

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**TEHNOLOŠKO METALURŠKI FAKULTET**

Jelena Gvozdenović-Jeremić

**MEHANIZAM NASTANKA HETEROTOPNE  
OSIFIKACIJE I KONCIPIRANJE ODGOVARAJUĆEG  
TRETMANA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

**UNIVERSITY OF BELGRADE**  
**FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALURGY**

Jelena Gvozdenović- Jeremić

**MECHANISM OF HETEROTOPIC OSSIFICATION AND  
ESTABLISHMENT OF THE APPROPRIATE TREATMENT**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

**MENTOR:**

---

**Dr Ljiljana Mojović**, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

**ČLANOVI KOMISIJE:**

---

**Dr Zorica Knežević-Jugović**, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

---

**Dr Sonja Pavlović**, naučni savetnik,  
Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

---

**Dr Maja Vukašinović-Sekulić**, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Datum odbrane:

*Svom mentoru, prof. dr Ljiljani Mojović, koja me je još od studentskih dana pratila i značajno uticala na moj profesionalni put, dugujem veliku zahvalnost na ukazanom poverenju, strpljenju i pruženom zadovoljstvu da sarađujem sa njom. Veliku zahvalnost dugujem Prof. dr. Yingzi Yang koja me je uvela u svet biologije kostiju i inspirisala da u njega hrabro i uspešno zakoračim.*

*Zahvalna sam im obema na velikom strpljenju, svesrdnoj i kontinuiranoj pomoći, konstruktivnim razgovorima i dobronamernim sugestijama u svakoj fazi, od uobličavanja teme do finalne izrade ove disertacije.*

*Zahvaljujem se članovima komisije, prof. dr Sonji Pavlović i prof. dr Zorici Knežević Jugović i dr. Maji Vukašinović-Sekulić, na konkretnim sugestijama i neprocenjivoj pomoći oko konačnog oblikovanja disertacije.*

*Mojoj majci Ljiljani i bratu Nebojši se najtoplije zahvaljujem na beskrajnoj ljubavi i bezrezervnoj podršci i razumevanju koje su mi pružali u svim mojim profesionalnim i životnim usmerenjima.*

*Mojim najmilijima, Mini, Luki i supruhu Aleksandru, dugujem beskrajnu zahvalnost na strpljenju i nesebičnoj pomoći u toku svih ovih godina odricanja i posvećivanja nauci.*

*Za svu ljubav i oslonac koju mi pružaju u životu beskrajno sam ih zahvalna.*

*Jelena*

## **MEHANIZAM NASTANKA HETEROTOPNE OSIFIKACIJE I KONCIPIRANJE ODGOVARAJUĆEG TRETMANA**

### **IZVOD**

Skeletni sistem je kompleksan organ koji se formira tokom embriogeneze, znatno uvećava tokom detinjstva, remodeluje tokom celog života i regeneriše nakon povreda. Formiranje kostiju je striktno kontrolisan proces, vremenski i prostorno. Prostorno gledano, granice skeletnog sistema su jasno ograničene u ljudskom telu. Van skeletna formacija kostiju ili heterotopna osifikacija (HO) je patološka pojava koja se javlja sporadično i predstavlja klinički problem jer dovodi do bola, otoka i potpune imobilizacije zglobova. Heterotopna osifikacija je definisana prisustvom lamelarne koštane mase tkiva van skeletnog sistema. Heterotopna ili ektopična osifikacija je problem koji se javlja kao posledica traume na koštano ili meko tkivo, ili mnogo ređe kao posledica genetske mutacije kod retkih naslednih bolesti kao što je, na primer, progresivna koštana heteroplazija (engleski Progressive Osseous Heteroplasia ili POH). Mehanizam ove osifikacije nije dovoljno razjašnjen, ali je poznato da se glavni defekt dešava na nivou neadekvatne i ubrzane metaplastične osifikacije koja ima za rezultat formiranje lamelarne kortikosteroidne kosti. Pretpostavlja se da su multipotente mezenhimske matične ćelije (MSC), ćelije koje se diferenciraju u osteoblaste. Stimulatorni G proteinski kompleks je nedavno prepoznat kao ključni regulator mezenhimskih ćelija skeletnog sistema. Inaktivirajuća mutacija alfa subjedinice stimulatornog G proteinskog regulatornog kompleksa ( $G\alpha_s$ ) adenil ciklaze (GNAS1), koja se javlja kod retke genetske bolesti POH, je glavni uzrok fenotipa - nekontrolisanog i progresivnog formiranja patološke osifikacije van skeletnog sistema, najčešće u okolnom mekom tkivu. Kao što često biva, iz primera retkih bolesti i mutacija koje one nose, možemo naučiti dosta o osnovnim biološkim mehanizmima i biološkim procesima u ćeliji.

Cilj ovog rada je bio da se rasvetli mehanizam nastanka HO kao i da se ispita efikasnost tri inhibitora Hedgehog (Hh) signalnog puta, arsen trioksida (ATO),

lovastatina (Lov) i aktivne forme vitamin D3 (VitD3) u sprečavanju osteogeneze u progenitorskim mezenhimalnim ćelijama i koncipira efikasna kombinacija leka primenom niskih koncentracija navedenih agenasa.

Korišćen je animalni model za POH kao i humane i progenitorske mezenhimalne ćelije miša. Analizom genske ekspresije praćen je sadržaj iRNK Gli1 gena koji je glavni marker Hh signalnog puta.

Dokazano je da je Hedgehog signalni put dovoljan i neophodan za nastanak HO. Primena molekula male molekularne mase, Hh inhibitora, je rezultirala u značajnom smanjenju osteogene aktivnosti progenitorskih mezenhimskih ćelija. Pokazana je funkcionalna veza između inhibicije Hh signalnog puta i osteogeneze u progenitorskim mezenhimskim ćelijama. Analizom ekspresije gena utvrđene su smanjene koncentracije iRNK Gli1 gena. Kombinacija koja je sadržala niske koncentracije navedena tri Hh inhibitora se pokazala podjednako efikasna u inhibiciji Hh signalnog puta i osteogeneze u testiranim humanim i ćelijama miša kao i pojedinačno dejstvo agenasa.

Predložena formulacija koja sadrži niske koncentracije antagonista Hh signalnog puta može biti efikasna u profilaksi HO.

**Ključne reči:** Heterotopna osifikacija, Mezenhimske matične ćelije (MSC), Hedgehog signalni put, Arsen trioksid, Vitamin D3, statin, repozicioniranje lekova

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo

**Uža naučna oblast:** Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

**UDK broj:**

## **MECHANISM OF HETEROTOPIC OSSIFICATION AND ESTABLISHMENT OF THE APPROPRIATE TREATMENT**

### **ABSTRACT**

Skeletal system represents a very complex organ which forms during embryogenesis, develops during childhood, remodels during our lives and regenerates after injuries. Bone formation is strictly controlled, both spatially and temporally. Spatially, bones formation is restricted to the clearly defined skeleton boundaries. Ectopic bone formation or heterotopic ossification (HO) is a pathological bone formation which occurs periodically and is presented with a painful, swollen and motion restricted joints. Heterotopic ossification is defined by the presence of lamellar bone mass outside of the skeleton. Heterotopic or ectopic ossification is a complication which occurs after soft tissue or bone trauma, or very rarely as a consequence of a genetic mutation in an ultrarare disease such as Progressive Osseous Heteroplasia or POH. Mechanism of this pathologic ossification is not clear enough, but it is known that primary defect occurs at the level of rapid and inadequate metaplastic calcification which as a result has corticosteroid bone formation. It is proposed that multipotent mesenchymal stem cells (MSC), are the cells which are differentiating into osteoblasts. Stimulating G protein complex has been recently recognized as a critical regulator for the mesenchymal stem cells of the skeletal system. Inactivating mutation alpha subunit stimulating G protein complex (Gas) adenyl cyclase (GNAS1), which occurs in a rare genetic disease POH, is the leading cause of the phenotype - uncontrolled and progressive pathologic bone formation, most frequently present in soft tissue surrounding the bone. Like it frequently happens, from the rare disease examples and the mutations they carry we can learn a lot about underlying biological mechanisms and processes in the cells.

The purpose of this work is to shed the light on the mechanism of HO formation, as well to explore the efficacy of the three Hedgehog (Hh) inhibitors:

arsenic trioxide (ATO), lovastatin (Lov) and the active form of vitamin D3 (VitD3) or their combination in inhibiting osteogenesis in mesenchymal progenitor stem cells (MSC) in order to propose efficacious and safe treatment using low concentrations of Hh inhibitors.

We used the POH animal model as well as human and murine mesenchymal progenitor cells isolated from the bone marrow. Gene expression analysis of the major Hh signaling mRNA Gli1 gene was utilized.

It was proven that Hedgehog signaling is sufficient and necessary for HO formation. Application of the three small molecules Hh inhibitors resulted in a significant reduction of MSC's osteogenic activity. The functional link between inhibition of the Hh pathway and osteogenesis was presented. Gene expression analysis has shown reduced Gli1 gene expression. Combination with a low Hh inhibitors concentration has been proved to be equally efficient as a single agent when tested for Hh signaling inhibition in murine and humans mesenchymal stem cells.

Suggested formulation with a lower concentrations of Hh antagonist has a promising potential to be explored as a new prophylaxis for HO.

**Key words:** Heterotopic ossification, Mesenchymal stem cells (MSC), Hedgehog signaling, Arsenic trioxide, Vitamin D3, statin, drug repositioning

**Scientific field:** Technological engineering

**Scientific discipline:** Biochemical engineering and biotechnology

**UDC:**



## **SPISAK SLIKA**

**Slika 1.** Histopatološka pojava i nalaz heterotopne osifikacije tokom vremena.

**Slika 2.** Učestalost lokacije HO shodno mehanizmu i uzroku povrede ili traume.

**Slika 3.** 3D CT rekonstrukcija grudnog koša, kičme i gornjih ekstremiteta 12 godina starog deteta sa FOP.

**Slika 4.** Radiološki nalaz pacijenta sa POH.

**Slika 5.** Radiografski nalazi heterotopne osifikacije (HO).

**Slika 6.** Grafički prikaz demonstrira uticaj lokalnih i sistemskih faktora u formiranju HO.

**Slika 7.** Šematski prikaz glavnih koraka u razvoju i diferencijaciji preskeletnih mezenhimskih ćelija ka enhondralnom i intramembranskom tipu osifikacije.

**Slika 8.** Genomska organizacija GNAS lokusa.

**Slika 9.** Uprošćen šematski prikaz Hedgehog molekularnog puta.

**Slika 10.** Eksperimentalni dizajn simuliranja POH fenotipa heterotopne osifikacije kod *Gsaf/f* miša.

**Slika 11.** Potpuni gubitak *Gnas* u mezenhimu uda mišjeg embriona dovodi do HO.

**Slika 12.** Gubitak *GNAS* korišćenjem različitih *Cre* linija dovodi do HO.

**Slika 13.** Gubitak *GNAS* u potkožnom tkivu odraslog miša dovodi do HO.

**Slika 14.** Efikasno uklanjanje *GNAS* indukovano sa *Cre* rekombinazom.

**Slika 15.** Gubitak *GNAS* u progenitorskim mezenhimskim ćelijama dovodi do povećane ekspresije Hh signalnog puta *in vitro* i *in vivo*.

**Slika 16.**  $G\alpha_s$  deluje posredstvom cAMP i PKA na potiskivanje Hh signalnog puta.

**Slika 17.** Gubitak *GNAS* pospešuje diferencijaciju mezenhimskih progenitorskih ćelija u osteoblaste i smanjuje Wnt/ $\beta$ -katenin signal.

**Slika 18.** Redukcija Hh signalnog puta inhibira HO *in vivo* i *in vitro*.

**Slika 19.**  $G\alpha_s$  inhibira Hh signalni put pomoću regulacije Gli aktivacije.

**Slika 20.** Hh signalni put je aktiviran u ektopičnoj kosti kod POH pacijenta i aktivacija Hh signalnog puta je dovoljna da izazove HO.

**Slika 21.** Povećana aktivnost Hh signalnog puta kod embriona *Enpp1*<sup>-/-</sup> miša.

**Slika 22.** Redukovanje aktivacije Hh signalnog puta delimično popravlja fenotip kalcifikacije zgloba kod *Enpp1*<sup>-/-</sup> miša.

**Slika 23.** In vitro biomineralizacija-Test alkalne fosfataze (AF) izveden na potkožnim ćelijama mezenhima (SMP) izolovanih iz *Gα<sup>s</sup>/f* miša.

**Slika 24.** Analiza genske ekspresije Alkalne fosfataze (AF) SMP ćelija.

**Slika 25.** Kolorimetrijski test alkalne fosfataze (AF) kod primarnih mišjih BMSC ćelija (prvi pasaž) nakon izlaganja medijumu za osteogenezu.

**Slika 26.** Genska ekspresija ranog markera osteogeneze, alkalne fosfataze (AF) i markera Hedgehog signalnog puta *GLI1*.

**Slika 27.** Test alkalne fosfataze zajedno sa DAPI bojenjem kod primarnih humanih BMSC.

**Slika 28.** Ekspresioni profil ranog markera osteogeneze, alkalne fosfataze, (AF), i markera Hedgehog signalnog puta, *GLI1*, u humanim BMSC ćelijama.

## **SPISAK TABELA**

- Tabela 1.** Klasifikacija HO
- Tabela 2.** Pojave stečenih formi HO indukovanih traumom
- Tabela 3.** Primer Brokerove klasifikacije heterotopne osifikacije u predelu kuka
- Tabela 4.** Poređenje dve vrste genetske forme HO: FOP i POH
- Tabela 5.** Tipovi i poreklo ćelija dokumentovanih da doprinose nastanku HO u mišjim modelima
- Tabela 6.** Tipovi i poreklo ćelija za koje je pokazano da ne doprinose stvaranju ektopične kosti ili hrskavice u mišjim modelima HO
- Tabela 7.** Nukleotidne karakteristike korišćenih sekvenci za qRT-PCR amplifikaciju

## SPISAK SKRAĆENICA

<b>3D</b>	trodimenzionalno
<b>ACVR1</b>	( <i>engl. Activin A receptor, type I</i> ) Receptor za aktivin A
<b>ALK2</b>	( <i>engl. Activin A receptor, type I</i> ) Receptor za aktivin A, drugo ime
<b>AHO</b>	( <i>engl. Albright's hereditary osteodystrophy</i> ) Albrajtova nasledna osteodistrofija
<b>ATO</b>	( <i>engl. Arsenic trioxide</i> ) Arsen trioksid
<b>AF</b>	Alkalna fosfataza
<b>BGJB</b> kostiju	( <i>engl. BGJB medium</i> ) Medijum za ćelijsku kulturu pogodan za razvoj
<b>BMP</b>	( <i>engl. Bone morphogenetic protein</i> ) Koštani morfogenetski protein
<b>BMSC</b>	( <i>engl. Bone marrow stromal cells</i> ) Matične ćelije koštane srži
<b>cAMP</b>	( <i>engl. Cyclic Adenosine Monophosphate</i> ) Ciklični adenzin monofosfat
<b>cGy</b>	( <i>engl. centigray</i> ) centigrej
<b>CNS</b>	Centralni nervni sistem
<b>COX</b>	( <i>engl. Cyclooxygenase</i> ) Cikloksigenaza
<b>CT</b>	( <i>engl. Computed Tomography</i> ) Kompjuterska tomografija
<b>DAB</b>	( <i>engl. 3,3'-Diaminobenzidine</i> ) 3,3'-Diaminobenzidin
<b>DAPI</b>	( <i>engl. 4',6-diamidino-2-phenylindole</i> ) 4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DMSO</b>	( <i>engl. Dimethyl sulfoxide</i> ) Dimetil sulfoksid (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO
<b>DNK</b>	Deoksiribonukleinska kiselina
<b>FGF</b>	( <i>engl. fibroblast growth factor</i> ) faktor rasta fibroblasta;
<b>FGFR</b>	( <i>engl. fibroblast growth factor receptor</i> ) Receptor faktora rasta fibroblasta

<b>FOP</b>	<i>(engl. Fibrodysplasia ossificans progressive)</i> Fibrodisplastična progresivna osifikacija
<b>GACI</b>	<i>(engl. Generalized arterial calcification of infancy)</i> generalna arterijska kalcifikacija kod novorođenčadi
<b>GANT58</b>	farmakološki Inhibitor Hh signalnog puta
<b>GFP</b>	<i>(engl. Green Fluorescent Protein)</i> Zeleni fluorescentni protein
<b>GNAS</b>	kompleksan genski lokus kod ljudi čiji je glavni produkt stimulatorna G-protein alfa subjedinica
<b>GPCR</b>	<i>(engl. G protein coupled receptors)</i> receptori spregnuti sa G proteinom
<b>Hh</b>	<i>(engl. Hedgehog pathway)</i> Hedgehog signalni put
<b>HIF1</b>	<i>(engl. Hypoxia inducible factor 1)</i> -Hiposkijom indukovani factor 1; transkripcioni faktor
<b>HL</b>	<i>(engl. Hindlimb)</i> Zadnji ud ili zadnja noga
<b>HLAB27</b>	<i>(engl. human leukocyte antigen B27)</i> humani antigen leukocita B27
<b>HO</b>	Heterotopna Osifikacija
<b>IHH</b>	<i>(engl. Indian Hedgehog)</i> Indiski Hedgehog
<b>IL</b>	<i>(engl. Interleukin)</i> Interleukin;
<b>IP</b>	<i>(engl. Interferon induced protein)</i> Interferonom indukovan protein;
<b>iPCS</b>	<i>(engl. Induced Pluripotent Stem Cells)</i> indukovane pluripotentne matične ćelije
<b>iRNK</b>	<i>(engl. messenger Ribonucleic acid)</i> Informaciona ribonukleinska kiselina
<b>MMP</b>	<i>(engl. matrix metalloproteinases)</i> Matriksne metaloproteinaze
<b>MIP</b>	inflamatorni protein makrofaga
<b>MSC</b>	<i>(engl. Mesenchymal stem cells)</i> Mezenhimske matične ćelije
<b>mTOR</b>	<i>(engl. Mammalian target of rapamycin)</i>
<b>NSAIL</b>	Nesteroidni antiinflamatorni lekovi

<b>OC</b>	(engl. <i>Osteocalcin</i> ) Osteokalcin
<b>OMIM</b>	(engl. <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> ) katalog humanih genetskih bolesti
<b>OSX</b>	(engl. <i>Osterix</i> ) Osteriks
<b>PBS</b>	(engl. <i>Phosphate-Buffered Saline</i> ) Fosfatni pufer
<b>PGE2</b>	(engl. <i>Prostaglandin E2</i> ) Prostaglandin E2
<b>PKA</b>	(engl. <i>Protein Kinase A</i> ) Proteinska kinaza A
<b>PTHrP</b>	(engl. <i>Parathyroid hormone-related protein</i> ) paratiroidni hormonalni protein
<b>POH</b>	(engl. <i>Progressive Osseous Heteroplasia</i> ) Progresivna heteroplastična osifikacija
<b>RAR</b>	(engl. <i>Retinoic acid receptor</i> ) Receptor retinoidne kiseline
<b>RXR</b>	(engl. <i>Retinoid X receptor</i> ) Retinoidni X receptor
<b>RUNX2</b> RUNX2	(engl. <i>RUNX2 protein, transcription factor</i> ) Transkripcijski faktor
<b>RNK</b>	Ribonukleinska kiselina
<b>SMP</b>	(engl. <i>Subcutaneous mesenchymal progenitors</i> ) Potkožne mezenhimalne progenitorske ćelije
<b>SMAD1</b>	(engl. <i>SMAD family member1</i> ) pripadnik SMAD familije 1
<b>TGF-β</b>	(engl. <i>transforming growth factor β</i> ) transformativni faktor rasta β
<b>TOKM</b>	traumatsko oštećenje kičmene moždine
<b>TPM</b>	traumatska povreda mozga
<b>VDR</b>	Receptor vitamina D
<b>VEGF</b>	(engl. <i>Vascular endothelial growth factor</i> ) faktor rasta vaskularnog endotelijuma
<b>WNT/β-catenin</b>	(engl. <i>Wnt/β-catenin canonical signaling</i> ) Wnt-beta katenin kanonski signalni put
<b>WT</b>	(engl. <i>Wild type</i> ) divlji tip, bez genske mutacije

# 1. UVOD

Skeletni sistem, kao i svaki organ ima specifične funkcionalne karakteristike tokom razvoja koje definišu njegov identitet u biološkom i patološkom smislu. Skeletni sistem se sastoji od brojnih elemenata različitog oblika i porekla koji su smešteni u ljudskom telu. Prostorno gledano, granice skeletnog sistema su jasno ograničene u ljudskom telu. Većina elemenata skeletnog sistema je formirana od hrskavice i kostiju i svako od ovih tkiva poseduje specifične ćelije: hrskavica je sagradjena od ćelija hondrocita, a kosti od ćelija osteoblasta i osteoklasta. Na kraju svi ovi ćelijski tipovi imaju svoj sopstveni razvojni put, fiziološku funkciju i shodno tome i patološka stanja (1). Složenost skeletnog sistema, sa aspekta razvoja, fiziologije i patologije, i dalje se ispituje što dovodi do novih otkrića radi potpunog razumevanja ovog kompleksnog organa.

Vanskeletna formacija kostiju ili heterotopna osifikacija (HO) je raznovrstan i kompleksan patološki proces. Reč „heterotopna“ je grčkog porekla od reči „*heteros*“ i „*topos*“ što znači „ drugo mesto“ (2) i latinske reči „*ossificatio*“ što znači formiranje kosti. U bukvalnom prevodu: „formiranje kostiju na drugom mestu“. HO se javlja sporadično kao posledica abnormalne popravke tkiva i predstavlja klinički problem jer dovodi do bola, otoka i potpune imobilizacije zglobova. Spektar HO je veoma širok, pa tako lezije HO mogu biti jako male i klinički beznačajne dok veće lezije mogu imati čak i fatalni ishod. Prvi put je opisana u literaturi pre 1000 godina kao propratna pojava prilikom zarastanja kostiju (4). Tekstovi i zapisi o Američkom civilnom ratu i Prvom svetskom ratu jasno opisuju ovaj problem, koji se često javlja u slučajevima ratnih povreda i posledica amputacija (4). I do današnjeg dana heterotopna osifikacija predstavlja značajan problem u vojnoj medicini. Ratne povrede koje imaju

za posledicu amputacije ili kompleksne rane mekog tkiva često dovode do ove komplikacije i složene rehabilitacije koja sledi. Vojna medicina u celom svetu je jako zainteresovana da u potpunosti razume ovaj problem, etiologiju bolesti, mehanizam nastajanja, kao i metode prevencije i tretmane (4).

Heterotopna osifikacija mekih tkiva kao na primer mišića, ligamenata ili tetiva je takođe potencijalno značajna komplikacija nakon traume, selektivne hirurgije, neurološke povrede ili opekotina većeg stepena i ekstenzivnosti (3). Najčešće se javlja nakon otvorene redukcije interne fiksacije acetabularnog preloma, a zatim kod totalne artoplastike kuka. Posle operacije kuka pojava HO je zabeležena kod i do 90 % pacijenata, međutim samo 3 do 7 % pacijenata razvije kliničke simptome. Kod artoplastike kolena učestalost je od 4 do 39 %, ali samo 1% pacijenata razvije simptome ove bolesti (3).

Etiologija ove bolesti može se generalno svrstati u tri grupe: neurološkog, genetskog i traumatskog porekla (ortopedska hirurgija spada u ovu zadnju grupu). Mada je etiologija klasifikovana, patologija ove bolesti je još uvek nedovoljno razjašnjena (3). Nekoliko faktora se smatra da doprinosi razvoju bolesti: aktivnost prostaglandina (specifično tipa PGE-2), kao i hiperkalcemija, hipoksija tkiva, promene u simpatetičnim nervnim aktivnostima, produžena imobilizacija i disbalans između paratiroidnog hormona i kalcitonina su samo neki od njih. Mnogi drugi faktori rizika su identifikovani u raznim studijama koje su se bavile ovim patološkim stanjem (3).

Formiranje kostiju odvija se putem dva različita procesa; enhondralno i intramembranski. Enhondralni process odvija se kada se kondenzovane ćelije mezenhima diferenciraju u hondrocyte. Ove ćelije sekretuju ekstracelularni matriks pokosnice koji je bogat proteoglikanima, glikozaminoglikanima i kolagenom (tip II I X). Hondrocyti zatim prolaze kroz fazu striktno definisane diferencijacije i apoptoze, omogućavajući da hrskavica biva zamenjena tkivom kosti. Nasuprot tome, kod intramembranske osifikacije ćelije mezenhima se direktno diferenciraju u osteoblaste, prekursore koštanog tkiva.

Generalno, klasifikacija HO na osnovu mehanizma i tipa formirane kosti (intramembranske ili enhondralne) je prikazana u Tabeli 1. Osnovni mehanizmi

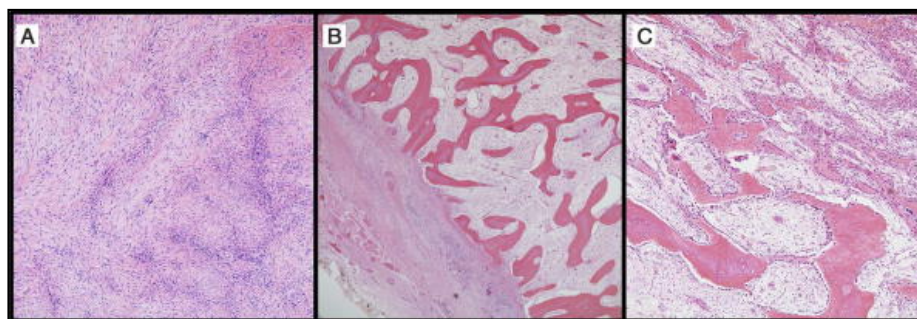


nastanka kosti u slučaju HO su generalno svrstani u dva tipa, mada postoji čitav spektar HO gde se oni preklapaju i najpravilnije je reći dominantno intramembranski ili dominantno enhondralni mehanizam, jer uglavnom nisu isključivi. U svakom slučaju nije neophodno isključiti mogućnost stvaranja kosti uključujući oba mehanizma.

**Tabela 1. Klasifikacija HO**

<i>Klasifikacija</i>	<i>Stečena forma</i>	<i>Genetska forma</i>
<i>Enhondralna osifikacija</i>	Izazvana traumom	FOP
<i>Intramembranska osifikacija</i>	Izazvana traumom	POH, AHO

Trenutna istraživanja teže za boljim objašnjenjima i razumevanjem ove pojave da bi se uspostavila rana dijagnoza i adekvatan tretman. Tipična histopatološka slika HO predstavljena je na Slici 1.



**Slika. 1. Histopatološka pojava i nalaz heterotopne osifikacije tokom vremena.**

Bojenje hematoksilinom i eozinom: A. Rana faza heterotopne osifikacije. U veoma ranom stadijumu HO izgleda kao reaktivna fibroplastična lezija. Fotomikrografija pokazuje ćelijsku proliferaciju fibroblasta aranžiranih blago talasasto u obliku slova C ili S (x200). B. Gusto mineralizovani osteoidi pomešani sa edemičnom fibroblastnom proliferacijom, (x40). C. Uvećanje (x100) pokazuje tendenciju sazrevanja na periferiji lezije (donje levo) u poređenju sa centralnom oblasti (gore desno). Naglašeni su osteoblasti na granici novoformirane kosti a duž linije lezije. Preuzeto iz *The Journal of Bone and Joint Surgery* [3].

Predmet istraživanja u okviru ove disertacije biće rasvetljavanje mehanizma koji dovodi do ove, ne tako česte, ali progresivne i veoma bolne pojave - heterotopne osifikacije. Mezenhimske matične ćelije (MSC) pripadaju populaciji multipotentnih adultnih matičnih ćelija i nalaze se u mnogim tkivima gde ostvaruju važne uloge u održavanju homeostaze. Zahvaljujući višestrukome potencijalu u regeneraciji tkiva, regulaciji hematopoeze i imunomodulaciji, kao i regulaciji ekstra skeletnog formiranja koštanog tkiva, pokušaćemo da rasvetlimo ulogu MSC u formiranju heterotopne osifikacije.

Kao polazni model za istraživanje ovog fenotipa koristiće se model miša koji selektivno putem flox kasete uvodi tkivno specifičnu mutaciju na prvom egzonu alfa subjedinice stimulativnog G proteinskog kompleksa adenil ciklaze, posredstvom adeno virusa.

Utvrdiće se da li je aktivacija Hedgehog molekularnog puta dovoljan i potreban uslov da bi došlo do heterotopnog formiranja kosti.

Takodje, istražiće se mogućnost farmakološkog tretmana korišćenjem molekula niske molekularne mase, inhibitora Hedgehog puta kao potencijalno nove metode preventivnog tretmana.

## 2. TEORIJSKI DEO

### **2.1 Epidemiologija Heterotopne Osifikacije**

Heterotopna ili ektopična osifikacija je problem koji se javlja kao posledica traume na koštano ili meko tkivo, ili mnogo ređe kao posledica genetske mutacije u slučaju retkih naslednih bolesti kao što su, na primer, progresivna koštana heteroplazija (engleski Progressive Osseous Heteroplasia ili POH) ili progresivna koštana fibrodisplazija FOP (engleski Fibrodysplasia Osseous Progressiva) (Tabela 1). Genetski oblik HO je srećom jako redak i procenjuje se na oko stotinak zabeleženih slučajeva POH ili oko hiljadu slučajeva FOP, u celom svetu.

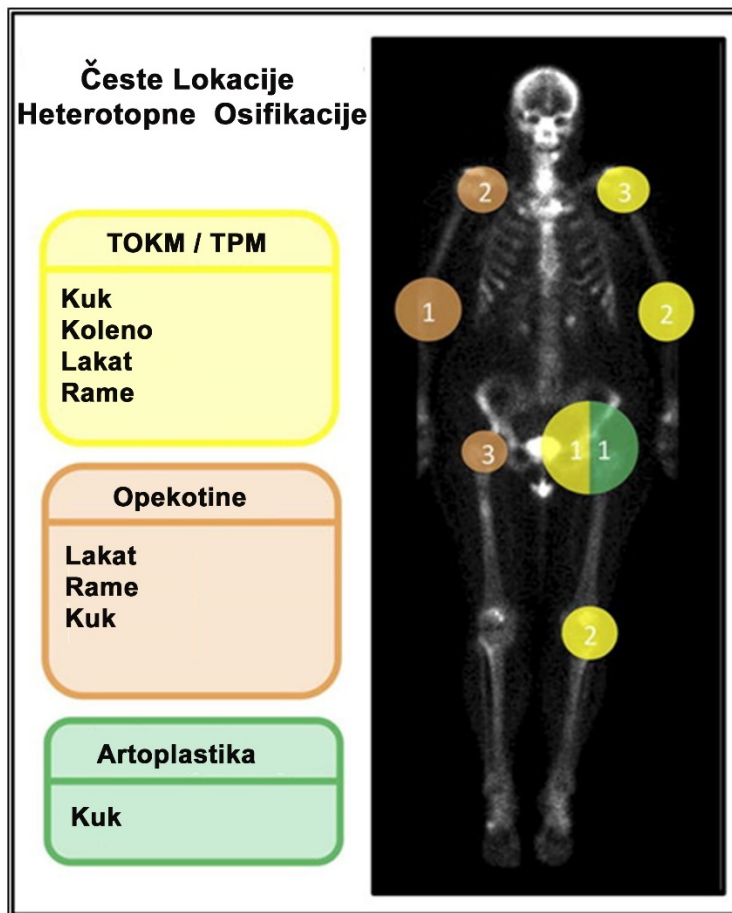
Pored genetske forme, HO je vrlo dobro poznata i dokumentovana u slučajevima artoplastike kuka (javlja se u oko 40%), lomljenja ili dislokacije kostiju (u oko 30% slučajeva, sa laktom kao najčešće zahvaćenim zglobovom), visokoenergetskim eksplozivnim povredama (učestalost i do 60%), traumatskim povredama mozga ili kičmene moždine (javlja se u oko 50% slučajeva) i opekotinama trećeg stepena (oko 20%) (2). Većina slučajeva stečene forme heterotopne osifikacije se javlja nakon muskulaturno skeletnih ili neuroloških trauma (Tabela 2). Nakon muskulaturno-skeletnih trauma HO se može javiti u mekom tkivu neposredno izloženom traumi, kao na primer pojava HO u blizini dugih kostiju nakon hirurških intervencija, preloma ili dislokacija zglobova.

