih stanica u liječenju oštećenja hrskavice“

U posljednjih nekoliko stoljeća, životni tempo se neprestano ubrzava, a životni vijek je sve duži i stresniji. Prehrana je nezdrava, sve više i više ljudi je pretilo, a razvojem tehnologije razvijaju se i računala i obavljaju sve više posla, što dovodi do toga da znatan broj ljudi radi u uredu ili ima neko slično, sedentarno zanimanje. Sve gore navedeno su faktori rizika za razvoj jedne od degenerativnih bolesti hrskavice. Liječenje ovih bolesti je kompleksno, a terapijske metode su za sad ili nedovoljno efektivne dugoročno gledano ili pre invazivne u ranoj ili umjereno razvijenoj fazi bolesti. Razvojem regenerativne medicine, došlo do novog pogleda na metode liječenja oštećenja hrskavice jer postoji razlika između tkiva dobivenog popravkom hrskavice i onog dobivenog regeneracijom hrskavice. Cilj je svakako postići regeneraciju hijaline hrskavice, nasuprot cijeljenja fibroznom. Postoji velik broj modela koji se proučavaju kao potencijalne metode liječenja osteoartrisa, degenerativne bolesti diska i patologije meniskusa koje koriste matične stanice, najčešće mezenhimalne matične stanice. Ispituje se primjena matičnih stanica na nosačima, ubrizgavanje istih u zglobnu pukotinu ili pak injiciranje samo njihovih produkata u zglob u obliku egzosoma. Matične stanice mogu biti ubrizgane onakve kakve su izolirane, nepromijenjene ili se može njima manipulirati citokinima i faktorima rasta. Uz matične stanice, potencijal za korištenje u terapiji već navedenih bolesti ima i genska terapija koja se, isto kao i terapija matičnim stanicama, istražuje u raznim oblicima. Dio istraživanja kao vektore koristi viruse, najčešće adenoviruse i rekombinantne adeno-povezane viruse, drugi koriste neviralne vektore. U ovom pregledu literature su navedene činjenice iz trenutno dostupnih radova s tematikom matičnih stanica i genske terapije. Znanstvena zajednica se slaže da je ovo područje istraživanja zanimljivo i obećavajuće, ali se isto tako slaže i da nedostaje velik broj kvalitetnih istraživanja i dobro osmišljenih kliničkih pokusa.

Ključne riječi : matične stanice, genska terapija, hrskavica, osteoartritis, degenerativne bolesti hrskavice, regenerativna medicina

Abstract

„Application of gene therapy and stem cells in cartilage damage therapy“

During several last centuries, the pace of life is constantly getting faster and life span is getting longer and more stressful. Diet is unhealthy and statistics regarding obesity are catastrophic. Perpetual development of technology has lead to a situation in which most of the work is being done in front of a computer, sitting. Everything that was just stated is a risk factor for the development of degenerative cartilage disease. Treatment of these diseases is complex while therapy methods are either not effective enough in the long run or too invasive for a patient with mild disease. With the development of regenerative medicine, new perspectives concerning therapy methods have emerged because there is a big difference between tissue reparation and restoration. The goal of the treatment method should be hyaline cartilage restoration, as opposed to the reparation with fibrocartilage. There are numerous models of potential osteoarthritis, degenerative disc disease, and meniscus treatments that could be using mesenchymal stem cells in the future. Likewise, there are several methods for stem cell application being tested, such as stem cell scaffolds, injection of the cells in the joint and injection of the products of the stem cells via their exosomes. Stem cells can be used in therapy without any treatment with growth factors or cytokines, but many authors have experimented with the preparation of mesenchymal stem cells with different molecules. Besides stem cells, gene therapy has shown great potential for the treatment of degenerative cartilage diseases. There are quite a few ways of using gene therapy for these diseases. For instance, a portion of researchers uses adenoviruses, while other use recombinant adeno-associated viruses. Others use non-viral methods of gene transfer. The facts listed in this review are collected from scientific researches concerning gene therapy and stem cells. The scientific community agrees on the prosperity and theoretical possibilities of this area of research, but there is also a consensus that states that there is a further need for investigation and well-designed experiments and clinical trials.

Keywords: stem cells, gene therapy, cartilage, osteoarthritis, degenerative cartilage diseases, regenerative medicine

1. Uvod

Moderan i nezdrav stil života, produljenje životnog vijeka i epidemija pretilosti u svijetu su uvelike utjecali na porast prevalencije degenerativnih bolesti poput osteoartritis, osobito među starijom populacijom (1). Osteoartritisom je zahvaćeno oko 7% svjetske populacije (2), dok se taj postotak prema nekim autorima (3) penje i na više 50% od ukupnog stanovništva za populaciju stariju od 65 godina. Za razliku od starije populacije, u mlađoj populaciji do oštećenja hrskavice i dolazi zbog sportskih ozljeda, koje su najčešće povezane s profesionalnim i rekreativnim bavljenjem određenim sportovima, osobito nogometom, košarkom i američkim nogometom (4). Te ozljede tek kasnije mogu dovesti do osteoartritisu stradalih zglobova. Upravo je terapija matičnim stanicama novi oblik terapije koji ima potencijal prevenirati i liječiti ovu degenerativnu bolest.

Terapija oštećenja hrskavice se za potrebe uvodnog dijela ovog diplomskog rada može podijeliti na konzervativnu ili nekiruršku i kiruršku, a detaljniji opis terapijskih metoda se nalazi dalje u radu. U posljednjih dvadesetak godina se razvila metoda pod nazivom ACI (Autologous chondrocyte implantation) ili autologna implantacija hondrocita, koja je postala zlatni standard u terapiji hrskavičnih defekata (5). Napretkom molekularne biologije, ortopedije i općenito medicinskih znanosti otkrivene su nove metode koje bi se rezultatima mogle uspoređivati s ACI kao što je implantacija mezenhimalnih matičnih stanica (6). Mezenhimalne matične stanice bi mogle pronaći primjenu i kod bolesti vertebralnih diskova i meniskusa koljena.

Cilj ovog preglednog rada je iznijeti recentne i relevantne stavove i činjenice iz literature iz područja terapije oštećenja hrskavice s posebnim naglaskom na molekularno-biološke aspekte terapijskih metoda u kojima se koriste matične stanice te genska terapija.

2. Hrskavica

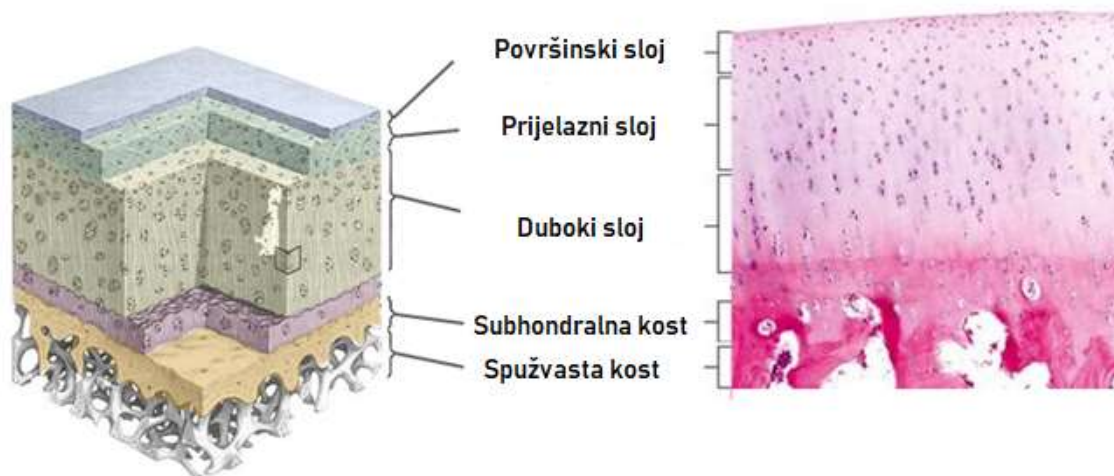
Hrskavica je avaskularno, aneuralno i alimfatično tkivo koje se, kao i ostala vezivna tkiva, sastoji od stanica (hondrocita), vlakana i ECM-a (ekstracelularnog matriksa) (7). Hondrociti su stanice koje se u zdravih odraslih osoba gotovo uopće ne dijele, a energiju proizvode i aerobnim i anaerobnim procesima, ovisno o uvjetima u kojima se nalaze. Nutrijente opskrbljuje tkivo perihondrija, a ako perihondrij nedostaje hrskavica dobiva nutrijente preko okolnih struktura, ponajviše sinovijalne tekućine. Do samih hondrocita nutrijenti dolaze procesom difuzije.

U ljudskom tijelu postoje tri vrste hrskavice : hijalina ili staklasta, elastična i vezivna ili fibrozna hrskavica. Perihondrij je vezivno tkivo koje okružuje hrskavicu i sastoji se od dva sloja. Vanjski sloj perihondrija sadrži krvne žile koje prehranjuju hrskavicu, a unutarnji sloj sadrži fibroblaste i osteohondroprogenitorne stanice koje se kasnije diferenciraju u osteoblaste i hondrocite. Hijalina hrskavica se naziva i staklastom zbog svog izgleda, a nalazi se u grkljanu, dušniku, bronhima, ventralnim krajevima rebara, epifiznim zonama rasta i na zglobnim površinama. Elastičnu hrskavicu nalazimo u uški, vanjskom slušnom hodniku, epiglotisu, grkljanu i bronhima, a osim vlakana koja su izgrađena od kolagena tipa II, sadrži i mrežu elastičnih vlakana. Vezivna hrskavica se uglavnom sastoji od kolagena tipa I i II i izgrađuje zglobne diskove i meniske, pubičnu simfizu, a nalazimo je i na mjestima insercije tetiva.

Hijalina i elastična hrskavica posjeduju perihondrij dok istog nema u vezivnoj hrskavici. Iznimka su zglobne hrskavice, koje se histološki svrstavaju u tip hijaline hrskavice, ali niti kod njih se ne nalazi perihondrij. Zglobne hrskavice su osobito podložne oštećenjima i degenerativnim promjenama zbog nedostatka perihondrija te zbog velikih sila koje djeluju na zglobove. Najčešće oštećenje hrskavice je oštećenje zglobne hrskavice koljena.

2.1. Zglobna hrskavica

Zglobna hrskavica je debela 2 – 4 mm. U sastavu ekstracelularnog matriksa zglobne hrskavice se nalaze proteini kolageni, među kojima dominira kolagen tip II koji s tipovima IX i tip XI stvara osnovnu strukturu, te proteoglikani, glikozaminoglikani, ostali proteini i voda (8) . Struktura zglobne hrskavice je kompleksna, podijeljena u četiri sloja. Površinski sloj je relativno tanak, s plosnatim hondrocitima i većim brojem kolagenih vlakana. U prijelaznom ili srednjem sloju nalazimo manje plosnate hondroците i slabije organizirana kolagenska vlakna. Isto tako, ovo je sloj s najviše proteoglikana. Duboki, odnosno bazalni sloj se sastoji od hondrocita koji su okrugli i posloženi u stupove, paralelno sa smjerom pružanja kolagenskih vlakana. Posljednji, najdublji sloj hrskavice se naziva kalcificiranom slojem. Glavna uloga kalcificiranog sloja zglobne hrskavice je povezivanje površnijih slojeva hrskavice sa subhondralnim dijelom kosti.



Slika 1. Slojevi zglobne hrskavice.

(slika preuzeta s <https://www.orthobullets.com/basic-science/9017/articular-cartilage>, prepravljena i prevedena)

Bitno je spomenuti i dio ekstracelularnog matriksa koji neposredno okružuje hondrocite – pericelularni matriks (PCM). PCM služi kao svojevrsna zona prijenosa biokemijskih, signalnih molekula i biofizikalnih faktora koji nastaju opterećenjem zgloba, te kao zona transporta između hondrocita i ekstracelularnog matriksa. Hondrocit s pripadajućim PCM tvori jedinicu – hondron.

Funkcija zglobne hrskavice je višestruka. Ona distribuira teret i smanjuje stres na subhondralnu kost zbog svojih elastičnih svojstava koja proizlaze iz kompleksne strukture hrskavice. Kolageni hrskavici daju oblik i vlačnu čvrstoću, dok proteoglikani zbog svoje polarnosti navlače molekule vode i uvelike pridonose elastičnosti i otpornosti na kompresiju (9). U zglobovima faktori trenja su niski zbog glatke površine hrskavice i zbog sinovijalne tekućine, koja služi kao lubrikant, pa pokreti u zglobu teku glatko.

