Učinkovitost koštanoga morfogenetskoga proteina BMP1-3 u procesu cijeljenja kosti

Đurđević, Dragan

Doctoral thesis / Disertacija

2017

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:364372

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Dragan Đurđević

Učinkovitost koštanoga morfogenetskoga proteina BMP1-3 u procesu cijeljenja kosti

DISERTACIJA

Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Dragan Đurđević

Učinkovitost koštanoga morfogenetskoga proteina BMP1-3 u procesu cijeljenja kosti

DISERTACIJA

Zagreb, 2017.

Disertacija je je izrađena na Medicinskom fakultetu i Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, dok je istraživanje provedeno u Zavodu za procesno inženjerstvo - Laboratorij za tehnološke operacije, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: akademik Slobodan Vukičević

Zahvaljujem se:

voditelju projekta i mentoru **akademiku Slobodanu Vukičeviću** na stručnom vođenju i tehničkoj pomoći pri osmišljanju i provođenju istraživanja te na savjetima u izradi rada,

prof. dr. sc. Lovorki Grgurević i njenom timu u Laboratoriju na nesebičnoj pomoći i potpori u izradi rada,

prof. dr. sc. Damiru Ježeku i njegovom timu na tehničkoj podršci i stručnoj pomoći u izvođenju istraživanja,

Bastalić Ivančici, prof., na tehničkoj pomoći u izradi rada

a rad u cijelosti posvećujem Marijani, Nini i Marinu bez kojih svi moji napori ne bi imali pravi smisao.

SADRŽAJ

1.	**UVOD**	1
1.1.	Epidemiologija	5
1.2.	Uloga koštanih morfogenetskih proteina u embrionalnom razvoju	7
1.3.	Koštani morfogenetski protein-1 (BMP-1)	9
2.	**HIPOTEZA**	18
3.	**CILJ RADA**	19
4.	**MATERIJAL I METODE**	20
4.1.	Stanice	20
4.2.	Antitijela	20
4.3.	Kloniranje i ekspresija BMP-1 isoformi	20
4.4.	Analiza genske ekspresije	21
4.5.	Ljudsko tkivo, imunohistokemija i morfometrijska analiza	22
4.6.	Model slomljene bedrene kosti u štakora	22
4.7.	Kritični defekt ulne u kunića	22
4.8.	MicroCT	23
4.9.	Pokus stvaranja koštanih čvorića in vitro	25
4.10.	MC3T3-E1 stanice	25
4.11.	Biomehaničko testiranje	26
4.12.	Id-1 reporter metoda mjerenja BMP aktivnosti	26
4.13.	Statistika	26
5.	**REZULTATI**	28
5.1.	Cirkulirajući Bmp1-3 potiče cijeljenje prijeloma u štakora	28
5.2.	Ekspresija BMP1-3 u razvoju ljudske kosti	31
5.3.	Lokalna primjena BMP1-3 potiče i ubrzava regeneraciju kosti	32
5.4	BMP1-3 utječe na diferencijaciju osteoblasta in vitro	37
5.5.	BMP1-3 potiče aktivnost BMP7 in vitro	42
6.	**RASPRAVA**	44
7.	**ZAKLJUČCI**	49

8. SAŽETAK 50

9. SUMMARY 51

10. LITERATURA 52

11. ŽIVOTOPIS 63

POPIS UPOTREBLJENIH OZNAKA I KRATICA

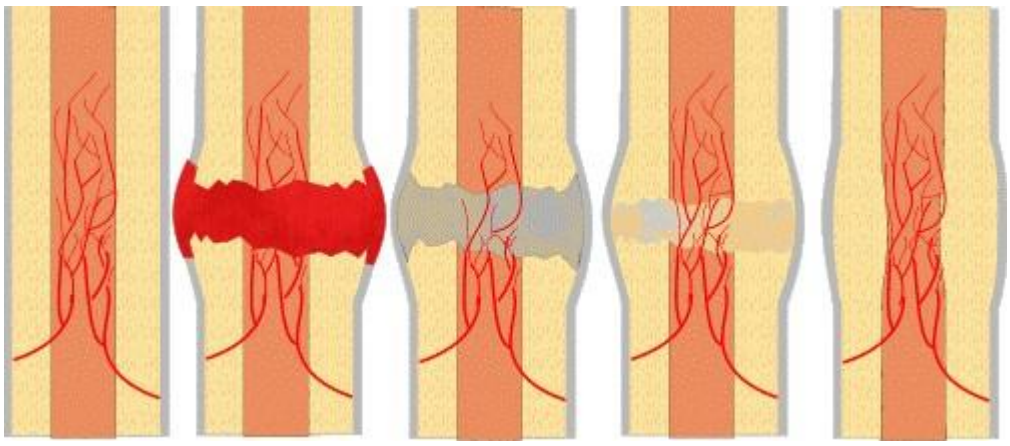
AP	- od lat. antero-posteriorno
BMP	- koštani morfogenetski proteini (od engl. bone morphogenic protein)
cDNA	- komplementarni lanac DNA
CKD	- kronična bubrežna bolest
Coll I,II	- kolagen tipa I,II
CT	- kompjutorizirana tomografija (od engl. computed tomography)
DNA	- deoksiribonulkeinska kiselina (od engl. deoxyribonucleic acid)
dpp	- od engl. decapentaplegic
ECM	- izvanstanični matriks (od engl. extracelluar matrix)
EGF	- epidermalni faktor rasta (od engl. epidermal growth factor)
GAPDH	- glicerid-3-fosfat dehidrogenaza
LL	- od lat. latero-lateral
MC3T3E1	- prosteoblastična stanična linija kosti mišje kalvarije
mRNA	- ribonukleinska kiselina (od engl. messanger ribonucleic acid)
PCP	- prokolagen C proteinaza (od engl. procollagen C proteinasis)
rhBMP	- rekombinantni koštani morfogenetski protein
TGFβ	- transformirajući faktor rasta (od engl. transforming growth factor type β)

1. UVOD

Kost je izrazito aktivno tkivo u tijelu kojeg obilježava proces trajnog preoblikovanja. Taj se proces manifestira sposobnošću regeneracije kosti nakon prijeloma, pokretanjem cijelog niza staničnih procesa sa konačnim ciljem stvaranja nove kosti. U posljednja dva desetljeća je učinjen značajan napredak u razumijevanju procesa regeneracije kosti te je utvrđeno da kost cijeli unaprijed određenim slijedom događaja (1) /Slika 1/. Faze pregradnje kosti u procesu cijeljenja prijeloma kod odraslog čovjeka uvelike nalikuju slijedu embrionalnog razvoja kosti. Novostvoreni hrskavični prijelomni kalus postupno vaskularizira a potom, u normalnim okolnostima, okošta u prosječnom vremenu od 24 tjedna od prijeloma. Ukoliko prijelom ne zacijeli u periodu od 8 mjeseci govorimo o nesraštanju koje zahtijeva dodatne mjere liječenja.

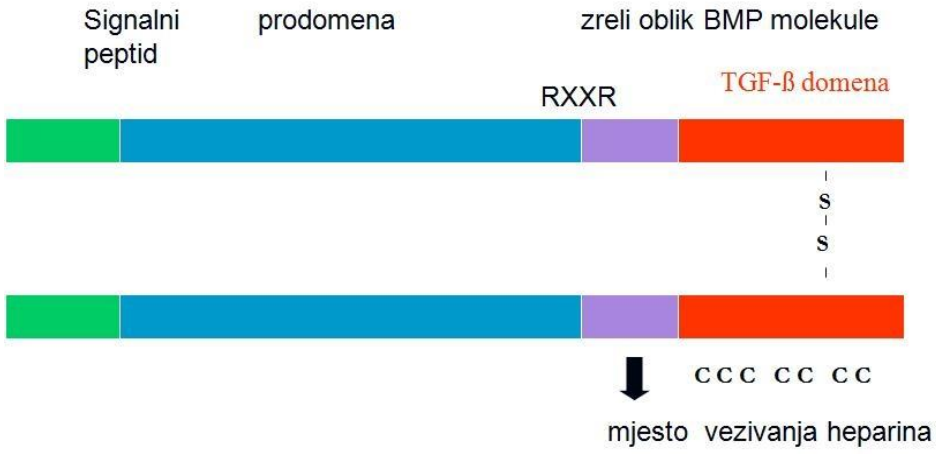
Kod liječenja odloženog sraštanja ili nesraštanja prijeloma u svakodnevnoj kliničkoj praksi metoda autologne spongioplastike je i danas „zlatni standard“. Zasniva se na stimulaciji cijeljenja prijeloma poticanjem mikrosredine autotransplantacijom kosti u mjesto nesraštanja prijeloma. Međutim, kliničke studije su pokazale nezadovoljavajući učinak ove metode i do 30% slučajeva, posebice kod slučajeva većih koštanih defekata. Kao nuspojave metode relativno su često tegobe u smislu bolova, neurovaskularnih ozljeda te infekcije na mjestu uzimanja spongiozne kosti. Moguće se rješenje tih problema ponudilo sredinom 60-tih godina prošlog stoljeća otkrićem obitelji osteogenih molekula sa izraženim osteoinduktivnim učincima u kosti ali i drugim tkivima. Te su molekule nazvane koštani morfogenetski proteini (engleski: Bone Morphogenic Proteins, BMPs). Riječ je o grupi citokina iz nadobitelji transformirajućeg faktora rasta β (TGFβ)

/Slika 2/. Članovi BMP obitelji imaju raznoliku ulogu te se smatraju općim čimbenicima rasta tijekom embriogeneze i formiranja organizma. Većina članova te grupe (uključivo BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, BMP9, BMP12 i BMP13) imaju izraženo osteoinduktivno djelovanje u kostima i drugim tkivima kao i važan utjecaj na stvaranje hrskavice (2-7). Proteini BMP2 do BMP7 čine jedinstvenu obitelj unutar nadobitelji transformirajućeg čimbenika rasta ß (TGFß). Pored njihove važnosti u razvoju kostura kralješnjaka, ističe se i njihovo veliko značenje u razvoju drugih tkiva i organa koji se stvaraju mezenhimsko-epitelijalnim međudjelovanjem(8). Nedavna istraživanja staničnog djelovanja BMP proteina pokazala su da oni imaju vrlo važnu ulogu kao diferencijacijski čimbenici koji potiču i pojačavaju izražaj različito diferenciranih fenotipova mezenhimalnih stanica. Dostupnost postupaka molekularne biologije i proteinske kemije, te postojanje prikladnog životinjskog modela omogućilo je otkriće gena odgovornih za kodiranje proteina čija se funkcija veže uz indukciju koštanog tkiva (9).



Slika 1. Faze u cijeljenju koštanog prijeloma

Proces stvaranja hrskavice i kosti *in vivo* kao odgovor na koštane morfogenetske proteine je vrlo složen i stupnjevit proces u kome nedvojbeno aktivno sudjeluju brojni lokalni čimbenici rasta i sustavni hormoni. Istraživanja pojedinačnih koraka u tom procesu ispitivanjem učinaka koštanih morfogenetskih proteina na različite stanične tipove *in vitro* omogućila su nam početak razumijevanja i razjašnjavanja djelovanja tih čimbenika na staničnoj razini (10). Raznovrsne stanice odgovaraju na koštane morfogenetske proteine povećanjem ili smanjivanjem proliferacije. Na tretman koštanim morfogenetskim proteinima osteoblastične, odnosno, osteoprogenitorske stanice reagiraju povećanjem proliferacije (11,12). Izvjesno je da su ti čimbenici uključeni u mnoge regulacijske stupnjeve rasta i održavanja različitih tipova stanica unutar hrskavičnih i koštanih linija. Prisutnost koštanih morfogenetskih proteina uzrokuje diferencijaciju mezenhimskih stanica u nekoliko fenotipova te pojačava izražaj pokazatelja združenih sa tim fenotipovima. Oni također djeluju na hondroblaste, hondrocite i hondroprogenitorske stanice. Premda su članovi TGF-β nadobitelji, koštani morfogenetski proteini i TGF-β imaju malo zajedničkih učinaka na stanice *in vitro*.



Slika 2. Proteinska struktura članova TGFβ nadobitelji.

Koštani morfogenetski proteini *in vitro* imaju znatne učinke na stanice tijekom procesa enhondralnog stvaranja kosti opaženog nakon ugradnje tih proteina *in vivo*. Mehanizmom kemotaksije koštani morfogenetski proteini mogu dovesti stanice na mjesto ugradnje, potaknuti mezenhimalne progenitorske stanice na diferencijaciju u stanice sposobne stvoriti hrskavicu i kost te utjecati na proliferaciju tih stanica na različitom stupnju razvojnog procesa. Najizraženiji a istodobno i najspecifičniji opaženi učinak koštanih morfogenetskih proteina jest diferencijacija mezenhimskih progenitorskih stanica u hondroblaste i osteoblaste (12). Kako koštani morfogenetski proteini ne ostaju na mjestu ugradnje dovoljno dugo da usmjere sve te procese *in vivo*, izražaj različitih BMP molekula u različitim staničnim tipovima, posebice osteoblastima, upućuje na to da kaskada izražaja različitih BMP molekula može barem djelomično regulirati proces stvaranja kosti koji je započet ugradnjom jednog koštano morfogenetskog proteina.

Nakon otkrića BMP molekula i njihovih receptora objavljena su brojna izvješća o njihovoj kliničkoj primjeni (13-21). Kliničke studije, mada još brojčano slabije u odnosu na pretklinička istraživanja, potvrdile su tvrdnju da su BMP molekule pouzdane, snažne i primjenjive molekule u regenerativnoj medicini kojima se u kombinaciji sa drugim faktorima može poboljšati cijeljenje kosti, ali i drugih tkiva ili organa (12).

Široka klinička primjena BMP molekula pokazala je i neke manje ali prisutne nedostatke. U biološkom smislu problem je u korištenju nosača životinjskog podrijetla (goveđi kolagen) uz primjenu visokih doza rekombinantnog BMP2 ili BMP7 proteina što se odražava visokom cijenom proizvoda koja je realna zapreka širokoj primjeni. S druge strane postoji mogućnost prijenosa prionskih i virusnih bolesti (npr. goveđa spongioformna encefalopatija, tzv. „kravlje ludilo“) zbog čega su u određenom periodu

komercijalni nosači goveđeg podrijetla potpuno povučeni sa tržišta. Iz navedenog proizlazi jasna potreba za razvojem nove osteogene naprave (nosača) kojom će se omogućiti uspješno cijeljenje prijeloma zasnovano na biološki prihvatljivim komponentama uz prikladnu cijenu za široku primjenu. Idealan nosač treba u sebi posjedovati svojstvo polaganog otpuštanja BMP molekula uz očuvanu osteoinduktivnu aktivnost, imunološku inertnost, biorazgradivost, dobra mehanička svojstva te jednostavnost primjene. Do sada su raznoliki materijali korišteni kao nosači: kolagen, fibrin, kalcijev fosfat, polilaktična kiselina, titanski implantati itd. Danas se u komercijalnoj upotrebi najčešće koriste preparati kolagena. Primjena rhBMP7, BMP2 i kolagenog nosača dovodi do uspješnog cijeljenja segmentalog defekta kosti kod zečeva, pasa, majmuna, te ljudi (12, 22, 23).

1.1. Epidemiologija

Prijelomi uslijed osteoporoze zauzimaju sve značajnije mjesto u sveukupnom morbiditetu stanovništva razvijenih zemalja ali i zemalja u razvoju. Osteoporozom je zahvaćeno gotovo 75 milijuna ljudi u Europi, SAD i Japanu (25). Više od 6 milijuna osteoporotskih prijeloma godišnje se zabilježi u zemljama Europe i SAD-u te oko 13 milijuna u Indiji. Od 1990 do 2000 godine broj prijeloma kuka na svjetskoj je razini porastao za 25%. Procjenjuje se da će do 2050 godine učestalost prijeloma kuka (kao najčešćeg osteoporotskog prijeloma) na svjetskoj razini porasti za 310% kod muškaraca i 240% kod žena (26). Pritom treba istaknuti da u razvijenim industrijskim zemljama osteoporoza uzrokuje 70% svih prijeloma kod osoba iznad 45 godina starosti te da su kod osoba iznad 50 godina starosti prijelomi glavni uzrok hospitalizacije (27). U Europi je

invalidnost uzrokovana osteoporozom veća od one koju uzrokuju zloćudni tumori. Kod žena iznad 45 godina starosti trajanje hospitalizacije zbog osteoporoze je veće nego kod dijabetesa, infarkta miokarda ili karcinoma dojke (27).

Kod 6 do 10% osteoporotičnih prijeloma dolazi do nesraštanja uz razvoj kroničnih simptoma kao što su bol, funkcionalna i psihosocijalna invalidnost. Takvo stanje zahtijeva sekundarne kirurške zahvate uz dugotrajno i skupo liječenje. S produljenjem prosječnog životnog vijeka stanovništva raste i broj bolesti povezanih uz muskuloskeletni sustav. 2000 godine troškovi liječenja osteoporotskih prijeloma u Europi su iznosili 31,7 milijardi €, a procjenjuje se da će do 2050 godine ti troškovi narasti na 76,7 milijardi € (28).