**Tabela 2. Pojave stečenih formi HO indukovanih traumom**

Stečena forma	Lokacija traume	Lokacija HO	Primeri
Trauma	Muskulo-skeletni sistem	Blizu mesta traume	Ortopedska hirurgija, iščašenje zgloba, prelomi
Trauma	Nervni sistem	Udaljeno od mesta traume	Traumatska povreda mozga, povreda kičmene moždine, tumori

HO se može ekstremno retko javiti i u abdomenu, plućima i drugim organima (5). Pored gore navedenih scenarija, HO se susreće i kao posledica primarnih ili sekundarnih malignih tumora gastrointestinalnog trakta, jetre, bubrega ili dojke (6,7). Dve su pretpostavke postavljene u vezi HO povezane sa malignitetom. Jedna je da se maligne ćelije diferenciraju direktno u ćelijsku populaciju koja rezultira osteoblastnom metaplazijom (8). Drugi izvori podržavaju hipotezu da multipotentne stromalne ćelije u okolini tumora učestvuju u diferencijaciji osteoblasta i formiranju HO. Imunohistohemijska ko-lokalizacija proteina paratiroidnog hormona (PTHrP) registrovana na primarnim lokacijama malignog tkiva, strome koja okružuje HO i mestima metastaze, sugeriše da PTHrP iz malignog tkiva igra kritičnu ulogu u malignoj HO osteogenezi (9).

Najčešće lokacije na telu na kojima se javlja HO prikazane su na slici 2.



**Slika 2. Učestalost lokacije HO shodno mehanizmu i uzroku povrede ili traume.** Brojevi od 1 (najčešći) do 3 (najređi) indiciraju opadajući učestalost pojave HO na datom mestu, shodno uzroku povrede. TOKM= traumatsko oštećenje kičmene moždine, TPM= traumatska povreda mozga. Modifikovano iz *The Journal of Bone and Joint Surgery* [3]

Napredak u vojnoj medicini, opremi i okruženju na vojnim zadacima, kao što su moderni zaštitni oklopi i brza evakuacija, rezultira u sve većem broju vojnika koji preživljavaju katastrofalne povrede, što je bio redak slučaj pre samo pola veka. Amputacije izazvane jakim blast povredama kod preživelih vojnika ostavljaju velike šanse da dođe do razvitka HO kao i da imaju posledično problem korišćenjanja proteze (4). Blast povrede su izazvane talasom eksplozije i dovode do teških oštećenja vazдушnim talasom i udarcima. Isto tako, preživele civilne žrtve bombaških terorističkih napada kao npr, u Londonu 2005. imaju velike šanse za razvoj HO. U

slučaju trauma kod civilnog stanovništva HO se javlja u rasponu od 10 % do 30% kao posledica povreda kičmene moždine, lakta, povreda glave i preloma karlice. U slučaju amputacija čak i do 90% amputiranih vojnika razvije HO u nekom obliku. U nedavnim vojnim intervencijama kao npr. u Avganistanu i Iraku, zabeležen je razvoj HO kod amputiranih vojnika i do 63% (15). To je neočekivan ishod jer je do skoro HO retko bila dijagnostikovana kod rezidualne amputacije (16). Faktori rizika za razvitak HO uključuju: dob, mehanizam blast povrede, amputaciju, kao i broj hirurških intervencija u blizini povrede (12).

## **2.2 Klinička slika stečene forme HO**

Klasična klinička slika HO u slučaju traume je mladi pacijent (oko polovina pacijenata je u dvadesetim i tridesetim godinama života) sa istorijatom nedavne lokalne traume ili hirurškog zahvata. Međutim, pacijenti svih uzrasta su registrovani, od beba do starijih osoba. Muški pol je malo češće podložan HO, sa odnosom 3:2 u poređenju sa ženskim. Istorija traume kao inicijatora HO je prisutna u gotovo 75% slučajeva, a ostatak pacijenata ima neku formu repetitivnog mehaničkog stresa ili mikro traume (2).

Traumom izazvana HO može da se javi bilo gde na telu ali najčešće se javlja u predelu lakta, karlice, ramena i kolena. Mnogo češće HO se javlja kao posledica neurotraume ili mišićno skeletne traume nakon operacija. HO neurološkog porekla je povezana sa genetskim elementom- HLA B27 i njegovim prisustvom kao pre dispozicionim faktorom za razvoj HO neurološkog porekla (4). HO nakon hirurške intervencije je mnogo češće povezana sa totalnom artoplastikom kuka i zabeležena je učestalost između 8% i 90 % . Postraumatska HO se formira nakon traume na mekim tkivima u blizini kosti . Stepem trauma može varirati od običnog uganuća do otvorenih preloma dugačkih kostiju . HO se može javiti i na koži, pogotovo kod autoimunih bolesti kao što su dermatomiozitis i sistemska skleroza. Prsti su takodje poznata lokacija HO pogotovo u slučaju bolesti „*fibro-osseous pseudotumor*“ (2).

HO se najčešće javlja nepovezano sa pokosnicom kosti skeletnog sistema. Nakon dužeg vremena dolazi do povezivanja HO sa pokosnicom, kao sekundarna

pojava ove bolesti. U ranoj fazi HO prvi simptomi su lokalni bol, osetljivost i otok. U kasnijoj fazi i prilikom sazrevanja kosti otok je sve više lokalizovan, čvrst na dodir i ponekad dovodi do smanjene pokretljivosti najbližeg zgloba. Oko 20% pacijenata razvije nepokretljivost (ankilozu) zgloba zahvaćenog HO ponekad nakon samo par meseci (2). Radiološka dijagnostika je prvi pristup u dijagnostici, obzirom da je vrlo lako dostupna i jednostavna, i obično se koristi klasični anterioposteriorni rentgenski snimak. Mnogo ređe se koristi kompjuterizovana tomografija (CT), s trodimenzionalnim rekonstrukcijama, ili scintigrafija kostiju sa Tehnecijumom. HO često radiološki podseća na osteosarkom ili osteohondrom, tumore kostiju, pa su dodatni snimci potrebni da bi se postavila tačna dijagnoza. Klinički HO se dijagnostikuje i klasifikuje pomoću Brokerove skale (Tabela 3). Brokerova klasifikacija HO je generalno prihvaćena klasifikacija u kliničkoj praksi i koristi se za definitivnu dijagnozu stepena jačine HO (14). Veoma sličnu klasifikaciju napravili su Hastings i Graham za HO prisutnu u lakatnom zglobu (17).

Pojedine studije su pokazale da dolazi do povećanja nivoa alkalne fosfataze u krvnom serumu tokom rane faze HO, čak i pre prve kliničke slike (4). Zatim, Prostaglandin E2, posrednik tokom inflamacionog procesa koji se lako može detektovati u mokraći. Pronađeno je da je Prostaglandin E2 znatno povišen u kliničkim uzorcima mokraće kod ljudi koji kasnije razviju HO. Stoga, on može biti veoma dragocen biomarker, i od značajne kliničke vrednosti za ranu detekciju HO (4).

**Tabela 3. Primer Brokerove klasifikacije heterotopne osifikacije u predelu kuka**

<b>STEPEN</b>	
<b>I</b>	Ostrvca koštanog tkiva u mekanim tkivima oko predela kuka
<b>II</b>	Proksimalni koštani izraštaji sa karlice ili kraja femura, ostavljajući najmanje oko jedan centimetar između suprotnih površina kostiju
<b>III</b>	Koštani izdanci iz karlice ili proksimalnog kraja femura, smanjujući prostor između suprotnih površina kostiju na manje od jednog centimetra
<b>IV</b>	Anklioza kuka ili kompletna fuzija kostiju kuka

### **2.3 Klinička slika genetskih formi HO**

Retke genetske bolesti koje rezultiraju heterotopnom osifikacijom imaju različitu kliničku sliku od stečene forme HO i znatno su agresivnije forme HO. Genetski izazvana HO nam ukazuje koji su genetski faktori bitni za nastanak ovog fenomena. Dva najčešće zastupljena tipa genetske forme HO opisana su u Tabeli 4.

Dosta saznanja o HO dolazi od proučavanja retke bolesti FOP (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva) .



**Tabela 4. Poređenje dve vrste genetske forme HO: FOP i POH**

<b>Nalsledni oblik</b>	<b>FOP</b>	<b>POH</b>
<b>Genska mutacija</b>	Heterozigotna mutacija ACVR1 gena	Gubitak funkcije GNAS gena
<b>Nasleđivanje</b>	Putem očinskog ili majčinskog alela	Putem očinskog alela
<b>Fenotipske karakteristike sa vremenom</b>	Deca nemaju simptome odmah, ali vremenom se javljaju otekline koje prelaze u koštane lezije tokom vremena	Koštane lezije se javljaju neposredno po rođenju i progresivno napreduju sa vremenom
<b>Fenotipske prostorne karakteristike</b>	Koštane lezije se javljaju od dorzalno-ventralno i proksimalno-distalno	Koštana ostrvca se javljaju prvo potkožno a onda prodiru u dublje tkivo

FOP je retka, sporo napredujuća bolest ali progresivna bolest, sa veoma lošom prognozom i ishodom, za koju trenutno nema efikasnog leka. U slučaju FOP inflamatorni patogeni proces je jasno definisan povećanom ekspresijom morfogenog proteina kostiju 4 (BMP-4) i snižavanjem ekspresije Noggin proteina, antagoniste BMP4 (4).

FOP je uzrokovana heterozigotnom tačkastom mutacijom c.617G>A; p.R206H na aktivin A receptoru tipa 1 (ACVR1) (FOP, OMIM:135100), koji predstavlja jedan od receptora BMP (bone morfogenic protein- koštani morfogenetski protein). Ova mutacija dovodi do hiperaktivacije BMP proteina, a posledično i do abnormalne skeletogeneze u obliku enhondralne osifikacije. Oko 850 pacijenata je registrovano sa ovom dijagnozom širom sveta. Prvi simptomi FOP se javljaju već u prvim godinama života gde nakon pada ili povrede mekog tkiva dolazi

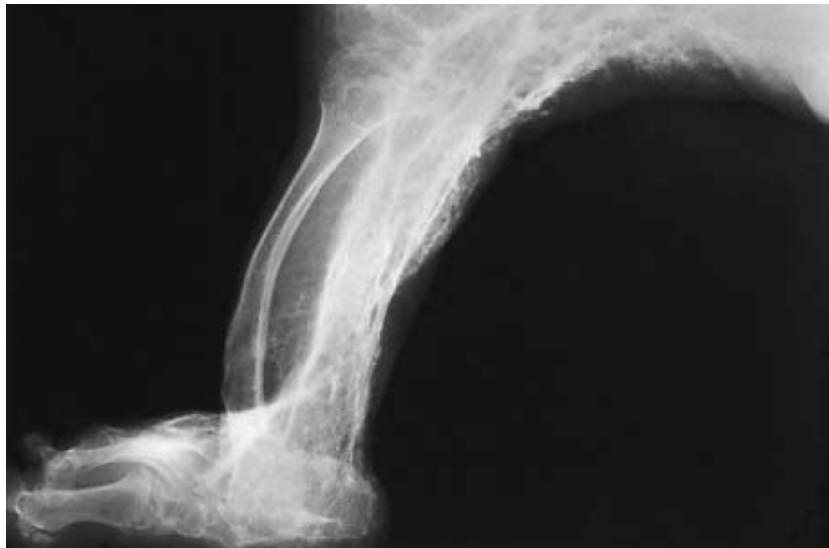
do procesa inicijacije enhondralne osifikacije. Pacijenti takođe gotovo uvek imaju prepoznatljivu malformaciju nožnog palca, dismorfologiju prstiju na rukama ili malformaciju kičmenog stuba. FOP pacijenti razvijaju progresivne bolne otekline i HO lezije koje limitiraju mobilnost kod ovih pacijenata. Biopsije nisu preporučljive kod ovih pacijenata jer svaka naknadna trauma vodi do nove egzacerbacije HO. Mnogi slučajevi FOP nastanu kao spontane mutacije, ali i autozomno dominantno nasleđivanje je isto tako zabeleženo u literaturi (2). FOP karakteriše progresivna osifikacija mekih tkiva: mišića, tetiva i ligamenata (Slika 3.) koja dovodi do otežanog držanja, i nepravilnog disanja tako da prosečan životni vek ovih pacijenata ne prelazi 40 godina (2). Radiografski snimci FOP obično pokazuju veoma jasno razgraničenu oblast, obično prateći oblik specifičnog mišića.



**Slika 3. 3D CT rekonstrukcija grudnog koša, kičme i gornjih ekstremiteta 12 godina starog deteta sa FOP. (preuzeto iz New England Journal of Medicine)[22]**

Mehanizam ACVR1/ALK2 mutacija je veoma dobro dokumentovan, posebno heterozigotna mutacija R206H koja dovodi do hiperaktivnog BMP signalnog puta. FOP je prevashodno kontrolisana enhondralnim mehanizmom osifikacije (2).

POH je genetska forma progresivne heterotopne osifikacije okarakterisana relativno skoro, a izazvana je inaktivirajućom mutacijom u *GNAS1* genu, koji kodira alfa subjedinicu ovog transmembranskog proteina. POH je autozomno dominantna bolest i može biti *de novo*, spontana mutacija ili nasledna preko očinskog alela (POH, OMIM:166350). Osifikacija je predominantno intramembranskog tipa, mada se sporadično tkivo hrskavice može naći pri histološkoj analizi. Radiološki snimci pokazuju koštanu masu kao mrežastu čauru koja umrežava vezivno tkivo od slojeva kože do mišića. Radiološki nalaz pacijenta sa POH je prikazan na Slici 4. Molekularni defekt koji izaziva POH je isti kao kod pseudohipoparatiroidizma (PPHP)(OMIM: 612463) i ima skup sličnih fenotipskih nalaza kao Albrajtova nasledna osteodistrofija (AHO, OMIM#103580) (13,22.



**Slika 4. Radiološki nalaz pacijenta sa POH.** (preuzeto iz *New England Journal of Medicine*)[22]

## **2.4 Klinički faktori rizika**

### **2.4.1. Artoplastika kuka.**

Nakon totalne artoplastike kuka između 2% i 7% pacijenata razvije simptome i klinički relevantnu HO. Kada bi se uzeli u obzir i faktori rizika kao na primer cementni implantati, produženo vreme post operativne ishemije i vrsta hirurškog pristupa, taj broj se penje i do 40%. U slučaju da se radi reviziona hirurgija, procenat je i znatno veći. Pacijenti koji imaju ankilozirajući spondilitis, Pagetovu bolest ili hipertrofični artritis imaju veći rizik od razvoja HO nakon ovog hirurškog zahvata (2).

### **2.4.2. Prelomi**

Formiranje HO nakon traume i preloma je najviše proučavano u slučaju preloma acetabuluma i preloma lakta. Kod oko 40% pacijenata nakon unutrašnje fiksacije acetabuluma javlja se HO. Hirurški pristup može biti dodatni rizik za HO, verovatno povezan sa oštećenjem i traumom okolnih mekih tkiva tokom hirurškog zahvata (2). Više od 20% pacijenata koji razviju HO imaju klinički relevantnu smanjenu pokretljivost zgloba. Dodatni faktori uključuju : povreda glave sa kombinacijom preloma, odložena interna fiksacija, i korišćenje koštanih graftova.

### **2.4.3. Povreda kičmene moždine**

HO je veoma poznata komplikacija kod povreda centralnog nervnog sistema (CNS), uključujući povredu kičmene moždine. Učestalost neurološke HO je zabeležena od 10 do 53%. Interesantno da pacijenti u slučaju povrede CNS uglavnom razviju HO na velikim zglobovima kao sto su kuk, koleno, rame ili lakat. Neurološka HO počinje da se razvija nekoliko meseci nakon povrede centralnog nervnog sistema i progresivno se razvija i do nekoliko godina nakon povrede.

Mada veza između nervnog sistema i procesa formiranja kostiju nije dovoljno razjašnjena, poznato je da periferni neurotransmiteri utiču na formiranje osteoblasta (18,19). Nije još uvek poznato kako povreda centralnog nervnog sistema inicira sekvencu događaja koji dovode do heterotopne osifikacije na udaljenom zglobu. Razvijeni su mnogi animalni modeli koji će pomoći da se razjasni ovaj fenomen. Interesantno je da mehanizam i način nastanka kosti u slučaju povrede kičmene moždine još uvek nije definisan, tako da ostaje nejasno da li je pretežno intramembranski ili enhondralni (2).

#### **2.4.4. Termičke povrede**

Pojava HO je takođe veoma dobro poznata nakon ekstenzivnih opekotina. Rizik za stvaranje HO se povećava sa uvećanom površinom opekotine (ukoliko je veća od 20% od totalne površine tela, rizik je značajno veći). Dodatni faktori rizika uključuju pol (malo veći kod muškog pola) i odaljenost opekotine od zgloba ( najčešće se javlja blizu lakta, zatim ramena i najzad kuka).

Radiografski nalazi HO različitih etiologija su prikazani na Slici 5.

### **2.5. Patologija**

Stečena HO je često markirana tipom tkiva koje je zahvaćeno ovom pojavom. Na primer, ukoliko je ektopična kost zahvatila mišićno tkivo često će se obeležiti kao *myositis ossificans*. Ukoliko je zahvaćen tanak sloj vezivnog tkiva dijagnoza može biti *fascitis ossificans*. Ovo su neki nazivi korišćeni od strane patologa koji mogu biti pogrešno tumačeni u opštoj predstavi o HO, jer ovo stanje nije specifično za neko posebno tkivo.

Rane lezije često su na patološkom nalazu multicelularne sa malim brojem koštanih ćelija ili koštanog matriksa, što često može voditi do postavljanja pogrešne dijagnoze kao npr. sarkoma mekog tkiva. Kasnije lezije HO su vrlo prepoznatljive sa jasno oivičenom zonskom strukturom. Ćelijskom hiperproliferacijom vretenastih ćelija sa malo koštanog matriksa stvaraju se nodularne, granulirane formacije, koje

regrutuju razne vrste ćelija. Osifikacija koja sledi je prepoznatljiva sa značajnim ćelijskim oblaganjem sastavljenog od osteoblasta (Slika 1.). Postepeni prelazak od



**Slika 5. Radiografski nalazi heterotopne osifikacije (HO).** (A) lateralni snimak kolena pokazuje posteriorno, dobro izolovanu masu mekih tkiva sa perifernom radiološkom gustinom karakterističnom za HO (bele strelice). (B) lateralna radiografija lakta, pokazuje anterijorno, dobro oivičenu i značajno osifikovanu masu mekanog tkiva (bele strelice). Periferna radiološka gustina je manje uočljiva u ovom primeru. (C) U kasnijoj fazi HO može se formirati fokalno i difuzno spajanje sa najbližom kosti. U ovom slučaju jasno oivičena koštana lezija (crvena strelica) ima široku bazu (bela strelica) kojom se spaja posteriorno sa femurom. Ova lezija je nastala bez ikakve traume, a pacijent je samo osećao lokalnu neprijatnost. (D) u ekstremnim slučajevima kompletna fuzija (ankiloza) zgloba je primećena, kao na primer u ovom slučaju CT snimka. (E) Lateralna radiografija članka demonstrira osifikaciju Ahilove tetive (bela strelica) usled lokalne traume. (F) u ovom slučaju genetski indukovana HO, FOP (*fibrodysplasia ossificans progressiva*), gde je ekstremna osifikacija prisutna u potkožnom tkivu, mišićima i duboko u mekanom tkivu proksimalne natkolenice. Preuzeto iz *JBMR Plus* (2019)[2]

paučinaste kosti to zrele lamelirane kosti je često prepoznatljiv i jasan znak koji razlikuje HO od osteosarkoma.

Veoma upečatljiva histološka sličnost je prisutna kod regularnog zarastanja preloma i HO, što zaslužuje specijalnu pažnju. Kao kod rane faze zarastanja kostiju, rana HO demonstrira fibroproliferativnu stromu sa mitotskom aktivnošću. Kako HO sazreva fibrozna kost daje mesto lamelarnoj kosti što vremenom dovodi do pojave kortikalne kosti. Kost potpuno sazreva sa koštanom srži i punom vaskularizacijom.

Zrele lezije HO patološki izgledaju identično, bez obzira na poreklo tkiva gde se HO stvara i veoma se teško razlikuju od pravih koštanih elemenata, na histološkom nivou (2).

## **2.6. Prevencija i tretman HO**

Potencijalni klinički pristup ovom problemu može se generalno podeliti u dve grupe:

- 1) strategiju profilaktičkog pristupa prevenciji i smanjenju rizika razvitka HO,
- 2) strategiju tretmana da se ublaže simptomi i poboljša funkcija zgloba kada se HO već pojavila.

Naravno, pristupi će biti značajno različiti u slučaju genetski izazvane HO i stečene HO.

Stečena HO i profilaktični pristup- ovde je veoma važno naglasiti da su svi dole navedeni pristupi veoma uopšteni i nespecifični za patološki proces HO osteogeneze. Pošto su uzroci HO nedovoljno poznati, pristup prevencije je veoma otežan . Mada su mogući slučajevi spontanog smanjenja HO bez ikakve terapije, hirurški tretman je preporučljiv kada dođe do potpune nemogućnosti korišćenja zgloba.

### **2.6.1. Profilaktički pristup zračenjem**

Niske doze zračenja su proučavane kao modalitet i primarna prevencija u tretmanu HO (2). Terapija zračenjem je najbolje proučavana u primeru artoplastike kuka. Profilaktične doze variraju od 400 do 800 cGy i daju se ili 24 sata pre operacije ili do 72 sata posle operacije. Kod pacijenata koji su imali totalnu artoplastiku kuka, kliničko ispitivanje je pokazalo da je 700 cGy primljeno postoperativno bilo značajno efikasnije u prevenciji HO (25% pacijenata je ipak razvilo HO) nego 400 cGy (42 % je razvilo HO). U tom smislu preventivne mere za HO, nisu pokazane značajne razlike između pre-operativne i post-operativne primene zračenja. Većina kliničkih studija gde se koristi zračenje je urađena kod operacije kuka. Nešto redje, efekat je pokazan i na nekim studijama kod povreda kičmenog stuba, ali skoro nikakav efekat nije pokazan kada je u pitanju povreda lakta. Velika pažnja se posvećuje tome da kosti koje treba da zarastu nakon operacije ili traume, ne budu ometene u tom procesu primenom radijacije i da ne dodje do nepotpunog zarastanja kostiju. Radiološko zračenje je isto tako nepoželjno jer je dosta komplikovano logistički sprovesti sam tretman, jer on se obično sprovodi na odeljenju nezavisnom od ortopedske hirurgije (2). Isto tako, treba imati na umu i potencijalni kancerogeni efekat zračenja na duži rok.

### **2.6.2. Profilaktički pristup sa nesteroidnim antiinflamatornim lekovima (NSAIL)**

Imajući u vidu da je HO uglavnom praćena inflamacijom, trenutno u civilnom okruženju uglavnom se pacijentima daju nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL), mada se još uvek ponegde primenjuje i lokalno zračenje kao metoda prevencije HO. Ipak, još uvek nije dovoljno pokazano u kliničkim studijama da je primena NSAIL znatno efikasnija u odnosu na placebo (20). Neke studije su nekompletne, neke ne pokazuju statistički značajnu razliku. Takođe, prisutne su značajne nuspojave (21). NSAIL imaju ozbiljan terapijski problem jer kao opšti lekovi, nedovoljno su specifični i efikasni. Oni deluju antiinflamatorno i moraju se uzimati u velikim dozama na duži rok da bi se uočili neki efekti. Najčešće



upotrebljavan NSAIL za prevenciju HO je Indometacin, derivat indolsirćetne kiseline. Zbog velikih gastrointestinalnih smetnji (nadražaji želuca, bolovi i povraćanje) kao i mogućnosti krvarenja (zbog perforacija ulkusa) veliki je problem dobijanja saglasnosti pacijenta da se do kraja primeni terapija, pa oko 20% pacijenata prekida terapiju usled neželjenih pojava (21). Indometacin deluje i na CNS, pa tako pacijenti neretko imaju glavobolje, vrtoglavice i konfuzije.

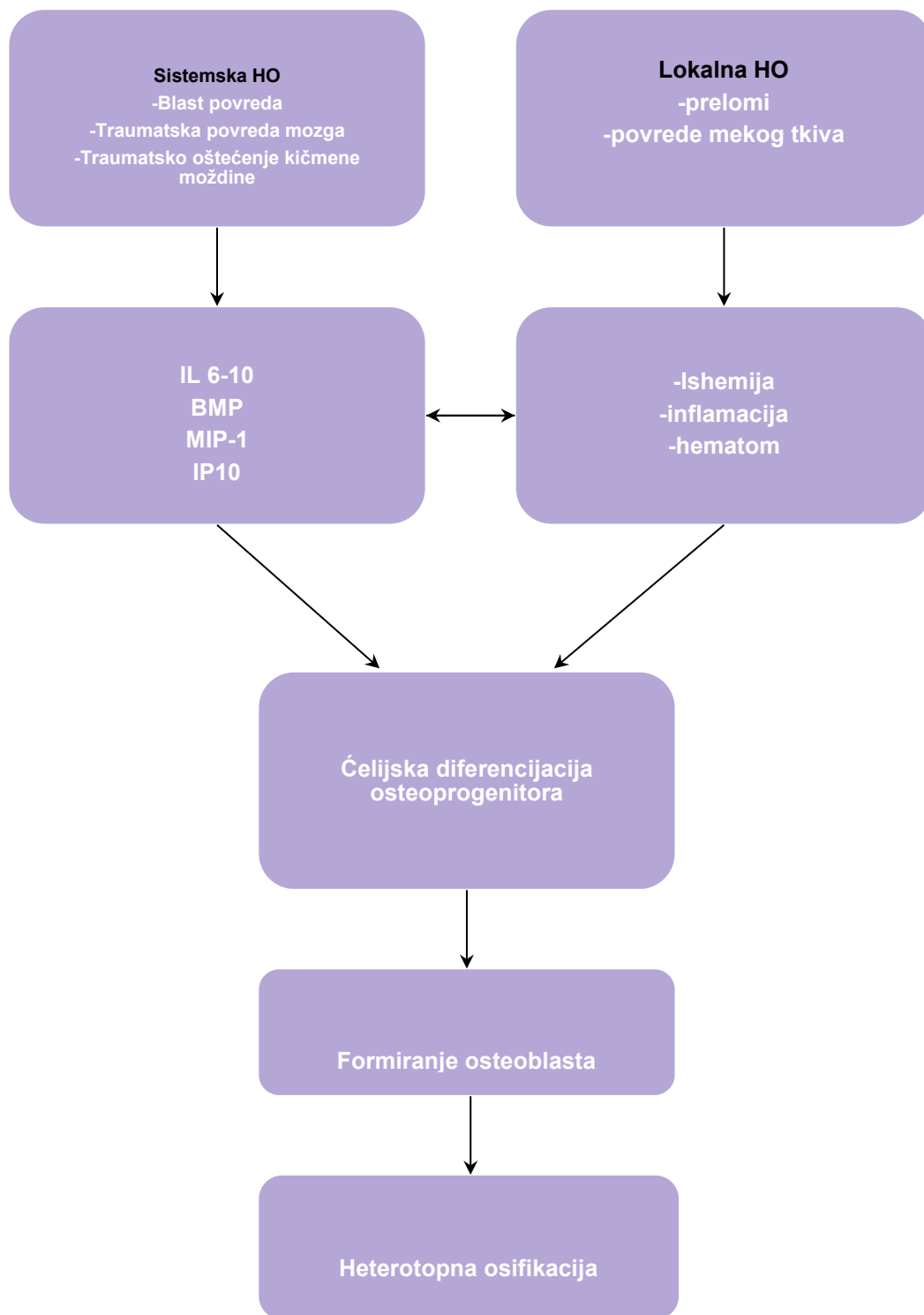
Razne preporuke se nalaze u literaturi u smislu doze, učestalosti uzimanja NSAIL i dužine tretmana. Selektivni COX inhibitori su takođe opcija, uzimajući u obzir gore navedene nuspojave NSAIL-a. NSAIL su takođe povezane sa povećanim rizikom nesrastanja kostiju nakon npr, preloma acetabule. U nedostatku boljeg i efektivnijeg tretmana NSAIL se koriste sa velikim oprezom kao profilaktički tretman za HO (4).

### **2.6.3 Terapija primenom fizikalne terapije**

Nedovoljno je poznato da li fizikalna terapija uopšte ima značajnu ulogu u razvoju i poboljšanju simptoma heterotopne osifikacije. Oprečna razmišljanja se nalaze u literaturi da li rane vežbe koje povećavaju opseg pokretljivosti zglobova uopšte pomažu HO pacijentima (2). Hirurzi koji operišu na primer pacijente sa opekotinama tvrde da vide češće razvitak HO kod pacijenata koji su pribegli agresivnim vežbama kako bi zadržali pokretljivost zglobova.

### **2.6.4 Terapija hirurškim zahvatom**

Prirodni tok HO je da potpuno preraste u zrele kost tokom vremena. Pacijenti kod kojih je HO progresivno dovela do značajnih simptoma koji ometaju kvalitet života nemaju drugu opciju nego da se podvrgnu hirurškom zahvatu odstranjivanja patološki formirane kosti. Hirurški zahvat se obično izvodi kada je rast patološki formirane kosti potpuno završen, što je najčešće šest meseci nakon prve detekcije.



**Slika 6. Grafički prikaz demonstrira uticaj lokalnih i sistemskih faktora u formiranju HO.** BMP-koštani morfogeni protein; IL- Interleukin; IP-Interferonom indukovani protein; MIP-inflamatorni protein makrofaga;

Ukoliko se kost ukloni hirurškim putem pre potpunog sazrevanja, dolazi do velikog rizika da će nova trauma na meko tkivo pogoršati ishod i dovesti do naknadne, sekundarne HO. Ovde treba pomenuti da HO ne poštuje uvek prirodne anatomske barijere i može se proširiti u neurovaskulatorne strukture.

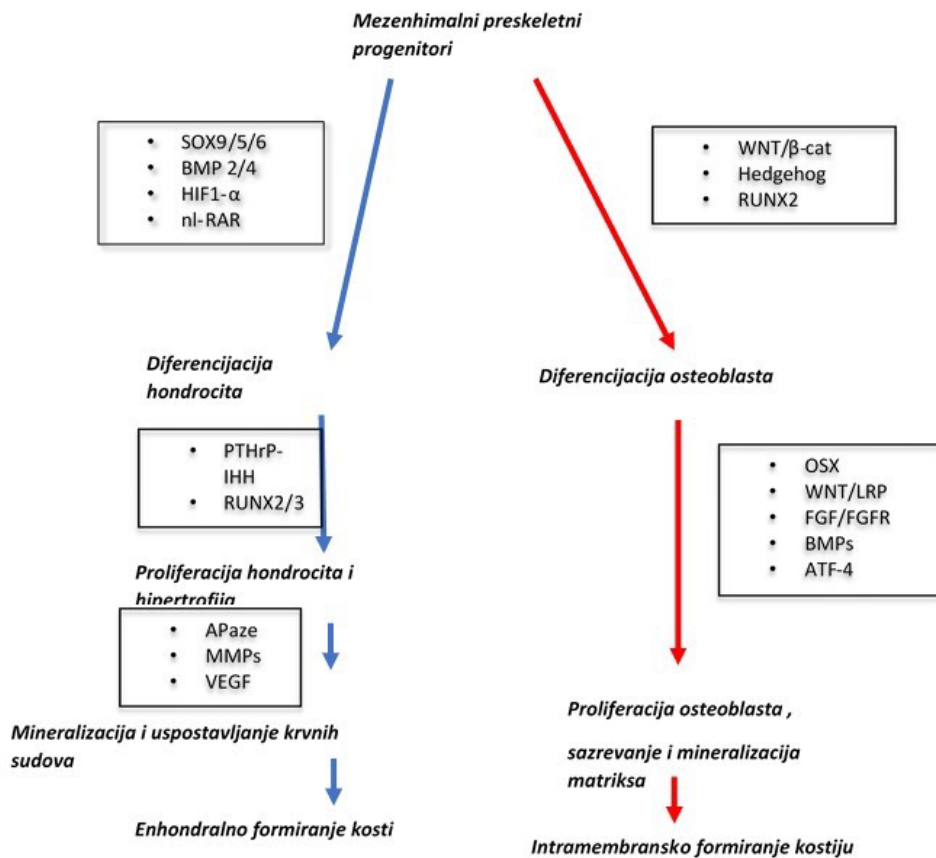
Veoma je visok broj neurovaskulatoernih povreda nakon operativnih HO intervencija. Terapija hirurškim putem je najčešće veoma skupa procedura sa dosta neizvesnim ishodom.