2.2. Meniskusi

Meniskusi su male hrskavice koljena, oblika slova „C“ kojima je glavna uloga postići bolju kongruenciju zgloba i djelomično oteretiti hrskavicu zglobnih površina (10). Postoje medijalni i lateralni meniskus. Medijalni meniskus je polukružna hrskavica koja se nalazi između medijalnih kondila femura i tibije, te je srastao s kolateralnim ligamentom tibije pa je puno manje gibljiv nego lateralni. Lateralni meniskus je okruglastiji i pomičniji je jer nije srastao s ligamentima pa je i puno rjeđe oštećen. Nakon što osoba doživi odraslu dob, samo vanjskih 10-25% meniskusa je vaskularizirano, pa se ta zona naziva i vaskularnom odnosno neuralnom zonom ili crveno-crvenom zonom. Zona bez krvnih žila se naziva bijelo-bijelom zonom i upravo je ta avaskularna bijelo-bijela zona najpodložnija trajnim posttraumatskim i degenerativnim lezijama (11). Meniskusi su opterećeni velikim silama tlaka i vlaka, a mogu ih podnositi zbog svoje specifične strukture. U crveno-crvenoj zoni prevladava kolagen tip I, dok u bijelo-bijeloj zoni prevladava kolagen tip II. Uz kolagene u meniskusima pronalazimo i elastin, čiji utjecaj na biomehanička svojstva meniskusa još nije u potpunosti razotkriven (12).

2.3 Intervertebralni diskovi

Intervertebralni diskovi su hrskavične strukture koje se nalaze između svakog cervikalnog, torakalnog i lumbalnog kralješka, a iznimka su atlas i axis između kojih ne postoji disk. U ljudskom tijelu ukupno postoji 23 intervertebralna diska, a svaki se sastoji od debelog vanjskog, fibroznog prstena koji se naziva i annulus fibrosus i od unutarnjeg, mekanijeg dijela koji se naziva i nucleus pulposus. U nucleusu pulposusu je kolagen nasumično raspoređen (13), a uz kolagen se nalaze još i elastinska vlakna. Vanjski annulus fibrosus se sastoji od 12 do 25 koncentričnih prstenova, a kolagenska vlakna su postavljena otprilike pod 60° u odnosu na vertikalnu os. Elastična vlakna su postavljena između lamela (14).

Uz annulus fibrosus i nucleus pulposus treći dio intervertebralnog diska je završna ploča koja se nalazi na mjestu spajanja intervertebralnog diska s kralješkom. U intervertebralnim diskovima kod odraslih ljudi u pravilu nema krvnih žilica, ali u vanjskoj lamini annulusa fibrosusa postoje proprioceptori (15).

Funkcije diskova su bitne za pokretljivost tijela i uspravno hodanje kod čovjeka. Osnovna funkcija diska je da omogući pokrete između kralježaka. Druge funkcije diska su da apsorbira mehanički šok na kralješke i da distribuira teret koji kralježnica nosi. Osim ovih funkcija, struktura i cjelovitost diska su neophodne za održavanje intervertebralnih otvora dovoljno velikim za prolazak moždinskih živaca.

3. Oštećenja hrskavice

U ovom poglavlju su opisane patologije hrskavice u čijem se liječenju koriste matične stanice i genska terapija ili postoje istraživanja koja ispituju korištenje matičnih stanica ili genske terapije.

3.1. Osteoartritis

Ghuri i Conaghan (16) navode da je osteoartritisom zahvaćeno 242 milijuna ljudi na svijetu, a u istraživanju Global burden of diseases (17) iz 2019. godine stoji da je osteoartritis 15. bolest po broju YLD (Years lived with disability) s tendencijom blagog rasta na istoj tablici od 1990. godine. Iz ovih podataka je vidljivo da je osteoartritis, do kojeg dolazi nakon akutnog ili kroničnog oštećenja hrskavice, ozbiljan teret zajednici i zdravstvenim sustavima. Razlog tome je, što barem trećina osoba koje su oboljele od ove bolesti navodi da osjeti umjerenu do jaku bol u području zahvaćenog zgloba (16), a drugi simptomi su ukočenost, osjetljivost, gubitak fleksibilnosti zgloba i oteklina.

Postoji određeno razilaženje između razine oštećenja hrskavice i jačine kliničkih simptoma među pacijentima (18), ali je ipak bilo potrebno uvesti klasifikaciju stupnja oštećenja. Najpoznatija klasifikacija osteoartritisa je klasifikacija po Kellgreenu i Lawrenceu, koja na temelju rendgenske slike raspoznaje četiri stadija osteoartritisa. Znakovi po kojima se raspoznaje uznapredovalost osteoartritisa na rendgenskoj snimci su : suženje zglobne pukotine, osteofiti, subhondralna skleroza i ciste (19).

Etiologija osteoartritisa je raznolika, ali sigurno je da traume, genetika, prekomjerna tjelesna težina, metabolički sindrom, operacije i drugi upalni procesi pridonose razvoju ove bolesti. Molekularni mehanizmi u osteoartritisu su kompleksni. Prije prvih znakova

osteoartritisa dolazi do izmjena u molekularnom sastavu i organizaciji ECM (20). Hondroci se aktiviraju i dolazi do proliferacije. Oni se grupiraju, a u ostatku hrskavice dolazi do pojačane kalcifikacije i vaskularizacije (21). Iako se osteoartritis, već tradicionalno, smatra degenerativnom bolešću kojoj je glavni uzrok „wear and tear“, utvrđeno je da se zbog povećanog mehaničkog opterećenja dolazi do lučenja proupalnih citokina (TNF- α , IL-1 β i IL-6) i narušavanja homeostaze u ECM (22). Proupalni citokini udruženi s velikim opterećenjima zgloba dovode do aktivacije enzima iz skupine metaloproteaza matriksa (MMP) među koje spadaju kolagenaze i agrekanaze (23,24). Cilj u terapiji ranijih stadija osteoartritisa je spriječiti gubitak strukture, odnosno mreže kolagenih vlakana. U trenutku kada se izgubi kolagenska struktura, hrskavica se više ne može popraviti (21).

S biomehaničke strane, otkriveno je da dolazi do promjene u Youngovom modulu PCM kod hrskavice zahvaćene osteoartritisom. Youngov modul PCM-a, mjera elastičnosti tkiva, je značajno smanjen kod osteoartritisa kao posljedica djelovanja MMP-a (25). Prema nekim autorima, ove promjene PCM-a u osteoartritisu, osim što mogu biti znak bolesti, mogu biti i uzrok promjene hondrocične aktivnosti zbog već navedene važnosti PCM u prijenosu sila, svojevrsnih biomehaničkih signala, do hondrocita.(26).

3.2. Ruptura meniskusa

Do rupture meniskusa najčešće dolazi kod mlađe i populacije srednjih godina koje se bave sportom te kod starije populacije kod koje dolazi do degenerativnih promjena . Nagli, snažni, rotacijski pokreti u flektiranom koljenu su najčešći mehanizam nastanka ove ozljede. Uz ovakve pokrete koji su specifični za sportove poput nogometa, skijanja, košarke i rukometa, ulogu u rupturi meniskusa igraju i degenerativne promjene hrskavice. Faktori rizika za rupturu meniskusa, osim bavljenja već navedenim sportovima, su : svakodnevno klečanje i čučanje, uspinjanje uz stepenice, dugotrajno stajanje i fizički poslovi prenošenja tereta (27). Pacijenti se najčešće žale na bol pri rotaciji i ekstenziji koljena, oteklinu, nemogućnost potpune ekstenzije koljena - „zaključano koljeno“ i osjećaj preskakanja u koljenu. Sama ruptura meniska se dijeli na horizontalne, radijalne, longitudinalne, „flap“ rupture, degenerativne rupture i rupture nalik na dršku košarice („bucket-handle“). Važno je spomenuti da uz rupturu medijalnog meniskusa često ide i ruptura prednjeg ukriženog ligamenta i medijalnog kolateralnog ligamenta, što se poznato i pod nazivom „zlokobni trijas“.

3.3 Degenerativna bolest diska

Degenerativna bolest diska, koja za posljedicu ima bol u leđima, je izrazito čest uzrok dolaska liječnicima opće prakse i specijalistima. U ovoj bolesti dolazi do propadanja diskova i smanjenja udaljenosti između susjednih kralježaka i pritiskanja neuralnih struktura pa tako uz bol, degenerativna bolest diska može izazivati simptome nalik na radikulopatije, mijelopatije i spinalnu stenoza (28). Dolazi do smanjenja kvalitete života zbog bolova, a određena doza degeneracije diska može biti uzrok nastajanju protruzija i buldginga diska. Glavni mehanizam nastanka bolesti je smanjivanje količine proteoglikana u nucleusu pulposusu i posljedično smanjivanje osmotskog tlaka i gubitak vode (29). Nakon gubitka vode i promijene mehaničkih svojstava diska, dolazi do aktivacije MMP-a i dolazi do preoblikovanja ECM-a (30). Faktori rizika za degenerativnu bolest diska su starost, obiteljska anamneza, pušenje, pretilost, sedentarni stil života i traume.

4. Liječenje

U ovom poglavlju bit će govora o metodama liječenja gore navedenih patologija, a terapija matičnim stanicama i genska terapija bit će obrađene dalje u diplomskom radu.

4.1. Liječenje osteoartritisa

Trenutno, većina terapijskih metoda liječenja osteoartritisa temelji na umanjivanju simptoma i boli. Za početak, bitno je naglasiti važnost blage do umjerene tjelesne aktivnosti, fizikalne terapije i smanjenje BMI-ja iako je on visok. Medikamentozne metode se baziraju na smanjenju upale, pa se zato u blagom obliku najviše upotrebljavaju nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID), u teškom obliku mogu se upotrijebiti i analgetici koji nemaju protuupalno djelovanje, ali smanjuju bol, a u egzacerbaciji bolesti su preporučeni i kortikosteroidi intraartikularno (31). Uz kortikosteroide se mogu injicirati i preparati hijaluronske kiseline za koje se vjeruje da pomažu kod blagog do srednje teškog osteoartritisa. Cilj ubrizgavanja hijaluronske kiseline u zahvaćeni zglob je obnavljanje viskoelastičnih svojstava sinovijalne tekućine, pa se zato i ovaj oblik terapije naziva „viskosuplementacija“. Rezultati metaanaliza o poboljšanju bolesti nakon injiciranja hijaluronske kiseline su različiti, a omjer koristi i troška je upitan (32).

Nakon kortikosteroida i hijaluronske kiseline važno je spomenuti i preparate plazme bogate trombocitima, koji se također ubrizgavaju u zglob. Mehanizam akcije se temelji na otpuštanju faktora rasta iz trombocita koji će potaknuti hondrogenezu, diferencijaciju stanica, proliferaciju, a potisnut će upalu (33). Iako je ovaj oblik terapije obećavajuć, za korištenje plazme bogate trombocitima nedostaje jakih znanstvenih dokaza prvenstveno zbog nedostatka

biomarkera za praćenje bolesti i nepotpunog razumijevanja mehanizma djelovanja te su daljnja istraživanja neophodna (34).

Operacijsko liječenje je indicirano ako ne dođe do poboljšanja simptoma nakon medikamentoznog liječenja i smanjenja tjelesne težine. Kod malih zglobova šake postoje dvije opcije kirurškog liječenja. Prva opcija je artrodeza odnosno fuzija kostiju zahvaćenog zgloba. Druga opcija je rekonstrukcija. Kirurško liječenje razvijenog osteoartritisa kuka se temelji na ugradnji totalnih endoproteza kuka i pokrovnih endoproteza kuka. Kirurške terapijske opcije blažih oblika osteoartritisa kuka su ograničene i sastoje se od metoda poput osteotomije pelvisa i artroskopije kuka.

Oblik kirurškog liječenja osteoartritisa koljena koji će se provoditi ovisi o simptomima, stadiju bolesti i o dobi bolesnika. Prije svakog kirurškog liječenja je potrebno pokušati s nekirurškim opcijama. Artroskopska lavaža i debridment je operacija za koju je metanalizama utvrđeno da je korisna, odnosno da olakšava simptome kod osoba srednje i mlađe dobi s blagim do umjereno teškim osteoartritisom (35,36). Postupak se temelji na ispiranju viška tekućine i slobodnih tijela u zglobu (lavaža) te na zaglađivanju zglobne površine, odnosno na odstranjivanju oštećene hrskavice.