Rekonstrukcija velikih koštanih defekata jedan je od najtežih problema u ortopedskoj kirurgiji. Broj koštanih defekata se povećava porastom broja i složenosti ozljeda, prvenstveno zbog porasta broja teških prometnih nezgoda i nasilnih incidenata. Postoji više metoda putem kojih se nadomještaju veliki koštani defekti: transplantacija kosti, segmentalni transport kosti, ugradnja zglobnih endoproteza kod defekata na zglobnim krajevima kosti te metode tkivnog i genetskog inženjeringa s ugradnjom nadomjestaka za kost ispunjenih faktorima rasta i genetski promijenjenim matičnim stanicama. Autotransplantacija kosti (autospongioplastika) je i danas „zlatni standard“ u rekonstrukciji velikih koštanih defekata. Nedostatak metode su morbiditet mjesta uzimanja spongiozne kosti (bol, neurovaskularne komplikacije, infekcija) te ograničene količine tako dobivene kosti. To je povećalo učestalost metode transplantacije kosti sa čovjeka na čovjeka (homotransplantacija). Njeni su nedostaci mogućnost prijenosa virusnih i prionskih bolesti, te smanjena sposobnost poticanja stvaranja kosti domaćina

kao i slabija pregradnja velikih homotransplantata i ksenotransplantata. Provedena su mnogobrojna istraživanja s ciljem pronalaženja sintetskih ili prirodnih nadomjestaka za koštane transplantate (29). Oni se kombiniraju s osteoinduktivnim tvarima kao što su koštani morfogenetski proteini, koštana srž i matične mezenhimalne stanice (30). Idealna metoda u liječenju koštanih defekata bi bila ona koja će omogućiti brzo popunjavanje defekta uz kvalitetnu anatomsku i funkcionalnu regeneraciju. Pri tome je od velike važnosti izbor nosača koji će svojim odlikama osigurati brzu, sigurnu i potpunu koštanu regeneraciju, osiguravajući time povrat punog integriteta koštanog sustava.

1.2. Uloga koštanih morfogenetskih proteina u embrionalnom razvoju

Nedvojbeno je dokazano da su mnogi koštani morfogenetski proteini i njihovi srodnici uključeni u složene razvojne procese tijekom embriogeneze. Štoviše, mnogi od njih imaju ključne uloge u razvoju različitih i vrlo udaljenih vrsta. Opisano je četrdesetak članova TGF-β nadobitelji, uključivo i homologe mnogih BMP molekula, koji su identificirani čak i u vrsta koje ne posjeduju hrskavično ili koštano tkivo. Na primjer, protein *60A* iz vinske mušice koji je evolucijski udaljen 700 milijuna godina od koštanih morfogenetskih proteina sisavaca (poput BMP-5, BMP-6, BMP-7) ali njihov slijed aminokiselina nije bitno različit. Dapače, rekombinantno izražen protein vinske mušice, *Drosophilae melanogaster*, koja nema niti hrskavice niti kosti, može potaknuti razvoj hrskavice i kosti kada se ugradi s kolagenskim nosačem u potkožno tkivo sisavaca (32).

Dva su člana TGF-β nadobitelji izolirana u *Drosophilae*. Dorzo- ventralno oblikovanje u blastodermu *Drosophilae* uvjetuje transkripcija grupe od sedam gena. Jedan od njih, gen nazvan *Decapentaplegic(dpp),* je strukturalno najsrodniji proteinima

sisavaca BMP2 i BMP4 a drugi, *60A*, je najsrodniji proteinima BMP5, BMP6, BMP7 i BMP8. *Decapentaplegic* je nužan za specifikaciju dorzalnog ektoderma a također i za diferencijaciju srednjeg crijeva (33). Pretpostavka da BMP2, BMP4 i *dpp* služe analognim funkcijama podkrijepljena je rezultatima koji pokazuju da područje proteina BMP4, koje je odgovorno za vezivanje na receptor, može u cijelosti zamijeniti ono u proteina *dpp* i time vratiti mutantni tip *dpp* u divlji oblik (34).

Manje je poznato o funkciji gena *60A* (35,36) koji je otkriven prvenstveno zbog homologije sa obitelji BMP a ne zbog genetskih analiza. Zna se da je izražen tijekom razvoja te da ima specifični maksimalni učinak u određenoj razvojnoj fazi. Izražaj gena *60A* je najprije otkriven na početku gastrulacije, mahom u mezodermu rastućeg germinativnog tračka. Kasnije je izražaj tog gena uočen i u prednjem i stražnjem crijevu. Kako su dva jedina gena TGF-β obitelji u *Drosophilae* vjerojatno potekli iz istih genskih preteča kao i podgrupe BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7 i BMP8, a važni su za njezin razvoj, BMP molekule su snažni kandidati za razvojno važne gene sisavaca.

Zanimljivo je napomenuti da *Drosophila tolloid*, koji posjeduje sličan aminokiselinski slijed i strukturu proteina kao BMP1, iskazuje sličan mutantni fenotip kao i *dpp*. Taj je gen, kao i *dpp*, potreban za stvaranje dorzalnih struktura tijekom embrionalnog razvoja. Nedavni nalazi upućuju na to da *tolloid* stvara gradijent *dpp* aktivnosti (36) te ga na određenim mehanizmom može i aktivirati. Navodi se da je to moguće putem cijepanja prekursora ili inaktivnog oblika pomoću *tolloid* proteaze (37). Slično tome, moguće je da BMP1 pojačava aktivnosti drugih koštanih morfogenetskih proteina, na način koji još nije do kraja razjašnjen.

1.3. Koštani morfogenetski protein-1 (BMP1)

U ranim radovima M. Urista iz 1979. godine te potkožnim koštanim esejem iz 1981. godine (3) pokazano je da usitnjena demineralizirana kortikalna kost ugrađena potkožno u štakora dovodi do stvaranja ektopične kosti što je potvrdilo osteoinduktivnu aktivnost ugrađenog materijala. Izdvajanje i prepoznavanje pojedinačnih proteina pod zajedničkim nazivom koštani morfogenetski proteini (engl. Bone Morphogenetics Proteins) započeo je 1988. Wozney sa suradnicima (4). Određivanjem aminokiselinskog slijeda nekih od komponenti sa morfogenetskim učinkom, izolirana su tri cDNA klona koja su nazvana BMP1, BMP2A i BMP3. Analiza aminokiselinskih sekvenci je pokazala je da BMP2A i BMP3 prema svojoj građi pripadaju nadobitelji transformirajućeg faktora rasta β (TGF-β). Nakon toga identificirano je još pet pripadnika iste nadobitelji (BMP 2, BMP 3, BMP 4, BMP 5, BMP 6, BMP 7) (38,39).

BMP1 je ubrzo izdvojen iz te grupe jer se svojom građom vidljivo razlikuje od pripadnika nadobitelji TGF-β ali i od drugih koštanih morfogenetskih proteina (40). Njegov aminokiselinski slijed pokazuje da na aminotermalnom kraju ima hidrofobno područje koje upućuje na to da se radi o sekrecijskom čimbeniku. 1987. godine Titani i suradnici su otkrili da BMP1 ima područje homologno proteazi u raka roda *Astacus* (41). Do danas je to područje identificirano u cijelom nizu proteina iz obitelji metaloendoproteaza koji su nazvani Astacini. Ime su dobili po enzimu astacin koji je prvi sekvencioniran i biokemijski raščlanjen (42). Astacin je izgrađen od proteazne domene i pre-prosegmenta koji sadrži 49 aminokiselinskih ostataka. Tijekom biosinteze signalni peptidi usmjeravaju protein u endoplazmatski retikulum što potvrđuje činjenicu da se svi proteini iz obitelji izlučuju iz stanice ili se vežu na plazma membranu. U studijama na

meprinu mišjeg bubrega, digestivnoj proteazi u raka, meprinima iz ljudskog crijeva te BMP-1 utvrđeno je da svi sadrže domenu astacin-nalik proteaze za kojom slijedi EGF domena te tri CUB domene. Do sada je otkriveno više od 20 pripadnika ove obitelji. Za njih je svojstvena 18- aminokiselinska sekvenca sa početnim cink-vežućim motivom (**HE**XX**H**XX**G**XX**H)**. Taj je motiv zajednička odlika nizu cink- ovisnih metalopeptidaza u koje spadaju astacin, matriks metaloproteinaza, adamalizini (proteinaze zmijskog otrova) i seralizini (bakterijske alkalne proteinaze) koji čine superobitelj nazvanom „metzincini"(43). Daljnja istraživanja su bila usmjerena na djelovanje metaloproteinaza, posebice BMP1 i njihovu razvojnu ulogu.

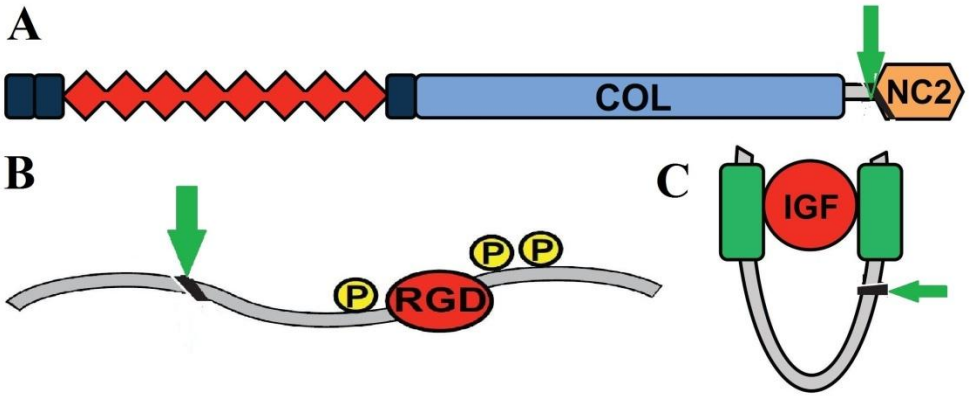
BMP1 se sintetizira kao inaktivni proenzim (42) a područje odvajanja prodomene moglo bi biti mjesto aktivacije BMP1. Otvorena je mogućnost da se prodomena BMP1 cijepa unutar stanice uz sekreciju aktivne molekule. Pro BMP1 molekula se sastoji od signalnog peptida, prodomene, katalitičke domene, tri CUB domene i EGF domene. CUB i EGF su nekatalitičke, interakcijske domene koje mogu omogućiti protein - protein i substrat interakciju. EGF slične domene se sastoje od otprilike 40 aminokiselina i imaju 6 visoko konzerviranih cisteinskih ostataka koji su vjerovatno povezani interdomenskim disulfidnim vezama. Nalazimo ih u velikom broju proteaza kao što su koagulacijske proteaze (faktor IX i X, protein C, tkivni plazminogenski aktivator) te u brojnim plazma membranskim proteinima (trombomodulin, L-selektin, neureksin 1-α, Neu- faktor diferencijacije). CUB domene se sastoje od 110 aminokiselinskih ostataka i 4 konzervirana cisteinska ostatka za koje se smatra da formiraju anti-paralelni β cilindar, vrlo sličan imunoglobulinskom (38). Uloga prodomene je nejasna iako se pretpostavlja da je odgovorna za održavanje molekule u latentnom stanju. Ekspresija rekombinantnog

BMP1 bez prodomene pokazuje da njena odsutnost ne znači prekid sekrecije čime se pak ne isključuje pretpostavljena važnost prodomene u sekreciji i aktivaciji molekule BMP1. Ostaje pitanje da li prodomena održava BMP1 u inaktivnom obliku dok se ne transportira na mjesto akcije gdje se potom odstranjenjem prodomene izlučuje aktivni oblik BMP1 (44).

Veliki broj astacina sadrži produženu C-terminalnu domenu jednaku onoj kod BMP1 a nekoliko većih astacina ima važnu ulogu u zametanju embrija, dorzo-ventralnom oblikovanju te u ranim fazama razvoja embrija. Također, postoje indirektni dokazi da veći astacini djeluju istim signalnim putevima kao članovi TGF-β nadobitelji, možda kroz izravnu protein-protein interakciju (44). Prokop i suradnici su 1996. izolirali aminokiselinsku sekvencu peptidnih fragmenata prokolagen C-proteinaze, enzima odgovornog za procesuiranje prokolagena u fibrilski kolagen (45). Pritom su utvrdili da je prokolagen C-proteinaza strukturalno identična BMP1. Do istog je otkrića nešto ranije iste godine došao i Kessler sa suradnicima (46). Temeljem tog otkrića postavljena je teza da je BMP1 multifunkcionalnog djelovanja jer utječe na modifikaciju izvanstaničnog matriksa (ECM) ali i mnogobrojne procese te staničnu diferencijaciju (47).

Prokolagen C-proteinaza (PCP) je metaloproteinaza koja cijepa karboksil propeptide (C- propeptide) prokolagena tip I, II i III i time ih aktivira u zreli oblik koji formira kolagena vlakna, glavnu komponentu ECM (48). Bez cijepanja C- propeptida prokolagen ostaje kao djelomično procesuiran topivi prekursor te se ne inkorporira u fibrile (49). Nadalje, C-proteinaza *in vitro* procesuira prekursor lizil oksidaze u aktivni enzim što upućuje na njenu moguću ulogu u sintezi kovalentnih ukrižene sveza koje su ključne za normalnu tenzijsku snagu vlakana i kolagena i elastina. To znači da PCP ima

ključnu ulogu u biološkom funkcioniranju strukturalnih proteina koji uvelike određuju veličinu, oblik i snagu većine kompleksnih organizama. Brojni su dokazi da BMP1 i PCP djeluju na isti način (identične inhibicije, mogućnost cijepanja ljudskog prokolagena na isti način bazirano na analizi NH2 sekvence, jednake reakcije u Western blot analizi sa antitijelima za vežući BMP1 protein, identična pokretljivost nakon deglikozilacije na SDS-PAGE gelu). Iako još nije izoliran i sekvencioniran cDNA klon PCP-a, može se ustvrditi da su BMP1 i PCP zapravo isti enzim.



Slika 3. Shematski prikaz najčešće poznatih BMP 1 substrata: A/ molekule kolagena; B/ proteini koji ne pripadaju grupi kolagena ali čine proteine izvanstaničnog matriksa; C/ drugi proteini koji ne pripadaju molekulama izvanstaničnog matriksa (npr. IGFBP3).

U ranim studijama (2,4) BMP1 je funkcionalno povezivan uz razvoj kosti i hrskavice. Zbog ektopičnog stvaranja kosti u štakora BMP-1 je smatran glavnim dijelom niza razvojnih procesa, posebno stanične diferencijacije i histogeneze. BMP1 je tada izdvojen zajedno sa ostalim članovima BMP TGF-β nadobitelji te se pretpostavlja da se njegova koštana aktivnost ostvaruje katalitičkom aktivacijom latentnih oblika TGF-β i BMP molekula. Nadalje, temeljem studija EGF domena drugih proteina, smatralo se da

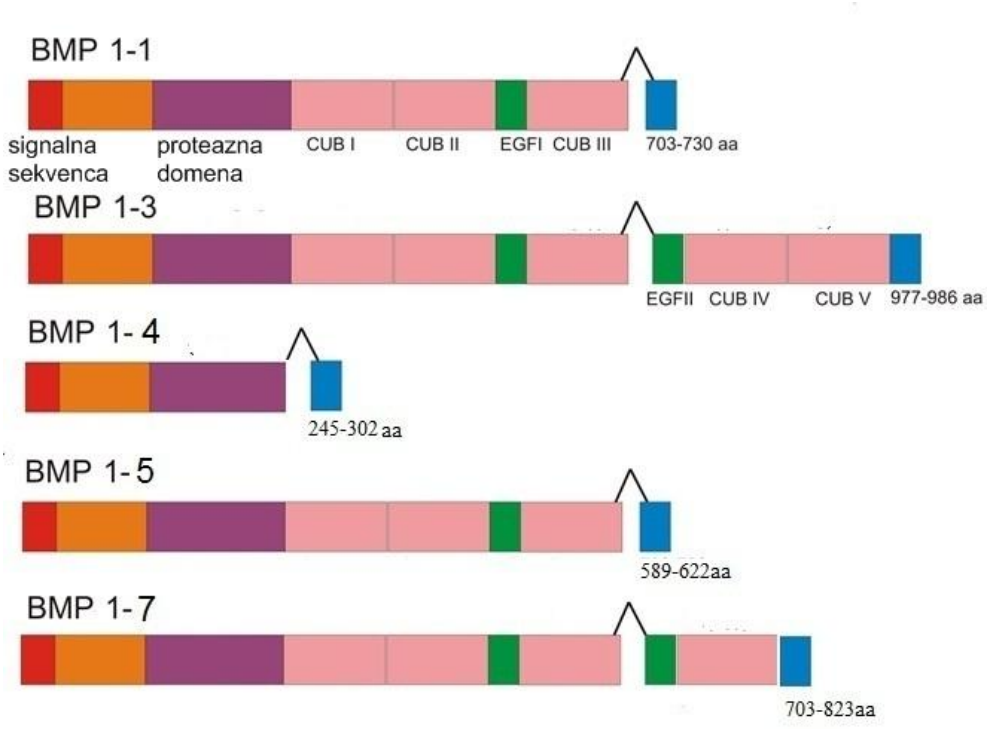
su EGF domene u BMP1 uključene u protein- protein interakcije. Sve navedeno je upućivalo na potencijalnu vezu BMP1, faktora rasta i razvojnih signalnih procesa koji rezultiraju staničnom diferencijacijom i histogenezom. 1991.godina je bila ključna jer se neočekivano otkrilo da je produkt dorzalno-ventralnog gena oblikovanja *D. melanogaster, tolloid* (TLD), strukturalno povezan sa BMP-1 (39). U blastodermu *Drosophilae*, dorzo-ventralno oblikovanje ovisi o transkripciji sedam zigotskih gena. Jedan od njih je nazvan *decapentaplegic /dpp/*. *Dpp* je ključan za dorzo-ventralno oblikovanje te je, poput BMP2-7, član TGF-β nadobitelji (50). *Tld* je jedan od nekoliko gena koji reguliraju *dpp* (51). Kako se razvojne potrebe oblikovanja za Tld mogu zaobići povišenjem razine *dpp* RNA u embrijima, predpostavljeno je da Tld djeluje na način da regulira aktivnost *dpp*, bilo aktivacijom *dpp* iz inaktivnog kompleksa ili izravnom proteolitičkom aktivacijom (52). Drugim riječima, Tld je potreban jer određuje gradijent aktivnosti *dpp* (38). Novije mutacijske studije upućuju na zaključak da C- terminal CUB domene i EGF domena olakšavaju *tolloid-dpp* intarakciju, vjerojatno stvaranjem protein-protein kompleksa u kome *dpp* aktivira proteolitička astacin domena Tld proteina (53). Ove studije na *Drosophili* su pružile genetsku potporu funkcionalne povezanosti između astacin metaloproteinaza (Tld protein), aktivacije faktora rasta te određenja osovine i formacije obrazaca.