## **2.7 Ćelijski i molekularni mehanizam heterotopne osifikacije**

Mehanizam heterotopne osifikacije još uvek nije dovoljno razjašnjen, ali je poznato da se glavni defekat dešava na nivou neadekvatne i ubrzane metaplastične osifikacije koja ima za rezultat formiranje lamelarne kortikosteroidne kosti. Mehanizam nastanka post traumatske HO karakterisan je inflamacijom, proliferacijom miofibroblasta i njihovom diferencijacijom u hondroците ili osteoblaste. Faktori, lokalni i opšti, za koje se do sada zna da utiču na HO prikazani su na slici 6. Takođe je poznato da je stečena forma HO okarakterisana mešavinom nepoznatog odnosa patološke enhondralne i intramembranske osifikacije.

Glavni regulatori koji utiču na razvoj ova dva mehanizma osifikacije su prikazani na slici 7. Dobro je poznato da su sklonost i diferencijacija preskeletnih mezenhimskih ćelija ka hondrogenezi i enhondralnom mehanizmu osifikacije regulisani: hipoksijom, BMP signalnim putem, transkripcionim faktorima kao SOX9 i nl RAR. Sa druge strane sklonost MSC ka osteogenezi i formiranju koštanog tkiva promovisana je: Wnt/beta catenin signalnim putem, nuklearnim faktorima kao Runx2 i Osx, kao i vaskularizacijom.

Mišljenje je da značajna lokalna inflamacija nakon izazvane traume regrutuje progenitorske ćelije i sekreciju za sada nedovoljno poznatih pro-skeletogenih faktora, tzv. rearanžiranje. Pretpostavlja se da su multipotentne mezenhimske



**Slika 7. Šematski prikaz glavnih koraka u razvoju i diferencijaciji preskeletnih mezenhimskih ćelija ka enhondralnom (levo) i intramembranskom (desno) tipu osifikacije.** Mnogi različiti mehanizmi kontrolišu sudbinu i preopredeljenje progenitorskih ćelija prilikom formiranja kostiju, uključujući hipoksiju, retinoide i Wnt  $\beta$ -katenin signalni put koji su od naročitog značaja. Specifični faktori i regulatori uključeni u diferencijaciju su eksplatisani kao mogući racionalni terapijski ciljevi za obe vrste HO, stečenu i genetsku. BMP- koštani morfogeni faktor; HIF-hiposkijom indukovani faktor; RAR-receptor retinoidne kiseline PTHrP-paratiroidni hormonalni protein; IHH- Indian Hedgehog; AF alkalna fosfataza; MMP-matriks metaloproteinaza; VEGF- vaskularni endotelijalni faktor rasta; FGF-fibroblastni faktor rasta; FGFR-receptor fibroblastnog faktora rasta; OSX-osteriks

matične ćelije (MSC) naime ćelije koje se diferenciraju u osteoblaste. Pošto se HO javlja u raznim tkivima, različita istraživanja ukazuju na različito poreklo ćelija prekursora. Na primer u slučaju mišićne traume, matične mišićne ćelije su prepoznate po osteogenom potencijalu usled povećanja ekspresije BMP4. To posledično dovodi do vaskularne proliferacije i osteogeneze. Imajući u vidu kompleksnost ovog problema vrlo je moguće da su i različiti tipovi progenitorskih ćelija uključeni u ovaj proces (3).

### **2.7.1 Ćelije prekursori HO**

Poreklo ćelija koje dovode do ovog patološkog stanja tek je nedavno donekle objašnjeno mada je, na primer, genetska mutacija kod FOP već odavno poznata. Trebalo je vremena da se putem eksperimentalnog praćenja ćelijskog porekla pokaže koje poreklo imaju ćelije koje se pretvaraju u patološki fenomen HO. Mnogo toga se saznalo korišćenjem animalnih transgenih reporter modela kako bi se identifikovale ćelije koje su navodno odgovorne za formiranje kosti u slučaju HO (2).

**Tabela 5. Tipovi i poreklo ćelija dokumentovanih da doprinose nastanku HO u mišjim modelima.**

<b>Cre nosač</b>	<b>Izvor ćelija</b>
Prx-Cre	Ćelije mezenhima (23)
Nfatc1-Cre	Ćelije mezenhima (24)
Dermo-Cre	Ćelije mezenhima (25)
Scx-Cre;Scx-CreERT2	Tetiva (26,23)
Mx1-Cre	Skeletni mišić intersticium/ koštana srž (26)
Glast-CreERT	Periciti/adipociti/konektivno tkivo interstitium (27)
Wnt1-CreERT	Endoneurium (28)
Tie2-Cre/VE-Cadherin-Cre	Endotelijum/satelitske mišićne ćelije (29,30)

Tabela 5 sumira tipove ćelija za koje je do sada pokazano da doprinose razvoju HO u mišjim modelima ove bolesti.

Pored koštano-hondro-stromalnih progenitorskih ćelija neke studije sugerišu da se vaskularne ćelije endotelijalnog porekla (Tie 2+), ćelije tetive (Scx+) i mišićno intestinalne ćelije (sa Mx1 ekspresijom) također nalaze zajedno sa hondrocitima i osteoblastima u HO lezijama (31-33). Pokazano je, na primer, da ćelije endotelijalnog porekla ko-eksprimiraju i markere mezenhimalnih matičnih ćelija (MSC) i poprimaju većinu fizioloških osobina MSC nakon uvođenja ALK2 aktivacije bilo genetskim ili hemijskim putem (26). Nedavno je pokazano da ALK2 ekspresija mutanta u ćelijama Scx+ porekla dovodi do spontane osifikacije tetiva i ligamenata, dok kod ćelija koje vode poreklo od Mx1+, uvođenje ALK2 mutacije izaziva intramuskulaturu HO nakon povrede. Interesantno bi bilo ustanoviti da li se ove ćelije različitog porekla transformišu u koštanu masu i hrskavicu direktno ili preko intermedijarne tranzicije u mezenhimalne matične ćelije, kao i koji su to faktori indukovani povredom dodatno potrebni da potpomognu BMP signalni mehanizam da dođe do razvoja intramuskulature HO. U Tabeli 6 prikazani su tipovi i poreklo ćelija koje ne doprinose stvaranju ektopične kosti ili hrskavice u mišjim modelima HO.

**Tabela 6. Tipovi i poreklo ćelija za koje je pokazano da ne doprinose stvaranju ektopične kosti ili hrskavice u mišjim modelima HO.**

Cre nosač	Izvor ćelija
Cadh5-CreER	Zreli endotelijum
CD19-Cre	B-ćelije
LCK-Cre	T-ćelije
LysM-Cre	Monociti/Makrofazi

Nestin-Cre	Ćelije somitskog porekla
Myf5-Cre	Skeletni mišić
MyoD-Cre	Skeletni mišić
SM22a-Cre	Vaskularni glatki mišić-periciti
SMMHC-Cre	Vaskularni glatki mišić
Ng2-Cre	Arteriolarni periciti
FoxD1-Cre	Periciti/konektivno tkivo intersticijuma
Vav1-Cre	Hematopoetične ćelije i endotelijum

Kada se tumače rezultati ovih eksperimenata veoma je bitno imati na umu i potencijalne nedostatke ovih modela (2). Neki od njih su:

- Animalni HO modeli imaju jasno izražene razlike u obliku traume, lokaciji HO i prisustvu ili odsustvu mutacija koje dovode do HO. Shodno tome poreklo ćelija kod svih modela koje dovode do HO se ne može generalizovati.
- Cre ekspresija se može dogoditi i u ćelijama ili tkivima koji nisu regulisani specifičnim promotorom (nespecifična ekspresija).
- Prisustvo same Cre ekspresije može dovesti do ćelijske toksičnosti i neželjenog efekta koji naknadno može uticati na fenotip heterotopne osifikacije i tumačenje dobijenih rezultata.

Matične ćelije mezenhima se smatraju odgovornim za većinu ćelija koje se diferenciraju u osteoblaste ili hondrocite i dovode do HO. Kao što se iz do sada prikazanog može zaključiti najverovatnije je da je kod ovog veoma kompleksnog problema patološkog formiranja kosti više vrsta ćelija sinhronizovano uključeno u ovaj proces.

### **2.7.2 Lokalno mikrokruženje**

Lokalni faktori igraju veoma važnu ulogu u ovom procesu formiranja ektopične kosti (2). Koncentracija kiseonika, pH, mikronutrijenti i mehanički

stimulansi takođe utiču na formiranje kosti. Tkivo pokosnice je detektovano u ranoj histološkoj analizi HO što ukazuje na enhondralni mehanizam osifikacije. Inflamacija i ćelijska apoptoza mogu rezultirati u lokalnoj promeni pH vrednosti i stvaranju matriksa koji može da pospeši stvaranje depozita kalcijuma u formi kristala hidroksiapatita. Faktori rasta kao koštani morfogenetski protein (BMP) stimulišu mineralizaciju i formiranje kostiju preko njihovog efekta na osteoblastne progenitorske ćelije (3).

Hipoksijom indukovani faktor 1-alfa (HIF-1) je ključni transkripcioni regulator ćelijskog odgovora na ishemiju i deluje stimulacijom vaskularnih endotelijskih ćelijskih prekursora (34,35). Nedavna istraživanja su pokazala da HIF 1-alfa povećava intenzitet i trajanje BMP signalnog puta preko Rabaptin 5 (RABEP1)-posredovanog zadržavanja ACVR1 u endozomalnom delu hipoksičnog konektivnog tkiva progenitorskih ćelija iz pacijenta sa FOP (36,37),

Kako je aktivin veoma važan citokin koji se proizvodi lokalno od strane imunih ćelija (38) nakon ozlede i koji se povećava sa starenjem (39), od važnog je značaja da se ispita da li aktivin se oslobađa lokalno nakon povrede i igra ulogu u HO izazvanoj traumom.

### **2.7.3 Signalni putevi koji dovode do HO**

Precizan signalni put odgovoran za formiranje HO nije u potpunosti razjašnjen. Ovde ćemo prodiskutovati nekoliko molekularnih puteva za koje se zna da igraju ulogu u ovom procesu i eventualno međusobno interaguju tokom patološkog formiranja kosti.

#### **2.7.3.1 BMP signalni put**

Još 1965. Marshall R. Urist je otkrio supstancu u ekstracelularnom matriksu kosti koja je imala mogućnost da indukuje heterotopnu osifikaciju kada bi se implantirala u mekano tkivo. Još od tada BMP proteini se smatraju da imaju centralnu



ulogu u formiranju i zarastanju kostiju, kao i homeostazi tkiva i osteogenezi (4). Kao deo (TGF)-beta superfamilije, BMP proteini indukuju formiranje kompleksnih receptora sa uniformnom serin-treonin aktivnošću kinaze. Mada postoji više od dvadeset tipova BMP proteina, isključivo BMP2 i BMP4 superfamilija je relevantna za osteoinduktivne karakteristike (3). Aktivacija BMP2 receptora je jedan od glavnih molekularnih puteva koji dovode do formiranja HO (40-42). BMP2 receptor koji se aktivira pomoću liganda koji zatim dovodi do fosforilacije proteina SMAD 1/5/8. Kao rezultat dolazi do aktivacije genske transkripcije, ćelijske diferencijacije i proliferacije što dovodi do povećane sinteze osteogenih faktora.

Dalje je poznato je da TGF - $\beta$ 2 i BMP4 mogu da aktiviraju ALK2 kao i da indukuju endotelijal-mezenhimnu tranziciju (34). Takodje, fibroblasti izolovani iz FOP pacijenata pokazuju povećanu efikasnost da indukuju multipotentne matične ćelije (iPCS). U normalnim fibroblastima efikasnost stvaranja iPCS je povećana uvođenjem tranzicione mutacije ACVR1 ili SMAD1 ili dodatkom BMP4 proteina u toku rane faze reprogramiranja (43). Ovi pronalasci pokazuju da BMP-SMAD signalni put doprinosi indukciji mezenhimalnih ćelija posredstvom endotelijalnih ili mišićnih ćelija. Brojne studije su pokazale povećanu lokalnu regulaciju BMP molekularnog puta nakon termičkih povreda, ili opekotina (42).

Pored lokalnog BMP posredovanog mehanizma, retinoidni receptori su takođe važni u hondrogenezi. Dodavanje retinoida inhibira hondrogenezu i dovoljni su za suzbijanje HO u traumatskom i FOP mišjem modelu. (54).

### **2.7.3.2 mTOR signalni put**

mTOR signalni put reguliše brojne ćelijske procese, uključujući diferencijaciju hondrocita (44). Izolovanjem ćelija iz FOP pacijenata pronađen je abnormalan aktivin A signal indukovani mutacijom ACVR1 koji je naime doveo do povećanog mTOR signala. Isto je poznato da rapamicin suzbija formiranje HO u

eksperimentalnim FOP modelima (53, 45). Administracija rapamicina je inhibirala HO i u nekim HO modelima indukovanih traumom (55, 58). Efekat mTOR molekularnog puta u formiranju HO smatra se da je posredovan proteinom leptinom. Pokazano je *in vitro* kao i *in vivo* da leptin pospešuje osteogenezu i da je taj efekat efikasno smanjen prisustvom rapamicina (47).

### **2.7.3.3 Hipoksijom indukovani faktor ( HIF)**

HIF faktori aktiviraju gene koji posreduju u adaptivnom odgovoru redukcije parcijalnog pritiska kiseonika (48). HIF kompleks se sastoji od 1 do 3 alfa subjedinice koje se vezuju za HIF beta jedinicu. HIF alfa signalni put povezuje kost i vaskularizaciju tokom razvoja (49), a relativna hipoksija tkiva izaziva HIF1 alfa aktivaciju, koja povećava produkciju pro-angioznih citokina kao što je VEGF. Oba eksperimentalna modela, traumom izazvan i FOP mišji model demonstriraju hipoksiju i povišen HIF1 signalni put. FOP uzorci pacijenata pokazuju takodje povećano HIF1 alfa imunološko bojenje. Šta više, farmakološka inhibicija HIF1 alfa pokazano je da smanjuje formiranje HO u više eksperimentalnih modela. Ovi rezultati su potvrđeni različitim tehnikama, kao npr. utišavanjem gena (gene silencing) ili njihovim potpunim uklanjanjem (gene deletion).

### **2.7.3.4 Receptori signalnog puta retinoidne kiseline**

Retinoidi su potentni morfogeni koji utiču na oba procesa, osteogenezu i hondrogenazu, u toku razvoja skeletnog sistema. Postoje dve klase nuklearnih receptora, receptori retinoidne kiseline (RAR  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ) i retinoidni x receptori (RXR  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ). Ovi receptori se vezuju kao RAR/RXR heterodimeri ili RXR homomeri za DNK

elemente zvane RA-response elementi (RAREs) da bi aktivirali transkripciju RA ciljanih gena. U slučaju razvoja skeletnih elemenata  $RAR\alpha$  je eksprimiran veoma rano i po celoj površini mezenhima uda. Kada ćelije mezenhima počnu da se diferenciraju u hondrocite,  $RAR\alpha$  ekspresija se smanjuje.  $RAR\gamma$  ekspresija postaje sve značajnija i sve više lokalizovana u elementima hrskavice (51,52).

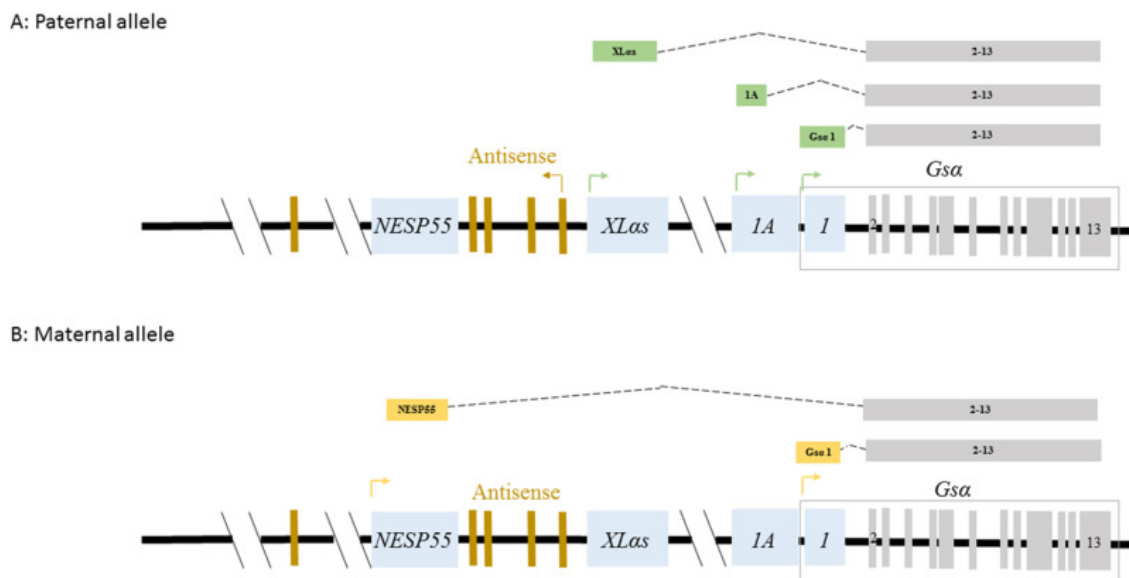
Ranije je pokazano da kontinuirana ekspresija  $RAR\alpha$  elementa u prehondrocitima sprečava njihovu diferencijaciju u hondrocite i kao rezultat se javljaju razne skeletne anomalije kod transgenih miševa (53) što vodi ka ideji da suzbijanje  $RAR\alpha$  može sprečiti razvitak HO. Selektivni  $RAR\alpha$  agonist je prvo testiran u mišjem modelu sa implantom i rekombinantim BMP (54). Kao rezultat detektovan je smanjen nivo heterotopne kosti i hrskavice ali kompletan nestanak HO nije postignut (54,55). Sledeća studija je proučavala efekat oba  $RAR\alpha$  i  $RAR\gamma$  inhibitora.  $RAR\gamma$  se pokazalo da smanjuju potkožnu i intramuskularnu HO indukovanu putem rBMP2, kao i da dramatično redukuju osifikaciju kod FOP mišjeg modela. Oba agonista  $RAR\alpha$  i  $RAR\gamma$  inhibiraju hondrogenezu i preventiraju HO, ali  $RAR\gamma$  agonisti su se pokazali mnogo efikasniji (56). Veća efikasnost  $RAR$  gama agonista može se objasniti širim ekspresionim miljeom  $RAR\gamma$  receptora, u hondrogenim ćelijama i hondrocitima u poredjenju sa  $RAR\alpha$ . Mehanistički, za  $RAR\gamma$  agoniste je pokazano da umanjuju BMP signalni put tako što inhibiraju fosforilaciju SMAD kompleksa a takodje i pomoću smanjenja nivoa SMAD proteina posredstvom proteazoma (55). Za Palovaroten, specifičan  $RAR\gamma$  agonist, je pokazano da može da neutrališe patolosko formiranje kosti kod ACVR mutant miša. U oštećenom mišićnom tkivu dodatkom Palovarotena je postignut manji broj mastocita, redukovana je fibrolitička proliferacija i formiranje hrskavice i smanjen je obim HO (50). Nedavne studije u animalnim modelima sugerišu potencijalne neželjene efekte tretmana sa  $RAR\gamma$  agonistima, uključujući skeletne abnormalnosti i problem zarastanja rane (57,58). U svakom slučaju klinička ispitivanja koja su u toku sa Palovarotenom pokazuju značajan potencijal za tretiranje FOP bolesti. Palovaroten je trenutno u fazi III kliničkih studija.

### **2.7.3.5 GNAS**

*GNAS* je veoma kompleksan gen koji kodira alfa subjedinicu stimulatornog heteritrimeričnog G proteina ( $G\alpha_s$ ). *GNAS* se nalazi na hromozomu 20q13 kod ljudi a kod miša na hromozomu 2 i ima sličnu genomsku organizaciju (59). *GNAS* generiše više različitih produkata korišćenjem alternativnih promotora i prvog egzona koji se izrezuje sa zajedničkim egzonima 2 do 13 (Slika 8). Najudaljeniji alternativni egzon je  $G_s\alpha$  egzon 1, koji generiše transkript  $G_s\alpha$  subjedinice.

Veoma kompleksno utiskivanje *GNAS* gena je rezultat korišćenja alternativnih promotora i prvog egzona pri čemu se generišu različiti genski produkti, uključujući  $G_s\alpha$  isoformu  $XL\alpha_s$  i hromogranin protein NESP55, koji su specifično eksprimirani sa očinskog odnosno materinskog alela, respektivno. Sam  $G_s\alpha$  je utisnut u zavisnosti od tkiva gde se eksprimira, u većini slučajeva je bilatelarno ekspimiran ali u ponekim tkivima je utišan, kao kod očinskog alela.

$G\alpha_s$  je stimulatorna alfa subjedinica heterotrimeričnog kompleksa G proteina koja prenosi signale preko G-protein povezanih receptora (GPCR). Kao ključni regulator razvića skeleta i njegove homeostaze,  $G\alpha_s$  reguliše diferencijaciju, opredeljenost i sazrevanje ćelija skeletnog sistema. Signalni put posredovan  $G\alpha_s$  interaguje sa WNT i Hedgehog signalnim putevima, gde su oba puta veoma značajna za razvoj skeletnih elemenata i zarastanje povreda (59). Kritična uloga  $G\alpha_s$  signala u razviću skeleta je ilustrovana defektima skeletnog sistema kod ljudi koji nose bilo aktivirajuću ili inaktivirajuću mutaciju u *GNAS* genu.



**Slika 8. Genomska organizacija GNAS lokusa.** Generalna organizacija GNAS gena je prikazana sa  $G\alpha_s$  ekzonom 2-13 (sivo uokvirena oblast), četiri alternativna ekzona: broj 1, NESP55,  $XL\alpha_s$  i 1A su naznačeni na slici plavo ukovirenim oblastima. Promotori su prikazani iznad materinskog ili očinskog alela strelicama. (A) Očinski alel  $XL\alpha_s$ , 1A i  $G\alpha_s$  ekzon 1 (zeleno) iskrojen uz ekzon 2-13 (siva) i tri moguća transkripta nasleđena preko očinskog alela, i NESP55 je utišnut. (B) Materinski alel NESP55 i  $G\alpha_s$  ekzon 1 (žuti) iskrojen uz ekzon 2-13 (sivi) su dva moguća transkripta sa materinskog alela, dok su  $XL\alpha_s$  i 1A utišnuti.

Ova subjediniica inhibira Hedgehog signalni put i gubitak *GNAS* kao rezultat ima povećanu aktivaciju Hedgehog signalnog puta (25). Inaktivirajuća mutacija u okviru *GNAS* gena može dovesti do POH ili do AHO (*Albright's hereditary osteodystrophy*). Formiranje HO koji preslikava POH bolest je postignuto u mišjim modelima korišćenjem različitih Cre nosača (Prx-Cre, Dermo-Cre, Ap2a-Cre) (25). U ovim mišjim modelima kao i u kliničkim uzorcima POH pronađen je povišen Hedgehog signal. Ponekad je Hedgehog signal znatno povišen i u modelima koji su predominantno enhondralni (60). Na primer, u mišjem modelu koji overeksprimira BMP4, pronađene su Gli1 ekspimirajuće ćelije (korišćenjem Gli1-CreERT reporter sistema) koje doprinose stvaranju enhondralne HO u svim fazama razvića.

Stimulatorni G proteinski kompleks je nedavno prepoznat kao ključni regulator mezenhimskih ćelija skeletnog sistema. Inaktivirajuća mutacija alfa subjedinice stimulatornog G proteinskog regulatornog kompleksa ( $G\alpha_s$ ) adenil ciklaze (*GNAS1*), koja se javlja kod retke genetske bolesti POH, je glavni uzrok fenotipa ove bolesti - nekontrolisanog i progresivnog formiranja patološke osifikacije van skeletnog sistema, najčešće u okolnom mekom tkivu. Kao što često biva, primeri retkih bolesti i mutacija koje one nose, mogu doprineti novim saznanjima o osnovnim biološkim mehanizmima i biološkim procesima u ćeliji.

Alfa subjedinica stimulatornog G proteinskog regulatornog kompleksa,  $G_s\alpha$ , je važan metabolički regulator kao i veoma bitan faktor za generisanje hormonski stimulisane ciklične adenil ciklaze.

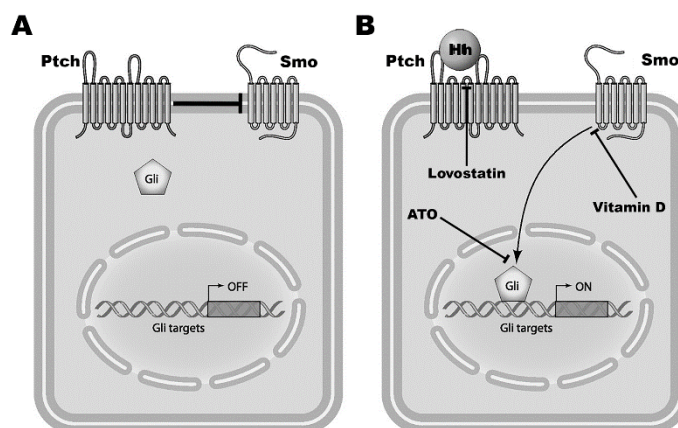
#### **2.7.3.6 Hedgehog signalni put**

Hedgehog signalni put igra ključnu ulogu u embionalnom razviću i simetriji tokom razvoja. Kod vertebrata je neophodan za normalan razvoj mnogih struktura, uključujući nervnu tubu, aksijalni skeletni sistem, kožu i kosu. Povećana aktivnost ovog signalnog puta u tkivima odraslih je povezana sa razvojem mnogih karcinoma kao što su: bazalni ćelijski karcinom, meduloblastoma, pojedini gastrointestinalni karcinomi kao i karcinom pankreasa. (61)

Hedgehog (Hh)/GLI signalni put igra važnu ulogu u raznim aspektima razvoja vertebrata, uključujući formiranje razvojnog obrazca, proliferacije i diferencijacije velikog broja ćelijskih tipova (62). Hedgehog familija vertebrata sastoji se od tri člana: Sonic Hedgehog (SHH), Desert Hedgehog (DHH) i Indian Hedgehog (IHH). Shh je najbolje okarakterisan homolog kod vertebrata i veoma je važan tokom embrionalnog razvića, naročito za regulaciju načina razvojnog puta i indukciju proliferacije u brojnim tkivima. Na Slici 7. prikazan je uprošćen šematski prikaz Hedgehog signalnog puta.

Transdukcija Hh signala je inicirana sekrecijom Hh prekursor proteina (45kD) od strane ćelija koje izlučuju ovaj prekursor. Nakon toga prekursor prolazi kroz autokatalitičko procesovanje i modifikaciju. Prekursor se preseca na 20kD N-terminalnu sekvencu i 25 kD C-terminalni katalitički deo. Nakon autoprocenovanja

prekursora, molekul holesterola se kovalentno vezuje za karboksil grupu N-terminalne signalne sekvence. Modifikovan N-terminalni signalni deo se izlučuje u citosol kao Hh ligand. Sa druge strane, na ćeliji do koje dolazi ovaj ligand postoji Ptch receptor, dvanaest-transmembranski protein koji međusobno interaguje sa Hh ligandom i tada otpušta svoju interakciju sa Smo, 7-transmembraskim proteinom, koji dalje prenosni signala i kao krajnji rezultat aktivira Gli transkripciju gena. Gli molekuli su cink-finger transkripcioni faktori koji učestvuju u poslednjem koraku Hh-Gli signalnog puta i regulišu nekoliko gena, uključujući gene koji regulišu kontrolu ćelijskog ciklusa i Hh-Gli signalni put. U odsustvu Hh liganda, Ptch uzajamno se vezuje za Smo i tako inhibira njegovu funkciju i sprečava dalje aktiviranje signalne kaskade, uključujući i Gli molekule.



**Slika 9. Uprošćen šematski prikaz Hedgehog molekularnog puta.** Glavni učesnici PTCH i SMO locirani su na ćelijskoj membrani dok Hh ligand se vezuje za PTCH sa spoljašnje strane ćelije. GLI, transkripcioni aktivator mnogih gena koji regulišu kancer, je aktiviran kad se Hh ligand veže za PTCH i SMO signalni put tada postaje aktiviran. **A.** U odsustvu Hh liganda, Hh signalni put je suprimiran (signalni put je OFF). **B.** U ćelijama sa abnormalnom  $G\alpha$  funkcijom dolazi do aktivacije Hh signalnog puta (ON). Ilustracija takođe odlikava različite tačke predloženih regulatornih mesta aktivacije tri Hh inhibitora (Arsen trioksida (ATO), Vitamina D i Lovostatina) koji su ispitani u ovoj disertaciji.

Postoje više Gli molekula, pri čemu GLI1 deluje kao aktivator gena dok su GLI2 i GLI3 poznati i kao aktivatori i kao represori. Svi Gli molekuli se vezuju preko pet karakterističnih, tzv. cink-finger oblasti koji prepoznaju konsenzus Gli selektivne sekvence 5'-GACCACCCA-3', koja reguliše transkripciju.

Pored veoma važne uloge Hh puta u razviću, povišen Hh signalni mehanizam je pronađen u više vrsta kancera. U slučaju kancera kože, mozga, prostate, pankreasa i pluća kao i malignim tumorima kao što su bazalni ćelijski karcinom ili meduloblastom, Hh je konstitutivno povišen kao posledica mutacija u SMO ili PTCH proteinima.

Zato interakcija sa funkcijom GLI proteina, zadnjeg u nizu Hh molekularnog puta, može biti obećavajuća strategija za razvoj novih terapija koje uspešno zaustavljaju i stavljaju pod kontrolu ovaj molekularni mehanizam.

## **2.8 Animalni modeli**

Veliki broj istraživanja koristi animalne modele kao sredstvo za proučavanje procesa HO i njegove prevencije. U literaturi se mogu se sresti modeli zeca, miša, pacova, koza, ovce kao i psa koji su jako puno doprineli razumevanju mehanizma HO (3). Pošto se HO može formirati putem dva različita procesa, intramembranskim i enhondralnim mehanizmom, postoji više različitih modela koji se koriste za izučavanje ovog fenomena i koji manje ili više uspešno preslikavaju nastajanje i kliničku sliku HO kod ljudi. Ovi modeli su od neprocenjive vrednosti za proučavanje ćelijskog i molekularnog mehanizma HO, kao i novih tretmana za ovu bolest. Trenutno postoji šest animalnih modela za stečenu formu HO:

### **2.8.1 Model Ahilove tetive**

Prvi pacijent sa heterotopnom osifikacijom Ahilove tetive je registrovan 1932. Shodno tome, eksperimentalni model HO Ahilove tetive kod pacova je razvijen od strane Buck (63) i od strane McClure (64) kod miša. Oni su usvojili prosto presecanje tetive skalpelom nakon incizije kože. Mc Clure je našao da se HO razvije kod 60%



miševa sa presečenom tetivom nakon osam nedelja, a do 100% miševa nakon deset nedelja od operacije presecanja tetive. HO nastala u ovom modelu se formira enhondralno što oslikava proces metaplazije hrskavice. Enhondralni proces stvaranja HO je višestepeni razvojni proces u kome preskeletne mezenhimske ćelije prolaze kroz proces kondenzacije i diferenciraju se u hondrocite koji se postepeno slažu i formiraju osnovu hrskavice kao budućeg novog skeletnog elementa. Novoformirani hondrociti se organizuju u ploču rasta sa tipičnim zonama maturacije, proliferacije i hipertrofije koji omogućavaju rast, ekspanziju i izduživanje skeletnih elemenata. Ovaj model je veoma reproducibilan, ali je relevantnost ovog modela u ljudskom fenotipu osporljiva, jer se HO u Ahilovoj tetivi veoma retko javlja u kliničkoj praksi.