Nakon lavaže i debridmenta, treba spomenuti i abrazijsku artroplastiku, mikrofrakture, mozaikplastiku i presadak autologne hrskavice (ACI). Abrazijskom artroplastikom se instrumentom abraderom skida 1-2 mm subhondralne kosti kako bi došlo do krvarenja i grušanja krvi. Nakon grušanja dolazi do nakupljanja granulacijskog tkiva i pluripotentnih matičnih stanica koje pridonose reparaciji hrskavice (37). Artroplastika mikrofrakturama je proces sličan prethodno opisanoj abrazijskoj artroplastici. Mozaik plastika je autotransplantacija koštanog cilindra sa zdravom hrskavicom s mjesta manjeg opterećenja težinom na mjesto hrskavičnog defekta u koljenu. Presadak autologne hrskavice je proces

skupljanja hondrocita, umnožavanja *in vitro*, te se unose s ili bez nosača u područje defekta hrskavice (38).

Iduća kirurška opcija je korektivna osteotomija. Ona se koristi kada je osteoartritis izraženiji na jednoj strani koljena, a procedura se sastoji od vađenja klina kosti tibije ispod zdrave strane koljena kako bi rasteretio dio zahvaćen osteoartritisom. Ova metoda se koristi kod mlađe i aktivnije populacije (39). Ako se bolest ne stavi pod kontrolu i ne reagira se pravodobno, od kirurških metoda ostaje samo potpuna ili parcijalna artroplastika, odnosno ugrađivanje endoproteze koljena. Iako ugrađivanje endoproteze velikom broju pacijenata uvelike povećava kvalitetu života, njih 30% i dalje iskazuje nezadovoljstvo s istom (40).

4.2. Liječenje rupture meniskusa

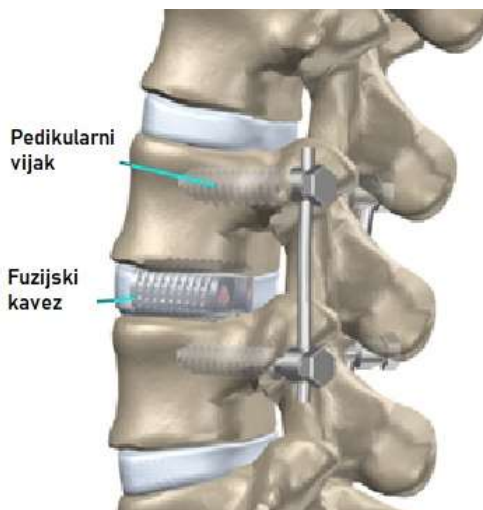
Odabir metode liječenja rupture meniska ovisi o veličini i lokalizaciji rupture, ali i o starosti pacijenta, razini fizičke aktivnosti i drugim ozljedama. Ako se manja ruptura dogodi u crvenoj zoni meniskusa, postoji mogućnost da ona sama zacijeli. A ako je ruptura veća i nalazi se u bijeloj zoni hrskavice meniskusa, mogućnost cijeljenja je manja. Ako simptomi nisu nepodnošljivi i prolaze, a samo koljeno nije „zaključano“ mogu se primijeniti nekirurške metode poput hlađenja koljena, umatanja zavojima, korištenja NSAID-a, fizikalne terapije i poštete koljena.

Iako istraživanja pokazuju da neoperativno liječenje rupture meniskusa, prvenstveno jačanje muskulature, pomaže pacijentima, trećina tih pacijenata se ipak odluči za operacijsko liječenje kako bi smanjili bol i poboljšali funkciju koljena (41). Prije operacije liječnik utvrđuje težinu i lokaciju rupture meniska uz pomoć magnetske rezonance i artroskopije. Operacije meniska su u današnje doba u pravilu artroskopske i manje invazivne od otvorenih operacija

koljena. Postoje tri opcije, a to su potpuna meniscektomija u kojoj liječnik odstranjuje meniskus u cijelosti, druga opcija je parcijalna meniscektomija u kojoj se odstranjuje samo dio meniska i popravak, odnosno šivanje meniska.

4.3. Liječenje degenerativne bolesti diska

Terapiju treba započeti s konzervativnim metodama. Za početak je ključno smanjiti bol koju pacijent osjeća pomoću fizioterapije, analgezije i promjene načina života, prvenstveno držanja i smanjenja tjelesne težine. Ako se pacijentu stanje ne poboljša nakon navedenih metoda i ima nepodnošljive bolove ili gubitak funkcije, on je kandidat za operacijsko liječenje. Opcije kirurškog liječenja su spinalna dekompresija, discektomija i fuzija kralježaka koja se sastoji od discektomije, ugradnje metalnog „cagea“ i fiksacije kralježaka. Fuzija kralježnice je gotova kada koštano tkivo preraste „cage“. Spinalna dekompresija ima cilj osloboditi živčane strukture od pritiska. Discektomija se može izvesti kao minimalno invazivna procedura ili kao operacija ugradnje umjetnog diska.



Slika 2. Grafički prikaz stanja nakon posteriorne fuzije kralježnice.
(preuzeto 12.6.2020 s <https://www.orthogate.org/patient-education/lumbar-spine/anterior-lumbar-fusion-with-cages> i prevedeno)

5. Matične stanice i hondrogeneza

U ovom poglavlju bit će govora o temeljnim podjelama i tipovima matičnih stanica, te o samom procesu diferencijacije istih u hondrocite.

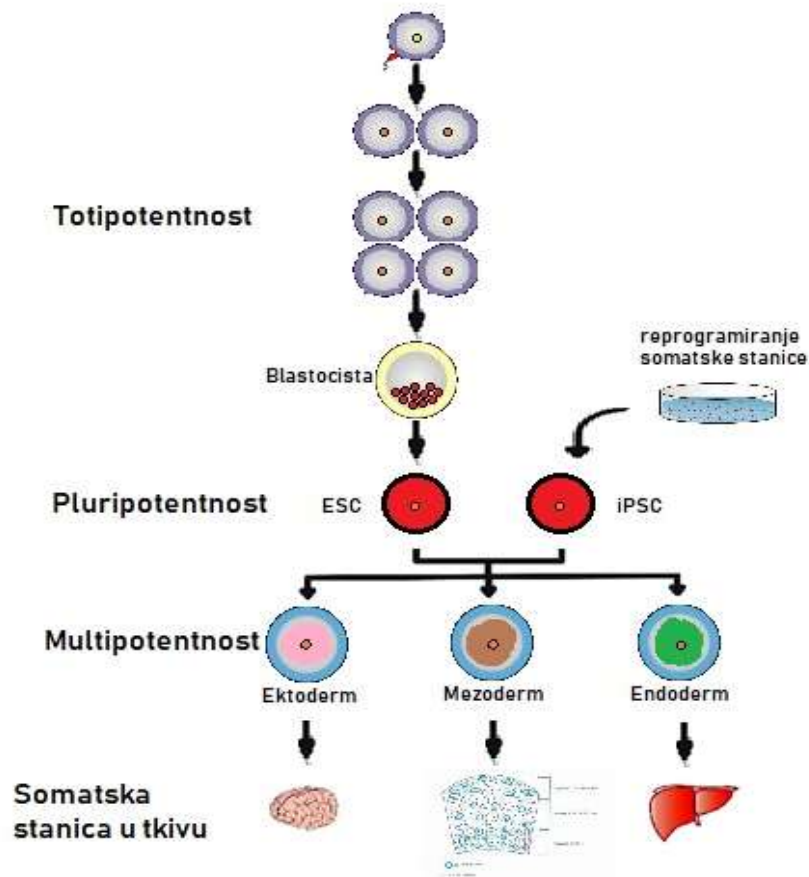
5.1. Matične stanice

Matične stanice čovjeka su prvi put izolirane 1994. godine iz blastociste (42), dok je prva linija ljudskih embrionalnih matičnih stanica (hES) nastala 1998. godine (43). Postoji više vrsta ljudskih matičnih stanica, a razlikuju se po potentnosti i po podrijetlu. Matična stanica mora ispunjavati dva uvjeta. Prvi uvjet je da se može diferencirati u specijalizirane stanice, a drugi uvjet je samoobnavljanje, odnosno sposobnost stanice da se dijeli i da se pritom ostaje u nediferenciranom obliku.

Rane embrionalne matične stanice su totipotentne i njih pronalazimo u embriju prije nego što dođe do formiranja blastociste. Ove stanice imaju potencijal diferencirati se u sve ljudske somatske stanice, ali i u ekstra-embrionalna tkiva, kao što je i posteljica. Nakon formiranja blastociste, stanice iz unutarnje mase stanica (ICM) više nisu totipotentne, nego pluripotentne. To znači da su izgubile dio diferencijacijskog potencijala, ali i dalje se mogu diferencirati u gotove sve stanice ljudskog tijela. Pluripotentne stanice se mogu dobiti još i iz fetusa, a iz pupkovine se mogu izolirati multipotentne stanice.

Multipotentne matične stanice se izoliraju i iz tkiva odrasle osobe, najčešće iz koštane srži, živaca, mišića, kosti, kože i periferne krvi (44). Tipovi matičnih stanica koje pronalazimo kod odraslih ljudi su mezenhimalne matične stanice, hematopoetske matične stanice i neuralne matične stanice. Multipotentne mezenhimalne matične stanice (MSC) možemo naći u više vrsta tkiva, ali se najčešće izoliraju iz koštane srži, masnog tkiva i iz pupkovine. One su po prvi

puta opisane u istraživanju Friedensteina 1968.godine kao stanice slične fibroblastima, izolirane iz koštane s mogućnošću diferencijacije u koštano tkivo (45). 2006. godine Međunarodno društvo za staničnu terapiju je odredilo tri kriterija koja moraju biti ispunjena kako bi se kultura stanica mogla smatrati kulturom mezenhimalnih matičnih stanica (46). Prvi kriterij kaže da stanice moraju biti adherentne na plastičnu podlogu pri standardnim uvjetima kulture tkiva. Drugi kriterij govori da stanica na sebi mora imati eksprimirane markere CD73, CD90 i CD105, dok se na stanici ne smiju nalaziti markeri CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 niti HLA-DR. Treći i posljednji kriterij zahtjeva da stanice iz kulture imaju kapacitet diferencijacije u osteoblaste, adipocite i hondroblaste *in vitro*.



Slika 3. Smanjenje potentnosti stanica diferencijacijom

Prema nekim istraživanjima (47-48), za regenerativnu terapiju hrskavice su najpogodnije mezenhimalne matične stanice izolirane iz koštane srži, dok druga navode kako bi matične stanice iz masnog tkiva mogle biti bolji odabir za ovakav oblik terapije zbog manje imunogenosti i jednostavnije izolacije (49). Treći (50) pak tvrde da sinovijalne MSC imaju superiorni potencijal za hondrogenezu naspram ostalih.

Uz sve navedene vrste matičnih stanice, treba navesti i inducirane pluripotentne stanice (iPSC). 2006. godine Takahashi i Yamanaka su objavili istraživanje u kojem je po prvi puta opisan proces reprogramiranja tjelesne stanice miša u induciranu pluripotentnu stanicu. U somatsku stanicu se uz pomoć retrovirusa unose geni i dolazi do ektopične ekspresije faktora Oct4, Sox2, Klf4 i c-Myc, danas poznatih kao i Yamanaka faktora (50). Inducirane pluripotentne stanice zaobilaze i jedan od većih problema u istraživanju matičnih stanica – pitanje etičnosti i prikupljanje matičnih stanica iz ljudskih blastocista.

Iako je vrlo vjerojatno da će se u budućnosti terapija matičnim stanicama u medicini samo nastaviti razvijati, treba biti oprezan. Najčešće komplikacije ove terapijske opcije su tumori zbog same sposobnosti matičnih stanica za diferencijaciju u različite vrste stanica. Uz tumore, poteškoće nakon terapije matičnim stanicama mogu nastati i zbog : migracije matičnih stanica sa željenog mjesta, transplantacije inficiranih stanica i imunoloških reakcija.

5.2. Hondrogeneza

Kada govorimo o matičnim stanicama u kontekstu liječenja oštećenja hrskavice, gotovo se uvijek govori o mezenhimalnim matičnim stanicama. Mezenhimalne matične stanice su podobne za ovakav oblik terapije zbog svoje dostupnosti kod odraslih ljudi i zbog toga što su ove matične stanice i histološki prekursori hondrocita. Diferencijacija matičnih stanica u hondrocite, odnosno hondrocitogeneza, kao i diferencijacije u druge stanice ovise o faktorima transkripcije.