Jedinstveni gen u sisavaca stvara alternativno preklopljenu mRNA za BMP-1 i za veći protein , točnije toloid sisavaca (mTld), zahvaljujući identičnoj strukture domena kao u Tld-a (54). Jedinstveni gen je odgovoran i za stvaranje BMP1 i mTld homologa u *Xenopusa* (55).Treba pritom reći da BMP1/TLD proteaze Xolloid *Xenopusa* (56) i tolloid zebraste ribice (57) imaju ventralizirajući učinak za vrijeme embrionalnog razvoja

cijepanjem proteina Chordina koji tvori latentne komplekse sa ventralizirajućim TGF-β nalik BMP2 i BMP4 te BMP 4/7 heterodimerima. Pandan tome u sisavaca je najvjerojatnije mTLL (engl. Mammalian Toloid like) za koga su Piccolo i Marques 1997. pretpostavili da je ortolog Xolloidu i Tld-u jer može ostvariti prokolagen-procesuirajuću aktivnost i djelomično kompenzirati izostanak BMP-1 i mTld kod BMP1/mTld null- miševa (54,56, 58). Zbog dokazane aktivnosti aktiviranja PCP-a i sudjelovanja u oblikovanju fibrila te gore navedenog svojstva cijepanja Chordina, Scott i suradnici 1999. pretpostavljaju da BMP1 i mTLL-1 imaju dvostruku aktivnost što znači da sudjeluju u organizaciji odlaganja matriksa s jedne strane ali i u procesima aktivacije TGF-β BMP molekula (59). Cijepanje Chordina i kod BMP1 i kod mTLL-1 je visokospecifičan proces gdje se kod oba enzima taj proces odvija na ista dva mjesta koja su vrlo nalik mjestima gdje je ranije opisano da BMP1 cijepa C- propeptide prokolagena I-III (46).

BMP1 gen se pojavljuje u nekoliko izoformi („splicing“ transkripti) od kojih su tri ranije otkriveni i opisani kao BMP1 (BMP1-1), BMP1/His (BMP1-2) i tld (BMP1-3) te tri novootkrivena oblika BMP1-4, BMP1-5 i BMP1-7 /slika 4/. Njihova ekspresija je prisutna u različitim tkivima. Za BMP1-3 se smatra da sudjeluje u aktivaciji TGF-β sličnih molekula te da vjerojatno cijepa i druge supstrate. Kod BMP1-2 izoforme je zadnja domena na C terminalnom dijelu BMP molekule zamijenjena sa dugom histidin bogatom domenom te se naziva i BMP1/His. BMP1-4 izoforma se razlikuje od ostalih oblika BMP1 molekule po tome što je proteazna domena prekinuta sa dodatnim egzonom. Pretpostavlja se da se takva molekula može vezati za ciljanu molekulu ali je ne može cijepati. Prema tome bi BMP1-4 bio prirodni inhibitor enzimske funkcije. Kod

BMP1-5 i BMP1-6 izoformi je proteolitička domena netaknuta dok je modificirana C terminalna regija uključujući CUB domenu odgovornu za protein-protein interakciju. Vjeruje se da tri novootkrivene izoforme vežu i procesuiraju supstrat potpuno drugačije od BMP-1, BMP/His ili Tld. Hipotezu da svaka od navedenih izoformi BMP-1 molekule djeluje kao samostalna proteaza sa jedinstvenom funkcijom podržavaju njihovi različiti ekspresijski izražaji. Tako je ekspresija BMP1-5 20% u placenti te 50% u bubregu a BMP1-4 1% u placenti a 9% u ovariju. Različite uloge BMP-7 u razvoju bubrega, BMP-8 spermatocita i BMP-9 jetre može sugerirati na funkcijsku povezanost sa koekspresijom „splicing“ izoformi BMP1 u tim organima. Jedinstvena struktura BMP-1 gena, njegova smanjena količina ekspresije, uloga u morfogenezi i njegova filogenetska očuvanost čine taj enzim izglednim kandidatom regulacije tkivne morfogeneze. Za sada je samo BMP-1 (BMP1-1) potvrđen na proteinskoj razini prateći njihovu izolaciju iz kosti. Sekvence ostalih BMP-1 izoformi nisu opisane na proteinskoj razini.



Slika 4. Shematski prikaz rasporeda domena nekih od izoformi BMP1 molekule.

Nedavno je otkriveno da BMP1-3 (izoforma *Bmp1* gena) cirkulira u plazmi zdravih ljudi no u slučajevima izoliranog prijeloma kosti tijekom prva tri tjedna nestaje iz cirkulacije. To upućuje da se vrlo vjerojatno veže na krajeve prelomljene kosti. Kako je BMP1-3 izoforma *Bmp1* gena, enzima značajnog za procesuiranje izvanstaničnog matriksa, moguće je da ima utjecaj i na brzinu srastanja prijeloma kosti kao i na brzinu cijeljenja koštanih defekata. Nekolageni proteini i enzimi u izvanstaničnom matriksu imaju utjecaja na matriks i regulaciju stvaranja kosti. Cirkulirajući BMP1-3 djeluje kao biološki regulator odlaganja kolagena u formiranju koštanog kalusa tijekom procesa regeneracije kosti. Nedavno je utvrđeno da inhibicija cirkulirajućeg BMP1-3 značajno usporava stvaranje ožiljkastog tkiva u bubregu štakora sa kroničnom bolesti bubrega (42). Ako se pokaže da BMP1-3 samostalno potiče lokalno stvaranje kosti, postoji mogućnost

njegove komercijalizacije u kliničkoj medicini. Nadalje, ako se dokaže da BMP1-3 i BMP7 imaju aditivni ili sinergistički učinak na zaraštanje defekata kosti, postoji mogućnost dizajniranja i testiranja nove i učinkovitije osteogene naprave od onih koje su trenutačno u kliničkoj primjeni.

2. HIPOTEZA

Rekonstrukcija velikih koštanih defekata i dalje predstavlja jedan od najvećih problema u ortopedskoj kirurgiji te do danas još nije nađeno cjelovito rješenje problema. Cirkulirajući oblik BMP1-3 molekule utječe na kvalitetu izvanstaničnog matriksa te bi time mogao imati utjecaj na brzinu cijeljenja prijeloma kosti. U kombinaciji sa koštanim morfogenetskim proteinima očekuje se aditivan ili sinergistički učinak na cijeljenje koštanih prijeloma te popunjavanje velikih koštanih defekata što bi moglo bitno doprinijeti našem razumijevanju regulacije procesa cijeljenja kosti.

3. CILJ RADA

Cilj rada je otkriti utjecaj novootkrivene cirkulirajuće molekule BMP1-3 na brzinu i uspješnost cijeljenja koštanog prijeloma u štakora i kunića. Pritom će se ispitati BMP1-3 učinak na izražaj gena važnih za funkciju osteoblasta u kulturi tkiva *in vitro,* ispitati učinak neutralizacije cirkulirajućeg BMP1-3 na brzinu cijeljenja uporabom specifičnog poliklonskog protutijela u štakora sa akutnim prijelomom bedrene kosti te pratiti učinkovitost kombinirane primjene BMP1-3 i rhBMP7 molekula na brzinu cijeljenja koštanih defekata kritične veličine ulne kunića. Dobiveni rezultati dati će nam odgovor na pitanje da li je BMP1-3 učinkovit u poticanju cijeljenja koštanih prijeloma te da li BMP1-3 proizveden rekombinantnom tehnologijom ima potencijal razvoja u lijek za primjenu kod ljudi.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. *Stanice* - U pokusima je upotrijebljena preosteoblastična stanična linija MC3T3-E1, uzgojena iz kalvarija novorođenih miševa soja C57B1/6 (62,63). Ta stanična linija ima sva osteoblastična obilježja kao što su sposobnost stvaranja kalcificiranog koštanog matriksa te kolagenih vlakana *in vitro*, aktivnost alkalne fosfataze, odgovora na paratiroidni hormon, prostaglandin E2 i 1,25-dihidroksivitamin D. Stanice su uzgajane u mediju DMEM, obogaćene fetalnim goveđim serumom (10%), ITS mješavinom (1%), penicilnom i streptomicinom. Uzgajane su u plastičnim posudama za uzgoj stanica (75 cm^3), u vlažnoj atmosferi s 5% CO2, na temperaturi od 37°C te su subkultivirane svakih tri do pet dana u omjeru 1:3 do 1:6 s pomoću otopine tripsina-EDTA.

Kulture stanica podijeljene su u dvije eksperimentalne grupe: kontrola bez terapije i grupu kojoj je svaki drugi dan primijenjen BMP1-3 (50ng/ml). Nakon tri tretmana ukupna je RNA izdvojena sa TRIzol-om (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA).

4.2. *Antitijela*- Poliklonska protutijela protiv zrele BMP1, BMP1-3 domene i BMP1 prodomene proizvedena su u kunića imuniziranjem specifičnim sintetskim peptidima: BMP1-1(aa 705-717); CRPALQPPRGRPHQ); BMP1-3 (aa759-772; CTSPNWPDKYPSKKE); i BMP1 prodomena (aa97-108; CQSTNGQPQRGA). Peptidna specifična antitijela su pročišćena prema srodnosti (Multiple Peptide Systems) te su ispitane križne reakcije i neutralizacijski učinci (rezultati nisu objavljeni).

4.3. *Kloniranje i ekspresija BMP-1 isoformi*- Ljudska BMP1-3 cDNA je sintetizirana iz RNA ljudske placente korištenjem Super Script TMIII First-Strand Synthesis System (Invitrogen). BMP1-3 protein kodirajuća sekvenca je pojačana s prednjim

(5'-GCAGGATATCCTGGACTTGGCCGAACTACACC-3') i reverznim (5'- GCATGCGGCCGCCCTTCC-TGCTGTGGAGTGTGTCC-3') primerima korištenjem Platinum ® Taq DNA Polymerase High Fidelity. Specifični genski produkti su klonirani u pENTR221 plazmid i sekvencionirani. Za stvaranje pcDNATM 3.2/V5-DEST ekspresijskog klona , slijed potvrđen sa pENTR221/BMP1-3 je rekombiniran sa pcDNATM 3.2/V5-DEST vektorom u LR rekombinacijskom procesu (Invitrogen Gareway® technology). Ekspresijski plazmid sisavaca pSec Tag2 *Bmp1-3* je prebačen u Freestyle TM CHO stanice korištenjem Free Style TM MAX transfekcijskog reagensa. Protein je pročišćen prema srodnosti kroz BMP1-3 kolonu specifičnih antitijela.

4.4. *Analiza genske ekspresije* – Ukupna RNA je izolirana iz MC3T3 stanica korištenjem TRIzol (Invitrogen). cDNA je sintetizirana i uvećana iz 1μg ukupne RNA korištenjem Super Script III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). Ciljana genska ekspresija je mjerena uporabom Light Cycler Fast Start DNA SYBR Green kit u Light Cycler instrumentu (Roche Diagnostics), kako je opisano (64). *Gapdh* je korišten kao gen za normalizaciju rezultata. Rezultati su prikazani kao „fold“ promjene na uporednom nivou ekspresije. Lista početnica koji su korišteni u reakcijama prikazana je u tablici 1.

Tablica 1. Slijed početnica korištenih za analizu genske ekspresije

Ciljani gen	Uzvodno 5'- 3'	Nizvodno 5'- 3'
Bmp1-3	CCCTGAGTATCCCAATGGCTA	CCACATAGTCATACCAGCACAG
Bmp-4	GACTTCGAGGCGGACACTTTCTA	GCCGGTAAAGATCCCTCATGTAA
Bmp-6	CAACGCCCTGTCCAATGAC	ACTCTTGCGGTTCAAGGAGTG
Bmp-7	ACGGACAGGGCTTCTCCTAC	ATGGTGGTATCGAGGGTGAA
Col 1	GCTCCTCTTAGGGGCCACT	CCACGTCTCACCATTGGGG
Bglap	TGACCTCACAGATCCCAAGG	GTCTGATAGCTCGTCACAAGG
Gapdh	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

4.5. *Ljudsko tkivo, imunohistokemija i morfometrijska analiza*- Ljudski embriji i fetusi u rasponu 5-14 tjedna gestacije koji su korišteni u ovoj studiji, prikupljeni su na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod kontrolom Internog nadzornog odbora i etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Imunohostokemija je provedena korištenjem imunoperoksidaza detekcijskog sistema (Zymed, San Francisco, CA) a snimke su učinjene Olympus Provis mikroskopom (Campbell, CA). Za praćenje formiranja kosti kod kritičnog defekta ulne u kunića, koštani uzorci su dekalcificirani i uklopljeni u parafin. Nakon rezanja uzorci su obojani trikromskim bojilom po Goldneru te hematooksilin eozinom (HE). Rezovi su učinjeni uzduž longitudinalne osi lakatne kosti kunića.

4.6. Model slomljene bedrene kosti u štakora - U istraživanju smo koristili muške Sprague-Dawley štakore (250-300 grama) kojima je u općoj anesteziji električnom cirkularnom pilom učinjena osteotomija proksimalne trećine bedrene kosti. Ulomci su potom reponirani nakon čega je učinjena intramedularna osteosinteza Kirschnerovom žicom. Štakori su nasumično podijeljeni u sljedeće grupe od po 8 članova (N=8):

A/ kontrola, samo osteotomija

B/ osteotomija uz davanje ne-imunogenog štakorskog IgG

C/ osteotomija uz davanje rhBMP1-3 i.v. 3x tjedno u dozi od 3 μg

D/ osteotomija uz davanje BMP1-3 antitijela i.v. 3x tjedno u dozi od 50 μg

Učinak liječenja smo praćen je rendgenskim snimanjima mjesta prijeloma svaka dva tjedna od operacije do šestog tjedna kada su životinje žrtvovane.

4.7. *Model kritičnog defekta lakatne kosti u kunića* - Za ovaj smo model koristili odrasle muške Novozelandske kuniće (3-4 kg tjelesne težine) radi procjene djelotvornosti

BMP1-3 u koštanom cijeljenju kritičnog defekta lakatne kosti. Kritični je prijelom napravljen pod općom anestezijom na lijevoj lakatnoj kosti kunića uz prijeoperativnu antibiotsku i analgetsku profilaksu. Nakon incizije kože i potkožja te prikaza kosti, u središnjem dijelu lakatne kosti pilom je napravljen defekt kosti veličine 15 mm. U taj smo defekt ugradili komercijalni nosač te potom ranu zatvorili po slojevima. Životinje su poslije operacije kroz narednih 7 dana dobivale antibiotik i analgetike. rhBMP1-3 (20μg) sa ili bez rhBMP7 (100 μg) dodan je na komercijalni kolagenski nosač (Helistat). Životinje su potom nasumično podijeljene u četiri ravnomjerne skupine (n = 8) :

A/ kontrola, defekt kosti ispunjen samo komercijalnim nosačem,

B/ defekt kosti ispunjen komercijalnim nosačem i rhBMP1-3 (20 μg),

C/ defekt kosti ispunjen komercijalnim nosačem i rhBMP7 (100 μg),

D/ defekt kosti ispunjen nosačem i kombinacijom rhBMP1-3 (20 μg i rhBMP7 (100 μg).