### **2.8.2. Imobilizacioni model**

Repetitivna forsirana mobilizacija imobilisanog zgloba kolena dovodi do pojave HO u mišiću kvadricepsa i oko drugih zglobova kod modela zeca koji je razvijen od strane Michelsson 1980 (65). Jedna noga na životinji se imobilize oko kolena koristeći plastičnu udlagu u periodu do oko pet nedelja. Šest dana u nedelji vrši se petominutni tretman forsirane mobilizacije pokušavajući da se postigne potpuna mobilnost kolena. U takvim uslovima, primećena je aktivnost osteoblasta u pokosnici i dalje napredovanje HO u kontinuitetu sa pokosnicom. Promene u prostaglandinu pre nego što se razvije HO koje su primećene kod ovog modela podržavaju pretpostavku da je inflamacija uključena u process formiranja HO. Ipak, relevantnost ovog modela za ljudski fenotip HO je pod znakom pitanja jer denervacija ne pogadja formiranje HO u ovom modelu sto je kontraindikovano sa kliničkim nalazima.

### **2.8.3 Model sa implantom**

Trenutno najčešće korišćeni animalni model je model kod koga se HO indukuje hirurškom implantacijom matriksa koji je obogaćen BMP proteinom na mestima gde se želi izazvati HO (66). Procedura je poboljšavana korišćenjem prečišćenijog BMP proteina, implantacije BMP gela sa matriksom ili pomoću rekombinantnog DNK konstrukta koji sintetiše BMP protein. Postoje i drugi modeli

sa implantom gde se direktno ubrizgavaju ćelije prekursori osteogeneze, ili osteoindukcioni biomaterijali. Ovi modeli su reproducibilni, relativno jednostavni i mehanistički relevantni za HO kod ljudi. Jedini problem je što se kod njih koristi jako visoka, fiziološki irelevantna koncentracija osteoinduktora i osteogenih faktora što nije u skladu sa realnom slikom HO kod ljudi.

#### **2.8.4 Model operacije kuka**

Da bi razvio model koji reprodukuje formiranje HO nakon operacije kuka Schneider (67) je razvio model kod zeca koji simulira proceduru sličnu onoj u kliničkoj praksi operacije kuka. Ovaj model je kopija fenotipa kod ljudi i reflektuje poznat uzrok HO kod ljudi, ali još uvek nije poznato da li je relevantan za ostale etiologije HO.

#### **2.8.5 Model indukovane traume**

Trauma mišića ili CNS često dovodi do HO kod ljudi, ali su svi napori da se napravi animalni model koji reprodukuje ovo stanje imali veoma limitirani uspeh. Zaccalini et al. (68) su indukovali HO u butini zeca primenom traume indukovane tupim predmetom. Da bi ispitalo kako amputacija ekstremiteta nakon blast traume spontano stimuliše razvoj HO Tannous (69) je razvio model u pacovu lokalizovane izloženosti uda visoko energetskej blast povredi.

Tannous je uspešno usvojio model amputacije u rezidualnom udu nakon blast traume. Kod ovih modela detektovana su oba modela stvaranja kostiju, i intramembranski i enhondralni. Ovi modeli reflektuju poznate inicijatore HO kod ljudi ali nisu dovoljno odgovarajući i pouzdani da bi se rutinski koristili.

#### **2.8.6 Iritantan model injekcije**

Heinen et al. je objavio indukciju HO kod zeca nakon ubrizgavanja 40%-nog alkohola, a za njim su i drugi pokušali da indukuju HO ubrizgavanjem raznih iritanata u mišiće kako bi izazvali HO (70). Nedovoljna pouzdanost ovog modela kao i klinička irelevantnost limitiraju primenu ovog modela za istraživanje patologije HO.

## **2.8.7 Modeli za nasledne forme HO**

### **2.8.7.1 FOP model**

Poznato je da je FOP kod ljudi uglavnom izazvana mutacijom ACVR1 gena gde je arginin zamenjen histidinom (A u H) na amino kiselini 206 (R206H), lociranoj na glicin serin (GS) obogaćenom domenu ALK2 receptora, koji ima za rezultat overekspresiju Bmp signalnog puta (71). Razvijen je transgeni model miša koji specifično overeksprimira BMP4 pod kontrolom promotora neuron specifične enolaze (Nse) (72). Ovaj model reprodukuje FOP HO koja se javlja nakon inflamatorne ili neuroinflamatorne inicijacije, ali ne reprodukuje urođeni fenotip ili kliničku sliku progresije FOP koja se ogleda u urođenoj deformaciji velikog nožnog prsta ili degenerativnim promenama zglobova. Globalna konstitutivna aktivacija ACVR1 u modelu miša vodi ka embriogenskoj smrtnosti, pa je razvijen model intramuskularne injekcije Cre-eksprimiranog virusa da bi se indukovala konstitutivno aktivna ekspresija ACVR1(ALK2Q207D) koja mimikrira fenotip FOP bolesti kod ljudi (73). Nedavno je razvijen knock-in model gde je jedna kopija mišjeg *Acvr1* gena zamenjena genom koji nosi *Acvr1* R206H mutaciju na endogenom hromozomskoj lokaciji (74). Ovaj model idealno rekapitulira kompletan spektar FOP fenotipa uključujući skeletne malformacije i progresivnu heterotopnu osifikaciju putem endohodralnog mehanizma.

### **2.8.7.2 POH model**

U *Gnas*<sup>+/-</sup> mišu sa heterogenom *Gnas* delecijom na očinskom alelu (75) detektovan je početak HO u podkožnom regionu kod 9 meseci starog miša u obliku malih, oštrih potkožnih granula. Izolovano je adipozno stromalno tkivo kod ovog miša i pronađena ubrzana osteogena diferencijacija matičnih ćelija *in vitro* (75). Stoga, lokalno indukovana *GNAS* deficit mutacija u potkožnom mezenhimnom tkivu može biti dovoljna za indukovanje progresivne HO.

## **2.9 Razvoj buduće terapije za HO**

I pored svih istraživačkih studija i dosadašnjih saznanja o HO ova, ne tako retka, komplikacija i dalje predstavlja problem kako u civilnoj tako i u vojnoj ortopedskoj hirurgskoj praksi.

Za uspešnu terapiju veoma je bitno otkriti mehanizam koji dovodi do stvaranja patološkog stanja ili bolesti. Lekovi koji otklanjaju uzrok bolesti i nosioca su tzv. kauzalne terapije. Ovakvi lekovi su najdragoceniji ali ih nema dovoljno jer se ili o mehanizmu bolesti ne zna dovoljno ili su patološki procesi veoma kompleksni da bi se napravio odgovarajući lek. Može se reći da su, u slučaju HO, do sada korišćene uglavnom tzv. simptomatske terapije tj. lekovi koji ublažavaju simptome ali ne i uzrok bolesti.

Nakon svega što se zna do sada o patologiji HO, može se slobodno zaključiti da bi sledeća generacija terapije za ovu bolest bili lekovi koji se koriste u profilaksi. Ovakva grupa lekova je od izvanredne važnosti jer su oni učinili mnogo da se neke bolesti sasvim iskorene ili stave pod kontrolu.

Medjutim, ono što je zajedničko za sve lekove je kvantitativna priroda njihovog delovanja. Neophodni uslovi za ispoljavanje lekovitosti novog leka su: tačna dijagnoza, pravilan put unošenja i pravo vreme za davanje leka.

Svaki novi razvoj terapeutskog medikamenta prolazi kroz sledeće faze:

1. Kvalitativna ocena aktivnosti ("*screening*").

U ovoj fazi se standardnim testovima ispituje da li nova supstanca ima farmakološko dejstvo. Kvantitativna analiza uključuje sledeće: farmakokinetiku, farmakodinamiku, toksičnost (akutna, subakutnu i hroničnu toksičnost, kao i posebne vidove toksičnosti: kancerogenost, teratogenost, poremećaji fertiliteta, i alergogenost).

2. Farmaceutska priprema leka.

U ovoj fazi se potencijalnom leku daje prikladan farmaceutski oblik (tableta, dražeja, rastvor, mast i sl.) da bi mogao da se primeni kod čoveka na odgovarajući način.

3. Kliničko ispitivanje.

Za kliničko ispitivanje lekova razvijene su naučne metode koje obezbeđuju kritično prikupljanje podataka koji se mogu podvrgnuti statističkoj analizi. Kliničko ispitivanje se sastoji od 4 faze: ispitivanje lekova na zdravim ljudima (I faza). Ova faza traje 24 do 30 meseci gde se ispituje aktivnost i farmakokinetika leka. Ovi podaci su značajni za pravilan izbor doza i režima doziranja.

Sledeća (II faza) je ispitivanje leka na manjem broju izabраниh bolesnika. U ovoj fazi ispitivanja obuhvataju nekoliko stotina bolesnika i traju od 12 do 24 meseca. Procenjuje se delotvornost leka kod pojedinih bolesti i određuje raspon doza.

Faza III je ispitivanje leka na velikom broju bolesnika. U ovoj fazi koja traje od 12 – 24 meseca vrše se ispitivanja na bolesnicima sa ciljem da se utvrdi terapijska efikasnost i uočene neželjena dejstva.

Četvrta faza (IV) je praćenje delotvornosti i neželjenih efekata posle puštanja lekova u promet. Ova faza služi za upotpunjavanje slike u efikasnosti i toksičnosti, odnosno bezbednosti leka.

Na osnovu svega do sada izloženog moglo bi se očekivati da bi najefikasnija nova terapija za HO potencijalno bila lokalna primena novog leka. Pošto lekovi u principu nisu dovoljno selektivni, povećavanjem doze umnožava se broj organa i tkiva na koje lek deluje pa se počinju javljati sporedna i neželjena dejstva koja ograničavaju ili onemogućavaju dalje povećavanje doze. Karakteristika lokalne primene je da se ovim načinom može primeniti vrlo visoka koncentracija leka na mestu delovanja, koja se nikada ne bih mogla postići drugim načinom primene zbog opasnosti od toksičnih pojava.

## 3. EKSPERIMENTALNI DEO

### 3.1. Materijal i metode

#### 3.1.1. Materijali

##### 3.1.1.1. Hedgehog inhibitori

U radu su ispitivani sledeći Hedgehog inhibitori: GANT-58, Arsen trioksid (ATO), Vitamin D3 (Kolekalciferol), Lovastatin, kao i specifične kombinacije. Ispitivanja su vršena na eksperimentalnim životinjama (miševima) ili u ćelijskim kulturama (BMSC i SMP ćelije kao i embrionalna ćelijska kultura ).

U slučaju ispitivanja u ćelijskoj kulturi, tj. na BMSC i SMP, ćelijske kulture su uzgajane do konfluentnosti i potom bi Hedgehog inhibitori bili dodati direktno u medijum za osteogenezu. Vreme kultivacije je zavisilo od tipa ćelija i tipa Hh inhibitora.

Priprema GANT58. GANT-58 (Tocris Bioscience) je rastvoren u u 20% DMSO i onda razblažen sa kukuruznim uljem pre injektiranja u miša.

U ćelijskoj kulturi GANT58 je primenjen u koncentracijama od 2,5 $\mu$ M, 5 $\mu$ M i 7,5  $\mu$ M i tretmani su trajali deset dana.

Priprema rastvora Arsen Trioksida (ATO): 50 mg ATO (Sigma Aldrich) je odmereno i stavljeno na dno 50 ml Corning plastične epruvete. Dodato je 1 ml, 1M NaOH (Sigma Aldrich) da bi se ATO potpuno rastvorio u baznoj sredini, zatim je dodato 48 ml fosfatnog pufera (pH 7.4) i na kraju pH rastvora je doterana do pH=7.2 sa 0,82 ml 1.2 N HCl . U slučaju intraperitonealne administracije kod miša, prvo je izmerena težina miša, a zatim je rastvor u koncentraciji od 5mg ATO/kg veoma pažljivo injektiran u bremenite mišice, strogo izbegavajući uterus prilikom injekcije.

Sveže pripremljen rastvor ATO je dalje razblažen direktno u medijumu za osteogenezu za dalje aplikacije u eksperimentima ćelijskih kultura od gde je korišćen u koncentraciji od 5 do 10  $\mu\text{M}$ .

Priprema rastvora Kolekalciferola (Vitamina D3): Kolekalciferol (Sigma Aldrich) je rastvoren u 100% etil alkoholu do koncentracije 10mM. Konačne koncentracije u eksperimentima su bile od 5 do 10  $\mu\text{M}$ , gde je reagens sveže pripremljen direktnim dodavanjem koncentrovanog rastvora u medijum za osteogenezu.

Priprema rastvora Lovastatina : Lovastatin, natrijumova so, (Calbiochem) je rastvoren u 100% etil alkoholu do 100mM koncentracije. Rastvor je dalje razblažen do 100  $\mu\text{M}$  u etanolu neposredno pred eksperiment. Konačna koncentracija u medijumu za osteogenezu je postignuta direktnim razblaživanjem do 0,5 ili 1  $\mu\text{M}$ , u samom mediju za osteogenezu.

Kombinacija Hedgehog inhibitora: Dobijena je mešanjem sve tri komponente iz njihovih koncentrovanih rastvora do finalnih koncentracija: Arsen trioksid 5  $\mu\text{M}$ , Lovastatin 0,5  $\mu\text{M}$  i Kolekaciferol 5  $\mu\text{M}$ , direktno u medijumu za osteogenezu.

### **3.1.1.2 Animalni modeli i ćelijske linije**

#### **3.1.1.2.1 Miševi**

***Gs $\alpha$ <sup>ff</sup>* miš.** U radu su korišćeni *Gs $\alpha$ <sup>ff</sup>* miševi oba pola. *Gs $\alpha$ <sup>ff</sup>* je miš kod koga je Exon1, specifičan za kodiranje *Gs $\alpha$* , okružen dvema *loxP* rekombinantnim sekvencama. Ovaj miš je dizajniran od strane Dr. Lee Weinstein sa Nacionalnog Instituta za zdravlje, SAD (76).

***Prx1-Cre* miš.** Ekspresija *Prx1* gena je specifična u tkivu uda gde predvodi ekspresiju Cre rekombinaze u transgenom mišu. Ovaj regulatorni element prisutan je u ranom začetku mezenhima. Ukrštanjem ove linije miša fenotip se najranije primeti oko 9,5 dana embrionalno, a tokom dalje faze razvitka uda do 10,5 dana embrionalno, rekombinacija je potpuno prisutna u celokupnom tkivu mezenihma

uda (77). Ovaj miš omogućava analizu funkcije gena koji su uključeni u embrionalni razvoj udova.

***Dermo1-Cre* miš.** Gen *Dermo1* kodira protein koji ima ulogu transkripcionog faktora (sličan Twist proteinu) koji može zaustaviti sazrevanje osteoblasta i održavati ćelije u preosteoblastnom stanju. Uvođenje homologne rekombinacije putem cre recombinaze u *Dermo1* (*Twist2*) lokus rezultira u značajnoj ekspresiji Cre kasete u kondenzovanom tkivu mezenhima iz koga se diferenciraju osteoblasti ili hondrociti (78).

***Ap2-Cre* miš.** Ovo je specifična linija kod koje je eliminisan transkripcioni faktor AP-alfa 2 tokom formiranja prednjeg nazalnog fronta koji nastaje intramembranskom osifikacijom. (79)

***Gli2<sup>f/f</sup>* miš.** Ovo je kondicioni mutant koji omogućuje selektivno i ciljano uklanjanje *GLI* gena putem ukrštanja sa Cre mišjom linijom. Neo kasete obeležena sa dve lox P strane ubačena je u *GLI2* lokus putem homologne rekombinacije (80).

***R26SmoM2* miš.** Ovaj miš je korišćen za postizanje uslovnog povećanja Hh signalnog puta (81). Mutacija M2 na alelu za Smoothened (*Smo*) receptor koju ovaj miš nosi dovodi do konstitutivno aktivnog Hh signalnog puta. Ovaj miš se široko koristi za ispitivanje procesa Hh-zavisnih tumorogeneza i opcija tretmana za iste.

***Enpp1<sup>-/-</sup>* miš.** Inaktivirajuća mutacija na oba alela *Enpp1* gena dovodi do medijalne arterijske kalcifikacije koja je povezana sa bolešću znanom kao generalna arterijska infantilna kalcifikacija koja dovodi do kalcifikacije krvnih arterija i sudova (GACI)(82).

Svi eksperimenti sa miševima su odobreni od strane NIH IACUC ( National Institute of Health Institutional Animal Care and Use Committee). Protokol za rad za životinjama je odobren od strane komiteta: NHGRI Animal Care and Use Committee.



### **3.1.1.2.2 Humani uzorci**

Kolekcija biopsija dobijenih od pacijenata dijagnostikovanih sa POH bolešću odobrena je od strane Institucionalnog odbora za istraživanja na ljudima na Univerzitetu Pensilvanija (Institutional Review Board of the University of Pennsylvania). Potrebna saglasnost pacijenata je dobijena za sve uzorke obrađene u ovom radu.

### **3.1.1.2.3 Mišje mezenhimske ćelije koštane srži (mBMSC)**

Ove ćelije su izolovane iz femura i tibije miša starog šest do osam nedelja. Ovaj miš je dizajniran od strane Dr. Lee Weinstein sa Nacionalnog Instituta za zdravlje, SAD (76).

### **3.1.1.2.4 Humane ćelije koštane srži (hBMSC)**

U radu su korišćene humane ćelije izolovane iz koštane srži (hBMSC) su nabavljene od kompanije ATCC (ATCC Manassas, Virginia, USA).

### **3.1.1.2.5 Adeno Cre rekombinatni virus**

Ovaj virus je korišćen kao vektor za izazivanje rekombinacije loxP regiona i POH fenotipa kod miševa. Cre recombinaza ili GFP adenovirus dobijen je od SAIC, NCI, (~10<sup>10</sup> pfu/ml), Merilend, (SAD) i razblažen 1:1000 da bi se izvršila infekcija ćelija. Adenovirus dnPKA je obezbeđen ljubaznošću Chen-Ming Fan (~10<sup>10</sup> pfu/ml) i razblažen je 1:300 radi infekcije ćelijske kulture.

### **3.1.1.3 Hemikalije, enzimi, antitela, medijumi za kultivaciju ćelija**

Sve korišćene hemikalije bile su p.a. čistoće. U radu su korišćene sledeće hemikalije, materijali, enzimi i kultivacioni medijumi:

Od enzima i enzimskih preparata korišćeni su:

Kolagenaza tip I (Sigma-Aldrich),

Tripsin (Gibco, SAD)

U radu su korišćene sledeće supstance p.a čistoće:

- Arsen trioksid,  $\text{As}_2\text{O}_3$  (Sigma-Aldrich)
- Alizarin S crveno (Sigma-Aldrich)
- Alcian plavo (Sigma-Aldrich)
- L-askorbinska kiselina,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$  (Wako, SAD)
- Etil alkohol 96 p.a.a (Fisher, SAD)
- Etidijum bromid (Sigma, SAD)
- Ciklopamin (BIOMOL, SAD)
- DMSO, Dimetil sulfoksid,  $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$  (Sigma, SAD)
- Forskolin,  $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_7$  (Sigma-Aldrich)
- Fosfatni pufer (Sigma-Aldrich)
- Glicerol,  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$  (Sigma-Aldrich)
- Glutaralhid,  $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$  (Fluka® Analytical, UK)
- GANT 58,  $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{S}$  (Tocris)
- Beta-Glicerol fosfat,  $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_6\text{P} \cdot 2\text{Na} [5\text{H}_2\text{O}]$  (Sigma-Aldrich, UK)
- IBMX, Sigma-Aldrich
- Hlorovodonična kiselina,  $\text{HCl}$  (Sigma-Aldrich)
- Hidrogen peroksid,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sigma-Aldrich)
- L-Glutamine (Gibco, SAD)
- Lovastatin (Calbiochem)
- Nuklearna crvena (Sigma-Aldrich, UK)
- Kalijum-hidroksid,  $\text{KOH}$  (Sigma-Aldrich)
- Kolekalciferol,  $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}$  (Sigma-Aldrich)
- Natrijum-hlorid,  $\text{NaCl}$  (Sigma-Aldrich)
- Natrijum-tiosulfit,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (Sigma-Aldrich)

- Natrijum-hidroksid, NaOH (Sigma-Aldrich)
- Srebro nitrat
- Sirius crvena
- Tween 20 (Sigma-Aldrich)
- Triton (Sigma-Aldrich)
- Sirćetna kiselina, CH<sub>3</sub>COOH (Sigma-Aldrich)
- Paraformaldehid (Sigma-Aldrich)
- Penicilin (Gibco)

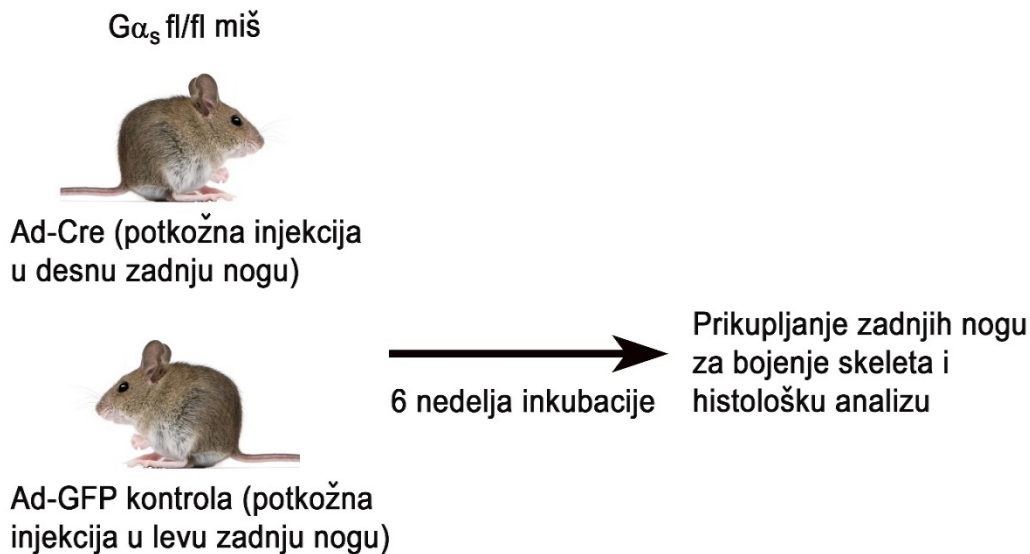
Različita sredstva za bojenja histoloških preparata ili imunobojenja, antitela, kitovi, prajmeri ili specifični reagensi za primenu u korišćenim procedurama molekularne biologije su bili nabavljeni od specijalizovanih renomiranih biotehnoloških dobavljača i specificirani su u opisu konkretnih procedura.

Primenjeni medijumi za gajenje ćelija su specificirani u opisu korišćenih ćelijskih kultura ili procedura za njihovu kultivaciju.

### **3.1.2 Metode**

#### **3.1.2.1. Metoda za dobijanje *Gsα<sup>fff</sup>* miševa**

Konstrukt je napravljen tako da se metabolički efekti deficijencije tj. gubitka *Gsα* mogu izazvati u specifičnom tkivu uvodeći Adeno Cre rekombinantni virus ili ukrštanjem ovog miša sa miševima koji nose Cre specifičnu liniju. Da bi se izazvao fenotip POH, koji uglavnom započinje formiranjem HO potkožno, Adeno Cre rekombinantni virus je isporučen lokalno, u potkožno tkivo injekcijom. Kao što je prikazano na slici 8, desna zadnja noga je primila potkožnu injekciju Ade Cre virusa, a zadnja leva noga bi služila kao kontrola i primila bi potkožno Adeno GFP virus, koji ne dovodi do efekta rekombinacije, pa samim tim ni do efekta HO. Kod ovog veoma elegantno dizajniranog eksperimenta, isti miš je i kontrola i eksperimentalna životinja u isto vreme.



**Slika 10. Eksperimentalni dizajn simuliranja POH fenotipa heterotopne osifikacije kod  $G\alpha_s$  fl/fl miša.**

Tretman adenovirusom je vršen na sledeći način: 2  $\mu$ l Cre rekombinaze ili GFP adenovirusa (SAIC, NCI, Frederick ( $\sim 10^{10}$  pfu/ml)) je rablaženo u 100  $\mu$ l fosfatnog pufera i ubrizgano u potkožni region zadnjih nogu miša starog 4 do 6 nedelja. Šest nedelja kasnije, miš je eutanizovan i koža sa udova je uklonjena. Ektopična kost je analizirana pripremom obojenog skeleta ili pripremom histoloških preparata (objašnjenim detaljno u daljem tekstu).

U slučaju *R26SmoM2* miša, adenovirus je injektiran kod 4 nedelje starog miša, a analiza tkiva je rađena u osmoj nedelji.

### **3.1.2.2 Izolacija i kultivacija mišjih mezenhimskih stromalnih ćelija koštane srži (mBMSC)**

Mišje mezenhimске stromalne ćelije su izolovane iz femura i tibije miša starog šest do osam nedelja. Najpre je izvršena disekcija femura i tibije od ostatka tkiva. Obe epifizalne ploče su uklonjene i koštana srž je sakupljena ispiranjem sa modifikovanim esencijalnim medijumom (DMEM, Gibco, Waltham, Massachusetts, USA) koji sadži 100 U/ml Penicilina, 100  $\mu$ g/ml Streptomocina i 10% serum govečeta (FBS) sa 25 G iglom. Monoćelijska suspenzija je pripremljena višestrukim pasažiranjem ćelijskog grumena kroz 18 G iglu nakon čega je sve filtrirano kroz a 70-

µm ćelijsko sito. Ćelije su propagirane u Alpha-MEM Gibco medijumu sa dodatim 20% serumom govečeta, L-Glutaminom (1x), i 100 U/ml Penicilinom/100 µg/ml Streptomycinom u ovlaženoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> na 37°C.

### **3.1.2.3 Izolacija mišjih potkožnih mezenhimskih progenitorskih ćelija (mSMP) i osteogena diferencijacija**

Potkožne mezenhimalne progenitorske (SMP) ćelije su izolovane iz GS alpha LoxP (*Gsa f/f* miša izdvajajući pažljivo, na hladnom ledu, potkožno tkivo koje sadrži i depozite masti. Tkivo je izmleveno i digestija sa 1 mg/ml kolagenazom tipa I i 0,5% Tripsinom u 0,1% rastvoru Bovine Serum Albumina je vršena 2 h na 37 °C . Potpuno razgrađeno tkivo je centrifugirano na 650 g oko 10 min i pelet je pažljivo sakupljen, nakon što su depoziti masti uklonjeni sa vrha epruvete. Nakon drugog centrifugiranja 650 g za 10 min, ćelijski pelet je filtriran kroz 100-µm ćelijski filter da bi se uklonili ostatci tkiva. Filtrat sa ćelijama je dalje kultivisan u plastičnim sudovima za gajenje ćelija ili je filtrat zamrznut u 10% DMSO i DMEM medijumu sa 20% FBS radi prezervacije.

SMP ćelije su dalje kultivisane u Alpha MEM (Invitrogen) sa 20% Fetal Bovine Serum (Gibco), 100 IU/ml penicilina and 100 µg/ml streptomicina (Gibco) i 2mM L-Glutamine (Gibco) na 37°C u a humidificiranom inkubatoru sa 5% CO<sub>2</sub> u vazduhu. Kada bi ćelije dostigle 80 % konfluentnost, onda bi bile inficirane sa Adeno virusom: Cre rekombinaze (~10<sup>10</sup> pfu/ml) u razblaženju 1:1000 i trajanju četiri sata, kako bi došlo do rekombinacije i uklanjanja lox P kasete u kultivisanim SMP ćelijama. Nakon četiri sata, ćelije su isprane sa Alpha MEM medijumom preko noći. Sledećeg dana medijum bi bio zamenjen medijumom za osteogenezu koji sadrži: DMEM (Invitrogen), 10% Fetal Bovine Serum (Gibco), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Gibco), 2 mM glutamine (Gibco), 10<sup>-4</sup> M L-askorbinsku kiselinu 2-fosfat (Wako) i 10 mM β-glicerol fosfat (Sigma Aldrich). U tretiranim ćelijama medijum za osteogenezu je sadržao i Hh inhibitor. Medijum je zamenjen svežim svakog drugog dana.

#### **3.1.2.4 Izolacija i kultivacija humanih ćelija koštane srži (hBMSC)**

Humane ćelije izolovane iz koštane srži (hBMSC) su nabavljene od ATCC (ATCC Manassas, Virginia, USA) i propagirane u bazalnom medijumu (ATCC PCS 500-030) obogaćenom faktorima rasta u humidificiranoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> na 37°C. U svim eksperimentima su korišćeni hBMSC pasaži 1-3.

Indukovanje osteogeneze je vršeno tako što je nakon dostizanja ćelijske konfluencije, osnovni medijum zamenjen sa medijumom za osteogenu diferencijaciju (OM) Medijum se sastoji od: DMEM, 10% FBS, 100 U/mL penicilin, 100 µg/mL streptomycin, 2 mM glutamin, 10<sup>-4</sup> M L-askorbinska kiselina 2-fosfat i 10 mM β-glicerol fosfat. Ćelije u duplikatu su izložene osteogenom medijumu sa ili bez Hedgehog inhibitora. Medijum je zamenjen svaki drugi dan sa sveže pripremljenim medijumom za osteogenezu.

#### **3.1.2.5. Detekcija Alkalne fosfataze (AF) biomineralnim esejom u mezenhimskim progenitorskim ćelijama**

Nakon četiri dana izloženosti medijumu za osteogenezu (koji sadrži Hh inhibitore ili kontroli, bez dodatih Hh inhibitora), mSMP ćelije su prvo isprane fosfatnim puferom pH 7.4, a zatim fiksirane sa 4% rastvorom paraformaledhida desetak minuta. Fiksativ je ispran dva puta, dodavanjem fosfatnog pufera. Nakon toga, ćelijama je dodat po jedan mililitar 1-Step NBT/BCIP (Thermo Fisher 34042) supstrata i inkubirane su na sobnoj temperaturi, u mraku. Ovo je kolorimetrijski esej gde se so 4- Benzilamino-2,5-dimetoksibenzen-ediazonijum hemi hlorida hidrolizuje putem alkalne fosfataze i kao rezultat se dobija plavo-ljubičasta boja koja precipitira i koja se može detektovati golim okom ili digitalnom kamerom. Nakon jednog sata reakcija je zaustavljena dodavanjem dejonizovane vode. Digitalna kamera, dodata na invertni fazno-kontrastni mikroskop (Motic 10.0 MP), je korišćena za dokumentovanje mikroskopskih obzervacija.

Kod mišjih mezenhimskih stromalnih ćelija koštane srži (mBMSC) alkalna fosfataza je detektovana nakon četiri dana izlaganja medijumu za osteogenezu, prateći gore navedenu proceduru.

Kod humanih mezenhimalnih stromalnih ćelija koštane srži (hBMSC) alkalna fosfataza je detektovana nakon šest dana izlaganja medijumu za osteogenezu, prateći gore navedenu proceduru.

Bojenje DAPI bojom za detekciju nukleusa korišćeno je po već poznatoj proceduri.

Image J softver je korišćen za evaluaciju AF pozitivnih ćelija prema ukupnom broju živih ćelija.

### **3.1.2.6. Priprema i bojenje skeleta (alizarin crveno i alcian plavo bojenje)**

Prvi korak kod skoro svake analize skeletnog fenotipa je analiza preparata celog skeleta da bi se uočile skeletne pravilnosti ili anomalije. Bojenje celog skeleta ovom metodom dozvoljava evaluaciju oblika i veličine skeletnih elemenata na njihovoj originalnoj lokaciji. Alizarin crveno i alcian plavo bojenje se široko koristi u biološkim istraživanjima razvoja i bolesti kostiju. Ova tehnika je glavna metoda kojom se utvrđuju promene u skeletnom obrazcu. Ova metoda bojenja kostiju omogućava jasno diferenciranje između koštanog tkiva i tkiva hrskavice jer se hrskavica i kost mogu različito obojiti pa ova tehnika predstavlja moćno sredstvo praćenja brzine sazrevanja skeletnih elemenata (83).