Iako postoji još nepoznanica u morfološkim i molekularnim događanjima u hondrogenezi, ona se po Hidaki (51) može podijeliti na četiri etape. Prva etapa je migracija matičnih stanica, a slijedi je agregacija. Za vrijeme agregacije dolazi do interakcije među stanicama i između stanica i matriksa i stvaranja propusnih veza i ECM-a bogatog hijaluronom i kolagenima tip I i II. Nakon agregacije nastupa faza kondenzacije čiji je početak definiran povećanom aktivnošću hijaluronidaze i pojavljivanjem N-kadherina i N-CAM molekula koje se kasnije mogu pronaći samo u perihondralnim stanicama. Indukcija stvaranja N-kadherina, N-CAM i fibronektina je potaknuta citokinima iz skupine transforming growth factor β (TGF β) u koju spadaju i koštani morfogeni proteini (BMP) (52). Sljedeći korak je povećana proliferacija i remodelacija ECM-a koji iniciraju tranziciju hondroprogenitornih stanica u zrele hondrocite.

Prvi znak da će MSC započeti diferencijaciju prema hondroocitu je ekspresija Sox9 gena, koji je izražen u svim hondroprogenitornim stanicama, hondroocitima, ali nije eksprimiran u visokodiferenciranim hipertrofičnim hondroocitima (53). Sox geni kodiraju transkripcijske faktore i pripadaju posebnoj super-obitelji gena koji se nazivaju HMG-box (high mobility group), a igraju važne uloge i u razvitku neuralnog grebena, neurogeneze centralnog živčanog

sustava i razvitku testisa. Konkretno, u diferencijaciji sudjeluju transkripcijski faktori gena Sox 5,6,8,9 i 13 (54), dok Sox 9, Sox 5 i Sox 6 reguliraju ekspresiju gena za kolagen tip II i agrekan..

Koštani morfogeni proteini (BMPs) su skupina citokina čija je uloga otkrivena preko njihove sposobnosti da izazovu stvaranje ektopične hrskavice i kosti u životinja. Yoon i Lyons (55) tvrde da BMP proteini kroz sat vremena pojačavaju ekspresiju gena za Sox 9, a L-Sox 5 i Sox 6 nešto kasnije. Isto tako, tvrde da sam BMP ne može inducirati kondenzaciju prekursora hondrocita.

Uz već navedene regulatore hondrogeneze treba spomenuti i faktor rasta sličan inzulinu (IGF). IGF-1 kod mezenhimalnih matičnih stanica inducira proliferaciju, regulira apoptozu i stimulira ekspresiju specifičnih markera hondrocita, poput kolagena tip II. Ako djeluje s TGF- β 2 ili BMP-2, IGF-1 može inducirati diferencijaciju matičnih stanica u hondrocite (56,57).

Iako je potencijal u stvaranju hrskavice hondrogenezom iz MSC-a ogroman, i dalje postoje određene nepoznanice i problemi. I dalje postoji razlika u mišljenjima stručnjaka o samoj hondrogenezi, a nakon toga se javlja problem u održavanju hondrocitnog fenotipa. Konkretno, problem je u zaustavljanju diferencijacije kako se hondrociti ne bi dalje diferencirali u hipertrofične hondrocite i izazvali mineralizaciju matriksa (58).

6. Mehanizmi liječenja hrskavičnih defekata matičnim stanicama i genskom terapijom

Terapijske metode u kojima se koriste mezenhimalne matične stanice možemo podijeliti na one u kojima se koriste matične stanice u nosaču (eng. *scaffold*), injiciranje matičnih stanica i injiciranje egzosoma u oštećene zglobove. Nakon izolacije, matične stanice je potrebno nasaditi na hranjivu podlogu kako bi se razmnožile i kako si dobili kulturu stanica. Genska terapija se temelji na korištenju viralnih ili neviralnih vektora kako bi se kodirala željena „copy DNA“ u stanicama, a rezultat bi bio produkcija građivnih molekula hrskavice.

6.1. Kokultura

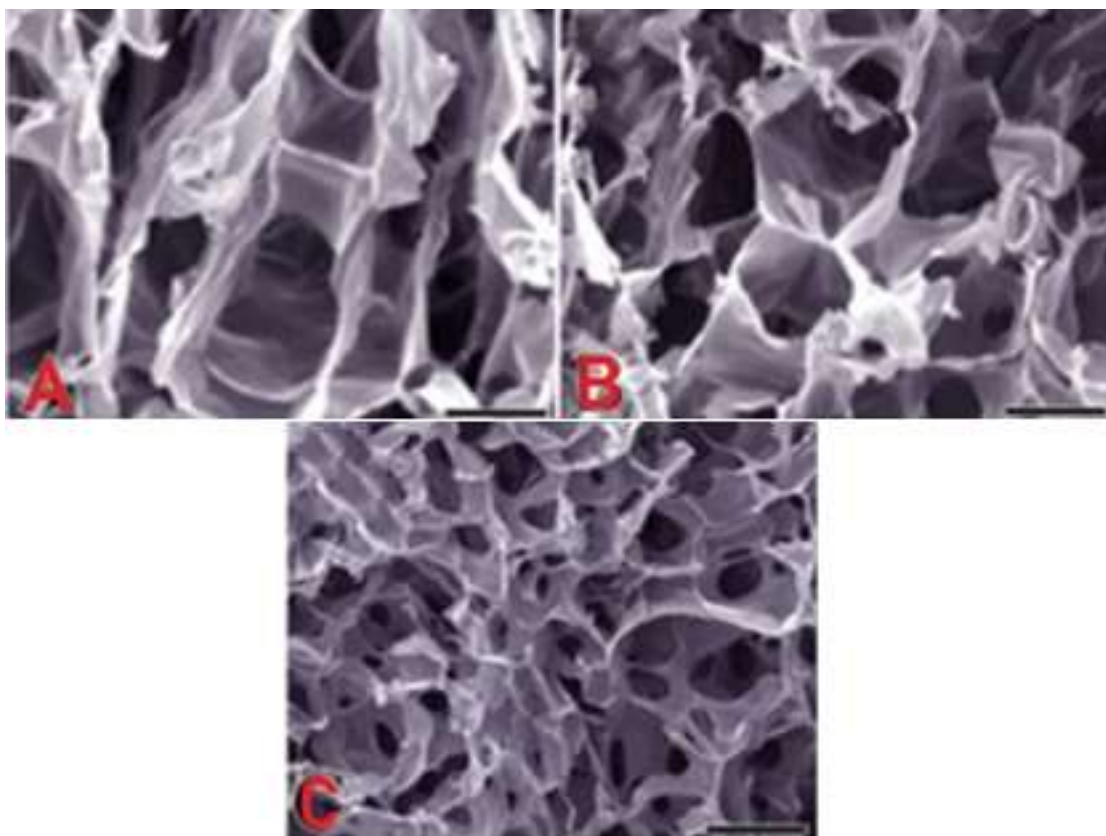
Prva metoda koja će biti opisana se naziva kokulturom i ona je specifična jer omogućuje parakrinu komunikaciju između dva tipa stanica. Kokulture mogu biti direktne i indirektne. Kod direktne kokulture ne postoji barijera između tipova stanica, dok se kod indirektne između dva tipa stanica nalazi polupropusna membrana. In-vitro istraživanja su pokazala da kokultura MSC-a i hondrocita dovodi do stvaranja ECM-a (59), ali i dalje ostaje velik broj nepoznanica. Određena istraživanja (60) navode kako su kokulture između ljudskih MSC-a i govedih hondrocita uspješno razvile ECM kroz 4 tjedna uz dodatak TGF- β 3 i deksametazona. Druga istraživanja (61) dovode u pitanje može li se potaknuti diferencijacija MSC-a u smjeru hondrocita bez dodavanja TGF- β 1, a treća (62) istražuju razvija li se ECM u in-vitro uvjetima kokulture zbog same diferencijacije MSC-a ili zbog trofičkog efekta MSC-a na hondrocite.

U daljnjim istraživanjima ovog područja, ključno će biti odrediti pravi omjer MSC-a i hondrocita i vanjskih faktora koji bi se teoretski mogli dodati (poput faktora rasta) kako bi se postigla optimalno stvaranje ECM-a. Uz MSC, metoda kokulture je ispitana (in-vitro) i za sada daje obećavajuće rezultate i s induciranim pluripotentnim stanicama. Naravno, ova metoda je još uvijek daleko od kliničke primjene (63).

6.2. Nosači matičnih stanica

Sljedeća metoda korištenja matičnih stanica u ovom području je implantiranje nosača matičnih stanica. Sam nosač mora imati određene karakteristike poput biorazgradivosti i biokompatibilnosti da bi se smanjio imunološki odgovor na njega. Uz to treba biti čvrst kako bi mogao izdržati opterećenje u zglobu, ali i porozan kako bi bila moguća migracija stanica i nutrijenata. Na kraju, materijal od kojeg je sačinjen nosač mora posjedovati i određenu dozu adhezivnosti da bi stanice i aktivne tvari mogle ostati uz njegovu stijenu (64). Nakon svega navedenog, jasno je zašto su se tu biološki materijali nametnuli kao jedna od boljih opcija. Od prirodnih biomaterijala najviše obećavaju nosači građeni od kolagena i hijalurona, gradivnih elemenata hrskavice. Eksperimentalna istraživanja na životinjama su pokazala da sama implantacija kolagenskog nosača (scaffolda) bez ikakvih dodanih faktora rasta niti stanica dovodi do naseljavanja MSC-a i njihove diferencijacije u hondrocite (i do popravka defekta) (65). Uz prirodne biomaterijale postoje i sintetski biomaterijali koji su načinjeni od polimera. Najpoznatiji polimeri iz ove skupine su PGA (poliglikolna kiselina), PLA (polilaktična kiselina), polikaprolakton (PCL) i PLGA (polilaktično-glikolna kiselina). PLGA je jedan od najatraktivnijih materijala jer ispunjava gore navedene uvjete, ali i iz drugih razloga: može biti modificiran tako da otpušta aktivne tvari kroz duže ili kraće razdoblje i može biti gradivni

element u nosačima različitih veličina, pa tako može poslužiti i kao nosač stanica, ali i kao nanosfera i mikrosfera (66). Neprestano se razvijaju novi materijali i ispituju se novi načini upotrebe postojećih materijala, ali znanost još uvijek nije pronašla materijal koji bi imao mehanička i biološka svojstva kao zglobna hrskavica. U novije vrijeme, istražuju se opcije korištenja kemijskog gradijenta kako bi se privukle matične stanice *in vivo*. Ugrađuje se nosač bez matičnih stanica, s različitim kemokinima i faktorima rasta koji potiču matične stanice na migraciju i diferencijaciju (67).



Slika 4. Slike učinjene skenirajućim elektronskim mikroskopom. Alginat (A), alginate-chitosan (B), chitosan (C).

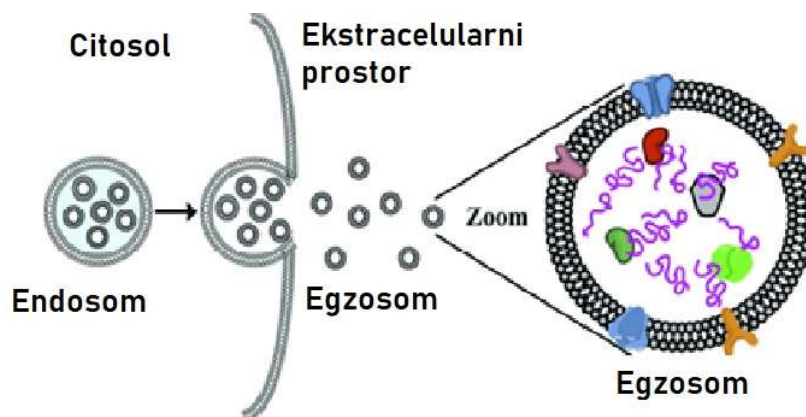
(open access, Oryan A, i sur., 2014. (68))

6.3. Injiciranje matičnih stanica

MSC koje se najčešće koriste za injiciranje u zglob su matične stanice dobivene iz koštane srži ili iz masnog tkiva (69). Princip je relativno jednostavan : matične stanice se izoliraju iz tijela pacijenta, mogu se umnožiti *in-vitro*, ali i ne moraju i nakon toga se injiciraju u oštećeni zglob. Korak koji se odvija *in vitro* omogućava homogeniju selekciju stanica koje će se unijeti u zglob po kriterijima već opisane klasifikacije za matične stanice (70). Prema nekolicini istraživanja (71-72), mehanizam djelovanja ove terapijske metode je temeljen na pretpostavci da mezenhimalne matične stanice ne služe samo kao prekursori hondrocita, nego su uključene i u obnavljanje hrskavice, smanjenje upale i smanjuju odgovor na stres svojom parakrinom aktivnošću, pa ih danas neki autori nazivaju i „medicinal signaling cells“. MSC svakako imaju mogućnost diferencijacije u hondrocite i prethodni navodi to ne negiraju, nego navode ovaj mehanizam kao dodatni način na koji matične stanice mogu biti korištene u liječenju hrskavičnih defekata. Navedena teorija je svakako zanimljiva i potrebna su daljnja, opsežna istraživanja.