Ovaj je protokol odobren od strane nadležnih etičkih tijela.

4.8. *MicroCT* – Tomografsko snimanje se temelji na usmjeravanju rendgenskih zraka prema predmetu iz više smjerova (kutova) te mjerenju smanjenja intenziteta emitiranih zraka. Kompjuterizirana tomografija (CT) je neinvazivna radiološka metoda koja koristi kompjuter za rekonstrukciju slike od ravnine poprečnog presjeka (*slice*) kroz predmet. Utišavanje rendgenskih zraka primarno je funkcija energije rendgenskih zraka te gustoće i kompozicije materijala koji se snima (65). Kod rekonstrukcije CT slika koriste se posebni algoritmi za rekonstrukciju distribucije utišanosti rendgenskih zraka u volumenu koji se snima. CT umjesto dvodimenzionalnih elemenata, piksela (slikovni elementi) sadrži voksele (volumni elementi) koji stvaraju trodimenzionalnost dobivene slike (66). CT metoda je prvi put razvijena 70-tih godina 20. stoljeća (67). U usporedbi sa

konvencionalnim radiološkim metodama koje su ograničene na dvodimenzionalne slike, CT omogućava vizualizaciju i kvantifikaciju unutarnje strukture promatranog predmeta. Za snimanje i predočavanje koštanih struktura dovoljna je razlučivost od nekoliko desetaka μm. S obzirom na razinu razlučivosti CT uređaji dobivaju prefiks pa smo tako u našem istraživanju koristili mikro CT (μCT) uređaj (slika 5).



Slika 5. μCT uređaj 1076 SkyScan. Konstrukcija uređaja omogućava *in vivo* kao i *ex vivo* snimanje uzoraka.

Za snimanje zečjih kostiju koristili smo μCT uređaj 1076 tvrtke SkyScan (Kontich, Belgija). Snimanje uzoraka kosti izvodilo se na prostornoj razlučivosti od 18 μm sa aluminijskim filtrom debljine 0.5 mm, radi homogeniziranja energije rendgenskih zraka, te rotacijskim pomakom od 0.6^{o} u području od 190^{o}. Snimljene slike su rekonstruirane NRecon programom (SkyScan). Skeniranje analizirane kosti je započeto točno iznad početka kritičnog defekta i nastavilo se u dorzoventralnom smjeru obuhvaćajući cijeli defekt lakatne kosti i zdravu palčanu kost. Daljnju analizu novonastale kosti napravili smo pomoću CTAn programa (SkyScan) kojim smo iz rekonstruiranih slika dobili

podatke o koštanom volumenu (BV) i odnosu tkivnog i koštanog volumena (BV/TV). Štakorske kosti su bile skenirane na Scanco μCT 40 uređaju (Scanco, Švicarska) u 500 slojeva debljine 5μm. Nakon utvrđivanja referentne točke (središte prijeloma) učinjeno je po 250 presjeka u oba smjera koji su potom rekonstruirani i analizirani radi objektiviziranja novonastale kosti. Trabekularni koštani volumen (BV, mm^3), broj trabekula (Tb. N, mm^{-1}), debljina trabekula (Tb. Th, μm) i trabekularno razdvajanje (Tb. Sp, μm) su izmjereni prema prethodno opisanoj metodi (68).

4.9. *Pokus stvaranja koštanih čvorića in vitro* - stanice koštane srži prikupljene su iz bedrene i goljenične kosti iz četiri WT miša 8 tjedana starosti. Stanice su nasađene u posebne plastične posude za uzgoj stanica u obliku predmetnica sa 6 zdenaca u koncentraciji od $7x10_6$/zdencu i inkubirane u medijskoj formuli αMEM koja sadrži 10% fetalnog telećeg seruma(FCS). Polovica medija je izmijenjena trećeg dana. Diferencijacijski medij koji sadrži αMEM, 10% FCS, 8 mM β-glicerofosfata , 50 μg/ml askorbinske kiselina i 10^{-8} M deksametazona je dodan sedmoga dana. Medij je mijenjan svaki drugi dan do okončanja kulture. BMP1-3 (150 ng/ml) i BMP1-3 antijela (1 μg/ml) su dodavani u medij kod svakog hranjenja. Nakon 21 dana stanične kulture, bojanjem po van Kossi se objektiviziralo formiranje mineraliziranog matriksa. Kvantifikacija mineraliziranog područja je učinjena uporabom SForm softvera te izražena u obliku postotka.

4.10. *Biomehaničko testiranje* - Biomehaničko ispitivanje kvalitete kosti provedeno je na sustavu za ispitivanje materijala Model 810 (MTS System Corp, SAD). Provedene su dvije vrste ispitivanja na bedrenoj kosti štakora. Kako bi se odredila mehanička svojstva bedrene kosti proveden je test savijanja u tri točke („three-point bending“). Dijafiza

bedrene kosti je podvrgnuta progresivnom savijanju u tri točke do konačnog loma uz brzinu pomicanja od 0.1 mm/s kako su opisali Turner i Burr (70). Maksimalno opterećenje i krutost kosti su izračunati iz krivulje opterećenja. Testom udubljenja („indentation test“) u distalnoj metafizi bedrene kosti su određena mehanička svojstva trabekularne kosti (71, 72). Ulaskom igle u medularni kanal na mjestu distalne metafize koja putuje brzinom od 0.1mm/s određuju se parametri mehaničke stabilnosti trabekularne kosti.

4.11. *Id-1 reporter metoda mjerenja BMP aktivnosti* - C2C12-BRE-Luc stanična linija je stabilno transficirana plazmidom koji se sastoji od BMP-specifičnih elemenata promotora Id-1 gena za koji je vezan luciferazni gen izvjestitelj (dobiveno ljubaznošću Dr. G. Inmana iz Beatson Instituta za istraživanje raka, Glasgow, Škotska).

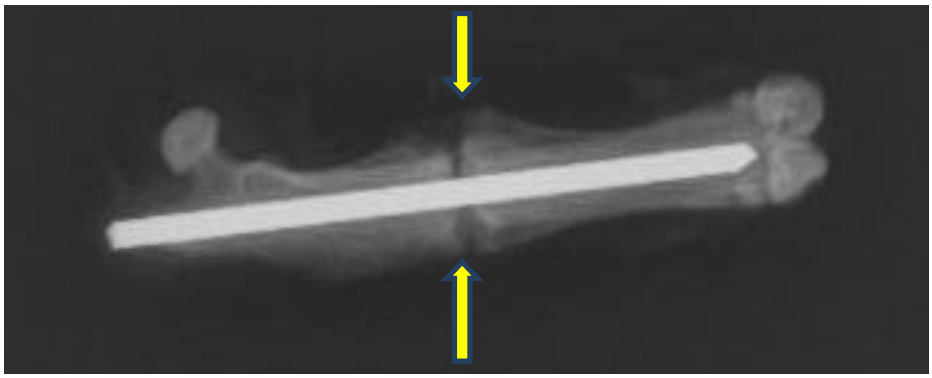
Dan prije pokusa stanice su nasađene u količini $2{,}5x10^4$ po zdencu, u pločicu sa 48 zdenaca. Nakon 24 sata medij je promijenjen te su stanice izgladnjivane u narednih 7 sati sa medijem koji se sastoji od DMEM/F-12 + 0.1% fetalnog goveđeg seruma. Izgladnjene stanice su potom tretirane sa BMP7 u odgovarajućim koncentracijama kroz sljedećih 17sati. Potom su stanice isprane sa hladnim PBS-om i lizirane u lizatnom puferu (Promeha, Reporter Lysis Buffer). U lizatima je izmjerena luciferazna aktivnost korištenjem reagensa (Promega, Luciferase Assay reagens) (20µl lizata + 100µl reagensa) na luminometru (Victor Wallack). Dobivene vrijednosti aktivnosti luciferaze su normalizirane prema koncentraciji ukupnih proteina u lizatima.

4.12. *Statistika* – Sve su vrijednosti prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) je primijenjena da se odredi učinak djelovanja BMP1-3 i antitijela BMP1-3 na kost. Statistička analiza stope

preživljenja je učinjena Petö-Wilcoxonovim testom. Rezultati su smatrani statistički značajnima ako je p vrijednost iznosila < 0.05.

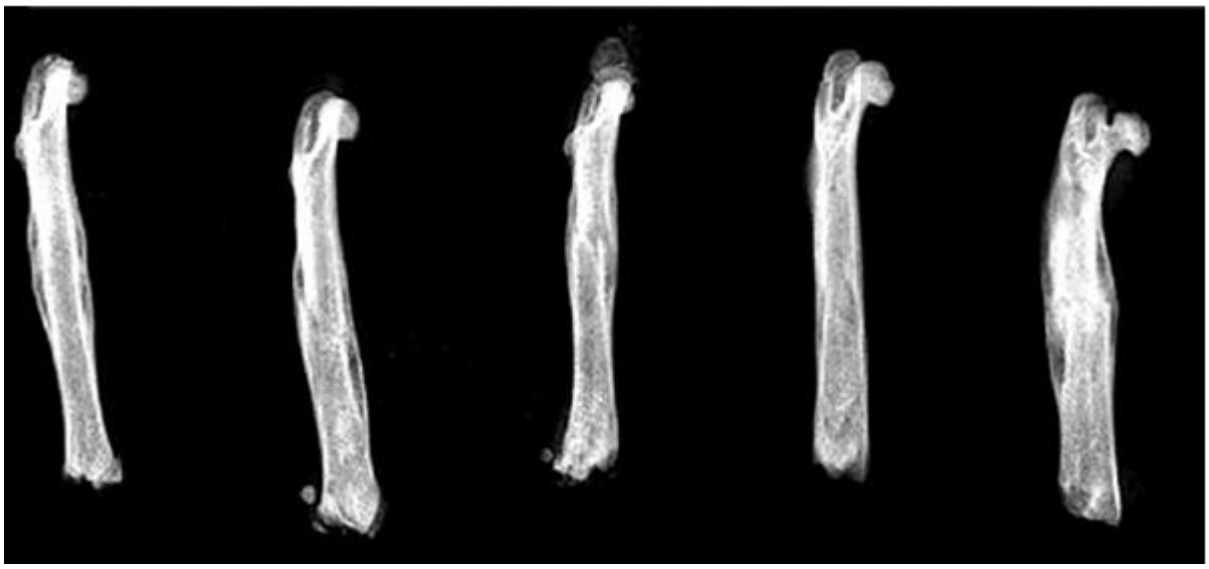
5. REZULTATI

5.1. *Cirkulirajući Bmp1-3 potiče cijeljenje prijelom u štakora* - Za određivanje fiziološke važnosti cirkulirajućeg BMP1-3 kod stvaranja kosti u štakora odabrali smo model slomljene bedrene kosti. Štakorima sa prijelomom bedrenom kosti smo intravenoznim putem (iv) davali neutralizirajuća poliklonska BMP1-3 antitijela. Kao rezultat je zamijećeno značajno slabije cijeljenje prijeloma (slika 6).



Slika 6. Radiološka snimka štakorske bedrene kosti nakon aplikacije BMP-1 antitijela. Nakon 8 tjedana prijelom nije zacijelio, prijelomna pukotina je jasno vidljiva.

Suprotno tome, sistemskim davanjem BMP1 i BMP7 proteina kroz vremensko razdoblje od 6 tjedana u dozi od 3 µg 3x tjedno, zabilježili smo povećanje koštane mase i ubrzano cijeljenje prijeloma (slika 7).



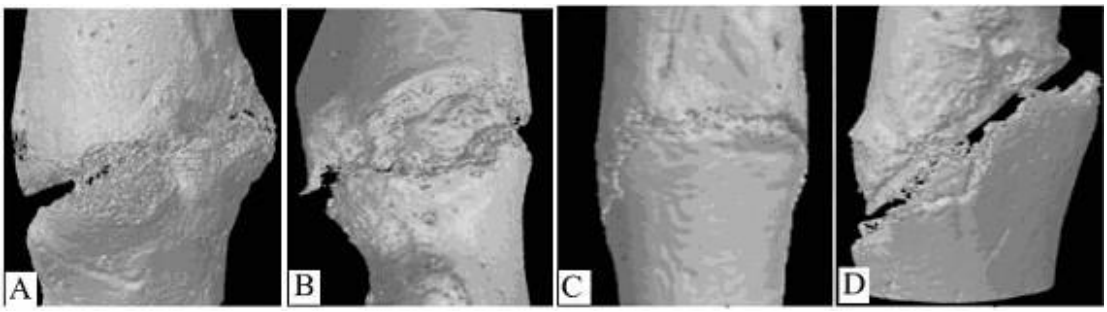
1. BMP1 2. BMP7 3. BMP7 4. BMP1 5. BMP7

Slika 7. Radiološke snimke štakorskih bedrenih kostiju nakon 8 tjedana. Bedrene kosti pod brojem 1 i 4 su potpuno zacijelile, prijelomne pukotine se ne prate a vidljiva je i pregradnja oba kortikalisa. Kod bedrenih kostiju pod brojevima 2, 3 i 5 je došlo do cijeljenja prijeloma no prijelomne pukotine su još zamjetne a nema niti potpune pregradnje kortikalisa.

Ex vivo mikroCT analiza tretiranih bedrenih kostiju pokazala je da je koštani volumen (BV) u štakora tretiranih sa rhBMP1-3 u dozi od 3 μg 3x tjedno porastao za 20% i bio 55% veći u usporedbi sa štakorima tretiranim sa BMP1-3 antitijelima u dozi od 50 μg 1x tjedno (tablica 2).

Tablica 2. Koštani volumen u mjestu prijeloma bedrene kosti u skupinama nakon 8 tjedana.

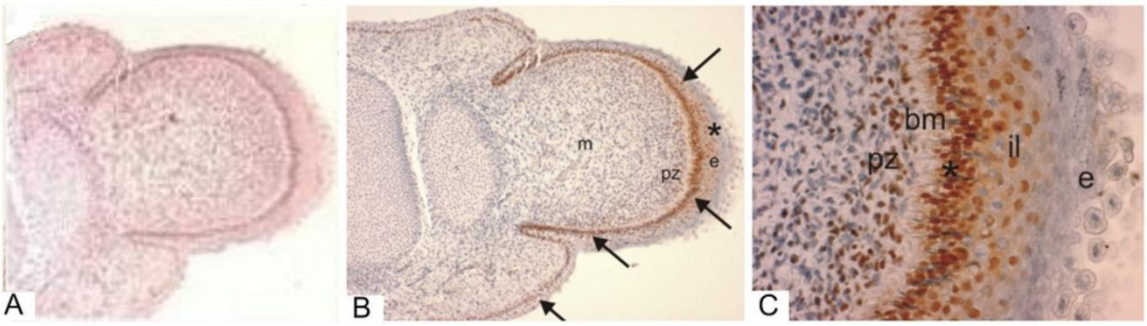
Terapija	**n**	**Volumen kosti (BV mm³)**
Kontrola (A)	8	78 ± 8
Grupa (B)	8	80 ± 9
Grupa (C)	8	134 ± 6[ab]
Grupa (D)	8	58 ± 8[abc]



Slika 8. MikroCT snimke štakorskih bedrenih kostiju *ex vivo*. Štakori su nasumično podijeljeni u jednu od grupa opisanih u Materijalima i metodama: A/ kontrola, samo osteotomija ; B/ grupa sa ne-imunogenim štakorskim IgG ; C/ osteotomija uz davanje rhBMP1-3 i.v. 3 µg, 3 x tjedno ; D/ osteotomija uz davanje BMP1-3 antitijela i.v. 50 µg 3x tjedno. Koštani volumen (BV); [a] P< 0.05 u usporedbi sa kontrolnom grupom, [b]P< 0.05 u usporedbi sa grupom tretiranom sa ne-imunogenim štakorskim IgG antitijelima,

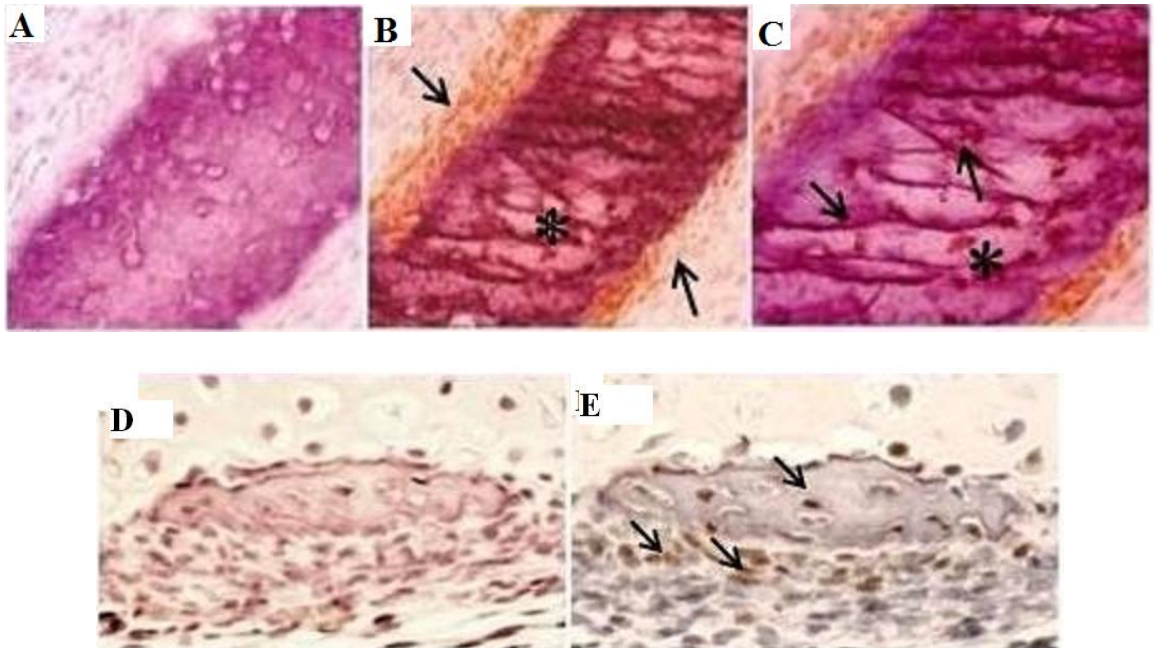
[c] P< 0.05 u usporedbi sa BMP1-3 grupom.