Ukratko, tehnika se sastoji od pripreme uzorka uklanjanjem tankog sloja kože kod embriona ili kože kod odraslog miša, unutrašnjih organa i masnog tkiva. Zatim su uzorci preko noći stavljeni u 100% etil alkohol radi dehidratacije. Radi boljeg prodiranja boje u preostalo tkivo, uzorci se stavljaju u aceton a zatim prebacuju u rastvor za bojenje koji sadrži Alcian plavo i alizarin crveno. Uzorci su zatim stavljeni u rastvor za bojenje dva dana. Rastvor je procesovan prema receptu (50 ml rastvora za bojenje je sadržao: 2,5 ml 100% sirćetne kiseline, 42,5 ml 70% etanola, 2,5 ml 0,3% rastvora alcian plavog, 2,5 ml 0,1% rastvora alizarin crvenog). Nakon dva dana, embrioni i udovi miša su isprani u vodi i stavljeni u 1% rastvor kalijum hidroksida do obezbojavanja i postizanja prozirnosti u svim ostalim tkivima, sem kostiju. Skeletni sistem je poprimio plavu boju (hrskavica) ili crvenu (kosti).

Embrioni ili udovi miša su stavljani u 80% glicerol prilikom uzimanja fotografija i radi čuvanja na duži rok.

### **3.1.2. Von Kosa bojenje**

Metoda bojenja srebrom po Von Kosa metodi se koristi za bojenje histoloških sekcija, kao i ćelijskih kultura radi detekcije kalcifikacije. Princip metode je zamena kalcijumovih jona sa jonima srebra, pri čemu dolazi do redukcije i precipitacije metalnog srebra. Bojenje (crnom bojom) mineralizovanih (i onih koji sadrže kalcijum fosfat) delova tkiva daje kontrastne boje, ali i prekriva strukturne razlike lamelarnih ili isprepletenih fibrila kolagena.

Von Kosa bojenje ćelijskih kultura. Ćelije su prvo fiksirane u 2,5% rastvoru glutaraldehida u fosfatnom puferu oko dva sata, zatim su isprane u destilovanoj vodi i obojene sa 5% rastvorom srebra nitrata pod lampom od 60 W oko 1 sat. Ćelije su isprane u destilovanoj vodi tri puta, zatim je dodat rastvor 5% natrijum tiosulfata oko 5 min, i zatim sledi ponovo ispiranje pre uzimanja fotografija.

U slučaju bojenja histoloških preparata, sekcije tkiva su deparafinizovane i hidratizane u destilovanoj vodi. Dodat je rastvor 5% srebra nitrata na pločicu i ona je izložena oko jedan sat pod lampom od 60 W. Sekcije su isprane tri puta u destilovanoj vodi. Rastvor 5% natrijum tiosulfata je dodat na sekciju i inkubiran oko 5 minuta. Sledi ispiranje destilovanom vodom tri puta. Pločice su dehidrirane sa ksilenom pre montiranja sa Permont rastvorom i nameštanja pokrovnog stakla za mikroskopiju.

#### **3.1.2.8 Alizarin crveno S bojenje**

Ovo je metoda koja se koristi za detekciju mineralizacije, kada je već došlo do stvaranja koštanog matriksa.

Za bojenje alizarin crvenim S, ćelijske kulture su isprane fosfatnim puferom pH 7,4, a zatim su fiksirane 4% rastvorom paraformaldehida na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja sa vodom, dodat je sveže napravljen rastvor za bojenje alizarin crvenim (1% alizarin crvenog u 2% etanolu) oko 5 minuta pre nego što su ćelije



finalno isprane destilovanom vodom pet puta pre uzimanja digitalnih fotografija pomoću mikroskopa.

### **3.1.2.9 Imunohistohemija**

Imunohistohemijske metode se koriste da bi se pokazalo prisutvo određenog proteina u sekcijama tkiva pripremljenih za histologiju. Histološki preparati su najčešće parafinski ugrađeni preparati ili duboko smrznuti preparati ugrađeni u medijum sa glikolom. Sekcije tkiva su deparafinizovane i hidratisane. Sekcije su zatim stavljene u ključali rastvor 10mM citrata pH=6 oko 15 minuta i zatim na sobnoj temperaturi oko 15 minuta. Stavili bismo sekcije zatim u 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/MeOH oko 15 minuta, ekvilibrisali sekcije u fosfatnom puferu sa 0,1% Tween-20 (PBS-T), blokirali ih 1 sat sa 5% normalnim kozjim serumom u PBS-T (Fosfatni pufer sa Tritonom). Zatim bi primenili zečje anti-Osx antitelo (Abcam; ab22552) u odnosu 1:1000. Sekcije su isprane i detektovan je signal koristeći Anti-rabbit ABC elite kit (Vector labs; PK-6101) i DAB tablete (Sigma-Aldrich; D4293). Sekcije su kontra obojene sa Nuclear Fast crvenim, hidratisane, očišćene ksilenom i montirane koristeći Permont. Kontra bojenje je urađeno sa nuclear fast crvenim bojom i alcian plavom bojom, a potom su uzorci hidratisani, očišćeni sa ksilenom i montirani sa Permontom. Za GLI1 imunohistohemiju, histološke sekcije su inkubirane sa 1:100 razblaženim GLI1 antitelom (Santa Cruz Biotechnology) preko noći na 4°C, zatim se inkubiraju sa univerzalnim sekundarnim antitelom (Broad Spectrum, Zymed Laboratories) oko 25 min, na 50 °C, blokiraju (Background Buster; American MasterTech) oko 30 min hidrogen peroksid bloking agensom (Lab Vision Corp.) oko 15 min, oba na sobnoj temperaturi. Sekcije se zatim inkubiraju sa streptavidin-HRP (Open Biosystem) oko 30 min na 50 °C i boja se razvija koristeći DAB (*SuperPicTure*<sup>™</sup> Polymer, Invitrogen) za 5 min na 37°C. Sekcije POH pacijenata su kontrabojene sa Adult Mastertech Harris Hematoxylin dok je Nuclear Fast Red korišćen kao kontra boja za Von Kossa bojenje. Neonatalni uzorci su kontrabojeni sa Alcian plavom, i nakon toga Siruis crvenom.

### **3.1.2.10 Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qRT-PCR)**

Relativna ekspresija određenih gena u ispitivanim ćelijama je određivana

Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja (engl., *Quantitative Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, qRT-PCR), je metoda kojom se određuje relativna ekspresija određenih gena. iRNK u uzorku se amplifikuje u komplementarnu DNK (ili cDNK) reverznom transkripcijom. Za razliku od klasične PCR reakcije gde se količina umnoženih gena određuje na kraju reakcije, ili u jednoj vremenskoj tački, qRT-PCR metodom se količina umnoženih gena određuje u realnom vremenu nakon svakog ciklusa tokom reakcije, primenom fluorescentnih markera.

Prvi korak je izolacija totalne RNK iz tkiva ili iz ćelijskih kultura korišćenjem Trizol (Invitrogen) reagensa. Nakon toga RNK je prečišćena korišćenjem RNeasy Kit (Qiagen) sa digestijom DNK-ze na koloni. Koncentracije RNK su kalkulisane na bazi spektroskopskog očitavanja na A<sub>260</sub>. Komplementarna cDNK je sintetisana korišćenjem iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad). Kvantitativni PCR je urađen na ABI7900 light cycler (ABI) ili BioRad CFX96 Realtime PCR cycler i za 40 ciklusa na 95°C (15 sekundi) i 60°C cycles na 95°C (15 sekundi) i 60°C (60 sekundi). Detekcija PCR akumuliranog produkta je rađena pomoću Sybr green (Invitrogen; Platimun SYBR Green qPCR SuperMix-UDG).

**Tabela 7. Nukleotidne karakteristike korišćenih sekvenci za qRT-PCR amplifikaciju**

Gen	Nukleotidna sekvenca- napred	Nukleotidna sekvenca-nazad
β-aktin	CAC AGC TTC TTT GCA GCT CCT T	CGT CAT CCA TGG CGA ACT G
Tubulin	CAA CGT CAA GAC GGC CGT GTG	GAC AGA GGC AAA CTG AGC ACC
Gα <sub>s</sub>	GCA GAA GGA CAA GCA GGT CT	CCC TCT CCG TTA AAC CCA AGG
Ptch1	CTC TGG AGC AGA TTT CCA AGG	TGC CGC AGT TCT TTT GAA
Gli1	GAA AGT CCT ATT CAC GCC TTG A	CAA CCT TCT TGC TCA CAC ATG TAA G

Hhip	GGG AAA AAC AGG TCA TCA GC	ATC CAC CAA CCA AAG GGC
Osx	CCC ACT GGC TCC TCG GTT CTC TCC	GCT GAA AGG TCA GCG TAT GGC TTC
Col1a1	CAC CCT CAA GAG CCT GAG TC	GTT CGG GCT GAT GTA CCA GT
Alk Fosfat	CAC GCG ATG CAA CAC CAC TCA GG	GCA TGT CCC CGG GCT CAA AGA
BSP	TAC CGG CCA CGC TAC TTT CTT TAT	GAC CGC CAG CTC GTT TTC ATC C
Oc	ACC CTG GCT GCG CTC TGT CTC T	GAT GCG TTT GTA GGC GGT CTT CA
Lef	TCT CAA GGA CAG CAA AGC TC	CAC TTG AGG CTT CAT GCA CAT
Tcf	ACA TGA AGG AGA TGA GAG CCA	CTT CTT CTT TCC GTA GTT ATC
Axin2	ATG TGT GGA TAC GCT GGA CTT	TTC TTG ATG CCA TCT CGT ATG

Gen korišćen za internu kontrolu :  $\beta$ -aktin.

Relativna genska ekspresija je kvantifikovana koristeći  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu (84).

### **3.1.2.11 GNAS PCR za genetski model miša**

Nukleotidne sekvence korišćene za PCR amplifikaciju kondicionog ili mutant alela su sledeće: 5'- GAGAGCGAGAGGAAGACAGC -3', 5'-TCGGGCCTCTGGCGGAGCTT -3', 5'- AGCCCTACTCTGTGCGCAGTC -3'. 100ng genomske DNK je amplifikovano PCR reakcijom (95°C – 3min, 35 cycles (95°C – 30sec, 62°C – 45sec, 72°C – 45sec), 72°C – 8min, 15°C - zauvek) i PCR produkti su analizirani na 2% agaroznom gelu sa Etidijum bromidom da bi se utvrdilo prisustvo trake ~400bp kondicionog alela ili ~250bp mutant alela .

### **3.1.2.12 In Situ hibridizacija i X-gal bojenje**

*In situ* hibridizacija je tip hibridizacije koji koristi obeleženu komplementarnu DNK, RNK ili modifikovan lanac nukleinskih kiselina da lokalizuje specifične DNK ili RNK sekvence u delu ili sekciji tkiva, ćeliji ili cirkulišućim ćelijama tumora.

*Whole-mount in situ* hibridizacija (WISH) je uobičajena tehnika koja se koristi za vizualizaciju lokacije eksprimirane RNK u embrionima. U ovom procesu sintetisana RNK proba se prvo komplementarno vezuje (hibridizuje) za transkript gena od interesa. Imunohistohemija ili fluorescentnost se dalje koristi da se detektuje hibrid sa RNK, otkrivajući prostorni i vremenski šablon genske ekspresije gena od interesa. Za razliku od tradicionalne tehnike *in situ* hibridizacije koja zahteva sekcije tkiva čiji obrasci detekcije trebaju da se kompjuterski sklope, tehnika *whole-mount* dozvoljava da se oceni obrazac u celom embrionu ili strukturi tkiva.

*In situ* hibridizacija embriona i X-gal bojenje je izvedeno korišćenjem standardnih tehnika opisanih u literaturi (85).

### **3.1.2.13 Imunobojenje**

Imunobojenje je rađeno koristeći standardnu tehniku. Zečje anti Gli3 antitelo je obezbedjeno ljubaznošću Dr. Susan Mackem (NIH/NCI), dok je pacovski anti- $\alpha$ -tubulin nabavljen od Sigmee Aldrich. Sledeća antitela su korišćena po uputstvu proizvođača  $G\alpha_s$  (#sc-55546, Santa Cruz Biotechnology), Creb (#3360R, BioVision Incorporated), Phospho-Creb (#06-519, Millipore), Gli2 (#AF3635, R&D Systems), Gli1 (#NB600-600, Novus Biologicals), Osx (#ab22552, Abcam), Oc (#LS-C42094, LifeSpan Biosciences),  $\beta$ -catenin (#9562, Cell Signaling Technology),  $\alpha/\beta$ -Tubulin (#2148, Cell Signaling Technology)

### **3.1.2.14 Kultura embrionalnih ćelija udova**

Izolovanje ćelija iz uda embriona je odavno korišćeno kao pogodan eksperimentalni sistem za proučavanje ćelijskih procesa tokom razvoja skeletnog sistema, formiranja 3D funkcionalnih karakteristika i regulacije koraka prilikom

razvića skeletnih elemenata (79). U ranoj fazi razvoj skeletnog sistema započinje kondenzacijom mezenhima na odredjenim mestima koja će odrediti dalji razvitak budućeg elementa skeletnog sistema. Eksperimenti su rađeni kako je već opisano u literaturi (86). BGJB medijum za kultivaciju ćelija je obogaćen 0,2% goveđim serum albuminom (Sigma Aldrich) kao i Forskolinom (Sigma Aldrich), IBMX-om (Sigma Aldrich), Ciclopaminom (BIOMOL), Arsen trioksidom (ATO) (Sigma Aldrich) ili GANT-58 (Tocris) u naznačenim koncentracijama. Medijum je zamenjen svakog drugog dana.

### **3.1.2.15 Merenje nivoa cikličnog AMP (cAMP)**

Da bi izmerili nivo cAMP u ćelijama, ćelije su prvo inkubirane u prisustvu cAMP stabilizatora, IBMX, oko 30 minuta i onda tripsinizovane, a zatim brzo smrznute do testiranja nivoa cAMP. Korišćen je ACT One cAMP fluorimetrijski ELISA kit (#CB-80500-503, Codex BioSolutions Incorporated) po instrukcijama proizvođača.

### **3.1.2.16 Statistika**

Svi eksperimenti i eseji su rađeni u triplikatu. U proceni značajnosti razlike korišćen je 2-tailed Student's *t* test za poredjenje dve eksperimentalne grupe ili multivarijantna ANOVA analiza za medju-grupna poredjenja. Nivo *P* vrednosti manji od 0,05 je usvojen kao statisticki značajan. Podaci su predstavljeni kao aritmetička sredina ± standardna greška (mean ± SD) ukoliko nije drugačije označeno.

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

Genetske forme HO nam pružaju jedinstvenu mogućnost da ispitamo mehanizme kojima se prostorno reguliše formiranje kostiju. Koji su to geni, molekuli ili mehanizmi koji ne dozvoljavaju formiranje kostiju van skeletnog sistema? Da bi spoznali njihovu ulogu ili važnost u procesu osteogeneze moramo obezbediti eksperimentalni model u kome ćemo efikasno biti u mogućnosti da uklonimo gen od interesa. U ovom radu koristili smo mišji POH model kako bi ispitali koji molekularni mehanizam dovodi do ektopične diferencijacije osteoblasta. POH je genetska bolest izazvana inaktivirajućom mutacijom *GNAS* gena koji kodira  $G\alpha_s$  -važan prenosilac signala sa G protein receptora (GPCR). Pošto je *GNAS* gen od systemske važnosti za opstanak, uklanjanje obe kopije ovog gena dovodi do rane embrionalne smrtnosti. Iz tog razloga, u ovom radu je korišćen miš sa uslovnim gubitkom ili tkivno-specifičnim uklanjanjem *GNAS* gena.

Uslovno brisanje gena  $G\alpha_s$  je postignuto ili ukrštanjem sa mišjim Cre linijama, specifičnim za određeno tkivo ili dodavanjem Cre virusa u ćelijsku kulturu  $G\alpha_s^{ff}$  mišjih ćelija ili ciljanim ubrizgavanjem Cre virusa u željeno tkivo na mišjem  $G\alpha_s^{ff}$  modelu.

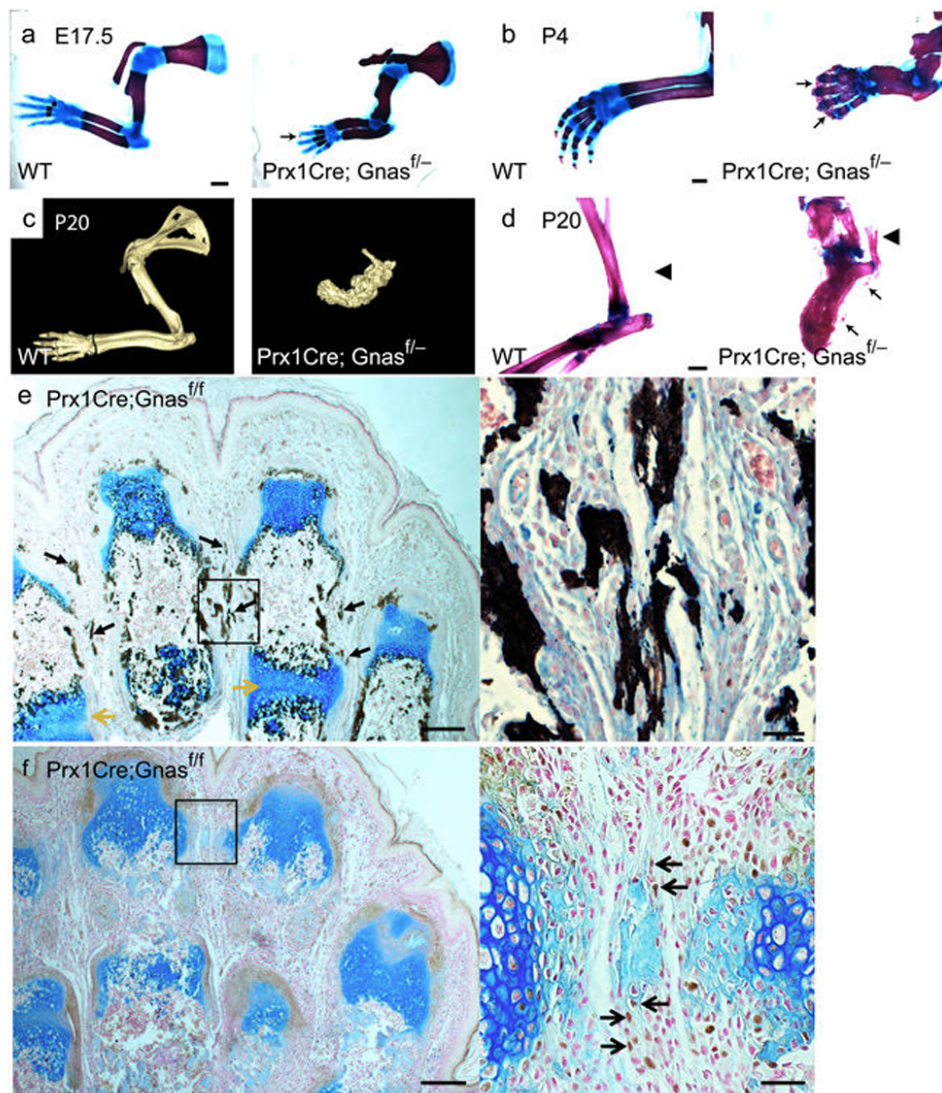
Ovi eksperimenti imali su za cilj da pokažu ulogu *GNAS* u ektopičnom stvaranju kostiju, kao i koji molekularni mehanizam biva aktiviran nakon potpunog uklanjanja *GNAS* iz specifičnog tkiva. Bilo je potrebno pokazati i u ćelijskoj kulturi, kao i u mišjem modelu ulogu matičnih mezenhimskih progenitorskih ćelija u *de novo* formiranju ektopičnog koštanog tkiva koje rezultira heterotopnom osifikacijom.

Eksperimentalne hipoteze i pitanja potvrđene su korišćenjem više eksperimentalnih tehnika da bi se došlo do konačnog zaključka. Primećeni fenomeni su potvrđeni na nivou tkiva (mišji model ili humani uzorci), zatim ćelijskom nivou

(na ćelijskoj kulturi ili na histološkim preparatima) i najzad na nivou proteina (Western blot) ili RNK (qRT-PCR ili *in situ* hibridizacija).

#### **4.1 Gubitak obe kopije *GNAS* gena rezultira u fenotipu koji oslikava POH i ispoljava skeletne anomalije ove bolesti**

Kao što je već pomenuto u teorijskom delu, kod mišjeg POH modela, heterozigotnim uklanjanjem *Gnas*<sup>+/-</sup> gena nije bilo moguće prepoznati tipične, rane simptome kao i progresivnu invaziju koštane mase u duboka tkiva (75). Imajući to u vidu, pošli smo od pretpostavke da je potrebno dodatno smanjivanje ekspresije *GNAS* gena da bi se postigao potpuni učinak i dobio fenotip koji oslikava POH. Zato je izvedeno ukrštanje *Gnas*<sup>f/f</sup> miša sa *Prx1-Cre* linijom i tako postignuto potpuno uklanjanje *Gnas* gena u progenitorskim ćelijama mezenhima embrionalnog uda. Dok je *Prx1-Cre; Gnas*<sup>f/+</sup> miš bio potpuno normalan, homozigotno uklanjanje *Gnas* u *Prx1-Cre; Gnas*<sup>f/-</sup> ili *Prx1-Cre; Gnas*<sup>f/f</sup> miša rezultiralo je pojavom brojnih skeletnih anomalija kao i drastičnom i progresivnom HO oslikavajući tipičan fenotip POH. (Slika 11. i 12.). *Prx1-Cre; Gnas*<sup>f/-</sup> i *Prx1-Cre; Gnas*<sup>f/f</sup> miševi su pokazali sličan fenotip i bili su rođeni sa sindaktilizmom mekog tkiva (syndactyly, pojavom opne između prstiju), spojenim zglobovima i progresivnom HO u mekanom tkivu (Slika 11.). Mineralizacija van skeleta je prvo detektovana kod embriona starih između 16,5 i 17,5 dana (E16.5 i E17.5), gde se značajno ubrzava i postaje vrlo izražena postnatalno četvrtog dana (P4). HO je primećena u regionu između prstiju i između radijusa i ulne, što je rezultiralo fuzijom kostiju postnatalno četvrtog dana (P4) (Slika 11.a,b). Progresivna mineralizacija se dalje nastavljala i većina miševa je uginula dvadesetog dana (P20) kao posledica ekstenzivne mineralizacije tetiva i potpune fuzije kostiju. (Slika 11.c i d.). Na osnovu toga se može zaključiti da je *Gnas* gen potreban u mnogim tkivima mezenhima da bi potisnuo ektopično formiranje kostiju i nepoželjnu mineralizaciju.



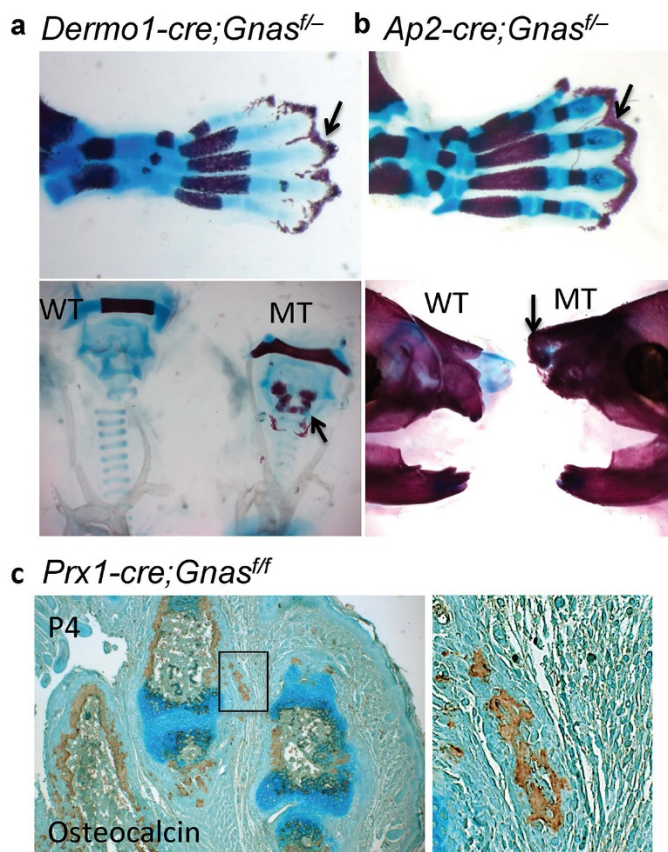
**Slika 11. Potpuni gubitak *Gnas* u mezenhimu uda mišjeg embriona dovodi do HO.** (a) Skelet prednjih udova kontrole (WT) i *Prx1-Cre;Gnas<sup>fl/fl</sup>* mutanta miša E17,5 (embrio 17,5 dana star) bojen alizarin crvenim i alcian plavim (b) Isti eksperiment samo sa mišom četiri dana starim, postnatalno (P4). Region začetka HO (a) i očiglednog HO fenotipa (b) su naznačeni strelicama. Skala bar, 1 mm. (c) Reprezentativni uzorak kompjuterske tomografije (CT) prednjih udova (P20) WT kontrole i *Prx1-Cre;Gnas<sup>fl/fl</sup>* mutanta. (d) Reprezentativni uzorak alizarin crvenog i alcian plavog bojenja zadnjih udova (P20) WT kontrole i *Prx1-Cre;Gnas<sup>fl/fl</sup>* mutanta. Region nemineralizovane Ahilove tetive (levo) i osifikovane tetive (desno). Predeli sa HO su označeni strelicama. Skala bar, 0,5 mm. (e, f) Longitudinalne sekcije (P4) *Prx1-Cre;Gnas<sup>fl/fl</sup>* miša kontraobojene sa alcian plavim i Sirius crvenim, a zatim bojene



sa Von Kosa metodom (e) ili sa *Osx* imunohistohemijom (DAB, braon) (f). Regioni ektopične mineralizacije (crne strelice) i hipertrofije hondrocita i fuzije zgloba (žute strelice) indiciraju braonkasto nuklearno bojenje *Osx* pozitivnim ćelijama (crne strelice) u međuprstnom regionu oivičene sa svetlo plavo obojenim koščicama (f). Uokvirena oblast između prstiju na svakom panelu je uvećana sa desne strane. Skala bar= 0,2 mm (levo) i 0,05 mm (desno).

*Prx1-Cre;Gnas<sup>f/-</sup>* ili *Prx1-Cre;Gnas<sup>f/f</sup>* miš predstavlja mišji model POH koji nam omogućava da ispitamo molekularni i ćelijski mehanizam POH bolesti i ulogu *GNAS* gena u procesu kontrole i restrikcije formiranja kostiju tokom embrionalnog razvića, jer selektivno uklanja *GNAS* gen samo u udovima embriona.

Sledeće je bilo potrebno demonstrirati da je ektopična mineralizacija zaista asocirana sa diferencijacijom ćelija mezenhima u osteoblaste tokom osifikacije. Kako bi to dokazali, koristili smo Van Kosa bojenje i imunohistohemiju ranog markera osteoblasta-osteriksa (*Osx*) (Slika 11. e i f ). Na histološkim sekcijama udova četiri dana starog mutanta, Van Kossa bojenje je potvrdilo prisustvo ekstenzivne mineralizacije kod *Prx1-Cre;Gnas<sup>f/f</sup>* miša (Slika 11.e). *Osx*-pozitivne i *Oc*-pozitivne ćelije su detektovane u tkivu gde je ektopična kost, i to u potkožnom i međuprstnom regionu, dok ćelije hrskavice (hondroociti) nisu detektovane (Slika 11.f i Slika 12.c). Ovaj rezultat jasno demonstrira da gubitak *GNAS* u mezenhimskim progenitorskim ćelijama indukuje ektopičnu diferencijaciju osteoblasta, kroz progresivno, intramembransko formiranje kostiju, koje ne uključuje ćelije hrskavice ili hondrocite.

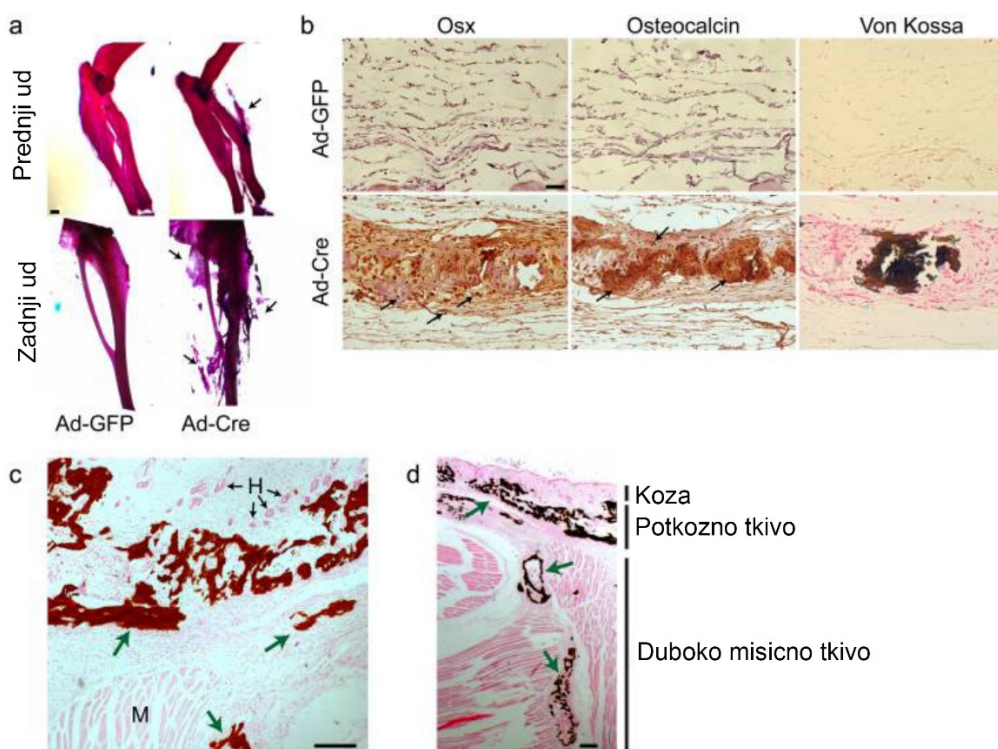


**Slika 12. Gubitak *GNAS* gena korišćenjem različitih *Cre* linija dovodi do HO.** (a, b) Kod skeleta embriona *Dermo1-Cre; Gnas<sup>fl/fl</sup>* (E17,5) i *Ap2-Cre; Gnas<sup>fl/fl</sup>* (E18,5) dolazi do formiranja HO (strelice) u međuprskom prostoru (gornji panel) i drugim mestima kao što su traheja ili nos (donji panel) (c) Imunohistohemija Osteokalcina na longitudinalnim sekcijama četrvtog dana postnatalno (P4) kod *Prx1Cre; Gnas<sup>fl/fl</sup>* miša. Uokviren region je prikazan uvećano sa desne strane. Ektopična detekcija Osteokalcina je registrovana u međuprskom regionu.

#### **4.2 Gubitak *GNAS* promoviše ektopično diferenciranje osteoblasta**

Pošto je Heterotopna osifikacija bolest koja se razvija kod odraslih, bilo je neophodno utvrditi da li gubitak *GNAS* u potkožnom tkivu mezenhima i kod odraslog miša može dovesti do HO fenotipa. Potkožnom injekcijom smo ubrizgali Cre- ili GFP-adenovirus (Ad-Cre ili Ad-GFP) kod četiri nedelje starog *Gnas<sup>fl/fl</sup>* miša, kao što je objašnjeno u poglavlju Materijali i metode (Slika 10). Intenzivna HO uz prisustvo ektopičnih osteoblasta i mineralizacije je detektovana šest nedelja nakon injekcije na

strani gde je ubrizgan Ad-Cre, ali ne i na strani Ad-GFP (Slika 13. a,b). Ovo jasno demonstrira da je inaktivacija *GNAS* u potkožnom mezenhimskom tkivu odraslog miša dovoljan da izazove HO, veoma sličnu POH i AHO fenotipu. Takođe, veoma bitna karakteristika je to što je uočena progresivna priroda HO. Progresivna priroda HO je detektovana i histološkom analizom (Slika 13. c id), gde se jasno zapaža HO koja kod miša sa vremenom zalazi duboko i u mišićno tkivo (nakon 12 nedelja), što veoma verno odslikava kliničku sliku POH.