6.4. Injiciranje egzosoma matičnih stanica

Egzosomi su jedan oblik ekstracelularnih vezikula (EV), čija je primarna funkcija komunikacija među stanicama (73). Ove vezikule su vrlo male, a veličina u promjeru je najčešće između 35 i 150 nm (74). Kao što je već navedeno u prošlom dijelu, sve se više istražuje tvrdnja da MSCi imaju funkciju da svojim parakrinim lučenjem, primarno egzosomima, sudjeluju u apoptozi, proliferaciji, invaziji i migraciji stanica, a jedan od mehanizama kojima to uspijevaju je i microRNA (75). Uz nukleinske kiseline, u egzosomima se nalaze i lipidi i proteini koji također igraju ulogu signalnih molekula. Istraživanja na životinjama su mnogobrojna, detaljna i vrlo perspektivna (76-78), unatoč tome terapija egzosomima u ovom području je i dalje nedovoljno istražena. U svakom slučaju, egzosomi se nameću kao jedna od terapijskih metoda kojom bi se u budućnosti mogao liječiti osteoartritis, hrskavične traume, te kao područje interesa sve većeg i većeg broja istraživanja.



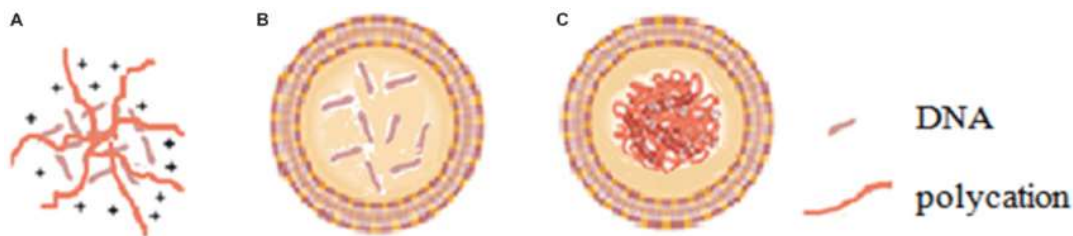
Slika 5. Shematski prikaz biogeneze egzosoma. Endosom se spaja sa staničnom membranom i otpušta egzosome koji sadrže proteine, DNA i RNA.

(preuzeto od : de la Torre Gomez C i sur. (2018)(79) i prilagođeno)

6.5. Genska terapija

Cilj genske terapije je unos gena u stanicu koji bi kodirali potrebne proteine. Sama ideja korištenja genske terapije za regeneraciju hrskavičnog tkiva je nastala kada je otkriveno da bi ekspresija pojedinih gena mogla utjecati na proces cijeljenja defekta (80). Prva podjela načina primjene genske terapije je podjela po vrsti vektora za unos gena. Vektori mogu biti viralni i neviralni, a genska terapija se može provoditi i *in vivo* i *ex vivo*.

Najčešći neviralni vektor je plazmid, a za sam unos plazmida je potrebno primijeniti jednu od fizikalnih metoda poput elektroporacije, ultrazvuka ili genetskog pištolja (engl. *gene gun*). Nasuprot fizikalnih metoda za transfekciju plazmida, postoje i kemijske metode u koje spada korištenje liposoma sastavljenih od sintetičkih kationskih lipida, koji se još nazivaju i lipopleksima i od poliplexa, sintetičkih kationskih polimera poput polietilenimina (PEI) (81). Korištenje plazmida za prijenos željenog gena je jeftinije i sigurnije, ali je i manje učinkovito od korištenja virusa.



Slika 6. Shematski prikaz polipleksa (A), lipopleksa (B) i polilipopleksa (C)
(uz dozvolu preuzeto od : Chen W i sur, 2016. (82))

Postoji velik broj viralnih vektora koji se koriste za gensku terapiju, a samo neki od njih su: adenovirusi, rekombinantni adeno-povezani virusi (rAAV), gamaretrovirusi i bakulovirusi, a Ad5 je serotip koji se najčešće spominje u *in vivo* i *in vitro* istraživanjima (83). *In vitro* su se uspješnim pokazali onkoretrovirus (84) i adenovirus (85) na životinjskim modelima, a na ljudskim hondrocitima se u sklopu kliničkih ispitivanja (86,87) istražuje prijenos gena za TGF- β 1 i antagonist receptora interleukina-1 pomoću retrovirusa. Najzanimljiviji virus u području regeneracije hrskavice je rAAV virus za *in vivo* primjenu jer može prodrijeti duboko u zglobnu hrskavicu i prenijeti genetski materijal hondrociitu *in situ*. Iako su *in vivo* istraživanja na životinjskim modela su uspješna i s drugim vrstama virusa, u kliničkim ispitivanjima na ljudima se za sad koriste samo rAAV virusi (88).

Jedan od problema genskoj terapiji oštećenja hrskavice je dugotrajnost ekspresije gena nakon transdukcije. Istraživanja su pokazala da je produkt unešenog gena bio sintetiziran samo do dva tjedna nakon početka terapije, što nije dovoljno za terapijski učinak (89,90). Nadalje, produkcija željenih faktora rasta nije ravnomjerna i u početnim danima nakon unosa gena može doći i do superterapijskih, odnosno toksičnih razina faktora rasta (91). Uz upitnu dugotrajnost ekspresije postoji i problem kancerogenosti. Uz dugotrajnost genske ekspresije, problem može biti i u imunogenosti virusa, u insercijskoj mutagenizi (insercija gena u tumor supresor gen ili u onkogen stanice) i sklonosti virusa mutacijama. Također, genska terapija je i dalje stigmatizirana od strane pacijenata (92).

7. Mogućnosti primjene matičnih stanica i genske terapije u odabranim patologijama hrskavice.

Na kraju ovog preglednog rada bit će opisani rezultati recentnih i relevantnih istraživanja o primjeni i potencijalu za primjenu opisanih terapijskih metoda .

7.1. Matične stanice i genska terapija kao budućnost liječenja osteoartritisa

Značajni napredak u regenerativnoj medicini u posljednjih desetak godina je osobito vidljiv u području liječenja degenerativnih bolesti hrskavice. Autologna implantacija hrskavice je i dalje zlatni standard u popravku hrskavičnih defekata, ali nedostatak te metode je taj što ona uključuje dvije operacije, a prikupljanje hondrocita mora biti ograničeno na zdrave, nepromijenjene dijelove hrskavice koji mogu biti uništeni tijekom postupka (93).

U sistematiziranom pregledu literature, kojeg su objavili Di Matteo i suradnici 2019. godine (94) stoji da je pregledom 23 istraživanja utvrđeno da su istraživanja o korištenju minimalno manipuliranih matičnih stanica relativno loše kvalitete zbog mogućeg *biasa* (pogreške). Imajući to na umu, utvrđeno je da je postupak zadovoljavajuće siguran i da ima kratkotrajno pozitivno djelovanje na simptome osteoartritisa, ali i da su se metode preparacije i administracije matičnih stanica razlikovale. Di Matteo zaključuje da nedostaje kvalitetnih studija, ali i da bi ovaj oblik terapije mogao biti siguran i djelotvoran, barem kratkoročno.

Metaanaliza Songa i suradnika iz 2020. godine (95), koja je obuhvatila devetnaest kontroliranih randomiziranih kliničkih ispitivanja, retrospektivnih i kohortnih studija, koje su proučavale subjektivne upitnike pacijenata prije i nakon terapije MSC-ima. Upitnici koji su bili proučavani su WOMAC („The Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index“) koji ispituje, ukočenost i funkciju zglobova zahvaćenih osteoartritisom i VAS (Visual

Analogie Scale) skala boli. Zaključak je da terapija matičnim stanicama pokazuje obećavajuće rezultate sa značajnim poboljšanjem simptoma po upitnicima. Također, zabilježene su i nuspojave ove terapije – bol, oteklina, krvarenje, frakture, infekcije, infarkti miokarda, ileus i poteškoće u pomicanju zglobova. Zaključak ove metaanalize je da je potreban veći uzorak kako bi se terapija matičnim stanicama mogla uvesti u kliničku praksu.

Maheshwer i suradnici su u metaanalizi obradili dvadeset i pet studija s 439 pacijenata (96). Za razliku od već navedenih istraživanja, oni su utvrdili da nije bilo značajne razlike u boli između kontrola i ispitanika liječenim MSC-ima, ali je značajna razlika u korist MSC-a po pitanju poboljšanja funkcije i povećanja volumena hrskavice. Također, napominju da postoji rizik od *biasa* u sedamnaest od dvadeset i pet studija. Zaključuju da preliminarni podatci o rezultatima terapije mezenhimalnim matičnim stanicama pokazuju znatnu heterogenost i napominju da je potreban oprez pri interpretaciji tih podataka.

Genska terapija je još nedovoljno istražena i nedostaje metaanaliza i sistematiziranih pregleda, ali dostupna literatura je dovoljna za postaviti nekoliko tvrdnji. IL-1 β igra ulogu u medijaciji erozivnih procesa hrskavice (97) i jasno je da je antagonist njegovog receptora molekula od interesa u ovom području, a studija iz 2012. godine (98) tvrdi da su pacijenti liječeni ovim antagonistom imali bolju funkciju koljena i manju bol u usporedbi s kontrolnom skupinom pacijenata. Uz IL-1 β istražuju se mogućnosti i vezane uz transformirajući faktor rasta, o kojem je već bilo riječi u ovom radu.

7.2. Primjena matičnih stanica i genske terapije kod patologije meniskusa

Ernest Chew u uvodu u svoj pregledni rad (99) navodi kako je regeneracija pomoću matičnih stanica svojevrsni sveti gral regeneracije meniskusa. Osim ove slikovite usporedbe u njegovom pregledu, koji je obuhvatio četiri istraživanja, stoji da i dalje nedostaje dokaza kako bi se moglo utvrditi da matične stanice mogu stvoriti tkivo sa svojstvima sličnim ljudskom meniskusu, unatoč pozitivnim rezultatima na životinjskim modelima. U budućnosti, postoji potreba za standardizacijom protokola. Iako ovo istraživanje ne daje pozitivne rezultate, i dalje vjeruje da će matične stanice igrati važnu ulogu u liječenju oštećenja meniskusa u budućnosti

U istraživanju Kozaka (100) također stoji da su rezultati pretkliničkih ispitivanja perspektivni, ali da je najduži period praćenja rezultata terapije bio 6 mjeseci, što nije dovoljno za procjenu pravog kapaciteta za terapiju. Jacob i suradnici (101) u svom radu navode kako je samo jedna randomizirana, dvostruko slijepa studija koji ispituje volumen meniskusa nakon medijalne menisektomije i aplikacije MSC injekcijom (102). Rezultati pokazuju povećanje volumena meniskusa nakon aplikacije, dok isto nije zabilježeno u kontrolnoj skupini. Druga istraživanja su provedena na izrazito malom broju pacijenata, različitim metodama i MSC-ima iz različitih tkiva, ali sva pokazuju povećanje volumena meniskusa (103-106). Na kraju svog rada, Kozak (100) napominje da si iz literature može zaključiti da su MSC sigurne i učinkovite u terapiji oštećenja meniskusa i da postoje mnogobrojni načini njihove primjene poput nosača i dodatka faktora rasta, ali unatoč tome još ne postoji konsenzus akademske zajednice o najboljem izvoru i načinu primjene ovih stanica.

Genska terapija oštećenja meniskusa je izrazito slabo istražena tema s malim brojem istraživanja. Vadodaria u svom pregledu iz 2019. godine (107) tvrdi da genska terapija pokazuje ogroman potencijal i u *in vivo* i u *in vitro* ispitivanjima (108-110) i da ubrzava proces popravka hrskavice, ali vjeruje da je ipak tkivno inženjerstvo budućnost terapije oštećenja meniskusa.