5.2. *Ekspresija BMP1-3 u razvoju ljudske kosti* - Da bi ocijenili potencijalnu lokalizaciju BMP1-3 u odnosu na ostale koštane morfogenetske proteine, istražili smo njegovu ekspresiju tijekom embrionalnog ljudskog razvoja. U prvih 8 tjedana gestacije BMP1-3 i BMP1-1 su lokalizirani u epitelu ektoderma okrajine u razvoju (slika 9 A-C).



Slika 9. Lokalizacija BMP-1 izoformi u embrionalnom razvoju čovjeka. U desetom gestacijskom tjednu ekspresija BMP1-3 je zamijećena u epitelu ektoderma (e), stanicama progresijske zone (pz), bazalnoj membrani (bm) te u intermitentnom sloju buduće kože (il) (na snimci B strelice, na snimci C zvjezdica). Snimka A je kontrolna grupa. Snimke A i B povećane su 10 puta, snimka C povećana je 40 puta.

Nakon hipertrofije hondrocita a prije urastanja krvnih žila, njihova je ekspresija zamijećena u periostalnom koštanom prstenu, u okolnom izvanstaničnom matriksu te u stanicama linije osteoblasta (slika 10). U periodu od 10 do 14 tjedna gestacije BMP1-3 je ograničen na ektoderm epitela (slika 10B) gdje je zajednički smješten sa BMP7 (podaci nisu objavljeni). BMP1-3 izoforme nisu lokalizirane u područjima intramembranoznog stvaranja kosti (slika 10B).

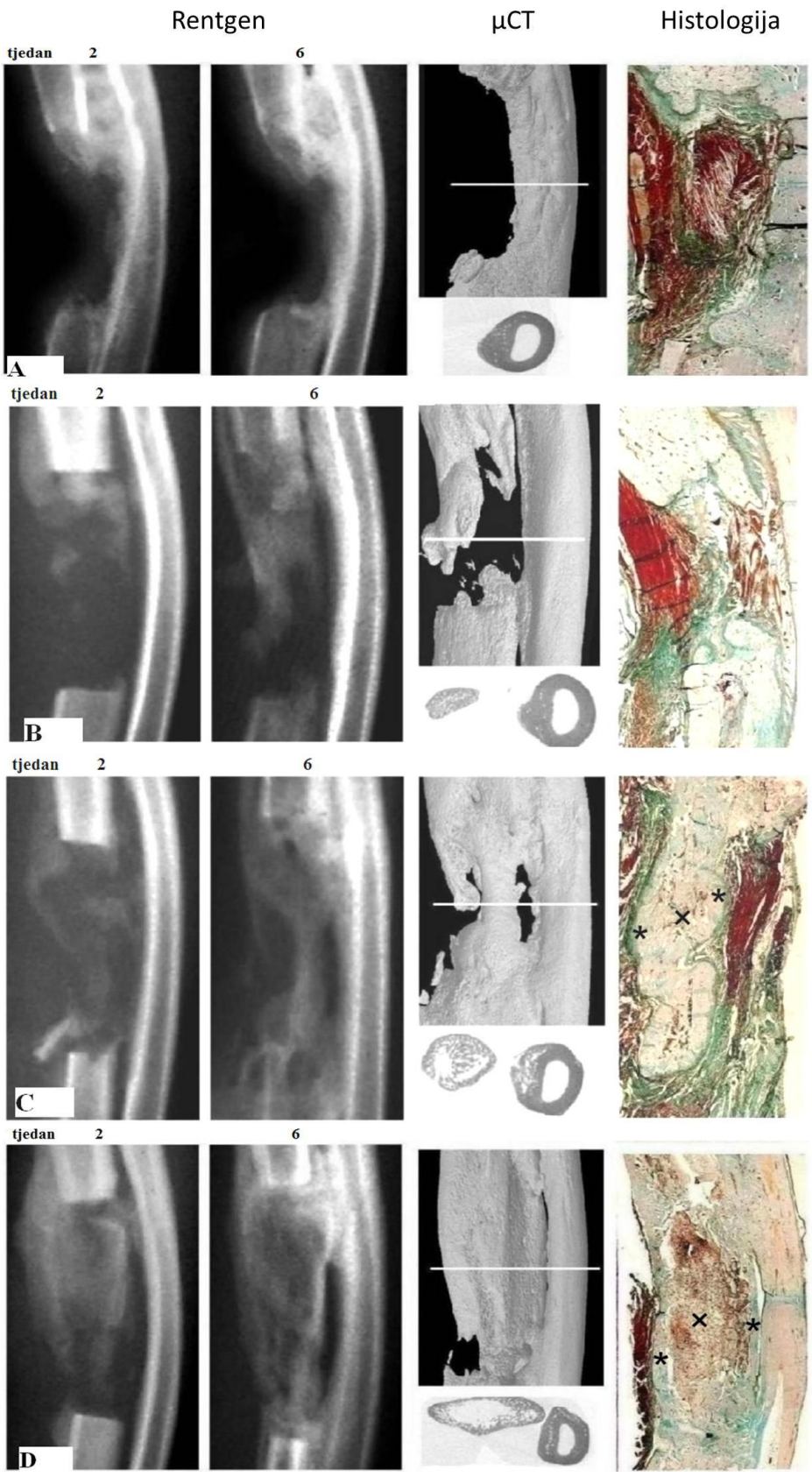


Slika 10. Za vrijeme endohondralnog okoštavanja samo je BMP1-1 prisutan u periostu (strelica, B), osteocitima (zvjezdica B i C) te u kanalikularnom sustavu osteocita (strelice C). Pre-osteoblasti i osteoblasti (strelice E) u periostalnom ovratniku. (A) i (D) kontrolna antitijela. (A) i (B) uvećanje X 20; (C, D i E) X 40.

5.3. *Lokalna primjena BMP1-3 potiče i ubrzava regeneraciju kosti* - Temeljem činjenice da je tijekom embrionalnog razvitka BMP1-3 smješten na istom mjestu kao i BMP7, ispitali smo njihovu pojedinačnu i zajedničku djelotvornost na modelu kritičnog defekta lakatne kosti u kunića. BMP1-3 samostalno potiče cijeljenje kosti (slika 11 B).

Kombinacija BMP1-3 i BMP7 je pokazala dodatni učinak na cijeljenje kosti što je u vremenu od 6 tjedana nakon operativnog zahvata rezultiralo kortikalnim premoštenjem defekta uz ubrzano remodeliranje trabekularne kosti (slika 11 D). Suprotno tome, u istom vremenskom periodu pojedinačni tretmani sa BMP1-3 ili BMP7 nisu rezultirali premoštenjem ulnarnog defekta novostvorenom mineraliziranom kosti (slika 11 B i C).

MikroCT analiza područja kritičnog defekta lakatne kosti u kunića tretiranih sa BMP1-3 / BMP7 kombinacijom pokazala je 28% povećanje koštanog (BV) i trabekularnog volumena (TV) (slika 11 D). Histomorfometrija preparata obojenih po Goldneru potvrdila je rezultate μCT analize, pokazujući visoki postotak novostvorene kosti (38%) sa dobro definiranim medularnim kanalom u istoj grupi (tablica 3). S druge strane, 6 tjedana primjene samog BMP1-3 rezultiralo je stvaranjem trabekularne kosti no bez jasnog kortikalnog premoštenja ili remodeliranje trabekularne kosti (slika 11 B). Slično tome, primjena samo BMP7 je dala novostvorenu trabekularnu kost bez znakova remodeliranja ili kortikalnog premoštenja (slika 11 C).


Rentgen
µCT
Histologija
tjedan 2
6
A
tjedan 2
6
B
tjedan 2
6
C
tjedan 2
6
D

Slika 11. Rendgenske snimke u dvije projekcije (AP i LL), mikroCT slojevne uzdužne i poprečne snimke te histološki preparati kritičnog defekta lakatne kosti u kunića tretiranog samo sa komercijalnim kolagenskim nosačem /Helistat/ (A), sa BMP1-3 (B), sa BMP7 (C) i BMP1-3 + BMP7 (D) učinjene *in vivo* 2. i 6. tjedana nakon operativnog zahvata. MikroCT i histološka analiza (bojanjem po Goldneru) kritičnog defekta lakatne kosti su učinjeni *ex vivo* 6 tjedana nakon kirurškog zahvata; * kortikalna kost, X trabekularna kost.

Tablica 3. Uspješnost cijeljenja analizom radiološkog skoriranja (0-6), volumena novostvorene kosti, područja medularnog kanala (Sform softwer) i BV/TV vrijednosti određenim µCT-om. [a] P< 0.05 vs kontrolna grupa; [b] P < 0.05 vs BMP1-3 + BMP7.

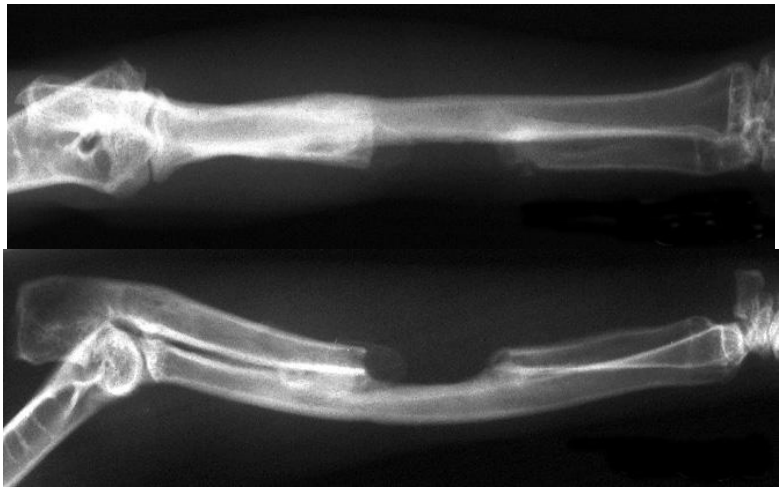
Terapija	Tjedan / Radiološki skor		Volumen novonastale kosti (%)	Medularni kanal (%)	µCT BV/TV (%)
	2	6			
Kontrola	0	0	2.9±1.5	0	0
rhBMP1-3	1±0.3	3±0.3[ab]	7.3±5.6[ab]	0[ab]	12.3±5.5[ab]
BMP7	3±0.5	5±0.4[ab]	28.4±12.3[ab]	13.5±7.4[ab]	16.4±5.2[ab]
rhBMP1-3 + BMP7	4±0.4	6±0.4[a]	37.7±14.5[a]	38.2±15.7[a]	28±6.7[a]

BMP1-3 značajno ubrzava regeneraciju kritičnog defekta lakatne kosti u kunića, posebice u vremenu između 2. i 3. tjedna po aplikaciji (slika 12). Kombinacija BMP1-3 i BMP7 je periodu od 8 tjedana rezultirala potpunom koštanom sanacijom defekta uz punu koštanu pregradnju oba kortikalisa (slika 14).

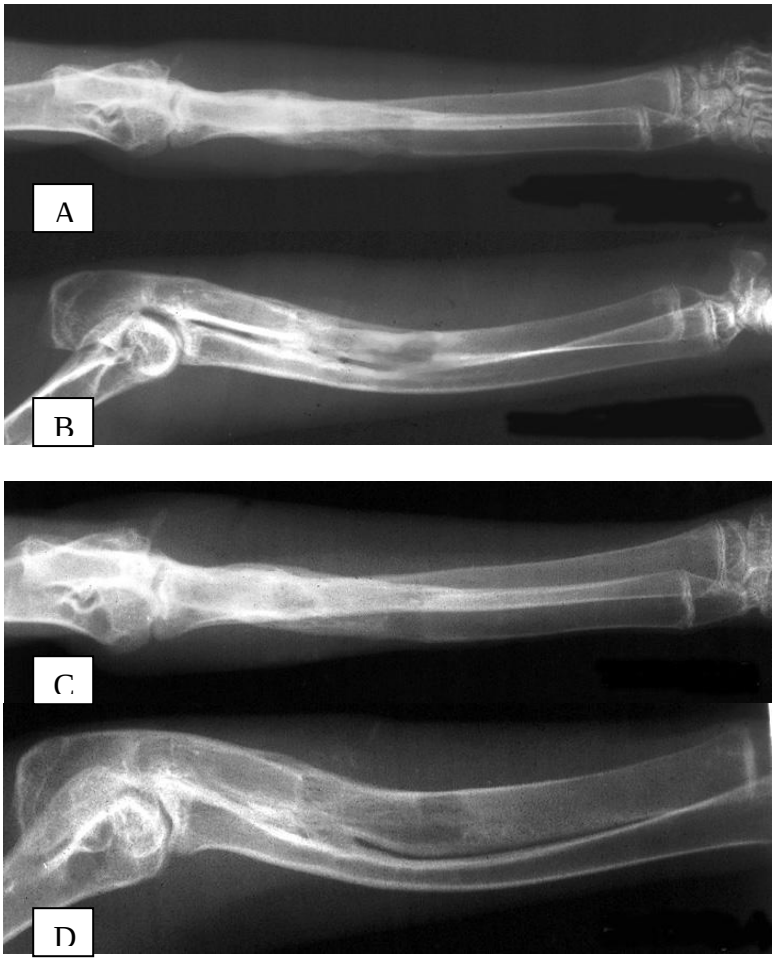


dva tjedna tri tjedna

Slika 12**.** Rendgenske AP i LL snimke kritičnog defekta ulne u kunića tretiranog samo sa BMP1-3 u vremenu dva tjedna (lijeva slika) i tri tjedna (desna slika) po aplikaciji. Snimke pokazuju ubrzano cijeljenje u usporedbi sa kontrolom gdje je apliciran samo komercijalni nosač te nema radioloških znakova cijeljenja (slika 13.)



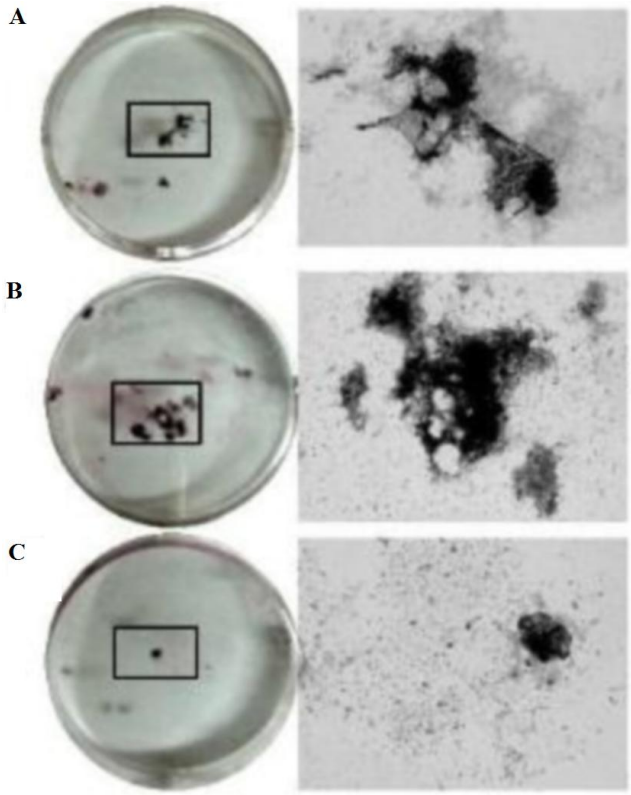
Slika 13. Kritični defekt lakatne kosti u kunića 8 tjedana nakon tretmana samo komercijalnim nosačem. Radiološki praktički nema znakova pregradnje defekta niti koštanog cijeljenja.