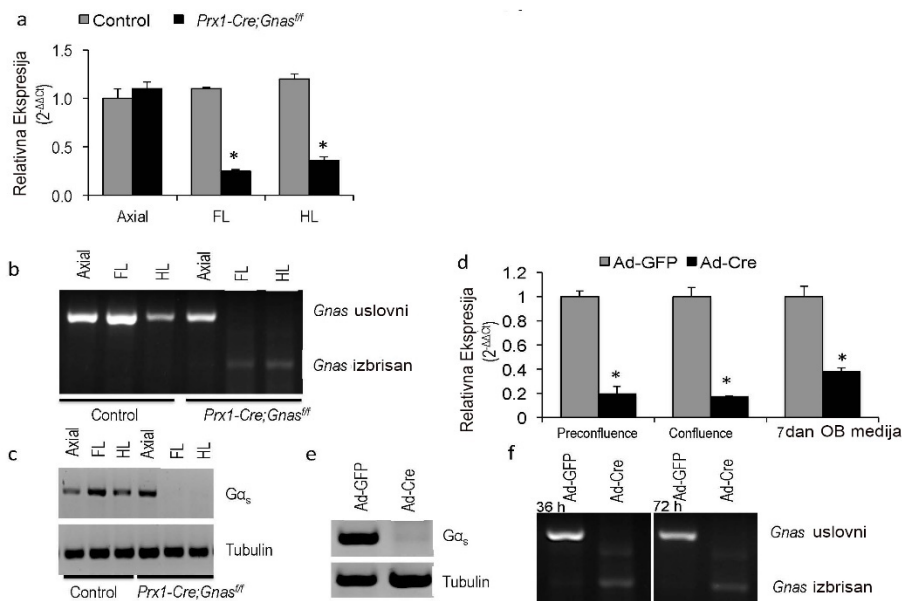
**Slika 13. Gubitak *GNAS* u potkožnom tkivu odraslog miša dovodi do HO.**

(a) Reprezentativni uzorak alizarin crvenog i alcian plavog bojenja skeleta *Gnas<sup>ff</sup>* miša kod kojeg je ubrizgan Ad-GFP ili Ad-Cre virus u potkožnom regionu (prikazano u Eksperimentalnom delu, slika 10). N=18. Ekstenzivno formiranje ektopične kosti je pokazano strelicom, Skala bar, 1 mm. (b) Histološka analiza ektopične kosti pokazana pomoću (a) *Osx* i *Oc* imunohistohemije (strelice) i Von Kosa bojenjem (tamno braon). Skala bar, 0,05 mm. (c, d) Reprezentativni uzorak Von Kosa bojenja ektopične kosti (zelene strelice) u potkožnom (c) i duboko mišićnom tkivu (d) u zadnjoj nozi *Gnas<sup>ff</sup>* miša starog 12 nedelja nakon Ad-Cre virus injekcije. H: folikul dlake; M: mišić. Skala bar= 0,2 mm (c), 0,05 mm (d).

Da bi ispitali da li je nastala HO rezultat diferencijacije mezenhimskih progenitorskih ćelija u osteoblaste, izolovane su mezenhimalne progenitorske ćelije koštane srži (BMSC) i potkožne mezenhimalne ćelije (SMP) iz *Gnas<sup>ff</sup>* miša. SMP i BMSC su nakon postizanja konfluentne gustine, tretirane u ćelijskoj kulturi sa Ad-Cre virusom, da bi se postigao potpuni efekat uklanjanja *GNAS* gena (ili Ad-GFP virusom, kao kontrola). Efikasno uklanjanje *GNAS* je potvrđeno genotipskom analizom (Slika 14. d–f).

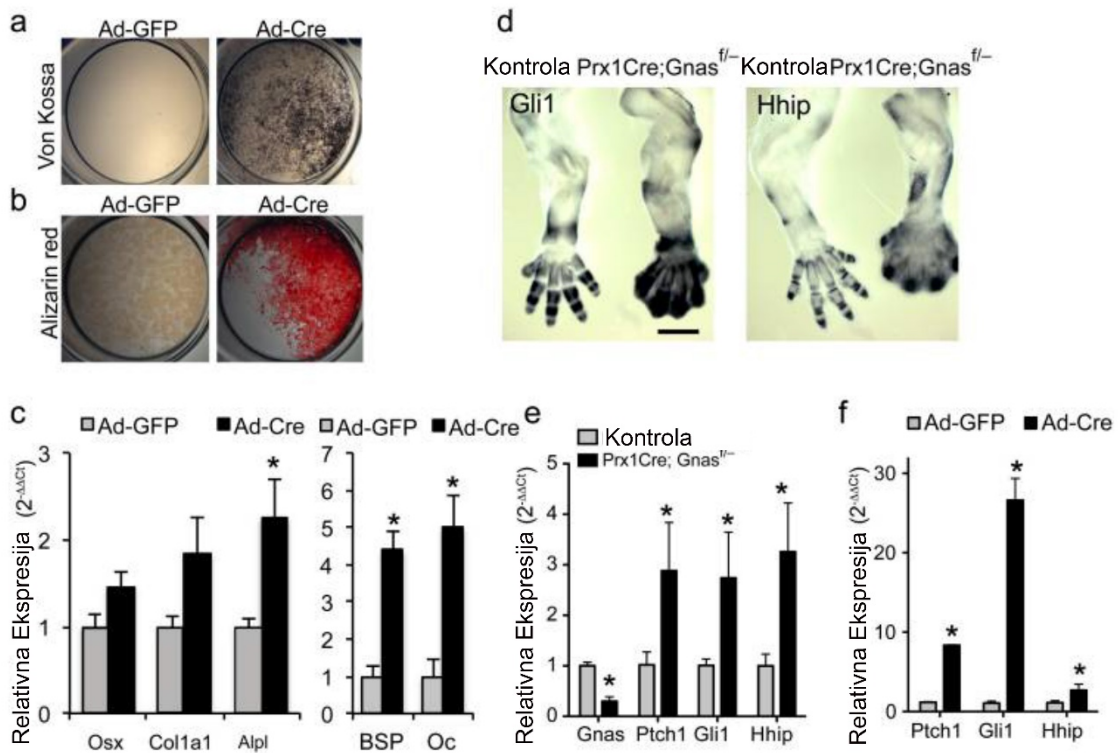
Obe ćelijske kulture, BMSC (Slika 15.a,b) i SMP, (Slika 17.a) pokazale su ubrzanu osteogenu diferencijaciju nakon izlaganja medijumu za osteogenezu, što je demonstrirano povećanim depozitima mineralnog matriksa korišćenjem dva različita testa za biomineralizaciju: Von Kosa i Alizarin crveno. Osteogeneza je eksperimentalno potvrđena i na nivou genske ekspresije, gde je pokazana povećana ekspresija markera osteogene diferencijacije kao što su *Osx*, *Colagen 1a1 (Col1a1)*, *Alkalna fosfataza (Alpl)*, *Bone Sialoprotein (BSP)* i *Osteokalcin (Oc)* kod Ad-Cre inficiranih BMSC u poređenju sa Ad-GFP )kontrola) inficiranim BMSC (Slika 15.c).

Pošto smo prethodno utvrdili da Ad-Cre virus efikasno uklanja *GNAS* gen iz inficiranih ćelija, bilo je potrebno utvrditi da li je ovaj efekat stabilan tj. da li slučajno ne dolazi do ireverzibilnog efekta kako ćelije postižu određenu gustinu tokom rasta. U tu svrhu proverili smo ćelijsku kulturu 36 sata nakon infekcije i pre dostizanja konfluencije, kao i 72 sata nakon-infekcije i konfluencije i 10 dana nakon infekcije i 7 dana u OB medijumu (Slika 14.). Ovim smo pokazali da je *GNAS* gen potpuno uklonjen i da i do deset dana nakon indukovanog uklanjanja *GNAS*, genotip ostaje nepromenjen.



**Slika 14. Efikasno uklanjanje *GNAS* indukovano sa Cre rekombinazom.** (a-c) Brisanje *GNAS* gena iz uda *Prx1-Cre; Gnas<sup>ff</sup>* embriona starog E14,5 dana. (a) analiza RNK izolovane iz embriona starog E14,5 dana: prednji ud (FL) zadnji ud (HL) pomoću qRT-PCR pokazano je da je *Gnas* iRNK ekspresija niska samo u udovima, ali ne i u aksijalnom delu embriona *Prx1-Cre; Gnas<sup>ff</sup>* miša (mean±SD; n=4; \**p*=0,0008 (FL), 0,008 (HL)). (b) PCR genomske DNK izolovane iz udova embriona E14,5 (FL i HL) *Prx1-Cre; Gnas<sup>ff</sup>* miša pokazuje Prx1-Cre-vodjeno brisanje *Gnas* na flox lokusu. (c) Analiza proteinskog nivoa *Gαs* Western blot tehnikom demonstrira nestanak *Gαs* proteina u limbu embriona E14,5 kod *Prx1-Cre; Gnas<sup>ff</sup>* miša, dok aksijalni skelet iz istog miša ne pokazuje promene. (d-f) Ad-Cre-vodjeno uklanjanje *Gnas* u potkožnim mezenhimalnim progenitorskim ćelijama (SMP) izolovanim iz *Gnas<sup>ff</sup>* miša, inficiranim Ad-Cre ili Ad-GFP, i nakon dostizanja konfluentnosti izložene medijumu za osteogenezu. (d) qRT-PCR analiza RNK izolovane iz SMP ćelija *Gnas<sup>ff</sup>* miša inficiranim Ad-Cre ili Ad-GFP virusom. Smanjenje ekspresije *Gnas* iRNK, 36 sata nakon infekcije i pre konfluencije, kao i 72 sata nakon-infekcije i konfluencije i 10 dana nakon infekcije i 7 dana u medijumu za rast, dok Ad-GFP inficirane ćelije ne pokazuju promene demonstrirajući gubitak *GNAS* isključivo kod Ad-Cre inficiranih uzoraka (mean±SD; n=4; \**p*=0,00004 (prekonfluencija), 0,001 (konfluencija), 0,002 7d (OB media)). (e) Western blot analiza *Gαs* proteina prikazuje gubitak *Gαs* proteina

posredovan Ad-Cre-infekcijom, 10 dana posle, 7 dana u OB medijumu (f) PCR genomske DNK izolovane iz Ad-Cre ili Ad-GFP inficiranih SMP ćelija *Gnas<sup>f/f</sup>* miša prikazuje da Ad-Cre-vodjeno uklanjanje floks alela na *Gnas* lokusu dovodi do specifične PCR amplifikacije *Gnas* mutant alela u Ad-Cre inficiranim ćelijama 36 sati nakon infekcije i prekonfluencije, i 72 sata nakon infekcije i dostizanja konfluencije.



**Slika 15. Gubitak *GNAS* u progenitorskim mezenhimskim ćelijama dovodi do povećane ekspresije Hh signalnog puta *in vitro* i *in vivo*** (a, b) Reprezentativni uzorci Von Kosa (a) i alizarin crveno bojenja (b) sa Ad-Cre ili Ad-GFP inficiranim BMSCs izolovanim iz *Gnas<sup>f/f</sup>* miša nakon deset dana u medjumu za osteogenezu. (c) qRT-PCR analiza osteoblast markera sedam dana nakon infekcije adenovirusom (mean±SD; n=3; \*  $p=0,017$  za Osx; 0,022 za Col1a1; 0,005 za Alpl; 0,003 za BSP; 0,003 za Oc). (d) Reprezentativni uzorci *in situ* hibridizacije urađeni na prednjim udovima embriona starog E14,5 dana na kontroli WT (levo) *Prx1-Cre; Gnas<sup>f/-</sup>* embrionima (desno). Skala bar=0,5 mm. (e) qRT-PCR analiza RNK izolovana iz prednjih udova embriona starih E14,5 dana. Ekspresija *Gnas* i transkripcionih target molekula Hh signalnog puta (mean±SD; n=4; \*  $p=2,8 \times 10^{-5}$  za *Gnas*; 0,012 za Ptch1; 0,036 za Gli1;

0,01 za Hhip). (f) qRT-PCR analiza Hh target gena u BMSC 2-3 dana nakon Ad-Cre ili Ad-GFP infekcije (mean±SD; n=3; \*  $p=1,1\times 10^{-4}$  za Ptch1; 0,001 za Gli1; 0,007 za Hhip).

### **4.3 GNAS je neophodan za inhibiciju Hh signalnog puta**

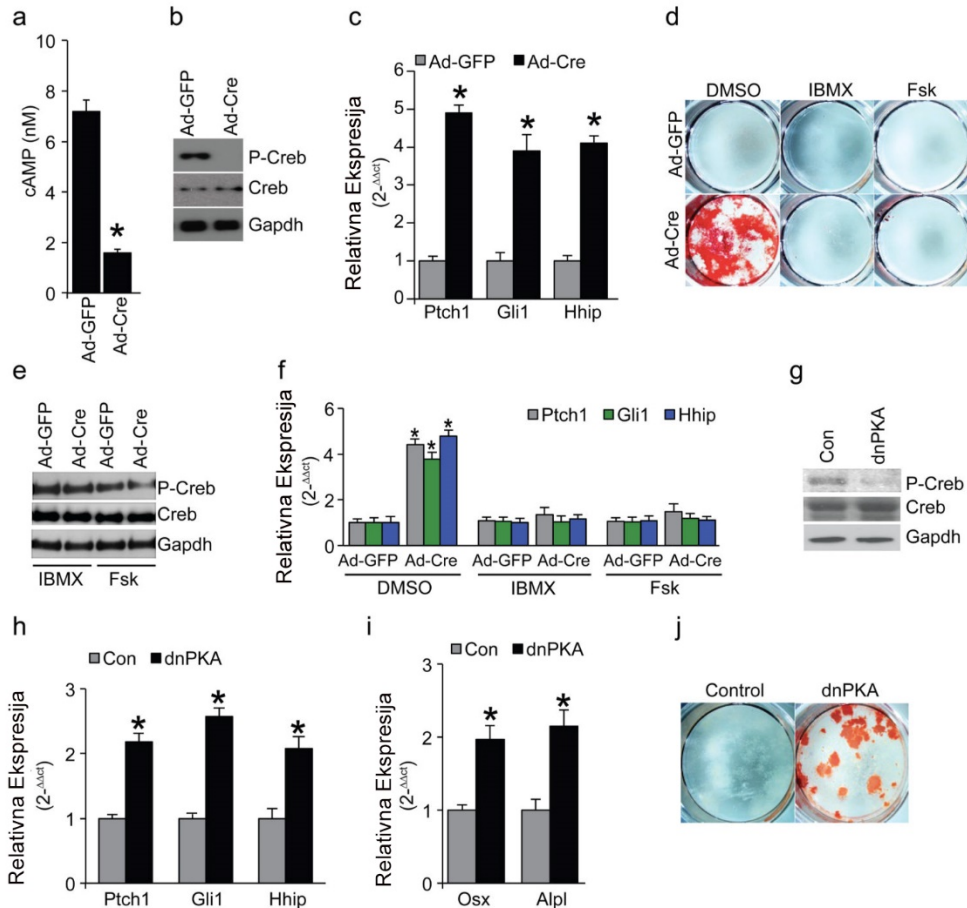
U prethodnim ispitivanjima (88) je pokazano da aktivirajuća *GNAS* mutacija dovodi do fenotipa Fibrozne displazije (Fibrous dysplasia, FD) potencirajući Wnt/ $\beta$ -katenin signalni put (91). Pošto je pokazano da nizak nivo Wnt/ $\beta$ -katenin signala ne dozvoljava diferencijaciju osteoblasta (92,93,94,95), stoga bi bilo neočekivano da inaktivacija *GNAS* dovodi do ektopičnog formiranja kostiju kod POH ili AHO dodatnim redukovanjem, već dovoljno niskog Wnt/ $\beta$ -katenin signala u mekom tkivu mezenhima. Da bi testirali da li  $G\alpha_s$  može takođe regulisati formiranje kosti regulacijom samo Hh signalnog puta, prvo je postavljeno pitanje da li je  $G\alpha_s$  glavni regulator PKA koji kontroliše Hh aktivnost *in vitro* i *in vivo*?

U našim eksperimentima *in vitro*, ustanovljeno je da inaktiviranje *GNAS* u SMP i BMSC ćelijama dovodi do oslabljenog Wnt signala na šta ukazuju niske ekspresije Wnt/ $\beta$ -katenin target gena: *Axin2*, *Tcf1* i *Lef1*; kao i niskog proteinskog nivoa  $\beta$ -katenina (95) (Slika 17.b-d). Dok su nivo cAMP i aktivnost PKA (odredjene Creb fosforilacijom) takođe niski, Hedgehog signalni put je povišen, kao što je pokazano qRT PCR analizom i ekspresijom gena karakterističnih za Hh signalni put: *Patched 1* (*Ptch1*), *Glioma homolog* (*Gli1*) i *Hh interacting protein* (*Hhip*) (Slika 15.a-c, Slika 15.e,f).

Blokiranje cAMP degradacije sa IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine)(90), ili aktivacija produkcije cAMP sa forskolinom (97) su efekti identični onim koji su izazvani uklanjanjem *Gnas* (Slika 16. d-f). Dalje, ekspresija dominantno negativne forme PKA (dnPKA) je podražavala efekat uklanjanja *Gnas* (Slika 16.g-j).

*In vivo*, eksperimenti dodatno potvrđuju da su ekspresija gena koji predstavljaju target Wnt/ $\beta$ -katenin signalnog puta kao i nivo proteina  $\beta$ -katenina detektovani na jako niskom nivou, dok je ekspresija *Ptch1*, *Gli1* i *Hhip* bila povišena u udu *Prx1-Cre;Gnas<sup>-/-</sup>* miša starog 14,5 dana embrionalno E14,5, uključujući i regiju između prstiju, pre pojave HO u embrionu starom 17,5 dana E17,5 (Slika 14. d-f).

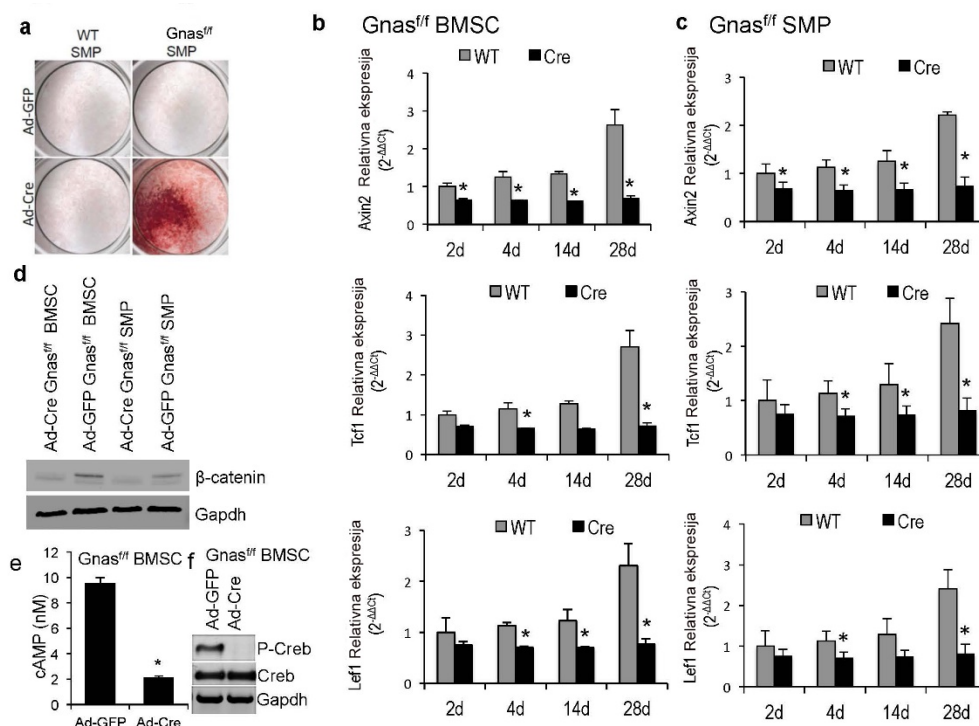
Nasuprot tome, inhibicija drugih članova  $G\alpha_i$  familije nije imala efekta na razvoj skeleta ili povišenu aktivnost Hh signalnog puta. Stoga, može se zaključiti da je,  $G\alpha_s$ , ali ne i ostali  $G\alpha_i$ , važan *in vivo* regulator Hh signalnog puta u mnogim tkivima i u mnogim fazama razvoja organa.



**Slika 16.  $G\alpha_s$  deluje posredstvom cAMP i PKA na potiskivanje Hh signalnog puta.** (a) Nivo cAMP u SMP ćelijama izolovanim iz *Gnas<sup>ff</sup>* miša meren tri dana nakon infekcije adenovirusom (mean±SD; n=3; \* $p=8,5\times 10^{-5}$ ). (b) PKA aktivnost detektovana je na osnovu koncentracije fosfo -Creb (P-Creb) proteina kod SMP ćelija iz *Gnas<sup>ff</sup>* miša pet dana nakon infekcije adenovirusom (c) qRT-PCR esej detektuje ekspresiju Hh target gena u SMP ćelijama iz *Gnas<sup>ff</sup>* miša pet dana nakon infekcije adenovirusom (mean±SD; n=3; \* $p=4,4\times 10^{-4}$  za Ptch1;  $2,4\times 10^{-5}$  za Gli1;  $2,6\times 10^{-6}$  za Hhip). (d) Bojenje Alizarin crvenim SMP ćelija iz *Gnas<sup>ff</sup>* miša 14 dana nakon datog tretmana. (e) PKA aktivnost detektovana je na osnovu nivoa P-Creb u SMP ćelijama *Gnas<sup>ff</sup>* miša pet dana nakon navedenog tretmana. (f) Ekspresija Hh gena q-RT-PCR



merena je u SMP ćelijama izolovanim iz *Gnas<sup>ff</sup>* miša koje su bile inficirane adenovirusom i tretirane kao što je navedeno u trajanju od pet dana (mean±SD; n=3; \* $p=2,1\times 10^{-4}$  za *Ptch1*;  $8,7\times 10^{-4}$  za *Gli1*;  $2,6\times 10^{-4}$  za *Hhip*). (g) PKA aktivnost indicirana nivoom proteina P-Creb u WT SMPs ćelijama inficiranim sa dnPKA adenovirusom 5 dana. (h) qRT-PCR analiza genske ekspresije Hh target gena u WT SMP inficiranih sa dnPKA adenovirusom za 5 dana (mean±SD; n=3; \* $p=0,001$  za *Ptch1*;  $2,1\times 10^{-4}$  za *Gli1*;  $3,9\times 10^{-4}$  za *Hhip*). (i) Analiza qRT-PCR gena odgovornih za diferencijaciju osteoblasta u WT SMP ćelijama inficiranim sa dnPKA adenovirusom u trajanju od 5 dana (mean±SD; n=3; \* $p=0,003$  za *Osx*;  $4,8\times 10^{-4}$  za *Alpl*). (j) Bojenje Alizarin crvenim WT SMP ćelija inficiranih sa dnPKA adenovirusom u trajanju od 14 dana.



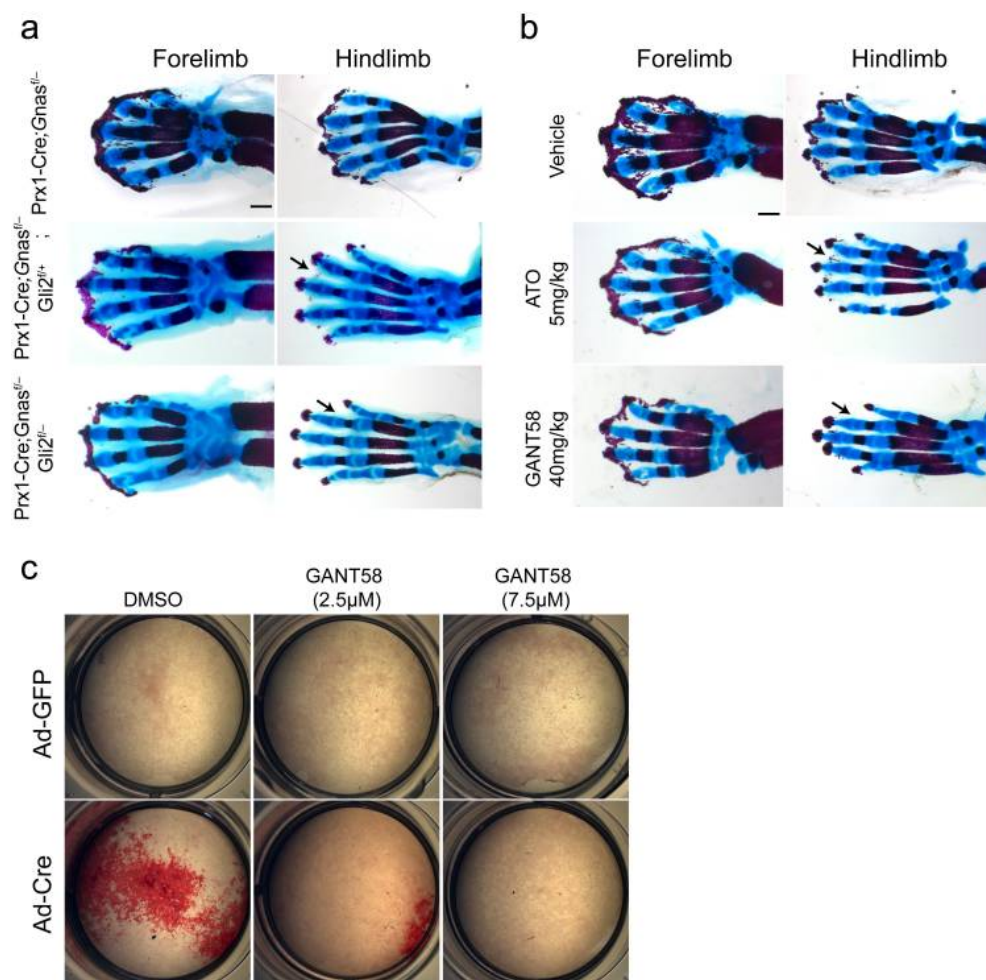
**Slika 17. Gubitak GNAS pospešuje diferencijaciju mezenhimskih progenitorskih ćelija u osteoblaste i smanjuje Wnt/β-katenin signal.** (a) SMP ćelije izolovane is *Gnas<sup>ff</sup>* miša inficirane su Ad-Cre ili Ad-GFP virusom. Ćelije su nakon dostizanja konfluentnosti prebačene u medijum za osteogenezu. Bojenje ćelijske kulture alizarin crvenim deset dana nakon izlaganja medijumu za osteogenezu pokazalo je povećanu mineralizaciju zahvaljujući ubrzanoj osteogenoj

diferencijaciji usled odsustva *Gnas*. (b, c) Ekspresija gena specifičnih za Wnt/ $\beta$ -katenin molekularni put je analizirana qRT-PCR: *Axin2*, *Tcf1* i *Lef1* u ćelijama koštane srži (BMSC) tretiranih Ad-Cre virusom (b) SMP (c) izolovanih iz *Gnas<sup>fl/fl</sup>* miša (mean $\pm$ SD; n=3; \* $p$ <0,05). Ćelije su sakupljene nakon označenog vremena izlaganja Ad-Cre tretmanu i medijumu za osteogenezu. d: dan. (d) Western blot ukazuje na nizak nivo  $\beta$ -katenina u Ad-Cre tretiranim SMP i BMSC ćelijama izolovanim iz *Gnas<sup>fl/fl</sup>* miša 14 dana nakon tretmana. (e) cAMP nivo u BMSC ćelijama meren je tri dana nakon Ad-Cre tretmana (mean $\pm$ SD; n=3; \* $p$ =7x10<sup>-6</sup>). (f) aktivnost PKA određena je nivoom P-Creb u BMSCs 5 dana nakon Ad-Cre tretmana. (c) Ekspresija Hh target gena (*Ptch1*, *Gli1* i *Hhip*) određena putem qRT-PCR (*Ptch1*, *Gli1* i *Hhip*) pet dana nakon infekcije adenovirusom (mean $\pm$ SD; n=3; \* $p$ <0,05).

Hedgehog signalni put ispoljava svoju biološku aktivnost održavajući balans između dve forme Gli „zink finger“ transkripcionih faktora: aktivatora (puna dužina) i represora (skraćena verzija) (*Gli<sup>A</sup>* i *Gli<sup>R</sup>*)(99). Povećan nivo *Gli<sup>A</sup>* i smanjen nivo *Gli<sup>R</sup>* dovode do aktivacije Hh signalnog puta (100). Kod vertebrata, funkcija *Gli<sup>R</sup>* u mnogome zavisi od faktora *Gli3*, dok dominantu ulogu u aktivnoj formi *Gli<sup>A</sup>*, igra *Gli2*. Ekspresija target gena Hh signalnog puta zahteva funkciju *Gli<sup>A</sup>*. Kako PKA (protein kinaza A) reguliše procesovanje *Gli3* i aktivaciju *Gli2* (101,102,103), postavili smo hipotezu da  $G\alpha_s$  preko PKA reguliše Hh signalni put, koncipirajući eksperiment u ćelijskoj kulturi udova. Dok je PKA inhibitor, H89, povećao gensku ekspresiju Hh target gena u kontroli (WT kultura limba) (Slika 19.a), forskolin je veoma potentno suprimirao povišen Hh signalni mehanizam u limbu mutanta (Slika 19.b). Pored toga, detektovani nivoi *Gli3* pune dužine (*Gli3<sup>A</sup>*) i *Gli2* su bili povišeni dok je *Gli3<sup>R</sup>* bio niži u *Prx1-Cre;Gnas<sup>fl/-</sup>* limb izdanku u poređenju sa kontrolom (Slika 19.c,d).

Dosada izneti rezultati ukazuju da  $G\alpha_s$  suprimira Hh signalni put regulišući *Gli* aktivaciju i procesovanje posredstvom PKA. U skladu sa tim, u eksperimentima nije postignuto smanjenje Hh target gena sa ciklopaminom u *Gnas* deficitnom udu miša. Ciklopamin je inhibitor Hh receptora, Smoothened (*Smo*)(104). Nasuprot tome, primenom *Gli* inhibitora, arsen trioksida (*ATO*)(105) ili *GANT58*(106), ovo je postignuto. (Slika 19.b). Ovi rezultati pokazuju da  $G\alpha_s$  deluje ispod *Smo* receptora i

iznad Gli transkripcionog faktora u Hh signalnom putu (Slika 9) da bi inhibirao ovaj signalni put u limbu embriona.



**Slika 18. Redukcija Hh signalnog puta inhibira HO *in vivo* i *in vitro*.** (a, b) Reprezentativni uzorci alizarin crvenog i alcian plavog bojenja udova embriona starog E18,5 dana sa datim genotipom. Slabije izražen HO, posebno u zadnjim nogama, je označen strelicom. Kod (b) E18,5 dana starog embriona gde je bremenita mišica primila placebo ili Hh antagonist (ATO ili GANT58) tri puta (E13,5, E15,5 i E17,5). Skala bar, 0,5 mm. (c) Bojenje Alizarin crvenim BMSC izolovanih iz *Gnas<sup>fl/fl</sup>* miša i izloženih medijumu za ostogenezu sa GANT 58 tretmanom različitih koncentracija (kontrola, samo DMSO).