7.3. Primjena matičnih stanica i genske terapije kod degenerativne bolesti intervertebralnog diska

2020. godine je Yolcu objavio sistematizirani pregled radova (111) iz ovog područja u kojem je šest istraživanja ispunjavalo kriterije. U klopju svakog istraživanja je ubrizgavan različit broj matičnih stanica, a brojevi su varirali od 10 do 50 milijuna stanica po jednom disku. Prosječno poboljšanje po skali za bol je nakon 12 mjeseci iznosilo 44.1%, a po ODI (Owestry disability index) je poboljšanje iznosilo 25.7%. Owestry disability index je skala koja u kojoj pacijent boduje intenzitet bola i mogućnost izvršavanja svakodnevnih aktivnosti, kao što su: hodanje, spavanje, sposobnost za higijenu, seksualni život, ustajanje, sjedenje i socijalni život. Zaključak Yolcu i suradnika, nakon upozorenja na opasnosti u korištenju matičnih stanica, je da matične stanice imaju potencijal postati terapija izbora u budućnosti za smanjenje boli kod degenerativne bolesti diska, ali da su za to potrebna daljnja, dobro dizajnirana ispitivanja.

Migliorini i suradnici su u sistematiziranom pregledu iz 2018. godine (112) analizirali devet istraživanja i utvrdili su da se ODI kroz 12 mjeseci poboljšao za 21.78%, a VAS za 30.04% u istom razdoblju. Zanimljivo je da je i u ovom sistematiziranom pregledu činjenica da su MSC-i dobiveni iz različitih tkiva tek napomenuta.

Sukladno s prethodno navedenim istraživanjima, Meisel i suradnici 2019. godine (113) potvrđuju poboljšanje stanja pacijenata prema upitnicima ODI i VAS, ali isto tako tvrde da je teško donijeti zaključak o ovoj terapijskoj metodi zbog velikih razlika u rezultatima istraživanja koja su slična. Kvaliteta dokaza je izrazito niska, a iako nema prijavljenih ozbiljnijih nuspojava mogućnost njihovog nastanka nije isključena zbog malog broja ispitanika. Kao i u ostalim navedenim radovima, naglašava se važnost budućih usporednih studija visoke kvalitete dokaza.

Kao i u ostalim degenerativnim bolestima hrskavičnog tkiva, biokemijski modulatori sudjeluju i u degenerativnoj bolesti intervertebralnog diska. Već je navedena uloga MMP-a u

degenerativnoj bolesti diska, a uz MMP u razgradnji matriksa sudjeluju i IL-1, IL-6 i prostaglandin E₂ (PGE₂) (114). U preglednom radu Eun Ji Roha i suradnika (115) je navedena nekolicina studija koje se bave temom genske terapije kod degeneracije intervertebralnih diskova. Još su krajem 90.-tih godina započeli *in vitro* pokusi s retrovirusima koji prijenose antagonist receptora za IL-1 (116). Paralelno s njima započeti su i pokusi *in vitro* i *in vivo* s adenovirusima na životinjskim modelima koji su se pokazali uspješnima(117). Uspješnim se pokazalo i korištenje rAAV i bakulovirusa kao vektora (118,119). Roh (115) navodi da bi se u području istraživanja genske terapije uskoro mogao dogoditi promjena fokusa s virusnih vektora na neviralne vektorske tehnologije kako bi se izbjegli rizici i nuspojave povezane s korištenjem virusa.

8. Zaključak

Ovim preglednim radom htjeli su se istražiti recentni i relevantni stavovi i činjenice iz literature iz područja terapije oštećenja hrskavice s posebnim naglaskom na molekularno-biološke aspekte terapijskih metoda u kojima se koriste matične stanice te genska terapija.

Pregledom literature očito je da je razvitak i napredak regenerativne medicine i metoda liječenja hrskavičnih degenerativnih bolesti i oštećenja od osobitog značaja u ovom području medicine. U ovom radu je predstavljen samo dio istraživanja iz područja i to dio povezan s matičnim stanicama i genskom terapijom, ali dovoljan dio da se stekne uvid u problematiku vezanu uz ovo područje.

Većina sistematiziranih pregleda i metaanaliza u svojim zaključcima ima rečenicu poput „Za izvesti konačni zaključak potreban je još velik broj kvalitetnih laboratorijskih ili kliničkih ispitivanja, s velikim brojem ispitanika i manjom opasnošću od *biasa*.“. Treba napomenuti da se u nekolicini navedenih metaanaliza i pregleda ne radi podjela s obzirom na vrstu tkiva iz kojeg su izolirane matične stanice, dok druge samo napominju na razlike u pripremi matičnih stanica za terapiju.

S druge strane imamo gensku terapiju koja izaziva iracionalan strah kod pacijenata, a sumnja u neškodljivost ove terapije postoji i među stručnjacima. Kao i kod svake terapijske, a i dijagnostičke metode, ključno je pronaći zadovoljavajući omjer rizika i koristi. U posljednje vrijeme se javlja osobit interes za metode korištenja nosača poput lipopleksa i polipleksa, kojima bi se moglo zaobići, pacijentima toliko odbojno, korištenje virusa.

Iako je evidentno da navedena područja nisu dovoljno istražena, svakako treba napomenuti da regenerativna medicina nije ograničena samo na korištenje matičnih stanica i genske terapije. Razvojem tehnologije i biomedicinskih znanosti pronalazimo nove mogućnosti. Ljudski genom će uskoro biti u potpunosti sekvencioniran, a iz genetike se izrodila

nova grana biologije – epigenetika. Regulacija ekspresije gena epigenetskim mehanizmima, u čiju se dubinu ne može ulaziti u ovom radu, također postaje područje od interesa u liječenju hrskavičnih degenerativnih bolesti. Uz epigenetiku postoji još jedno područje koje se ubrzano razvija i nameće. To područje je nanotehnologija, koje je samo spomenuta kada je bilo riječi o PLGA i o nosačima za matične stanice.

Potencijal u korištenju matičnih stanica i gena za liječenje mnogih bolesti, pa tako i degenerativnih bolesti hrskavice, je ogroman. Isto tako i troškovi svih navedenih istraživanja su veliki i to bi mogao biti razlog za relativno malen broj istraživanja. Terapija matičnim stanicama i genska terapija u liječenju oštećenja hrskavice je nedvojbeno zanimljivo i perspektivno područje koje zahtjeva još truda znanstvene zajednice kako bi bilo primjenjivo u svakodnevnom kliničkom radu.

9. Zahvale

Na početku, želio bih zahvaliti svom mentoru, doc. Frani Paiću na ukazanom strpljenju, kvalitetnim savjetima i tome što je u svakom trenutku bio dostupan. Zahvaljujem se i članovima povjerenstva koji su ovaj rad pregledali i ocijenili.

Najveću zahvalu želim uputiti članovima svoje najuže obitelji, mami Jelici i teti Ljubici, bez čije žrtve i puno razumijevanja završetak Medicinskog fakulteta u Zagrebu ne bi bio moguć. Hvala im što su me naučile životnim vrijednostima i što su mi dale toliko ljubavi i predivnih trenutaka.

Također, želim zahvaliti i svim svojim prijateljima i kumovima, drugoj obitelji koju sami biramo. I njima sam zahvalan na razumijevanju za mnoga propuštena duženja s moje strane i na velikoj podršci kroz svih šest godina studija.

Hvala svim dragim kolegama s kojima sam došao do kraja fakulteta i nadam se da je ovo tek početak naše zajedničke priče jer je već određen broj njih, kroz sve lijepe, a i one ne baš tako lijepe uspomene na fakultetu, prerastao iz kolega u prijatelje.

Zahvalan sam što sam i što sam dio ove zajednice, zahvalan sam što sam proživio toliko lijepih trenutaka za vrijeme studiranja i zahvalan sam i što sam, nakon svega navedenog, priveo svoje studiranje na Medicinskom fakultetu u Zagrebu kraju.

10. Popis literature

1. Xing D, Xu Y, Liu Q, Ke Y, Wang B, Li Z, et al. Osteoarthritis and all-cause mortality in worldwide populations: grading the evidence from a meta-analysis. *Sci Rep*. 2016 Apr 18;6:24393. doi: 10.1038/srep24393.
2. Network GC. Global burden of disease study 2017 (GBD 2017) results. Seattle, United States. 2018. (<http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>)
3. Musumeci G, Szychlińska MA, Mobasher A. Age-related degeneration of articular cartilage in the pathogenesis of osteoarthritis: molecular markers of senescent chondrocytes. *Histol Histopathol*. 2015 Jan;30(1):1-12. doi: 10.14670/HH-30.1.
4. McAdams TR, Mithoefer K, Scopp JM, Mandelbaum BR. Articular Cartilage Injury in Athletes. *Cartilage*. 2010 Jul;1(3):165-79. doi: 10.1177/1947603509360210.
5. Andriolo L, Merli G, Filardo G, Marcacci M, Kon E. Failure of Autologous Chondrocyte Implantation. *Sports Med Arthrosc Rev*. 2017 Mar;25(1):10-18. doi: 10.1097/JSA.000000000000137.
6. Le H, Xu W, Zhuang X, Chang F, Wang Y, Ding J. Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration. *J Tissue Eng*. 2020 Aug 26;11:2041731420943839. doi: 10.1177/2041731420943839.
7. Krishnan Y, Grodzinsky AJ. Cartilage diseases. *Matrix Biol*. 2018 Oct;71-72:51-69. doi: 10.1016/j.matbio.2018.05.005.
8. S.I. Vornehm, J. Dudhia, K. von der Mark, T. Aigner, Expression of collagen types IX and XI and other major cartilage matrix components by human fetal chondrocytes in vivo, *Matrix Biology*, Volume 15, Issue 2, 1996, Pages 91-98, ISSN 0945-053X, [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(96\)90150-X](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(96)90150-X).
9. Buckwalter JA. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther*. 1998 Oct;28(4):192-202. doi: 10.2519/jospt.1998.28.4.192. PMID: 9785255.
10. Luczkiewicz P, Daszkiewicz K, Witkowski W, Chróścielewski J, Ferenc T, Baczkowski B. The influence of a change in the meniscus cross-sectional shape on the medio-lateral translation of the knee joint and meniscal extrusion. *PLoS One*. 2018 Feb 15;13(2):e0193020. doi: 10.1371/journal.pone.0193020.
11. Arnoczky SP, Warren RF. Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med*. 1982 Mar-Apr;10(2):90-5. doi: 10.1177/036354658201000205.

12. Makris EA, Hadidi P, Athanasiou KA. The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. *Biomaterials*. 2011 Oct;32(30):7411-31. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.06.037.
13. Inoue H. Three-dimensional architecture of lumbar intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1981 Mar-Apr;6(2):139-46. doi: 10.1097/00007632-198103000-00006.
14. Urban JP, Roberts S. Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(3):120-30. doi: 10.1186/ar629.
15. Roberts S, Eisenstein SM, Menage J, Evans EH, Ashton IK. Mechanoreceptors in intervertebral discs. Morphology, distribution, and neuropeptides. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995 Dec 15;20(24):2645-51. doi: 10.1097/00007632-199512150-00005.
16. Ghouri A, Conaghan PG. Treating osteoarthritis pain: recent approaches using pharmacological therapies. *Clin Exp Rheumatol*. 2019 Sep-Oct;37 Suppl 120(5):124-129.
17. Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). GBD 2019 Cause and Risk summaries. Osteoarthritis - level 3 cause. Seattle, WA: IHME, University of Washington, 2016. Available from http://www.healthdata.org/results/gbd_summaries/2019/osteoarthritis-level-3-cause. (pristupljeno 30.5.2021.)
18. Maus T. Imaging the back pain patient. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2010 Nov;21(4):725-66. doi: 10.1016/j.pmr.2010.07.004.
19. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Ann Rheum Dis*. 1957 Dec;16(4):494-502. doi: 10.1136/ard.16.4.494.
20. Pacifici M, Koyama E, Iwamoto M. Mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation: recent advances, but many lingering mysteries. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2005 Sep;75(3):237-48. doi: 10.1002/bdrc.20050.
21. Goldring MB. Articular cartilage degradation in osteoarthritis. *HSS J*. 2012 Feb;8(1):7-9. doi: 10.1007/s11420-011-9250-z.
22. Martel-Pelletier J. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12 Suppl A:S31-3. doi: 10.1016/j.joca.2003.10.002.
23. Lark MW, Bayne EK, Flanagan J, Harper CF, Hoerner LA, Hutchinson NI, et al. Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. *J Clin Invest*. 1997 Jul 1;100(1):93-106. doi: 10.1172/JCI119526.
24. Pearle AD, Warren RF, Rodeo SA. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clin Sports Med*. 2005 Jan;24(1):1-12. doi: 10.1016/j.csm.2004.08.007.