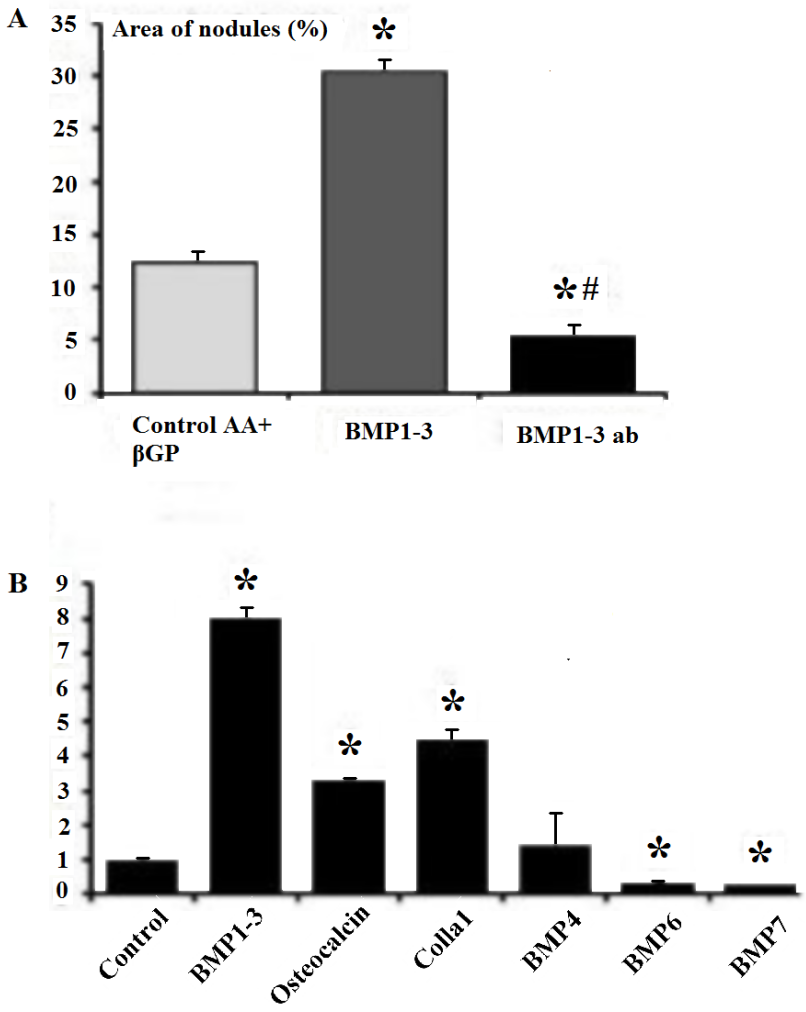
Slika 14. Kritični defekt lakatne kosti u kunića tretiran sa BMP1-3 i BMP7 u vremenima od 4 tjedna po aplikaciji (A/AP i B /LL projekcije) te 8 tjedana po aplikaciji (C/AP i D/LL projekcije). Nakon 8 tjedana vidljivo je potpuno koštano popunjavanje defekta uz pregradnju oba kortikalisa.

5.4. *BMP1-3 utječe na diferencijaciju osteoblasta in vitro* - BMP1-3 potiče diferencijaciju progenitornih mezenhimalnih stanica (MSC) koštane srži u osteoblaste što je rezultiralo povećanjem nakupina mineraliziranih koštanih čvorića u usporedbi sa kontrolnom kulturom stanica (bojanje po van Kossi) (slika 15B i 16A). Tretiranje MSC

BMP1-3 antitijelima imalo je suprotni učinak na formiranje mineraliziranih koštanih čvorića (slika 15C i 16A).



Slika 15. BMP1-3 utječe na stvaranje koštanih čvorića iz mezenhimalnih progenitornih stanica (MSC) koštane srži (BM). MSC su uzgojene u različito tretiranim medijima: kontrolna grupa (A); BMP1-3 (150ng/ml), 8mM β-glicerofosfata i 50 µg/ml askorbinske kiseline (B); BMP1-3 antitijelo (C). Povećanja 2x (lijevo) i 20x (desno).

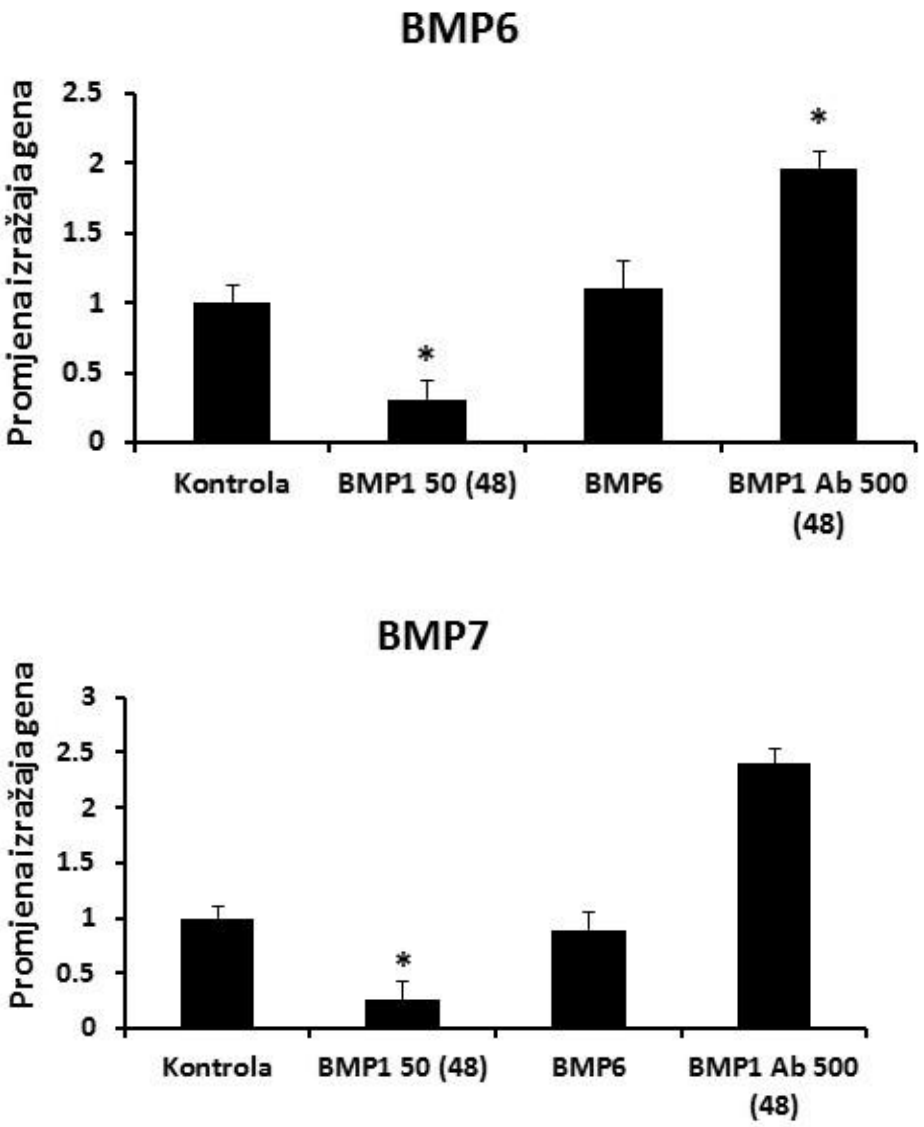


Slika 16. (A) Grafički prikaz kvantifikacije koštanih čvorića bojanjem po van Kossi, (B) MC3T3 mišji preosteoblasti, relativna genska ekspresija nakon tretmana sa 50 ng BMP1-3

* $P < 0.05$ vs kontrolna grupa; # $P < 0.05$ vs BMP1-3 terapijska grupa.

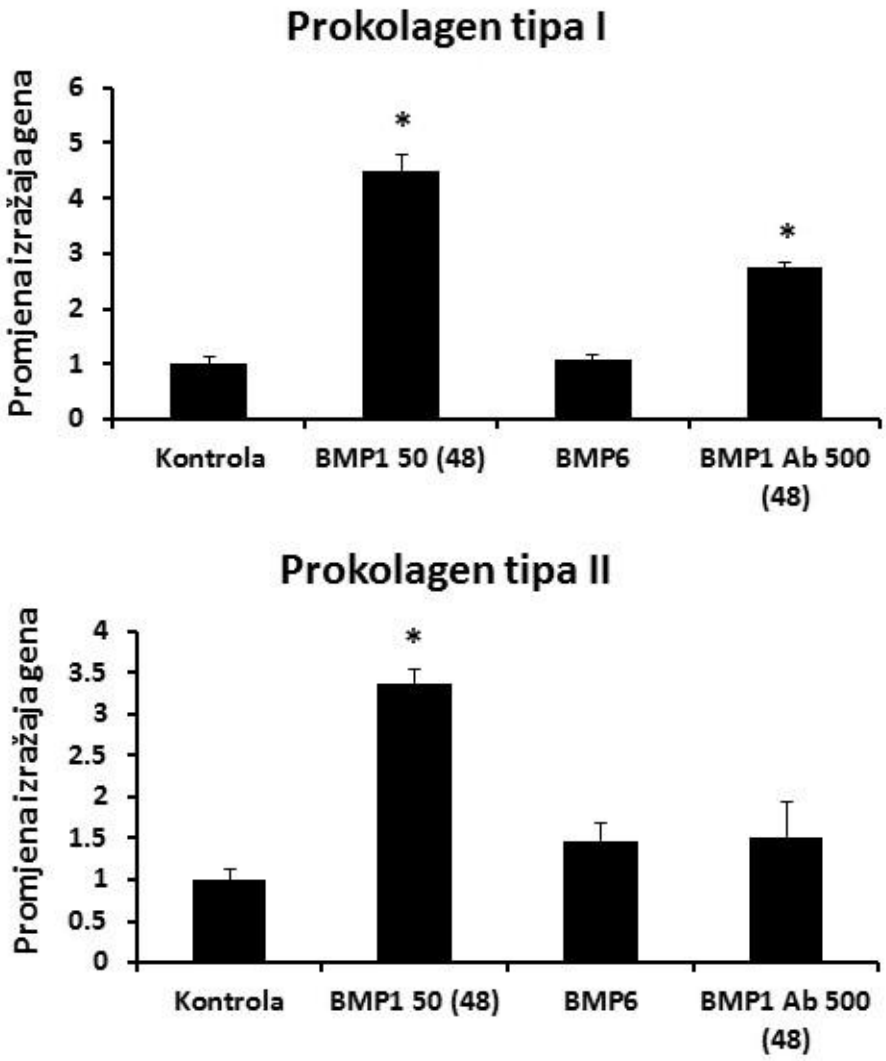
Analiza genske ekspresije MC3T3E1 pre-osteoblasta tretiranih sa BMP1-3 proteinom ukazala je na porast ekspresije *prokolagena*, *BMP1-3* i *osteokalcina* te smanjenje ekspresije *Bmp6* i *Bmp7* (Slike 16B, 17, 18 i 19). To upućuje da se pojačano sazrijevanje MSC u osteoblaste ne odvija putem BMP molekule dok porast razine ekspresije BMP1-3

može podržavati ubrzanje cijeljenja prijeloma kod štakora i kunića procesuiranjem izvanstaničnog matriksa (ECM). BMP1-3 antitijela dodana u kulturu MC3T3E1 stanica dovode do porasta ekspresije *Bmp 6* i *Bmp7* gena (rezultati nisu objavljeni).

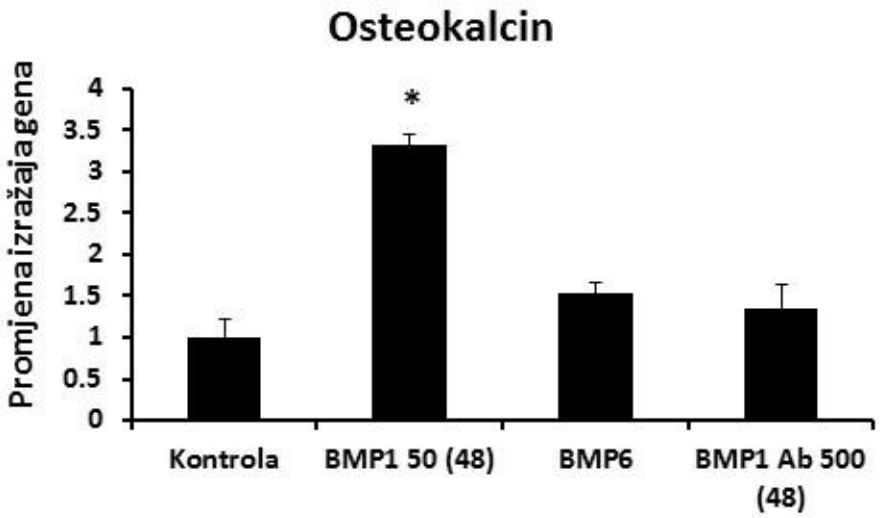


Slika 17. BMP1-3 inhibira ekspresiju BMP6 i BMP7. Primjenom neutralizirajućih poliklonskih BMP1-3 antitijela došlo do povećanja ekspresije i BMP6 i BMP7. To

upućuje da BMP1-3 potiče stvaranje izvanstaničnog matriksa te time snizuje ekspresiju BMP6 i BMP7.

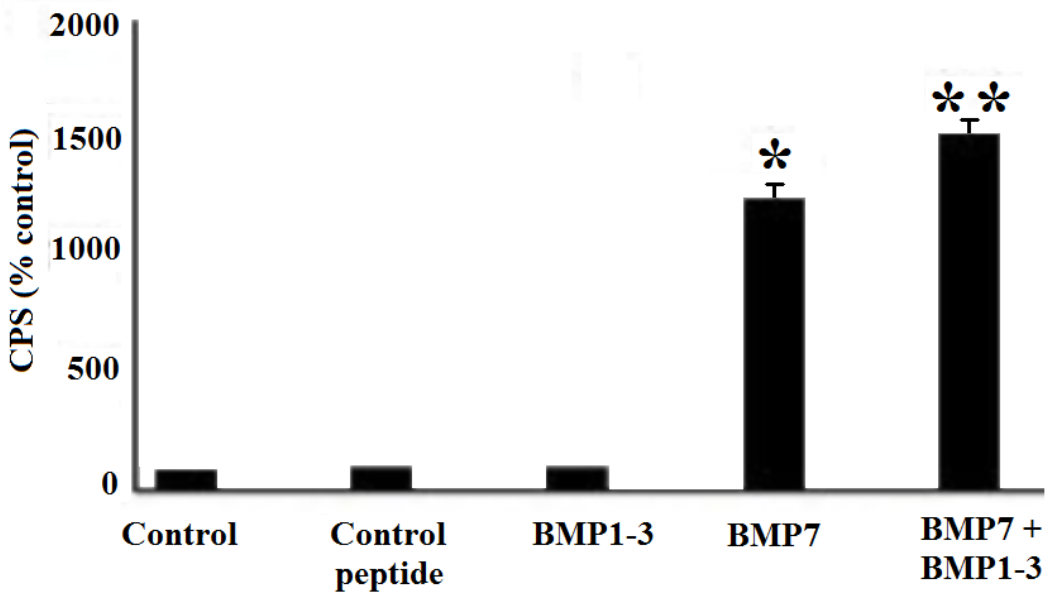


Slika 18. BMP1-3 jednako povisuje razinu prokolagena I i prokolagena II.



Slika 19. Primjena BMP1-3 povisuje ekspresiju osteokalcina.

5.5. *BMP1-3 potiče aktivnost BMP7 in vitro* – Kada se C2C12 stanična linija, stabilno transfektirana sa BMP elementom odgovora (BRE) (od *Id-1* genskog promotora), fuzionira sa luciferaza genom te se potom doda BMP1-3, on nema nikakvog učinka na indukciju luciferaze. No, ako se BMP1-3 kombinira sa BMP7 onda značajno povećava BMP7 aktivnost (Slika 20). Stoga smo mišljenja da BMP1-3 djeluje kao ko-aktivator BMP7 no mehanizam aktivacije još valja istražiti.



Slika 20. Učinak poboljšanja sa BMP1-3 na BMP7 posredovanu *Id-1* aktivaciju promotera. Stanice su tijelom 17 sati tretirane sa : BMP7, BMP1-3 i BMP7 + BMP1-3. U kombinaciji, BMP1-3 je preinkubiran 3 sata na 37°C a potom je dodan BMP7. Kontrolni peptid je poslužio kao kontrolna grupa. Medij sa 0.1% FBS je upotrijebljen kao negativna kontrola, n = 4. Reprezentativni rezultati jednog od tri odvojena pokusa su prikazani. *P< 0.05 vs kontrolna grupa; ** P< 0.05 vs BMP7.