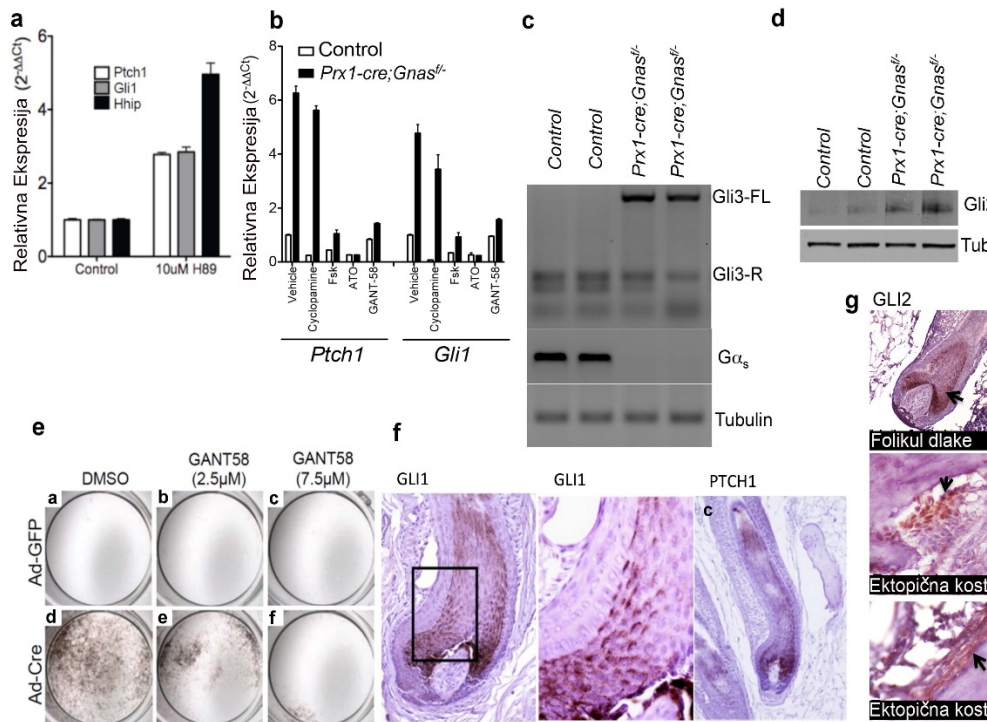
#### **4.4 Aktivacija Hh signalnog puta je dovoljan i neophodan uslov da izazove HO**

Gli2 formira uglavnom aktivirajuću formu Gli<sup>A</sup> koja dalje aktivira Hh signalni put (107,108). Da bi testirali da li aktivan Hh signalni put igra važnu ulogu u indukovanju HO, uklonili smo Gli2 iz *Gnas* mutanta miša ukrštanjem sa *Gli2<sup>c/c</sup>* mišem, kondicionim mutantom. Gubitak jedne kopije *Gli2* vodi do delimičnog poboljšanja HO u udovima *Prx1-Cre;Gnas<sup>f/-</sup>* miša (Slika 18.a). Gubitak obe kopije *Gli2* dovodi do daljeg poboljšanja ektopične mineralizacije, posebno u zadnjim nogama, gde su simptomi HO fenotipa, kao što su opna između prstiju, i fuzija zglobova skoro potpuno oporavljeni (Slika 18.a).

Ublažavanje simptoma HO je takođe postignuto ubrizgavanjem farmakoloških Gli inhibitora kao što su ATO ili GANT58, u bremenitu mišicu sa *Prx1-Cre;Gnas<sup>f/-</sup>* potomstvom (Slika 18.b). Dok su veoma visoke i česte doze ovih inhibitora potrebne za inhibiciju rasta tumora posredovanog Hh signalnim putem (105,106), slične doze su dovodile do spontanog pobačaja bremenitih mišica kod ovog mišjeg modela. Inhibicija diferencijacije osteoblasta sa GANT-58 je postignuta *in vitro* kod *Gnas*-deficitnih BMSC (Slika 18.c and Slika 19.e). Ovi rezultati pokazuju da je aktivacija Hh signalnog puta neophodna za diferencijaciju osteoblasta posredovanu gubitkom funkcije *Gnas* u mezenhimalnim progenitorskim ćelijama.

Da bi proverili da li je Hh signalni mehanizam zaista povećan i kod pacijenata sa POH, urađena je imunohistohemija uzoraka dobijenih od dva različita pacijenta na GLI1 i GLI2 signal (102). GLI1 i GLI2 ekspresija je uočena u folikulama kose gde je Hh signalni put inače aktivan pod normalnim okolnostima (Slika 19. f,g). Kod POH uzoraka, je takođe detektovana GLI1 i GLI2 ekspresija u ćelijama u samom ektopičnom tkivu (Slika 20.c, Slika 19.g). Najintenzivniji signal GLI1 i GLI2 je primećen na površini ektopične kosti, što sugeriše da je Hh signal najviše povećan na novoj, upravo formiranoj kosti koja sadrži matične progenitorske ćelije nove kosti. Ovo je u skladu sa dobijenim *in vitro* rezultatima koji pokazuju da je Hh signal znatno povišen u progenitorskim ćelijama neposredno pre diferencijacije u osteoblaste (Slika 13f). U udu *Prx1Cre; Gnas<sup>f/f</sup>* miša starog četiri dana P4, gubitak *Gnas* dovodi do povećanja Gli1 proteina u većini ćelija u poređenju sa WT kontrolom (Slika 19a). Na

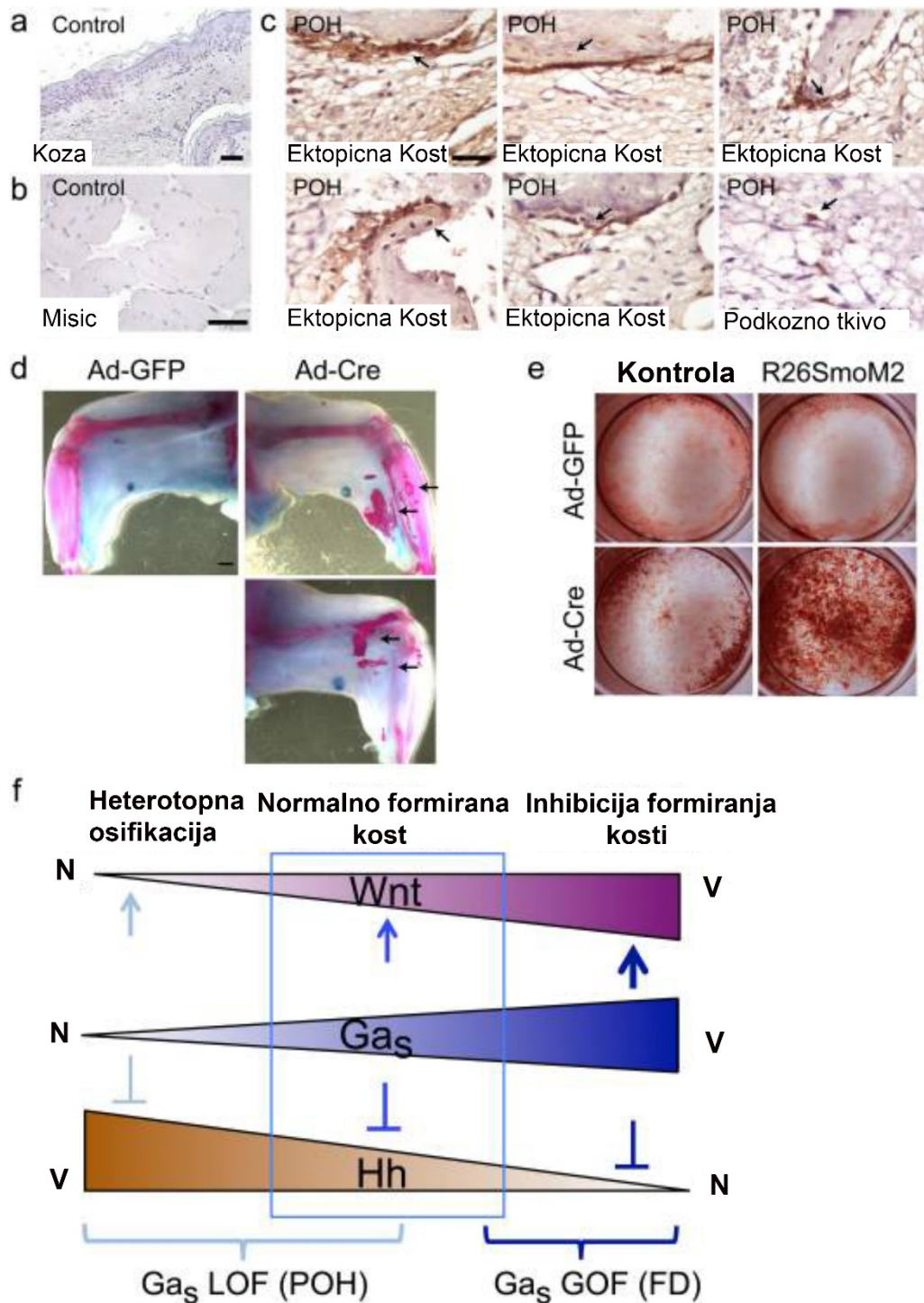
imunohistochemijskim preparatima primećeno je da ćelije u masnom tkivu sporadično sadrže GLI1 pozitivne ćelije (Slika 20c), što jasno sugerira da su ove ćelije potencijalne osteoprogenitorske ćelije u samom potkožnom tkivu. Ovi rezultati dodatno potvrđuju da povišen Hh signalni put takođe reguliše ektopično formiranje kosti kod ljudi.



**Slika 19. Gαs inhibira Hh signalni put pomoću regulacije Gli aktivacije.** (a) Limb kultura iz WT embriona E14.5 inkubirana u BGJB medijumu koji sadrži ili rastvarač (DMSO) ili 10 μM H89 (PKA inhibitor) inkubirana 4 dana. Ekspresija *PTCH1*, *GLI1* i *HHIP* analizirana je putem qRT-PCR. Slično efektu uklanjanja *GNAS*, inhibicija PKA farmakološkim sredstvima dovela je do pojačane ekspresije Hh target gena (mean±SD; n=3; \*p<0,05). (b) Kontrola i limb kultura *Prx1-Cre;Gnas<sup>-/-</sup>* miša izolovana iz embriona E14.5 i kultivisana *in vitro* 4 dana u BGJB medijumu koji sadrži sam rastvarač DMSO), 10 μM ciklopamina (Smo inhibitor), 5 μM forskolina (Fsk) (aktivator produkcije cAMP), 1 μM arsen trioksid (ATO) ili 10 μM GANT-58 (oba su Gli inhibitori). qRT-PCR je korišćena radi utvrđivanja ekspresije Hh target gena. U

odsustvu *GNAS* gena ekspresija Hh target gena je povišena u odnosu na kontrolu. Tretman ciklopaminom doveo je do umerene redukcije Hh signalnog puta, dok je tretman forskolinom, ATO ili GANT58 doveo do značajne inhibicije Hh molekularnog puta. (mean±SD; n=3; \* $p < 0,05$ ). (c) Imunoblot proteinskog lizata embriona E14,5 sa Gli3 antitelima pokazuje da je Gli3 aktivna forma (puna dužina) povišena, dok je Gli3 represorska forma (Gli3-R) smanjena u *Prx1-Cre;Gnas<sup>ff</sup>* embrionu. Tubulin je korišćen kao kontrola. (d) Imunoblot lizata limb kulture E14.5 sa Gli2 antitelima. (e) BMSCs iz *Gnas<sup>ff</sup>* miša inficirane Ad-Cre ili Ad-GFP virusom. Čelije su rasle do konfluencije i onda prebačene u medijum za osteogenezu 10 dana sa ili bez prisustva GANT-58 u naznačenim koncentracijama. Čelije su obojene Von Kosa metodom. (f) Testiranje specifičnosti GLI1 antitela u folikuli kose kao pozitivna kontrola. Imunohistohemija pokazuje sličnu GLI1 (levo, sredina); i PTCH1 (desno) ekspresiju u udaljenim folikulama ljudske kose Uokvirena oblast je prikazana u sredini. (g) GLI2 imunohistohemija (strelice); specifičnost GLI2 antitela u folikulama ljudske kose (dlake) kao pozitivna kontrola (gore); Gli2 imunohistohemija u ćelijama na površini kod POH pacijenata (sredina i dole).

Sa slike 20 može se videti je Hh signalni put aktiviran u ektopičnoj kosti kod POH pacijenta i da je aktivacija Hh signalnog puta dovoljna da izazove HO.



**Slika 20.** Hh signalni put je aktiviran u ektopičnoj kosti kod POH pacijenta i aktivacija Hh signalnog puta je dovoljna da izazove HO (a-c) GLI1 imunohistohemijsko bojenje humanih uzoraka. (a, b) Uzorci dobijeni od zdravih osoba Skala Bar: 1  $\mu$ m. (c) GLI1 ekspresija u ektopičnim osteoblastima kod uzoraka

POH pacijenata (strelice). Scala Bar: 1  $\mu$ m. (d) Reprezentativni uzorci alizarin crvenog i alcian plavog bojenja zadnjih nogu *R26SmoM2* miša kome je ubrizgan Ad-GFP (leva noga) ili Ad-Cre (desna noga). Novoformirana ektopična kost je označena strelicama. N=8. (e) Alizarin crveno bojenje SMP ćelija izolovanih iz *R26SmoM2* miša. (f) Šematska ilustracija pokazuje fundamentalnu ulogu  $G\alpha_s$  u formiranju kosti kao i mehanizam *GNAS* mutacije u bolestima kostiju. L: nizak, H: visok, GOF: pojačana funkcija, LOF: gubitak funkcije.

Sledeće je bilo potrebno utvrditi da li je samo aktivacija Hh molekularnog puta dovoljna za pojavu HO. Da bi ispitali da li je samo aktivacija Hh signalnog puta dovoljna da izazove HO korišćen je *R26SmoM2* miš kod koga je konstitutivno aktivna forma *Smo* (*SmoM2*) eksprimirana nakon Cre-posredovane rekombinacije (Slika 20).

Ad-Cre ili Ad-GFP je ubrizgan potkožno u zadnje noge *R26SmoM2* miša (110). Osam nedelja nakon Ad-Cre injekcije, ali ne i nakon Ad-GFP injekcije, HO je detektovana (Slika 20.d). BMSC i SMP izolovane iz *R26SmoM2* miša takođe pokazuju povišenu aktivnost Hh signalnog puta i ubranu diferencijaciju u osteoblaste nakon infekcije sa Ad-Cre (Slika 20.e i Slika 19.b–d). Ovi rezultati jasno pokazuju da je aktivacija Hh signalnog puta i dovoljna i neophodna da indukuje HO, i da Hh signalni mehanizam mora biti aktivno inhibiran pomoću  $G\alpha_s$  da bi se omogućila i osigurala prostorna restrikcija formiranja kostiju na normalni skelet kod ljudi.

Kao kritičan i veoma važan regulator diferencijacije osteoblasta kod mezenhimskih ćelija,  $G\alpha_s$  ispoljava svoju funkciju regulišući signalne aktivnosti Wnt/ $\beta$ -katenin i Hh, pri čemu oba signalna puta igraju fundamentalnu ulogu u razvoju skeleta i skeletnih bolesti (111). Aktivacija ili inaktivacija *GNAS* izaziva povećanu aktivnost samo jednog signalnog puta, što jasno govori da je jedna od funkcija  $G\alpha_s$  da održava kritičnu ravnotežu između Wnt/ $\beta$ -katenin i Hh signalnog puta, u mezenhimskim progenitorskim ćelijama, što je od izuzetnog značaja za regulaciju osteogeneze i prostornu regulaciju skeletnog sistema. Samo određeni nivoi Hh i Wnt signala koji bivaju determinisani specifičnim rasponom  $G\alpha_s$  aktivnosti (Slika 17.f) imaju za rezultat normalan razvitak kosti. Van uokvirenog raspona, ekstremni Wnt ili Hh signali mogu ili inhibirati formiranje kostiju ili izazvati ektopično formiranje kostiju u mekom tkivu. U skladu sa tim, vrlo je verovatno da



određene mutacije u *GNAS* genu uzrokuju odgovarajuće bolesti kostiju kao što su FD i POH menjajući balans između bilo, Wnt/ $\beta$ -Katenin ili Hh signalnog puta, respektivno (Slika 17.f).

Genetske studije su pokazale da Wnt signalni put stimuliše diferencijaciju osteoblasta. Diferencijacija osteoblasta je favorizovana kada je Wnt signal eksprimiran iznad određenog nivoa (92,93,94,112,113). Shodno tome promena u Wnt signalu sama po sebi primarno utiče na formiranje kostiju normalnog skeleta i ne može izazvati ektopično formiranje kostiju sve dok ne postoji inicijator diferencijacije osteoblasta. U ovoj studiji je definisan jedan mogući inicijator a to je Hh signalni put. Kod POH mišjeg modela, nizak nivo Wnt signala nije bio dovoljan da inhibira ektopično formiranje kosti izazvano povišenim Hh signalom. Potrebno je naglasiti da previše aktivan Wnt signal takođe inhibira diferencijaciju osteoblasta (88,111,112,113,114,115). Ovo, zajedno sa niskim Hh signalom kod FD pacijenata, objašnjava fenotip ove bolesti. Kako oba signalna puta, Wnt i Hh, imaju veoma aktivne regulatorne uloge, određeno smanjenje njihovog normalnog nivoa ekspresije može se tolerisati, dok ektopični signal izaziva štetne efekte. Zbog toga je fenotip bolesti na nivou tkiva ili ćelije primarno određen molekulanim putem koji je aktiviran. Kako su oba signala, Wnt i Hh, potrebna za regulisanje raznih fizioloških i procesa embriogeneze, otkriće do koga smo došli da je njihov balans regulisan pomoću *GNAS* obezbeđuje veoma važan konceptualni pristup razumevanju molekularnog i celularnog mehanizma bolesti koštanog sistema, a moguće i mnogih drugih bolesti regulisanih ovim signalnim putevima.

Ova doktorska studija pokazuje da se ektopična kost u mekom tkivu formira diferencijacijom mezenhimskih progenitorskih ćelija u osteoblaste. Čak i kada je *GNAS* potpuno uklonjen rano iz uda *Prx1Cre; Gnas<sup>f/-</sup>* miša, HO koji se javlja kasnije i progresivno napreduje iz distalnog uda koji sadrži više progenitorskih ćelija nego proksimalan ud (116,117). Hh signalni put posredovan putem Hh liganda je neophodan za enhondalnu kost. Stoga se može pretpostaviti mogućnost da intramembransko formiranje kosti, kao na primer kod fontanele, može biti pospešeno aktivacijom Hh signala, nezavisnom od Hh liganda. Može se zaključiti da je aktivacija Hh signala potrebna i dovoljna za intramembransko formiranje kosti što dalje sugerije da ovaj signalni put može imati važnu ulogu u fiziološkom formiranju

kostiju i homeostazi putem ligand-nezavisne aktivacije. Na primer, defektan GPCR- $G\alpha_s$  signal može izazvati nedovoljan razvoj kranijalne i ključne kosti (118).

Takođe bilo bi interesantno ispitati da li je pojava kosti van skeletnog sistema kod nekih životinjskih vrsta, kao na primer kod *armadillo* vrste (vrsta sisara sa oklopom), regulisana GPCR- $G\alpha_s$ -Hh signalnom osnovom tokom evolucije.

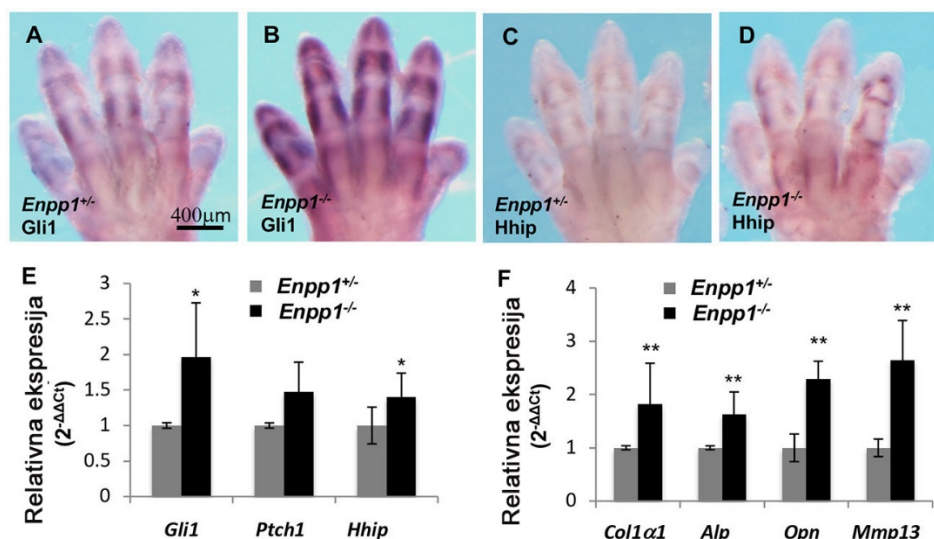
Klasični mozaicizam je pojava kada se fenotip bolesti ne pojavljuje istim intenzitetom niti ravnomerno po celom telu, i prisutan je kod POH i AHO pacijenata. Ovaj fenomen se može objasniti prisustvom dve genotipski različite ćelijske populacije koje vode poreklo iz istog zigota i mogu rezultirati različitim šablonom distribucije potkožnih osifikovanih lezija kod POH bolesti, što razlikuje POH od ostalih *Gnas*-bolesti gde HO prodire u dublja tkiva. Klasična mozaična priroda bolesti kao što su POH ili AHO sugeriše da blago povišen bazalni nivo Hh signala kod tih pacijenata obezbeđuje dovoljan senzibilitet u pozadini tkiva za ektopičnu diferencijaciju osteoblasta koja se javlja kada su dodatni osteogeni faktori obezbeđeni u lokalnoj mikrookolini. Na primer, povišen Hh signal u folikuli kose može inicirati HO u potkožnom regionu, kao što je primećeno kod POH i AHO pacijenata (119)

Stečene forme HO često sadrže mešavinu i pokosnice i kosti (120). Moguće je da je mehanizam nastanka ovog oblika HO kombinacija obe nasledne forme FOP i POH. U stvari, razvojni program ektopične hondrogeneze orkestiran je disregulacijom BMP signalnog puta i takodje dovodi do povećanja Hh signala na mestu povrede.

#### **4.5 Gubitak ektonukleotid pirofosfatne fosfodiesteraze (Enpp1) ima za rezultat povišenu aktivnost Hh signalnog puta**

Ektonukleotid pirofosfataza/fosfodiesteraza 1 (Enpp1) je ekto-enzim koji konvertuje ATP u AMP i oslobađa molekul pirofosfata (PPi) van ćelije. Enpp1 igra značajnu ulogu u homeostazi fosfata (121). Enpp1 enzim je detektovan u raznim tipovima ćelija, uključujući hondrocite i osteoblaste (122), dok je Enpp1 protein detektovan u artikularnoj pokosnici kod miša i kod ljudi (123). Nedavno je pronađeno da enzim Enpp1, inače inhibitor patološke kalcifikacije, ima smanjenu

ekspresiju u pokosnici zglobova kod ljudi sa osteoartritisom, kod ljudi, kao i u mišjem modelu, kao i da nedostatak ovog enzima dovodi do kalcifikacije zglobova. *Enpp1* inhibira formiranje hidroksiapatita generišući PPI, i tako inhibira kalcifikaciju mekog tkiva (124). Kod ljudi, mutacija na genu koja dovodi do gubitka funkcije ovog proteina izaziva tzv. generalnu arterijsku infantilnu kalcifikaciju (GACI) (125,126) ili *pseudoksantom elasticum* (127). *Enpp1* takođe predstavlja važan faktor genetske predispozicije kod osteoartritisa ruku, koji predstavlja treći najčešći oblik artritisa, posle artritisa kolena ili artritisa kuka. Kod miša, gubitak funkcije *Enpp1* ima za rezultat ektopičnu kalcifikaciju artikularne hrskavice, kapsule zgloba ili tetiva (128,129,130). Stoga, *Enpp1*<sup>-/-</sup> miš pokazuje promene tipične za osteoartritis (123).



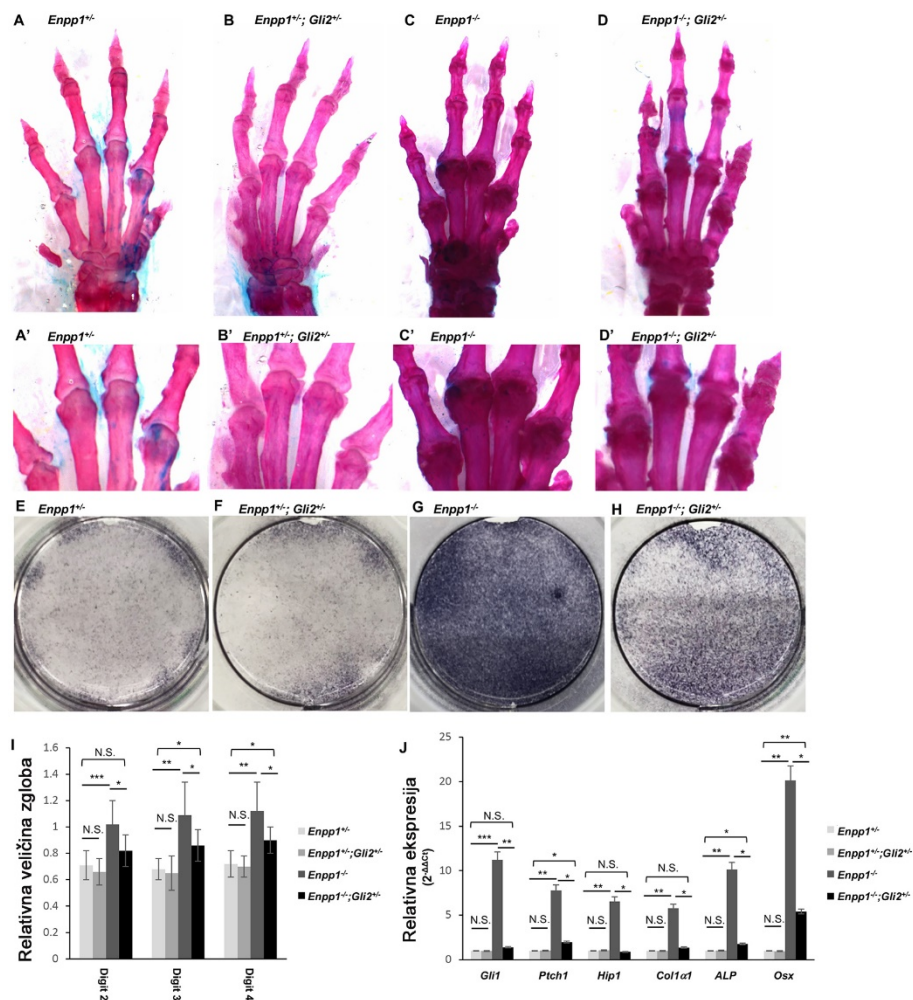
**Slika 21. Povećana aktivnost Hh signalnog puta kod embriona *Enpp1*<sup>-/-</sup> miša (A-D)** Ekspresija target gena Hh signalnog puta *GLI1* (A,B) i *HHIP* (C,D) kod embriona E15,5 kontrole (WT) i *Enpp1*<sup>-/-</sup> u prednjim udovima demonstrirana pomoću WISH (whole in situ hibridization). *GLI1* i *HHIP* iRNK nivo je povišen u udovima *Enpp1*<sup>-/-</sup> embriona. (E-F) qRT-PCR analiza ekspresije Hh target gena u prednjim udovima embriona E15,5 (n=3). \*P<0,05, \*\*P<0,01 (Studentski t-test).

Prethodne studije su pokazale da Hh pospešuje hipertrofiju hondrocita i diferencijaciju oseoblasta. (131,132). Postavili smo hipotezu da *Enpp1* inhibira

hipertrofiju hondrocita i diferencijaciju osteoblasta inhibirajući Hh signal. Gubitak *ENPP1* može rezultirati u aktivnom Hh signal izazivajući ektopičnu kalcifikaciju. Da bi proverili tu hipotezu prvo smo testirali Hh target gene *GLI1* (133), *HHIP* (134) and *PTCH1* (135) kod uda embriona (E) 15,5 pomoću whole-mount *in situ* hybridization (WISH). U daljim eksperimentima čiji su rezultati prikazani na Slici 21. pokušali smo da dobijemo odgovor da li Hh signalni put ima ulogu u kalcifikaciji hrskavice koja se javlja kod *Enpp1*<sup>-/-</sup> miša. Na osnovu eksperimenta prikazanog na Slici 20 jasno se može videti da povišena aktivnost Hh signalnog puta doprinosi kalcifikaciji zglobova kod *Enpp1*<sup>-/-</sup> miša. Povišena Hh signalna aktivnost je zapažena u ranom razvitku embriona *Enpp1*<sup>-/-</sup> miša.

Vrlo je verovatno da smanjen nivo pirofosfata i Hh molekularni put su dva paralelna procesa koji indukuju kalcifikaciju. To smo i dokazali delimičnom popravkom fenotipa ektopične kalcifikacije kod *Enpp1*<sup>-/-</sup> miša ukrštajući ga sa *Gli2*<sup>c/c</sup> uslovnim mutantom i uklanjajući jednu kopiju *GLI2* gena. Iz rezultata prikazanih na Slici 21. može se videti da redukovanje aktivacije Hh signalnog puta, uklanjanjem *GLI2* gena, delimično popravljajući fenotip kalcifikacije zgloba kod *Enpp1*<sup>-/-</sup> miša.

Shodno tome bilo bi razumno sugerisati da bi nove terapije za redukovanje ektopične kalcifikacije izazvane gubitkom ili smanjenjem funkcije *Enpp1* kod ljudi trebalo bazirati na inhibiciji Hh signalnog puta.



**Slika 22. Redukovanje aktivacije Hh signalnog puta delimično popravlja fenotip kalcifikacije zgloba kod *Enpp1*<sup>-/-</sup> miša.** (A-D) Reprezentativni uzorci bojenja skeleta Alcian plavog i alizarin crvenog kod tri meseca starog *Enpp1*<sup>-/-</sup> (A), *Enpp1*<sup>+/-</sup>; *Gli2*<sup>+/-</sup> (B), *Enpp1*<sup>-/-</sup> (C) i *Enpp1*<sup>-/-</sup>; *Gli2*<sup>+/-</sup> (D) miša. (A',B',C',D') Falengeal zglob prikazan uvećano (E-G) Reprezentativno AF bojenje SMP ćelija izolovanih iz kontrole WT (E), zatim het miša *Enpp1*<sup>+/-</sup>; *Gli2*<sup>+/-</sup> (F), homo *Enpp1*<sup>-/-</sup> (G) i *Enpp1*<sup>-/-</sup>; *Gli2*<sup>+/-</sup> miša (H) kultivisanih u medijumu za osteogenezu 7 dana. (I) Kvantifikacija relativne veličine metacarpophalangeal zgloba. t,n=4. (J) qRT-PCR analiza genske ekspresije Hh target i osteoblast gena u SMP ćelijama. SMP ćelije su kultivisane u medijumu za osteogenezu 7 dana (n=3). NS, nedovoljno značajno, \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 (Student's t-test)

## **4.6 Preusmeravanje određenih medikamenata za primenu u lečenju retke genetske bolesti- progresivne heteroplastične osifikacije**

Da bi se dizajnirali efikasni lekovi koji deluju na mehanizam stvaranja bolesti, tzv. kauzalne terapije, potrebno je dobro poznavati molekularni mehanizam nastanka patološkog stanja.  $G_s\alpha$  se pokazao kao iskonski regulator mezenhimskih progenitorskih ćelija u skeletnom sistemu.  $G_s\alpha$  je fiziološki aktivator PKA i inhibitor Hedgehog signalnog puta koji upravlja različitim procesima tokom razvoja (136, 137, 138). Kako je prethodnim eksperimentima pokazano da je Hedgehog (Hh) signalni put važan etiološki faktor u retkoj bolesti *Progressive osseous heteroplasia*, tako se otvorio put novim mogućnostima razvoja kauzalne terapije za ovu bolest.