25. Alexopoulos LG, Haider MA, Vail TP, Guilak F. Alterations in the mechanical properties of the human chondrocyte pericellular matrix with osteoarthritis. *J Biomech Eng.* 2003 Jun;125(3):323-33. doi: 10.1115/1.1579047.
26. Guilak F, Nims RJ, Dicks A, Wu CL, Meulenbelt I. Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix. *Matrix Biol.* 2018 Oct;71-72:40-50. doi: 10.1016/j.matbio.2018.05.008.
27. Snoeker BA, Bakker EW, Kegel CA, Lucas C. Risk factors for meniscal tears: a systematic review including meta-analysis. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2013 Jun;43(6):352-67. doi: 10.2519/jospt.2013.4295.
28. Kos N, Gradisnik L, Velnar T. A Brief Review of the Degenerative Intervertebral Disc Disease. *Med Arch.* 2019 Dec;73(6):421-424. doi: 10.5455/medarh.2019.73.421-424.
29. Roughley PJ. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix. *Spine (Phila Pa 1976).* 2004 Dec 1;29(23):2691-9. doi: 10.1097/01.brs.0000146101.53784.b1.
30. Colombini A, Lombardi G, Corsi MM, Banfi G. Pathophysiology of the human intervertebral disc. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(5):837-42. doi: 10.1016/j.biocel.2007.12.011.w
31. Rozental TD, Sculco TP. Intra-articular corticosteroids: an updated overview. *Am J Orthop (Belle Mead NJ).* 2000 Jan;29(1):18-23.
32. Ayhan E, Kesmezacar H, Akgun I. Intraarticular injections (corticosteroid, hyaluronic acid, platelet rich plasma) for the knee osteoarthritis. *World J Orthop.* 2014 Jul 18;5(3):351-61. doi: 10.5312/wjo.v5.i3.351.
33. Drengk A, Zapf A, Stürmer EK, Stürmer KM, Frosch KH. Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs.* 2009;189(5):317-26. doi: 10.1159/000151290.
34. Zhu Y, Yuan M, Meng HY, Wang AY, Guo QY, Wang Y, i sur. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013 Nov;21(11):1627-37. doi: 10.1016/j.joca.2013.07.017.
35. Siparsky P, Ryzewicz M, Peterson B, Bartz R. Arthroscopic treatment of osteoarthritis of the knee: are there any evidence-based indications? *Clin Orthop Relat Res.* 2007 Feb;455:107-12. doi: 10.1097/BLO.0b013e31802fc18c.
36. Hubbard MJ. Articular debridement versus washout for degeneration of the medial femoral condyle: a five-year study. *The Journal of bone and joint surgery. British volume.* 1996 Mar;78(2):217-9.

37. Haspl M, Pećina M. Lijecenje gonartroze metodom artroskopske abrazije [Treatment of gonarthrosis with arthroscopic abrasion]. *Lijec Vjesn.* 1995 Sep-Oct;117(9-10):236-40. Croatian.
38. Mithöfer K, Peterson L, Mandelbaum BR, Minas T. Articular cartilage repair in soccer players with autologous chondrocyte transplantation: functional outcome and return to competition. *Am J Sports Med.* 2005 Nov;33(11):1639-46. doi: 10.1177/0363546505275647.
39. Loia MC, Vanni S, Rosso F, Bonasia DE, Bruzzone M, Dettoni F, Rossi R. High tibial osteotomy in varus knees: indications and limits. *Joints.* 2016 Aug 18;4(2):98-110. doi: 10.11138/jts/2016.4.2.098.
40. Canovas F, Dagneaux L. Quality of life after total knee arthroplasty. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2018 Feb;104(1S):S41-S46. doi: 10.1016/j.otsr.2017.04.017.
41. Mordecai SC, Al-Hadithy N, Ware HE, Gupte CM. Treatment of meniscal tears: An evidence based approach. *World J Orthop.* 2014 Jul 18;5(3):233-41. doi: 10.5312/wjo.v5.i3.233.
42. Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam S. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum Reprod.* 1994 Nov;9(11):2110-7. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138401.
43. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998 Nov 6;282(5391):1145-7. doi: 10.1126/science.282.5391.1145.
44. Biswas A, Hutchins R. Embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007 Apr;16(2):213-22. doi: 10.1089/scd.2006.0081.
45. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968 Mar;6(2):230-47.
46. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7. doi: 10.1080/14653240600855905.
47. Park JS, Shim MS, Shim SH, Yang HN, Jeon SY, Woo DG, et al. Chondrogenic potential of stem cells derived from amniotic fluid, adipose tissue, or bone marrow encapsulated in fibrin gels containing TGF- β 3. *Biomaterials.* 2011 Nov;32(32):8139-49. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.043.
48. Pievani A, Scagliotti V, Russo FM, Azario I, Rambaldi B, Sacchetti B, et al. Comparative analysis of multilineage properties of mesenchymal stromal cells derived

- from fetal sources shows an advantage of mesenchymal stromal cells isolated from cord blood in chondrogenic differentiation potential. *Cytotherapy*. 2014 Jul;16(7):893-905. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.02.008.
49. Varghese J, Griffin M, Mosahebi A, Butler P. Systematic review of patient factors affecting adipose stem cell viability and function: implications for regenerative therapy. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Feb 28;8(1):45. doi: 10.1186/s13287-017-0483-8.
 50. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
 51. Hidaka C, Goldring M. Regulatory Mechanisms of Chondrogenesis and Implications for Understanding Articular Cartilage Homeostasis. *Curr Rheumatol Rev*, 2008 Aug 1;4(3):136-47. doi:10.2174/157339708785133541
 52. Chimal-Monroy J, Díaz de León L. Expression of N-cadherin, N-CAM, fibronectin and tenascin is stimulated by TGF-beta1, beta2, beta3 and beta5 during the formation of precartilaginous condensations. *Int J Dev Biol*. 1999 Jan;43(1):59-67.
 53. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet*. 1999 May;22(1):85-9. doi: 10.1038/8792
 54. Jiang T, Hou CC, She ZY, Yang WX. The SOX gene family: function and regulation in testis determination and male fertility maintenance. *Mol Biol Rep*. 2013 Mar;40(3):2187-94. doi: 10.1007/s11033-012-2279-3. Epub 2012 Nov 27.
 55. Yoon BS, Lyons KM. Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *J Cell Biochem*. 2004 Sep 1;93(1):93-103. doi: 10.1002/jcb.20211.
 56. O'Rear L, Longobardi L, Torello M, Law BK, Moses HL, Chiarelli F, et al. Signaling cross-talk between IGF-binding protein-3 and transforming growth factor-(beta) in mesenchymal chondrogenitor cell growth. *J Mol Endocrinol*. 2005 Jun;34(3):723-37. doi: 10.1677/jme.1.01746.
 57. An C, Cheng Y, Yuan Q, Li J. IGF-1 and BMP-2 induces differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes-like cells. *Ann Biomed Eng*. 2010 Apr;38(4):1647-54. doi: 10.1007/s10439-009-9892-x.
 58. Carballo CB, Nakagawa Y, Sekiya I, Rodeo SA. Basic Science of Articular Cartilage. *Clin Sports Med*. 2017 Jul;36(3):413-425. doi: 10.1016/j.csm.2017.02.001.
 59. Bigdeli N, Karlsson C, Strehl R, Concaro S, Hyllner J, Lindahl A. Coculture of human embryonic stem cells and human articular chondrocytes results in significantly altered phenotype and improved chondrogenic differentiation. *Stem Cells*. 2009 Aug;27(8):1812-21. doi: 10.1002/stem.114.

60. Demoor M, Ollitrault D, Gomez-Leduc T, Bouyoucef M, Hervieu M, Fabre H, i sur. Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Aug;1840(8):2414-40. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.02.030.
61. Giovannini S, Diaz-Romero J, Aigner T, Heini P, Mainil-Varlet P, Nestic D. Micromass co-culture of human articular chondrocytes and human bone marrow mesenchymal stem cells to investigate stable neocartilage tissue formation in vitro. *Eur Cell Mater*. 2010 Oct 5;20:245-59. doi: 10.22203/ecm.v020a20.
62. Wu L, Prins HJ, Helder MN, van Blitterswijk CA, Karperien M. Trophic effects of mesenchymal stem cells in chondrocyte co-cultures are independent of culture conditions and cell sources. *Tissue Eng Part A*. 2012 Aug;18(15-16):1542-51. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0715.
63. Wei Y, Zeng W, Wan R, Wang J, Zhou Q, Qiu S, i sur. Chondrogenic differentiation of induced pluripotent stem cells from osteoarthritic chondrocytes in alginate matrix. *Eur Cell Mater*. 2012 Jan 12;23:1-12. doi: 10.22203/ecm.v023a01.
64. Nikolova MP, Chavali MS. Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. *Bioact Mater*. 2019 Oct 25;4:271-292. doi: 10.1016/j.bioactmat.2019.10.005.
65. Lubiawski P, Kruczynski J, Gradys A, Trzeciak T, Jaroszewski J. Articular cartilage repair by means of biodegradable scaffolds. *Transplant Proc*. 2006 Jan-Feb;38(1):320-2. doi: 10.1016/j.transproceed.2005.12.012.
66. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*. 2011 Sep 1;3(3):1377-1397. doi: 10.3390/polym3031377.
67. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res*. 2014 Mar 17;9(1):18. doi: 10.1186/1749-799X-9-18. PMID: 24628910; PMCID: PMC3995444.
68. Pacelli S, Basu S, Whitlow J, Chakravarti A, Acosta F, Varshney A, i sur. Strategies to develop endogenous stem cell-recruiting bioactive materials for tissue repair and regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017 Oct 1;120:50-70. doi: 10.1016/j.addr.2017.07.011.
69. Arshi A, Petrigliano FA, Williams RJ, Jones KJ. Stem Cell Treatment for Knee Articular Cartilage Defects and Osteoarthritis. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2020 Feb;13(1):20-27. doi: 10.1007/s12178-020-09598-z.
70. Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2014 Jun;32(6):1408-19. doi: 10.1002/stem.1681.

71. Barry F, Murphy M. Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Oct;9(10):584-94. doi: 10.1038/nrrheum.2013.109.
72. Tolar J, Le Blanc K, Keating A, Blazar BR. Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*. 2010 Aug;28(8):1446-55. doi: 10.1002/stem.459.
73. Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol*. 2017 Mar;27(3):172-188. doi: 10.1016/j.tcb.2016.11.003.
74. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006 Apr;Chapter 3:Unit 3.22. doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30.
75. Xu Y, Shen L, Li F, Yang J, Wan X, Ouyang M. microRNA-16-5p-containing exosomes derived from bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibit proliferation, migration, and invasion, while promoting apoptosis of colorectal cancer cells by downregulating ITGA2. *J Cell Physiol*. 2019 Nov;234(11):21380-21394. doi: 10.1002/jcp.28747.
76. Mao G, Zhang Z, Hu S, Zhang Z, Chang Z, Huang Z, i sur. Exosomes derived from miR-92a-3p-overexpressing human mesenchymal stem cells enhance chondrogenesis and suppress cartilage degradation via targeting WNT5A. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Sep 26;9(1):247. doi: 10.1186/s13287-018-1004-0.
77. Jin Z, Ren J, Qi S. Human bone mesenchymal stem cells-derived exosomes overexpressing microRNA-26a-5p alleviate osteoarthritis via down-regulation of PTGS2. *Int Immunopharmacol*. 2020 Jan;78:105946. doi: 10.1016/j.intimp.2019.105946.
78. Enomoto T, Akagi R, Ogawa Y, Yamaguchi S, Hoshi H, Sasaki T, i sur. Timing of Intra-Articular Injection of Synovial Mesenchymal Stem Cells Affects Cartilage Restoration in a Partial Thickness Cartilage Defect Model in Rats. *Cartilage*. 2020 Jan;11(1):122-129. doi: 10.1177/1947603518786542.
79. de la Torre Gomez C, Goreham RV, Bech Serra JJ, Nann T, Kussmann M. "Exosomics"-A Review of Biophysics, Biology and Biochemistry of Exosomes With a Focus on Human Breast Milk. *Front Genet*. 2018 Mar 27;9:92. doi: 10.3389/fgene.2018.00092. PMID: 29636770; PMCID: PMC5881086.
80. Li KC, Hu YC. Cartilage tissue engineering: recent advances and perspectives from gene regulation/therapy. *Adv Healthc Mater*. 2015 May;4(7):948-68. doi: 10.1002/adhm.201400773.
81. Taniyama Y, Azuma J, Kunugiza Y, Iekushi K, Rakugi H, Morishita R. Therapeutic option of plasmid-DNA based gene transfer. *Curr Top Med Chem*. 2012;12(15):1630-7. doi: 10.2174/156802612803531342.