6. RASPRAVA

Cijeljenje koštanih prijeloma je povezano s nizom enzimskih aktivnosti na mjestu prijeloma što se odražava i na promjenu koncentracije brojnih enzima u plazmi. Kod bolesnika sa akutnim prijelomom nisu pronađene cirkulirajuće BMP molekule u plazmi. Nepostojanje molekule BMP1 u uzorku plazme kod akutnog prijeloma pokazuje njenu potencijalnu ulogu u procesuiranju izvanstaničnog matriksa u koštanoj regeneraciji i obnovi tijekom formiranja koštanog kalusa.

Nedavno je potvrđeno da dugi oblik alternativno rascijepljenog *Bmp-1* gena, BMP1-3, cirkulira u plazmi čovjeka i štakora u fiziološki relevantnim koncentracijama (62) . Prisutnost BMP1-3 u plazmi upućuje na njegov opći sistemni učinak te smo stoga, slijedeći lokalizaciju BMP1-1 i BMP1-3 tijekom razvoja skeleta čovjeka, ispitali njegovu djelotvornost na životinjskim modelima koštane regeneracije i bubrežne funkcije. Pripadnici BMP nadobitelji su izvorno purificirani i određeni iz kosti (2,4). Tijekom purifikacije je otkriven i BMP1 koji ne pripada morfogenima već je prokolagenska proteaza (8,73,74). BMP-1 nije autentični pripadnik BMP proteinske obitelji već po građi pripada astacin/BMP1/toloid sličnoj obitelji cink metaloproteinaza koje su ključne u razvoju i formiranju izvanstaničnog matriksa (1,2,80,81).

Cirkulirajuća BMP1-3 izoforma u čovjeka je aktivna i ne sadržava prodomenu što je potvrđeno *in vitro* procesuiranjem dentin matriks proteina (DMP-1). Poznato je da prodomena BMP1/TLD-slične proteinaze mora biti proteolitički odstranjena da se postigne puna aktivnost proteinaze (76). Takav aktivni cirkulirajući protein ima ulogu u regulaciji ekspresije i odlaganja izvanstaničnog matriksa što, između ostalih, može

rezultirati i fibrozom kod određenih bolesti. Ova je teza testirana ispitivanjem uloge BMP1-3 kod životinjskog modela kronične bolesti bubrega (CKD). Renalna fibroza je glavni pokazatelj progresije CKD a karakterizirana je prekomjernim nakupljanjem komponenti izvanstaničnog matriksa što vodi ka glomerulosklerozi, tubulointersticijalnoj fibrozi, upalnoj infiltraciji, gubitku bubrežnog parenhima i kroničnim promjenama na bubrežnim krvnim žilama. Molekularni mehanizam renalne fibroze nije u cijelosti rasvijetljen ali se smatra da ga određuje nivo ekspresije TGFβ1 (77). Smanjenje fibroze kod CKD u štakora primjenom BMP1-3 antitijela je izravno povezano sa snižavanjem koncentracije cirkulirajućeg TGFβ1 za više od 50%. Kako je od ranije poznat njegov snažni fibrinogeni učinak stimuliranjem stvaranja izvanstaničnog matriksa iz toga slijedi da BMP1-3 u plazmi može imati ulogu fiziološkog regulatora nivoa cirkulirajućeg TGFβ1 (62). Pozitivni učinak BMP1-3 na progresiju CKD se očituje u prevenciji aktivacije TGFβ1 u plazmi iz njegove latentne forme (78, 79, 80) a time i smanjenjem stvaranja izvanstaničnog matriksa.

Važnost BMP-1 u procesu regeneracije kosti do sada nije opisana. U originalnom otkriću Wozney-a i suradnika (4) opisano je da rekombinantni BMP1 na goveđem kolagenskom nosaču u štakorskom subkutanom eseju uzrokuje stvaranje nove kosti. Međutim, naknadno je ustanovljeno da je riječ o artefaktu hondrocita štakorske ploče rasta koji su zaostali u procesu izolacije demineraliziranog koštanog matriksa (82). Naša hipoteza o važnosti BMP1 u cijeljenju kosti proizlazi iz činjenice da proces cijeljenja prijeloma kosti slijedi kaskadu skeletnog razvoja u kojem BMP1-3 ima veliku ulogu u razvoju ekstremiteta. Koristeći model prijeloma štakorske bedrene kosti te kulturu diferencijacije osteoblasta, ovaj rad pokazuje da inhibicijom molekule BMP1-3

specifičnim protutijelima dolazi do značajnog usporavanja procesa cijeljenja kosti. Pokazali smo da BMP1-3 ima važnu ulogu u procesima diferencijacije osteoblasta i stvaranja kosti. Poznavajući lokalizaciju BMP1-3 za vrijeme embrionalnog razvoja pretpostavka je da BMP1-3 u cirkulaciji može sistemski utjecati na ubrzanje odlaganja izvanstaničnog koštanog matriksa (ECM). Dokazano je da rhBMP1-3 izoforma utječe na stvaranje kosti a u kombinaciji sa rhBMP-7 se postiže sinergistički učinak. Važnost rhBMP1-3 u koštanoj regeneraciji se prvenstveno očituje u procesuiranju ECM proteina potrebnih za formiranje kalusa, potom u pojačanom stvaranju osteoblasta iz MSC (83) kao i suprimiranju osteoklasta čime se u konačnici ubrzava stvaranje koštanog kalusa. Biomehaničkim testiranjem prelomljenih štakorskih bedrenih kostiju kroz proces cijeljenja dokazano je da sistemski primijenjen rhBMP1-3 ostvaruje glavni učinak na trabekularnoj kosti. Sistemska primjena specifičnih BMP1-3 antitijela usporava proces cijeljenja kosti potvrđujući time da je količina cirkulirajućeg BMP1-3 važna za skeletogenezu.

Za potpuno stvaranje kosti važni su funkcijski međuodnosi između proteinaza, faktora rasta i koštanih stanica jer su svi oni potrebni za normalnu osifikaciju i proces remodeliranja izvanstaničnog matriksa (84). Za migraciju stanica kroz matriks tijekom procesa cijeljenja nužno je rastvaranje matriksa oko migrirajućih stanica. Početni korak angiogeneze započinje migracijom endotelijalnih stanica uz proteolitičko rastvaranje izvanstaničnog matriksa.

Kombinacija BMP1-3 i BMP7 primijenjena lokalno potiče stvaranje kosti. Njihovim se udruživanjem kombiniraju i dva neovisna ali sinergistična učinka ključna za proces cijeljenja kosti: stimulacija proliferacije i diferencijacije stanica koju potiče BMP7

i olakšavanje migracije stanica pročišćavanjem komponenti matriksa na što utječe BMP1-3. Zbog toga se kombinacija BMP1-3 i BMP7 može uspješno koristiti za poticanje procesa regeneracije i cijeljenja kosti (85). Osim toga, BMP1-3 pospješuje aktivnost *Id*-genske ekspresije BMP7 u C2C12 mioblastima *in vitro* što bi moglo i *in vivo* doprinijeti uspješnom cijeljenju prijeloma. Mogući doprinos BMP1-3 koštanoj regeneraciji je u stimuliranju sinteze i procesuiranja ECM proteina te poticanju formiranja osteoblasta iz MSC. BMP1-3 pozitivno utječe na formiranje koštanih čvorića kao i diferencijaciju osteoblasta. Poznato je da proteinaze (MMPs) štite osteoblaste od apoptoze te održavaju vitalnost osteocita. U procesu koštanog razvoja remodeliranje izvanstaničnog matriksa je neophodno za diferencijaciju osteoblasta. Taj je proces uvelike uvjetovan proteolitičkom aktivnošću MMPs koja igra glavnu ulogu u procesu migracije osteoblasta. Ekspresija kolagena tipa I u osteoblastima kalvarije stanične linije MC3T3 nakon tretmana sa BMP1-3 može rezultirati odlaganjem kolagenskog matriksa tipa I što je karakteristično za period brze diobe stanica. Djelovanjem BMP1-3 pojačava se ekspresija kolagena tipa I i osteokalcina. Osteoblasti, matriks jezgre, DNA- vežući proteini sa kapacitetom vezanja DNA prepoznaju receptore na promotorima osteokalcina i kolagenu tipa I. Time se stvara fizička veza između gena ECM osteoblasta i staničnih struktura (86). Stimulacija genske ekspresije osteokalcina u uvjetima brze pretvorbe matriksa upućuje na kompleksnije mehanizme regulacije osteokalcina. Moguće je da se osteokalcin regulira čimbenicima koji se oslobađaju iz osteoblasta matriksa dok prolazi visoku preobrazbu. Kolagen tipa I može pritom izravno djelovati na stanične receptore ili biti potreban tek kao rešetkasti nosač za druge proteine matriksa pomoću kojega oni direktno djeluju na stanicu. Točan mehanizam djelovanja BMP1-3 u tome još valja podrobno utvrditi.

Sistemskom primjenom specifičnih BMP1-3 antitijela potiskuje se proces cijeljenja kosti što potvrđuje da je određena količina cirkulirajućeg BMP1-3 nužna za proces cijeljenja kosti. Tome treba pridodati snižavanje cirkulirajućeg nivoa TGF-β1 za 50% (62,87) što zbog njegovog poznatog učinka na proliferaciju osteoblasta dodatno utječe na slabljenje cijeljenja prijeloma. Proces odloženog sraštanja ili nesraštanja prijeloma je moguće povezan sa promjenama u MMP sistemu. Određivanje količine BMP1-3 u plazmi bolesnika sa prijelomom kosti se može upotrijebiti kao precizan pokazatelj procesa cijeljenja kosti. Konačno, ovaj rad donosi nove *in vivo* i *in vitro* dokaze o velikoj ulozi BMP1-3 u procesu cijeljenja koštanih prijeloma.

7. ZAKLJUČCI

Iz navedenih istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. BMP1-3 izravno utječe na cijeljenje prijeloma kako je pokazano na modelu prelomljene bedrene kosti u štakora, a u kombinaciji sa BMP7 postiže puni sinergistički učinak
2. Davanjem policiklonalnih BMP1-3 antitijela zamijećeno je značajnije slabije cijeljenje prijeloma na istom životinjskom modelu.
3. Lokalno primijenjen BMP1-3 potiče i ubrzava regeneraciju kosti kako je pokazano na modelu kritičnog defekta lakatne kosti u kunića. Primijenom sa BMP7 u kratkom se roku postiglo puno remodeliranje kortikalne kosti uz bikortikalno premoštenje defekta.
4. BMP1-3 utječe na diferencijaciju progenitornih mezenhimalnih stanica (MSC) koštane srži u osteoblaste što rezultira povećanjem broja mineraliziranih koštanih čvorića. Primjenom BMP1-3 antitijela očekivano je postignut suprotan učinak koji se očituje u znatno smanjenom broju novostvorenih koštanih čvorića.
5. BMP1-3 potiče aktivnost BMP7 *in vitro*. Na modelu stanica mišje kalvarije C2C12 aktivnost luciferaze se postigla kombinacijom BMP1-3 sa BMP7 što upućuje na zaključak da BMP1-3 značajno povisuje aktivnost BMP7, odnosno da djeluje kao ko-aktivator BMP7.

8. SAŽETAK

Članovi astacinske nadobitelji cink-ovisnih metaloproteinaza imaju znatan utjecaj na morfogenezu, između ostaloga procesuirajući sazrijevanje proteina izvanstaničnog matriksa te više faktora rasta kao što su TGFβ, BMP2, BMP4 i GFD8. Nedavno je otkriveno da izoforma *Bmp-1* gena, BMP1-3, cirkulira u plazmi uz značajno povišenje koncentracije kod svježih koštanih prijeloma. U ovom je radu istražena uloga BMP1-3 u procesu cijeljenja kosti *in vivo* i *in vitro*. Na modelu prijeloma bedrene kosti u štakora i modelu kritičnog defekta lakatne kosti u kunića sistemskim se davanjem postigao učinak ubrzanog cijeljenja prijeloma koji se sinergistički pojačao kada je uz BMP1-3 davan i BMP7. Suprotno tome, neutralizacija BMP1-3 specifičnim poliklonskim antitijelima je rezultirala odgođenim cijeljenjem ili izostankom cijeljenja. *In vitro*, BMP1-3 je u kulturi MC3T3 stanica povisio ekspresiju kolagena tip I te osteokalcina i pojačao stvaranje mineraliziranih koštanih čvorića iz mezenhimalnih stanica koštane srži.

Istraživanja u ovom radu su pokazala važnost BMP1-3 kao čimbenika u procesu cijeljenja kosti ali i kao potencijalnog biomarkera. Određivanjem njegove koncentracije u plazmi u bolesnika sa prijelomom kosti moglo bi se kvalitetno pratiti tijek i uspješnost cijeljenja. Usavršavanjem nosača otvara se mogućnost široke lokalne primjene BMP1-3 sa nesumnjivim poboljšanjem konačnog ishoda cijeljenja koštanih prijeloma.

9. SUMMARY

Members of the astacin superfamily of zinc-dependent metalloproteinases regulate morphogenesis by processing precursors to mature functional extracellular matrix proteins as well as several growth factors such as TGFβ, BMP2, BMP4 and GFD8. It has been recently discovered that BMP1-3 isoform of the *Bmp-1* gene circulates in the human plasma and is significantly increased in acute bone fractures. Circulating BMP1-3 regulates collagen deposition in the process of bone callus formation.

In this paper role of BMP1-3 in the process of bone healing *in vivo* and *in vitro* has been evaluated. When administred systemically to rats with a femur fracture and locally to rabbits with critical size defect of ulna, recombinant BMP1-3 enhanced healing. On the opposite side, neutralization of the BMP1-3 by specific polyclonal antibody resulted in a delayed union or bone non-union. *In vitro*, BMP1-3 increased the expression of collagen type I and osteocalcin in MC3T3E1 osteoblast-like cells and enhanced mineralized bone modules formation from bone marrow mesenchymal stem cells.

This paper shows the importance of BMP1-3 in the process of bone healing and its potential as a novel bone biomarker. By developing BMP1-3 specific assays we could monitor specific variations of its level in plasma, which could reflect on the possibility of a wide local implemantation of BMP1-3 in combinantion with other morphogens.

10. POPIS LITERATURE

1. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury* 38:S3-6, 2007.

2. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893-899, 1965.

3. Sampath TK, Reddi AH. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7599-7603, 1981.

4. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528-1534, 1988.

5. Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, Corbett C, Ridge RJ, Sampath TK, Oppermann H. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in TGF-β family. *EMBO J* 9:2085-2093, 1990.

6. Chang SC, Hoang B, Thomas JT, Vukicevic S, Luyten FB, Ryba NJ, Kozak CA, Reddi AH, Moos M jr.Cartilage-derived morphogenetic proteins. New members of the transforming growth factor-β superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development. *J Biol Chem* 269:28227-28234, 1994.

7. ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin CH, Miyazono K. Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem*1994;269:16985-8

8. Jones WK, Richmond EA, White K, Sasak H, Kusmik W, Smart J, Oppermann H, Rueger DC, Tucker RF. Osteogenic protein-1 (OP-1) expression and processing in Chinese hamster ovary cells: Isolation of a soluble complex containing the mature and pro-domains of OP-1. *Growth Factors* 11:215-225, 1994.

9. Vukicevic S, Latin L, Chen P, Batorsky R, Reddi AH, Sampath TK. Localization of osteogenic protein-1 (Bone morphogenetic protein-7) during human embryonic development: High affinity binding to basement membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 198:693-700, 1994.

10. Grgurevic L. Proteomska identifikacija koštanih morfogenetskih proteina i njima srodnih molekula u biološkim tekućinama. Doktorat, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2007.

11. Koenig BB, Cook JS, Wolsing DH, Ting UJ, Tiesman JP, Correa PE, Olson CA, Pecquet AL, Ventura F, Grant RA, Chen GX, Wrana JL, Massgue J, Rosenbaum JS. Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 5961-74.

12. Ashina I, Smpath TK, Hauschka P. Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells. *Exp Cell Res* 1996; 222: 38-47.

13. Graf D, Economides AN. Dissection of bone morphogenetic protein signalling using genome engineering tools. In: Vukicevic S, Sampath TK (editors). Bone Morphogenetic Proteins: From Local to Systemic Therapeutics. *Birkauser Verlag* 2008; pp. 115-40

14. Sieber C, Schwaerzer GK, Knaus P. Bone morphogenetic protein signalling is fine-tuned on multiple levels. In: Vukicevic S, Sampath TK (editors). Bone Morphogenetic Proteins: From Local to Systemic Therapeutics. *Birkauser Verlag* 2008; pp. 81-114.