82. Chen W, Li H, Liu Z, Yuan W. Lipopolyplex for Therapeutic Gene Delivery and Its Application for the Treatment of Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2016 Apr 5;8:68. doi: 10.3389/fnagi.2016.00068.
83. Rodriguez-Merchan EC, Valentino LA. The Role of Gene Therapy in Cartilage Repair. *Arch Bone Jt Surg.* 2019 Mar;7(2):79-90.
84. Makarov SS, Olsen JC, Johnston WN, Anderle SK, Brown RR, Baldwin AS Jr, i sur. Suppression of experimental arthritis by gene transfer of interleukin 1 receptor antagonist cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jan 9;93(1):402-6. doi: 10.1073/pnas.93.1.402.
85. Day CS, Kasemkijwattana C, Menetrey J, Floyd SS Jr, Booth D, Moreland MS, i sur. Myoblast-mediated gene transfer to the joint. *J Orthop Res.* 1997 Nov;15(6):894-903. doi: 10.1002/jor.1100150616.
86. Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC, Wasko MC, Tomaino MM, Kang R, i sur. Gene transfer to human joints: progress toward a gene therapy of arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jun 14;102(24):8698-703. doi: 10.1073/pnas.0502854102.
87. Ha CW, Cho JJ, Elmallah RK, Cherian JJ, Kim TW, Lee MC, i sur. A Multicenter, Single-Blind, Phase IIa Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of a Cell-Mediated Gene Therapy in Degenerative Knee Arthritis Patients. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 2015 Jun;26(2):125-30. doi: 10.1089/humc.2014.145.
88. Mease PJ, Hobbs K, Chalmers A, El-Gabalawy H, Bookman A, Keystone E, i sur. Local delivery of a recombinant adenoassociated vector containing a tumour necrosis factor alpha antagonist gene in inflammatory arthritis: a phase 1 dose-escalation safety and tolerability study. *Ann Rheum Dis.* 2009 Aug;68(8):1247-54. doi: 10.1136/ard.2008.089375.
89. Nixon AJ, Saxer RA, Brower-Toland BD. Exogenous insulin-like growth factor-I stimulates an autoinductive IGF-I autocrine/paracrine response in chondrocytes. *J Orthop Res.* 2001 Jan;19(1):26-32. doi: 10.1016/S0736-0266(00)00013-9.
90. Shi S, Mercer S, Trippel SB. Effect of transfection strategy on growth factor overexpression by articular chondrocytes. *J Orthop Res.* 2010 Jan;28(1):103-9. doi: 10.1002/jor.20945.
91. Yu P, Wang X, Fu YX. Enhanced local delivery with reduced systemic toxicity: delivery, delivery, and delivery. *Gene Ther.* 2006 Aug;13(15):1131-2. doi: 10.1038/sj.gt.3302760.
92. Goswami R, Subramanian G, Silayeva L, Newkirk I, Doctor D, Chawla K, i sur. Gene Therapy Leaves a Vicious Cycle. *Front Oncol.* 2019 Apr 24;9:297. doi: 10.3389/fonc.2019.00297.

93. Samsudin EZ, Kamarul T. The comparison between the different generations of autologous chondrocyte implantation with other treatment modalities: a systematic review of clinical trials. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2016 Dec;24(12):3912-3926. doi: 10.1007/s00167-015-3649-x.
94. Di Matteo B, Vandenbulcke F, Vitale ND, Iacono F, Ashmore K, Marcacci M, i sur. Minimally Manipulated Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Systematic Review of Clinical Evidence. *Stem Cells Int.* 2019 Aug 14;2019:1735242. doi: 10.1155/2019/1735242.
95. Song Y, Zhang J, Xu H, Lin Z, Chang H, Liu W, i sur. Mesenchymal stem cells in knee osteoarthritis treatment: A systematic review and meta-analysis. *J Orthop Translat.* 2020 Apr 27;24:121-130. doi: 10.1016/j.jot.2020.03.015.
96. Maheshwer B, Polce EM, Paul K, Williams BT, Wolfson TS, Yanke A, i sur. Regenerative Potential of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Knee Osteoarthritis and Chondral Defects: A Systematic Review and Meta-analysis. *Arthroscopy.* 2021 Jan;37(1):362-378. doi: 10.1016/j.arthro.2020.05.037.
97. Pettipher ER, Higgs GA, Henderson B. Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Nov;83(22):8749-53. doi: 10.1073/pnas.83.22.8749.
98. Kraus VB, Birmingham J, Stabler TV, Feng S, Taylor DC, Moorman CT 3rd, i sur. Effects of intraarticular IL1-Ra for acute anterior cruciate ligament knee injury: a randomized controlled pilot trial (NCT00332254). *Osteoarthritis Cartilage.* 2012 Apr;20(4):271-8. doi: 10.1016/j.joca.2011.12.009.
99. Chew E, Prakash R, Khan W. Mesenchymal stem cells in human meniscal regeneration: A systematic review. *Ann Med Surg (Lond).* 2017 Oct 5;24:3-7. doi: 10.1016/j.amsu.2017.09.018.
100. Twomey-Kozak J, Jayasuriya CT. Meniscus Repair and Regeneration: A Systematic Review from a Basic and Translational Science Perspective. *Clin Sports Med.* 2020 Jan;39(1):125-163. doi: 10.1016/j.csm.2019.08.003.
101. Jacob G, Shimomura K, Krych AJ, Nakamura N. The Meniscus Tear: A Review of Stem Cell Therapies. *Cells.* 2019 Dec 30;9(1):92. doi: 10.3390/cells9010092.
102. Vangsness CT Jr, Farr J 2nd, Boyd J, Dellaero DT, Mills CR, LeRoux-Williams M. Adult human mesenchymal stem cells delivered via intra-articular injection to the knee following partial medial meniscectomy: a randomized, double-blind, controlled study. *J Bone Joint Surg Am.* 2014 Jan 15;96(2):90-8. doi: 10.2106/JBJS.M.00058.
103. Pak J, Lee JH, Lee SH. Regenerative repair of damaged meniscus with autologous adipose tissue-derived stem cells. *Biomed Res Int.* 2014;2014:436029. doi: 10.1155/2014/436029.

104. Centeno CJ, Busse D, Kisiday J, Keohan C, Freeman M, Karli D. Regeneration of meniscus cartilage in a knee treated with percutaneously implanted autologous mesenchymal stem cells. *Med Hypotheses*. 2008 Dec;71(6):900-8. doi: 10.1016/j.mehy.2008.06.042.
105. Onoi Y, Hiranaka T, Nishida R, Takase K, Fujita M, Hida Y, i sur. Second-look arthroscopic findings of cartilage and meniscus repair after injection of adipose-derived regenerative cells in knee osteoarthritis: Report of two cases. *Regen Ther*. 2019 Aug 24;11:212-216. doi: 10.1016/j.reth.2019.07.010.
106. Sekiya I, Koga H, Otabe K, Nakagawa Y, Katano H, Ozeki N, i sur. Additional Use of Synovial Mesenchymal Stem Cell Transplantation Following Surgical Repair of a Complex Degenerative Tear of the Medial Meniscus of the Knee: A Case Report. *Cell Transplant*. 2019 Nov;28(11):1445-1454. doi: 10.1177/0963689719863793.
107. Vadodaria K, Kulkarni A, Santhini E, Vasudevan P. Materials and structures used in meniscus repair and regeneration: a review. *Biomedicine (Taipei)*. 2019 Mar;9(1):2. doi: 10.1051/bmdcn/2019090102.
108. Madry H, Cucchiaroni M, Terwilliger EF, Trippel SB. Recombinant adeno-associated virus vectors efficiently and persistently transduce chondrocytes in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Hum Gene Ther*. 2003 Mar 1;14(4):393-402. doi: 10.1089/104303403321208998.
109. Madry H, Cucchiaroni M, Kaul G, Kohn D, Terwilliger EF, Trippel SB. Menisci are efficiently transduced by recombinant adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Am J Sports Med*. 2004 Dec;32(8):1860-5. doi: 10.1177/0363546504265189.
110. Goto H, Shuler FD, Niyibizi C, Fu FH, Robbins PD, Evans CH. Gene therapy for meniscal injury: enhanced synthesis of proteoglycan and collagen by meniscal cells transduced with a TGFbeta(1) gene. *Osteoarthritis Cartilage*. 2000 Jul;8(4):266-71. doi: 10.1053/joca.1999.0300.
111. Yolcu YU, Moinuddin FM, Wahood W, Alvi MA, Qu W, Bydon M. Use of regenerative treatments in treatment of lumbar Degenerative Disc Disease: A systematic review. *Clin Neurol Neurosurg*. 2020 Aug;195:105916. doi: 10.1016/j.clineuro.2020.105916.
112. Migliorini F, Rath B, Tingart M, Baroncini A, Quack V, Eschweiler J. Autogenic mesenchymal stem cells for intervertebral disc regeneration. *Int Orthop*. 2019 Apr;43(4):1027-1036. doi: 10.1007/s00264-018-4218-y.
113. Meisel HJ, Agarwal N, Hsieh PC, Skelly A, Park JB, Brodke D, i sur. Cell Therapy for Treatment of Intervertebral Disc Degeneration: A Systematic Review. *Global Spine J*. 2019 May;9(1 Suppl):39S-52S. doi: 10.1177/2192568219829024.
114. Sobajima S, Kim JS, Gilbertson LG, Kang JD. Gene therapy for degenerative disc disease. *Gene Ther*. 2004 Feb;11(4):390-401. doi: 10.1038/sj.gt.3302200.

115. Roh EJ, Darai A, Kyung JW, Choi H, Kwon SY, Bhujel B, i sur. Genetic Therapy for Intervertebral Disc Degeneration. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 4;22(4):1579. doi: 10.3390/ijms22041579.
116. Wehling P, Schulitz KP, Robbins PD, Evans CH, Reinecke JA. Transfer of genes to chondrocytic cells of the lumbar spine. Proposal for a treatment strategy of spinal disorders by local gene therapy. *Spine (Phila Pa 1976).* 1997 May 15;22(10):1092-7. doi: 10.1097/00007632-199705150-00008.
117. Nishida K, Kang JD, Suh JK, Robbins PD, Evans CH, Gilbertson LG. Adenovirus-mediated gene transfer to nucleus pulposus cells. Implications for the treatment of intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976).* 1998 Nov 15;23(22):2437-42; discussion 2443. doi: 10.1097/00007632-199811150-00016.
118. Li H, Li W, Liang B, Wei J, Yin D, Fan Q. Role of AP-2 α /TGF- β 1/Smad3 axis in rats with intervertebral disc degeneration. *Life Sci.* 2020 Dec 15;263:118567. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118567.
119. Liu X, Li K, Song J, Liang C, Wang X, Chen X. Efficient and stable gene expression in rabbit intervertebral disc cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Spine (Phila Pa 1976).* 2006 Apr 1;31(7):732-5. doi: 10.1097/01.brs.0000206977.61305.43.

11. Životopis

Rođen sam 19.5.1996 u Zagrebu. Osnovnoškolsko obrazovanje sam stekao u Osnovnoj školi Retkovec. 2010. godine upisujem VII. Gimnaziju, popularno nazvanu „Križanićeva“. Tijekom osnovnoškolskog i srednjoškolskog obrazovanja sudjelujem na brojim natjecanjima na području fizike, kemije, matematike i biologije. Od malena pokazujem zanimanje za prirodoslovlje, a 2014 završavam srednju školu i maturiram za odličnim uspjehom.

U akademskoj godini 2016/2017 bio sam demonstrator na katedrama za Biologiju i Fiziku, a interes za ortopediju mi se javio na 4. godini fakulteta. Na 4. godini se također učlanjujem u studentsku udruhu EMSA Zagreb (European medical students' association) i ubrzo postajem i voditelj financijskog tima. U sklopu rada udruge sam sudjelovao u organizaciji brojnih projekata poput Zagreb international medical summit- a (ZIMS) i Emergency medicine summer school-a (EMSS).

Osim rada u studentskoj udruzi, više godine fakulteta su mi obilježene radom na Katedri za Biologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu pod mentorstvom docenta Frane Paića koji mi je i bio mentor u istraživačkom radu čiji sam sažetak prezentirao na studentskom kongresu CROSS. Za vrijeme rada na Katedri za Biologiju sam usvojio osnovne principe rada u biološkom laboratoriju, izolacije nukleinskih kiselina iz periferne krvi i PCR-a. Naslov prezentiranog sažetka je „Expression pattern of lncRNA H19 and MALAT1 in the peripheral circulation of patients with calcific aortic valve stenosis - preliminary data“ .