15. De Gorter DJJ, Krause C, Lowik CWGM, Bezooijen RL, ten Dijke P. Control of bone mass by sclerostin: inhibiting BMP – and WNT- induced bone formation. In: Vukicevic S, Sampath TK (editors). Bone Morphogenetic Proteins: From Local to Systemic Therapeutics. *Birkauser Verlag* 2008;pp. 257-276.

16. Buijs JT, Rentsch CA, van der Horst G, van Overveld PG, Weterwald A, Schwaninger R, Henriquez NV, ten Dijke P, Borovecki F, Markwalder R, Thalmann GN, Papapoulos SE, Pelger RC, Vukicevic S, Cecchini MG, Lowik CW, van der Pluijm G. BMP7, a putative regulator of epitehelial homeostasis in humane prostate, is a potent inhibitor of prostate cancer bone metastasis in vivo. *Am J Pathol* 2007; 171:1047-57

17. Buijs J, Henriquez NV, van Overveld PG, van der Horst G, Que I,Schwaninger R, Rentsch C, ten Dijke P, Clenton-Jansen AM, Notting IC, Vukicevic S, Lidereau R, Papapoulos SE, Cecchini MG, Lowik CWGM, van der Pluijm G. Bone morphogenetic protein 7 in the development and treatment og bone metastasis from breast cancer. *Cancer Res* 2007; 67:8742-51

18. Aspenberg A, Basic N, Tagil M, Vukicevic S. Reduced expression of BMP-3 due to mechanical loading- a link between mechanical stinuli and tissue differentiation. *Acta Orthop Scand* 2000;71:558-62

19. Aspenberg P. Stimulation of tendon repair: mechanical loading, GDFs and platelets. A mini review. *Int Orthop* 2007;71:558-62

20. Graf D, Nethisinghe S, Palmer DB, Fisher AG, Merkenschlager M. The developmentally regulated expression of Twisted gastrulation reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development. *J Exp Med* 2002;196:163-71

21. Nohe A, Hassel S, Ehrlich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI, Knaus P. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signalling pathways. *J Biol Chem* 2002;277:5330-38

22. Vukicevic S, Sampath TK (urednici). Bone Morphogenetic Proteins: From Local to Systemic Therapeutics. PIR Series, Birkauser Verlag AG, Basel, Boston, Berlin, 2008.

23. Vukicevic S, Sampath TK (urednici). Bone Morphogenetic Proteins: From Laboratory to Clinical Practice. PIR Series, Birkauser Verlag AG, Basel, Boston, Berlin, 2002.

24. Vukicevic S, Sampath TK (urednici). Bone Morphogenetic Proteins: Regeneration of Bone and Beyond. PIR Series, Birkauser Verlag AG, Basel, Boston, Berlin, 2004.

25. Canalis E, Giustina A, Bilezikian JP. Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *N Engl J Med* 2007; 357: 905-16

26. Who are candidates for prevention and treatment for osteoporosis? *Osteoporosis Int* 7:1-6, 1997.

27. Klotzbuecher CM, Ross PD, Landsman PB. Patients with prior fractures have an increased risk of future fractures: a summary of literature and statistical synthesis. *J Bone Miner Res* 2000;15:721

28. Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002;359:1761.

29. Kanis JA, Delmas P, Burckhardt P. Guidelines for diagnosis and management of Osteoporosis. The European Foundation for Osteoporosis and Bone Disease. *Osteoporosis Int* 1997;7:390.

30. Bishop GB, Einhorn TA. Current and future clinical application of bone morphogenetic protein sin orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop* 2007;31:721-8

31. White AP, Vaccaro AR, Hall JAG, Whang PG, Friel BC, Mc Kee MD. Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, non-unions and spinal fusions. *Int Orthop*2007;31:735-42

32. Sampath TK, Rashka KE, Doctor JS, Tucker RF, Hoffmann FM. Drosophila transforming growth factor beta superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(13):6004-8

33. Panganiban GEF, Reuter R, Scott MP, Hoffmann FM. A Drosophila growth factor homolog, *decantaplegic*,regulates homeotic gene expression within and acros germ layers during midgut morphogenesis. *Development* 1990;110:1041-50

34. Immergluck K, Lawrence PA, Bienz M. Induction across germ layers in *Drosophila* mediated by genetic cascade. *Cell* 1990;62:261-8

35. Padgett RW, St Johnston RD, Gelbart WM. A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor β family. *Nature* (London) 1993;325:81-4

36. Wharton KA, Thomsen GH, Gelbart WM. Drosophila 60A gene, another transforming growth factor β family member, is closely related to human bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9214-8

37. Doctor JS, Jackson PD, Rashka KE, Visalli M, Hoffmann FM. Sequence, biochemical characterization and developmental expression of a new member of the TGF- β superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 1992;151:491-505

38. Ferguson EL, Anderson KV. Localized enhancement and repression of the activity of the TGF- β family member, *decapentaplegic*,is necessary for dorsal-ventral pattern formation in the *Drosophila* embryo. *Development* 1992;114:583-97

39. Shimmel MJ, Ferguson EL, Childs SR, O'Connor MB. The Drosophila dorsal-ventral patterning gene tolloid is related to human bone morphogenetic protein. *Cell* 1991;67:469-81

40. Kim JS, Ballock RT. Cellular and molecular biology of transforming growth factor beta. U „Cellular and molecular biology of bone“. Noda M. (urednik). Izdavač: Academic press, San Diego, CA 1993; 97-129

41. Titani K, Torff HJ, Hormel S, Kumar S, Walsh K, Rodl J, Neurath H, Zwilling R. Aminoacid sequence of a unique protease from the crayfish *Astacus fluviatilis*. *Biochemistry* 1987;26:222-6

42. Bond JS, Beynon RJ. The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein Science* 1995;4:1247-1261.

43. Stocker W. The metzincins-topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidasis. *Protein Science* 1995;4:823-40

44. Leighton M, Kadler KE. Paired basic/furin-like proprotein convertase cleavage of pro-BMP-1 in the *trans*-Golgi network. *J Biol Chem* 2003;278:18478-84

45. Takahara K, Lyons GE, Greenspann DS. Bone Morphogenetic Protein-1 and a Mammalian Tolloid Homologue (mTld) are encoded by alternatively spliced transcripts which are differentially expressed in some tissues. *J Biol Chem* 1994;269:32572-32578

46. Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, Brusel M, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1: The type I procollagen C-proteinase. *Science* 1996;271:360-2

47. Sarras MP. BMP-1 and the astacin family of metalloproteinases: a potential link between extracellular matrix, growth factors and pattern formation. *BioEssays* 1996;18:439-42

48. Kadler KE, Watson RB. Procollagen C- peptidase: Procollagen C- proteinase. *Meth Enzymol* 1995;248:771-81

49. Li S-W, Sieron A, Fertala A, Hojima Y, Arnold W, Prockop DJ. The C-proteinase that processes procollagens to fibrillar collagens is identical to the protein previously identified as bone morphogenic protein-1. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:5127-30

50. Hecht PM, Anderson KV. Extracellular proteases and embryonic pattern formation. *Trens Cell Biol* 1992;2:197-202

51. Hoffman FM. Developmental functions of decapentaplegic, a member of the TGF-beta family in Drosophila. U „Genetics of Pattern Formation and Growth Control“ (urednik Mahowald AP). Izdavač Wiley-Liss, John Wiley &sons, NY, 1990:103-124

52. Finelli AL, Xie T, Bossie CA, Blackman RK, Padgett RW. The *tolkin* gene is a *tolloid*/BMP-1 homologue that is essential for Drosophila development. *Genetics* 1995;141:271-81

53. Childs SR, O'Connor MB. Two domains of the *tolloid* protein complex contribute to its unusual genetic interaction with decapentaplegic. *Dev Biol* 1994;162:209-220.

54. Takahara K, Lyons GE, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1 and a mammalian tolloid homologue (mTld) are encoded by alternatively spliced transcripts which are differentially expressed in the same tissue. *J Biol Chem* 1994; 269:32572-8

55. Lin JJ, Maeda R, Ong RC, Kim J, Lee LM, Kumg HF, Maeno M. XBMP-1B (Xtld), a Xenopus homologue of dorso-ventral polarity gene in Drosophila, modifies tissue phenotypes of ventral explants. *Dev Growth Differ* 1997;39:43-51

56. Piccolo S, Agius E, Lu B, Goodman S, Dale L, De Robertis EM. Cleavage of chordin by xolloid metalloprotease suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Speeman organizer activity. *Cell* 1997;91:407-16

57. Blader P, Rastegar S, Fisher N, Strähle U. Cleavage of the BMP-4 antagonist chordin by zebrafish tolloid. *Science* 1997;278:1937-40

58. Marqués G, Musacchio M, Shimmel MJ, Wünnenberg-Stapleton K, Cho KWY, O'Connor MB. Production of a DPP activity gradient in the early Drosophila embryo through the opposing actions of the SOG and TLD proteins. *Cell* 1977;91:417-26

59. Scott IC, Blitz IL, Pappano WN, Imamura Y, Clark TG, Steiglitz BM, Thomas CL, Maas SA, Takahara K, Cho KWY, Greenspan DS. Mammalian BMP-1/ tolloid related metalloproteinases, including novel family member mammalian tolloid-like 2,

have differential enzymatic activities and distributions of expression relevant to patterning and skeletogenesis. *Dev Biol* 1999;213:283-300

60. Scott IC, Imamura Y, Pappano WN, Troedel JM, Recklies AD, Roughley PJ, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1 process probiglycan. *J Biol Chem* 2000;30504-30511.

61. Wermter C, Howel M, Hintze V, Bombosch B, Aufenvenne K, Yiallouros I, Stocker W. The protease domain of procollagen C-proteinase (BMP-1) lacks substrate selectivity, which is conferred by non-proteolytic domains. *J Biol Chem* 2007; 513-521.

62. Grainger D., Mosedale D., Metcalfe J. TGF-ß in blood:a complex problem. *Cytokine&Growth Factor Reviews* 2000; 11: 133-145.

63. Grgurevic L, Macek B, Healy DR, Brault AI, Cipcic A, Grgurevic I, Rogic D, Galesic K, Brkljacic J, Stern-Padovan R, Paralkar VM, Vukicevic S. Circulating bone morphogenetic protein 1-3 isoform increases renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:681-92

64. Kodama H, Amagai Y, SudoH, Kasai S, Yamamoto S. Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn J Oral Biol* 1982;23:899-904

65. Sudo H, Kodama H, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 1983;96:191-8

66. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res* 2001;29:45

67. Goldman LW. Principles of CT and CT technology. *J Nucl Med Technol* 2007;35(3):115-28

68. Guldberg RE, Lin AS, Coleman R, RobertsonG, Duvall C. Microcomputed tomography imaging of sceletal development and growth. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2004;72(3):250-9

69. Ambrose J and Hounsfiled G. Computerized transverse axial tomography. *Br J Radiol* 1973;46(542):148-9

70. Hildebrand T, Laib A, Muller R, Dequeker J, Ruegsegger P. Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural dana from spine, femur, iliac crest and calcaneous. *J Bone Miner Res* 1999;14:1167-74

71. Vukicevic S, Luyten FP, Reddi AH. Stimulation of the expression of osteogenic and chondrogenic phenotypes in vitro by osteogenin. *Proc Natl Acad Sci USA*1989;86:8793-7

72. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial *Bone* 1993;14:595-608

73. Meng XW, Liang XG, Birchman R, Wu D.D., Dempster DW, Lindsday R, Shen. Temporal expression of the anabolic action of PTH in cancellous bone of ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 1996;11:421-9

74. Shen V, Birchman R, Xu R, Otter M, Wu D, Lindsday R, Dempster DW. Effects of reciprocal treatmentwith estrogen and estrogen plus parathyroid hormone on bone structure and strength in ovariectomized rats. *J Clinic Invest* 1995;96:2331-8

75. Garrigue-Antar L, Barker C, Kadler KE. Identification of amino acid residues in bone morphogenetic protein-1 important for procollagen C-proteinase activity. *J Biol Chem* 2001;276:26237-42

76. Sampath TK, Coughlin JE, Whetstone RM, Banach D, Corbett C, Ridge RJ, Ozkaynak E, Oppermann H, Rueger DC. Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP-2A, two members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* 1990;265:13198-205

77. Jasuja R, Ge G, Voss NG, Lyman-Gingerich J, Branam AM, Pelegri FJ, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein 1 prodomain specifically binds and regulates signaling by bone morphogenetic proteins 2 and 4. *J Biol Chem* 2007;282:9053-62

78. Liu Y. Renal fibrosis. New insights in pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 2006;69:213-7

79. Suzuki N, Labosky PA, Furuta Y, Hargett L, Dunn R, Fogo AB, Takahara K, Peters DM, Greenspan DS, Hogan BL. Failure of ventral body wall closure in mouse embryos lacking a procollagen C-proteinase encoded by Bmp1, a mammalian gene related to Drosophila tolloid. *Development* 1996;122:3587-95

80. Vukicevic S, Kopp JB, Luyten FP, Sampath K. Induction of nephrogenic mesenchyme by osteogenic protein 1 (bone morphogenetice protein 7). *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:99021-6

81. Vukicevic S, Basic V, Rogic D, Basic N, Shih MS, Shepard A, Jin D, Dattatreyamurty B, Jones W, Dorai H, Ryan S, Griffits D, Malikal J, Jelic M, Pastorcic M, Stavljenic A, Sampath TK. Osteogenic protein-1 (bone morphogenic protein 7) reduces severity of injury afetr ischemic acute renal failure in rat. *J Clinic Invest* 1998;102:202-14

82. Berry R, Jowitt TA, Ferrand J, Roessle M, Grossmann JG, Canty-Laird EG, Kammerer RA, Kadler KE, Baldock C. Role of dimerization and substrate exclusion in the regulation of bone morphogenic protein-1 and mammalian tolloid. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:8561-66

83. Reddi AH. BMP-1: resurrection as procollagen C-proteinase. *Science* 1996;271:463

84. Vukicevic S, Grgurevic L. BMP-6 and mesenchymal stem cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20:441-8

85. Ortega N, Wang K, Ferrara N, Werb Z, Vu TH. Complementary interplay between matrix metalloproteinase-9, vascular endothelial growth factor and osteoclast function drives endochondral bone formation. *Dis Models Mech* 2010;3:224-35

86. Kakagia D.D., Kazakos KJ, Xarchas KC, Karanikas M, Georgiadis GS, Tripsiannis G, Manolas C. Synergistic action of protease modulating matrix and autologus growth factors in healing of diabetic foot ulcers. *J Diabetes Complications* 2007;21:387-91

87. Bidwell JP, Alvarez M, Feister H, Onyia J, Hock J. Nuclear matrix proteins and osteoblast gene expression. *J Bone Miner Res* 1998;13:155-67

11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 06. srpnja 1960. na Sušaku u Rijeci. Nakon završene osnovne škole i gimnazije upisao sam Medicinski fakultet u Zagrebu koji sam diplomirao 1987. godine. Od 1992. zaposlenik sam Klinike za traumatologiju Zagreb odnedavno KBC „Sestre milosrdnice“, gdje radim i danas. 1997. sam položio specijalistički ispit iz opće kirurgije. Uže područje interesa mi je kirurgija zdjelice i acetabuluma te kirurgija ramena. Stručno sam se usavršavao u SAD-u i Francuskoj uz aktivno sudjelovanje na brojnim domaćim i međunarodnim specijaliziranim kongresima. 2002. godine sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu obranio magistarsku tezu pod naslovom «Stražnja dislokacija ramena».

Član sam International Collegue of Surgeons, Hrvatskog kirurškog društva, Hrvatskog traumatološkog društva, Hrvatskog udruženja ortopeda i traumatologa (HUOT) te Hrvatskog liječničkog zbora. Oženjen sam, supruga Marijana, kćer Nina i sin Marin.

Popis radova :

1. Vukicevic S, Oppermann H, Verbanac D, Jankolija M, Popek I, Curak J, Brkljacic J, Pauk M, Erjavec I, Francetic I, Dumic-Cule I, Jelic M, Durdevic D, Vlahovic T, Novak R, Kufner V, Bordukalo Niksic T, Kozlovic M, Banic Tomisic Z, Bubic-Spoljar J, Bastalic I, Vikic-Topic S, Peric M, Pecina M, Grgurevic L. The clinical use of bone morphogenetic proteins (BMPs) revisited: A novel BMP6 biocompatible carrier device OSTEOGROW for bone healing. ***Int Orthop*** 38:635-47, 2014.

2. Grgurevic L, Macek B, Jelic M, Smoljanovic T, Erjavec I, Djurdevic D, Maticic D, Vnuk D, Lipar M, Kufner V, Brkljacic J, Dumic-Cule I, Stern-Padovan R, Vukicevic S. Bone morphogenetic protein (BMP)1-3 enhances bone repair. **Biochem.Biophys.Res. Commun.** 408: 25-31, 2011.

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