Da još jednom podsetimo na glavne učesnike u ovom signalnom mehanizmu. Hh signalni put kod sisara uključuje specifične ligande (sonic Hh, Indian Hh, i desert Hh), receptor Patch (PTCH1), signal transducer smoothed (SMO), i transkripcioni faktor (GLI1, GLI2, GLI3). U odsustvu liganda, SMO signalni put u ćeliji je inhibiran pomoću PTCH1 receptora (Slika 9A). Nakon vezivanja aktivnog Hh liganda, ova inhibicija popušta, dozvoljavajući SMO da aktivira Gli klasu transkripcionih faktora (Slika 9B). Gli molekuli su poznati regulatori mnogih onkogeno. GLI1 i GLI2 su, kao što je prethodno pokazano, povećani u progenitorskim ćelijama neposredno pre njihovog diferenciranja u osteoblaste (25). Arsen trioksid (ATO) je već u upotrebi kao lek protiv kancera (odobren od strane FDA (Food and drug administration) kao "Trisenox"), i poznato je da se on direktno vezuje za GLI1 protein i inhibira njegovu transkripcionu aktivnost tako inhibirajući ekspresiju gena koji su pod njegovom neposrednom kontrolom, a koji su uglavnom odgovorni za diferencijaciju osteoblasta kod POH. Prethodno identifikovani inhibitori Hedgehog signalnog puta, posebno Gli inhibitori (slika 18), koji su odobreni kao terapije za kancer, mogli bi se preusmeriti za tretman heterotopne osifikacije i po mogućstvu i druge bolesti izazvane smanjenjem ekspresijom  $\alpha$ -subjedinice G proteina ( $G_s\alpha$ ), koja stimuliše aktivnost adenil ciklaze.

Dakle, arsen trioksid, je jedan od njih, koji ima potencijal da suprimira ektopičnu osifikaciju. Medjutim, ova inhibicija je moguća primenom jako visokih

koncentracija ATO koje mogu biti toksične po pacijente i izazvati jake nuspojave. Stoga bi bilo poželjno ispitati mogućnost primene drugih manje toksičnih molekula koji deluju na Hh molekularni put ili njihove kombinacije sa ATO radi formulisanje efikasnog i bezbednog tretmana za POH.

Dobro je poznato da su svi Hh proteini sekretovani molekuli, kao i da neki od njih deluju lokalno, a neki kao hormoni ciljaju udaljena tkiva tokom razvića (139). Hh protein prekursori prolaze kroz post-translacionu modifikaciju ili auto-odsecanje pri čemu se oslobađa N-terminalni fragment [HhN], koji se kovalentno vezuje sa molekulom holesterola na C-terminalu. Ova modifikacija je neophodna da bi došlo do vezivanja Hh liganda za PTCH receptor. Imajući ovo sve u vidu, značajno je limitirati raspoloživost slobodne, van membranske, forme holesterola i tako postići nizak stepen vezivanja Hh liganda za holesterol odmah nakon njegove sekrecije. Ovo bi značajno smanjilo vezivanje Hh molekula za PTCH i dalju aktivaciju Hh signalnog puta u ćeliji na mestu patološkog formiranja kostiju. Shodno tome, uključivanje statina u formulaciju nove terapije za POH može dodatno sniziti aktivnost Hh signala i imati pozitivan terapijski ishod.

Druga potencijalno efektivna komponenta nove formulacije tretmana za POH može biti Vitamin D3, (Kalcitriol), za koji je pokazano da vrlo potentno redukuje povišen Hh signalni put kod ćelija kancera kože- basal cell carcinoma (BCC) ćelijskih linija (140, 141). Primećeno je da Vitamin D3 igra ulogu potentnog inhibitora glavnog regulatora Hh signalnog puta, *GLI1* gena i posledično redukuje njegovu ekspresiju (142) Vitamin D je prohormon rastvoran u mastima čija je osnovna biološka funkcija da održava nivo kalcijuma u serumu i homeostazu fosfora. On pospešuje apsorpciju kalcijuma u crevima i njegovu reapsorpciju iz bubrega i inhibira sekreciju paratiroidnog hormona. Vitamin D tako omogućava normalnu mineralizaciju kostiju regulišući rast i metabolizam kostiju kod enhondralne kosti.

Na osnovu izloženog, cilj daljih istraživanje bio je da se eksperimentalno ispita da li statin, kao i Vitamin D, i u kojim koncentracijama, imaju potencijal inhibicije Hh signala u slučaju POH bolesti. Preusmeravanje već poznatih lekova i njihovih kombinacija je alternativni pristup koji povećava šansu za uspešnu primenu u terapiji bolesti kod kojih ne postoji efikasna terapijska opcija, kao što je POH. Pored

toga, adekvatnim kombinovanjem navedenih lekova moguće je dobiti efikasnu formulaciju koja potencijalno ima manju toksičnost i slabije izražene neželjene efekte od pojedinačnih komponenti.

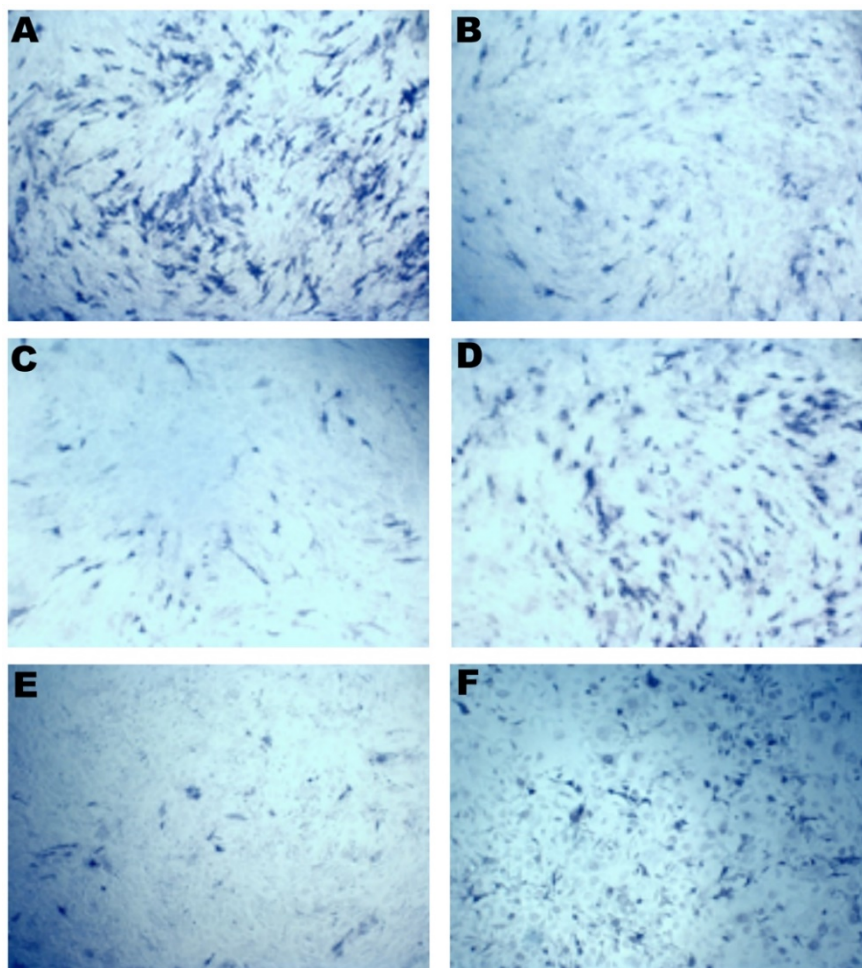
Razvoj novih lekova je inače veoma skup proces koji traje jako dugo. Novi pristupi, strategije i tehnologije su potrebne da poboljšaju ovaj proces i uspešno plasiranje novih lekova. Alternativni pristup za bolesti koje trenutno nemaju lek i koji bi znatno ubrzao ovaj proces je repozicioniranje lekova koji su već odobreni ili kandidata za lekove koji već imaju utvrđene profile toksičnosti. Iako se velika količina novca potroši za razvoj novih lekova, samo jedan od deset biva odobren i plasiran na tržište, što je dosta nepovoljan ishod.

Ovde smo dalje ispitivali novu primenu tri Hh inhibitora: arsen trioksida, statina, i vitamina D3 i njihove kombinacije u sprečavanju procesa osteogeneze kod potkožnih mezenhimskih progenitorskih ćelija (SMP). U tu svrhu korišćene su SMP ćelije izolovane iz *Gsa<sup>fff</sup>* miša, koji predstavlja reproducibilan i adekvatan model za humanu bolest POH.

Kao što je prikazano na Slici 23., sva tri Hh inhibitora pokazuju smanjenu mineralizaciju (koja se ogleda u odsustvu ili redukovanoj plavoj boji) kod SMP ćelija indukovanih za osteogenezu. Kombinacija sva tri agensa sa upola manjim koncentracijama efektivno inhibira mineralizaciju ovih ćelija. Ovim se pokazuje da navedeni agensi imaju dejstvo nalik sinergističnom delovanju.

Ovu su preliminarni rezultati koji po prvi put pokazuju da je korišćenjem tri različita Hh inhibitora postignut isti efekat kao sa pojedinačnim, samo u redukovanim individualnim koncentracijama. Predložena kombinacija lekova zahteva dodatno ispitivanje i detaljno utvrđivanje sinergističkog delovanja.

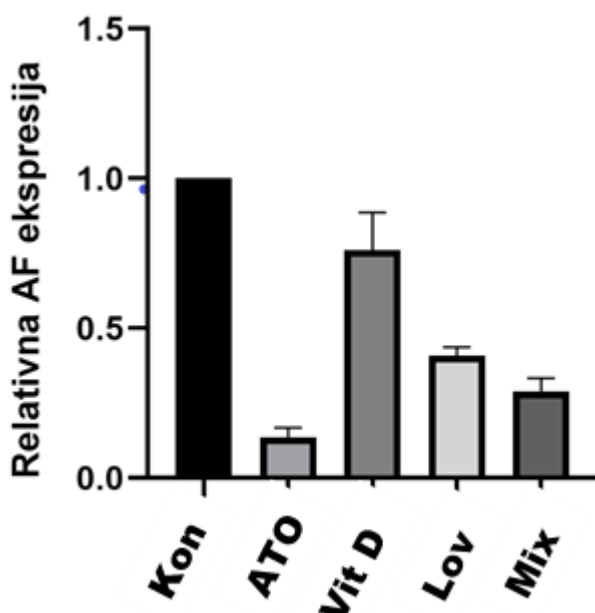




**Slika 23. In vitro biomineralizacija**-Test Alkalne fosfataze (AF) izveden na potkožnim ćelijama mezenhima (SMP) izolovanih iz *Ga $\alpha$ <sup>ff</sup>* miša inficiranih sa Adeno Cre virusom (izuzev F). Uočljiva je inhibicija mineralizacije (odsustvo ili redukovana plavo- ljubičasta boja) u prisustvu agensa (B) Arsen trioksida 10 $\mu$ M; (C) Kolekalciferola 10 $\mu$ M; (D) Lovastatina 1 $\mu$ M i (E) kombinacija sva tri agensa sa upola redukovanim koncentracijama u poređenju sa (F) SMP ćelije inficirane sa Adeno GFP virusom ili (A) kontrola (medijum za osteogenezu bez dodatog agensa).

Slika 24. kvantitativno karakteriše efekat primenjenih agenasa, nezavisno ili u kombinaciji, na gensku ekspresiju ranog markera osteogeneze, alkalnu fosfatazu (AF) u poređenju sa kontrolom. Ovaj pristup preusmeravanja već odobrenih lekova za nove aplikacije je od nedavno u porastu, specijalno za razvoj novih terapija i kod

bolesti kod kojih nedostaje efikasan tretman lekovima. Kombinacija dva ili više agensa sa različitim mehanizmima dejstva je alternativni pristup koji doprinosi uspešnom ishodu preusmeravanja lekova (143). U saglasnosti sa strategijom preusmeravanja lekova, kombinacija Hh inhibitora ima potencijal da u manjim koncentracijama pojedinačnih agensa postigne sličan nivo inhibicije rane diferencijacije osteoblasta, što se može zaključiti praćenjem nivoa genske ekspresije alkalne fosfataze u poređenju sa individualnim agensima (Slika 24.). Dakle, inhibicija osteogeneze i sprečavanje ektopične osifikacije je obezbeđeno sa nižim koncentracijama Hh inhibitora.



**Slika 24. Analiza genske ekspresije Alkalne fosfataze (AF) SMP ćelija, relativno u odnosu na kontrolu, šest dana nakon izlaganja u medijumu za osteogenezu.** Kontrola (samo medijum za osteogenezu ) u prisustvu agenasa: Arsen trioksida (ATO) 10  $\mu$ M; Vitamina D3 (VitD) 10 $\mu$ M; Lovastatina (Lov) 1  $\mu$ M ili njihove kombinacije (Mix) sa upola manjim koncentracijama pojedinačnih agenasa, radjena na potkožnim ćelijama mezenhima (SMP) izolovanih iz *G $\alpha$ <sup>s</sup>/f* miša inficiranih sa Adeno Cre virusom. Eksperimenti su rađeni u triplikatu. Vrednosti (nivo iRNK ) su normalizovane u odnosu na internu kontrolu (gen  $\beta$ -aktin) i izražene kao mean  $\pm$  SEM u odnosu na kontrolu (podešena na 1).

Može se zaključiti da kombinacija koja se sastoji od kolekalciferola, arsen trioksida i statina ima potencijal sprečavanja formiranja ektopične kosti i može biti od koristi za istraživanje potencijalno novog tretmana za POH. Prednost korišćenja ove multi-komponentne terapije bila bi u njenoj jedinstvenoj prednosti da ciljano reaguje na različite nivoe Hh signalnog mehanizma (Slika 9) i tako efikasno u nižim koncentracijama inhibira osteogenezu potkožnih mezenhimskih ćelija. Ovaj, potencijalno sinergistički efekat bi omogućio znatno redukovanje svake pojedinačne komponente i time potencijalno smanjio toksičnost i nuspojave novog leka za POH (Slika 23. i Slika 24.).

#### **4.7 Kombinacija arsen trioksida, vitamina D3 i statina efikasno sprečava osteogenezu i kod normalnih (WT) BMSC**

Pošto je utvrđeno da su Hh inhibitori veoma potentni pri sprečavanju osteogeneze kod matičnih ćelija koje imaju *GNAS* mutaciju i shodno tome povećanu aktivnost Hh signalnog puta, sledeće je bilo korisno utvrditi da li ovi isti inhibitori mogu sprečiti osteogenezu i kod normalnih zdravih ćelija koje posreduju u formiranju stečene forme HO. Iz literature i *in vivo* studija je poznato da Hh molekularni mehanizam doprinosi stvaranju HO, posebno u ranoj fazi kao i u mišjem modelu (25,60).

Imajući to u vidu, bilo je potrebno ispitati efikasnost i mehanizam delovanja Hh inhibitora na osteogenezu normalnih mezenhimskih progenitorskih ćelija, koje ne nose nijednu gensku mutaciju.

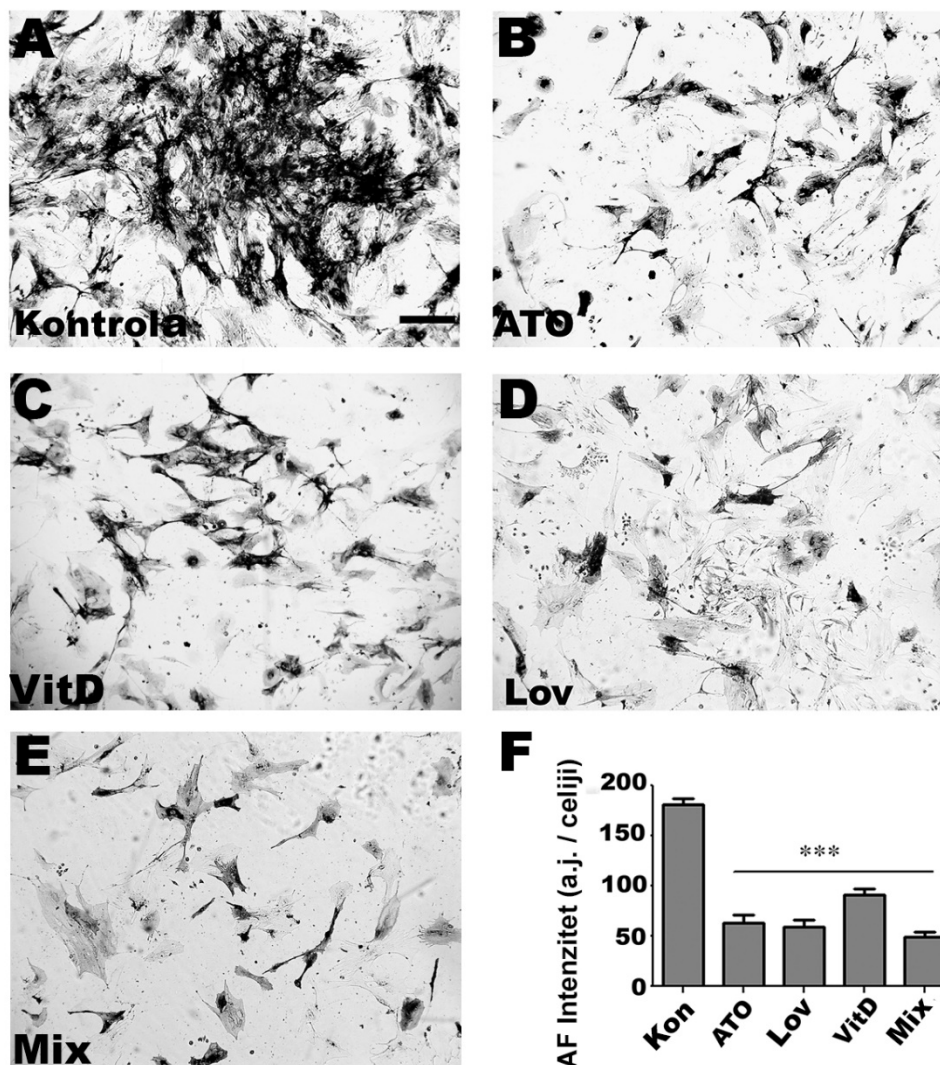
U sledećem eksperimentu korišćen je Arsen trioksid (ATO) tokom diferencijacije ćelija izolovanih iz koštane srži (BMSC) divljeg tipa miša, kao i Vitamin D3 (Kolekalciferol) i Lovastatin.

Za funkcionalno ispitivanje osteogeneze korišćen je test za alkalnu fosfatazu (AF), jer AF je jedan od prvih enzima koji se aktivira u ranoj fazi osteogeneze (144). Ključno objašnjenje uloge AF u mineralizaciji dato je u studiji fazne ekspresije gena tokom osteogeneze i kalcifikacije pokosnice (145). U oba tkiva, kostima i pokosnici, AF deluje u ranoj fazi formiranja osteoblasta. Osteoblasti su integralni deo formiranja

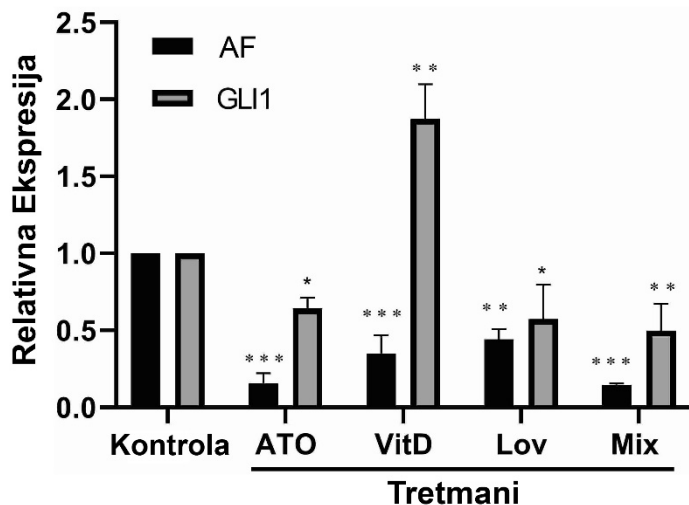
heterototpne osifikacije i njihovo nastajanje se može pratiti preko produkcije alkalne fosfataze.

Ćelije koštane srži izolovane su iz divljeg tipa miša i zasejane u prvom pasažu da bi se testirala osteogeneza u prisustvu ATO, Vitamina D3, Lovastatina ili njihove kombinacije. Rezultati su prikazani na slici 25. i 26. Nivoi alkalne fosfataze koji odražavaju osteogenetsku aktivnost, detektovani su u kontroli BMSC četiri dana nakon izlaganja medijumu za osteogenezu. (Slika 25.). Nasuprot tome, dodatak ATO, Vitamina D3, Lovastatina ili njihove kombinacije značajno je redukovao (više od dva puta) nivo alkalne fosfataze u poređenju sa kontrolom. (Slika 25.)

Velika sposobnost Hh inhibitora da modifikuju ključne regulatore osteogeneze primećena je i na nivou genske ekspresije (Slika 25.). Analiza PCR u realnom vremenu pokazala je da su, u poređenju sa kontrolom (samo medijum za osteogenezu), sva tri Hh inhibitora ili njihova kombinacija značajno redukovali (i do 90%) nivo iRNK alkalne fosfataze (Slika 25.). Da bi se dalje utvrdila uloga Hh signalnog mehanizma u osteogenezi BMSC ćelija, izmerene su promene u genskoj ekspresiji glavnog Hh markera, *GLI1*, u kontroli i u ćelijama tretiranim Hh inhibitorima. Arsen trioksid i statin su značajno suprimirali ekspresiju (za oko 30-40 %) *GLI1* iRNK nivoa u poređenju sa kontrolom (Slika 25.). Interesantno je da je kombinacija tri Hh inhibitora (Mix1) u dvostruko redukovanim koncentracijama izazvala jednako potentan inhibitorski efekat na ekspresiju *GLI1* gena koji je uporediv sa pojedinačnim tretmanima sa visokim dozama (Slika 26.). Ipak, sam Vitamin D3 nije inhibirao Hh signalni put, bar ne na nivou genske ekspresije *GLI1*. Ovaj rezultat sugeriše da neki alternativni signalni mehanizam, nezavisan od Hh signalnog puta, kao na primer signalni put vitamin D receptora (VDR), može biti uključen u suprimiranje osteogene aktivnosti mezenhimskih progenitorskih ćelija tretiranih sa Vitaminom D3 (146).



**Slika 25. Kolorimetrijski test Alkalne fosfataze (AF) kod primarnih mišjih BMSC ćelija (prvi pasaž), nakon izlaganja medijumu za osteogenezu. a) kontrola, bez prisutnog agensa; b) u pristustvu ATO (ATO); c) u prisustvu Vitamina D (Kolekalciferola) (VitD); d) U prisustvu Lovastatina (Lov); e) Kombinacija sva tri agensa u pojedinačnim koncentracijama razblaženim 1:2 (Mix); f) intenzitet AP signala kvantifikovan je korišćenjem Image J softvera (n=60, iz tri nezavisna eksperimenta) i izražen u arbitrarnim jedinicama po ćeliji (a.j. /ćeliji).**

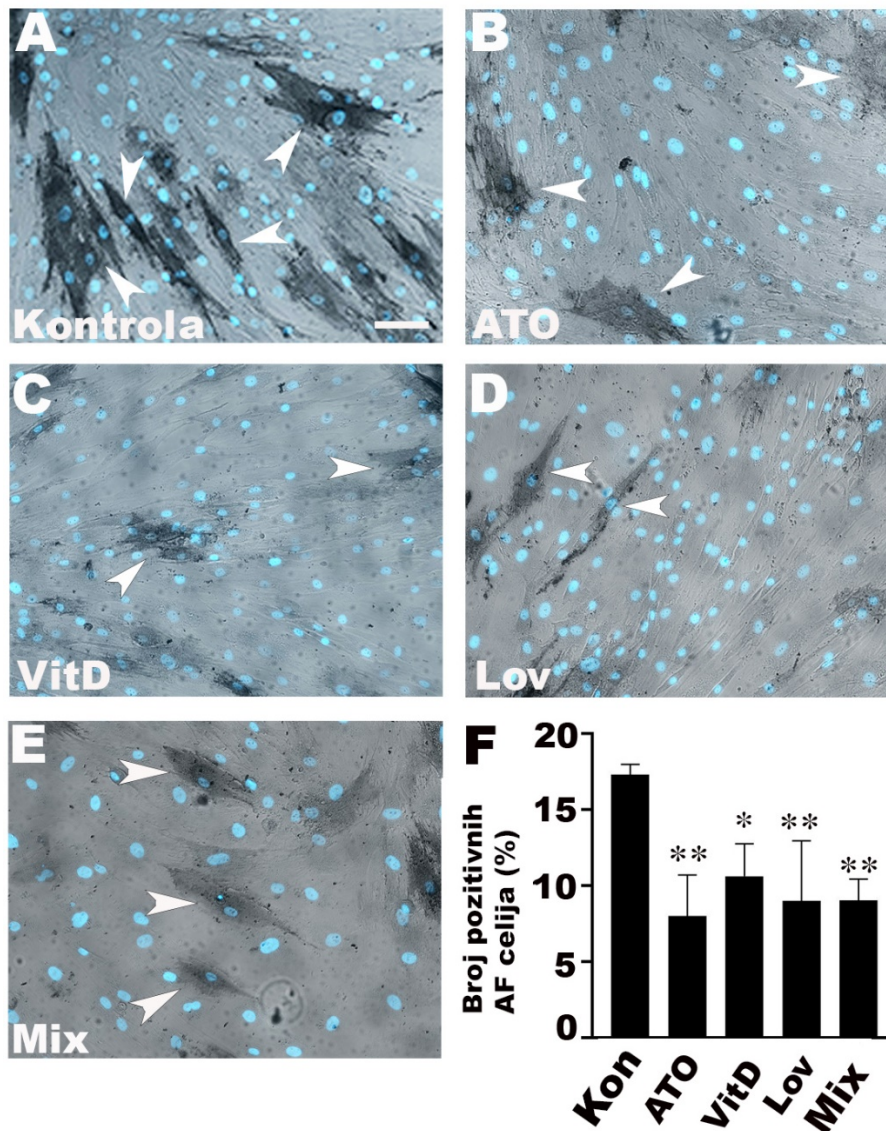


**Slika 26. Genska ekspresija ranog markera osteogeneze, alkalne fosfataze (AF) i markera Hedgehog signalnog puta *GLI1*, u WT ćelijama BMSC kultivisanih četiri dana u medijumu za osteogenezu bez prisutnog agensa (kontrola), sa pojedinačnim Hh inhibitorima (ATO, VitD i Lov) ili njihovom kombinacijom (Mix), izračunata koristeći  $\Delta\Delta$  Ct metod. Histogram predstavlja mean  $\pm$ SEM relativno u odnosu na kontrolu koja je 1.**

Sledeće je ispitivano da li je ovaj fenomen evolutivno konzervisan i da li je osteogeneza u humanim ćelijama takođe posredovana Hh signalnim mehanizmom ili je ovaj fenomen jedinstven samo za mišje BMSC ćelije. Analogno mišjim ćelijama (Slika 25.), svi Hh inhibitori su vidljivo redukovali bojenje AF u poređenju sa kontrolom (samo medijum za osteogenezu) kod humanih BMSC (Slika 27.). Da bi bili sigurni da ovo smanjenje AF aktivnosti nije posledica toksičnosti Hh inhibitora usled pojedinačnih visokih upotrebljenih koncentracija, ćelije su obojene nuklearnom bojom DAPI, i izmeren je ukupan broj AF pozitivnih ćelija (Slika 27.). Primenjeni pristup sa korišćenjem kombinovanog fluorescentnog i svetlosnog mikroskopa je pokazao da nema vidljivih znakova apoptoze kao što je ćelijsko skupljanje, nuklearna kondenzacija ili fragmentacija bilo u ćelijama kontrole ili u tretiranim ćelijama. Ipak, mikroskopske studije su pokazale značajno smanjenje (~ 2-puta) u broju AF pozitivnih ćelija i prosečnom redukovanju AF signala kod ćelija tretiranih Hh inhibitorima u poredjenju sa kontrolom (Slika 27.).

Slično je uočeno i kod analize genske ekspresije Hh markera u humanim BMSC (Slika 28.). Dodatak sva tri inhibitora pojedinačno ili u kombinaciji tokom osteogeneze humanih BMSC umanjilo je ekspresiju *AF* gena, označenu značajnim smanjenjem *AF* iRNK nivoa kod ATO, Lov ili Vit D3-tretiranih ćelija u poredjenju sa ćelijama u kontroli (Slika 28.). Slično kao kod mišjih ćelija, ATO i Lovastatin značajno umanjuju (oko 30-50 %) *GLI1* ekspresiju kod humanih BSMC relativno u odnosu na kontrolu, dok dodatak Vit D3 nije značajno modifikovao efekat na *GLI1*, molekularni rezultat Hh signalne aktivnosti.

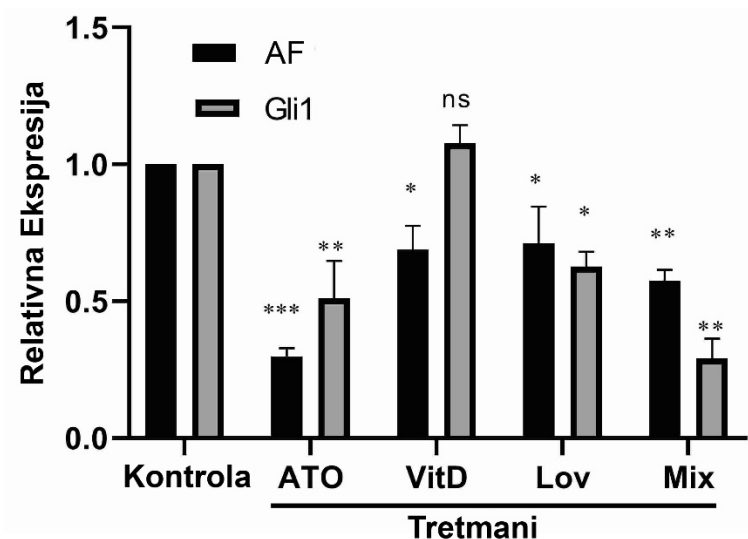
Ovi rezultati demonstriraju da inhibicija Hh signalnog puta koristeći arsen trioksid, vitamin D3, lovastatin ili njihovu kombinaciju snažno inhibira osteogenezu u nativnim mezenhimskim progenitorskim ćelijama.



**Slika 27.** Test alkalne fosfataze zajedno sa DAPI bojenjem kod primarnih **humanih BMSC**. (P1) nakon izlaganja medijumu za osteogenezu: a) kontrola, bez prisutnog agensa (Kon); b) u prisustvu ATO tokom osteogeneze (ATO); c) u prisustvu Kolekalciferola (VitD) tokom osteogeneze; d) u prisustvu Lovastatina (Lov) u medijumu za osteogenezu; e) Mix- ATO, Kolekalciferol i Lovastatin prisutni tokom osteogeneze; f) kvantifikacija AF pozitivnih ćelija izražena kao procenat obojenih ćelija u odnosu na ukupan broj živih ćelija. Histogram predstavlja mean  $\pm$ SEM relativno u odnosu na kontrolu koja ima vrednost 1.

*(Primetno je smanjenje AF aktivnosti u ćelijama tretiranim Hh inhibitorima u poređenju sa kontrolom)*





**Slika 28.** Ekspresioni profil ranog markera osteogeneze, Alkalne fosfataze, *AF*, i markera Hedgehog signalnog puta, *GLI1*, u humanim BMSC ćelijama kultivisanim šest dana u medijumu za osteogenezu bez prisutnog agensa (kontrola), sa pojedinačnim Hh inhibitorima ili njihovom kombinacijom, kalkulisanim korišćenjem  $\Delta\Delta$  Ct metode. Histogram predstavlja mean  $\pm$ SEM relativno u odnosu na kontrolu koja ima vrednost 1.

Na osnovu prikazanih rezultata može se videti da su ATO i Lovastatin blokirali osteogenezu kod mišjih i humanih BMSC ćelija putem zajedničkog mehanizma posredovanog Hedgehog signalnim putem. Međutim, Hh-posredovana osteogeneza i diferencijacija BMCS nije bila od značaja u slučaju Vitamina D3.

Ova studija obezbeđuje preliminarne dokaze da su ATO, Lovastatin i Vitamina D3 potentni inhibitori veoma brzog i ireverzibilnog procesa diferencijacije mezenhimskih ćelija u osteoblaste, pokrenute Hh i ostalim osteogenim signalnim mehanizmima. ATO, Lovastatin i Vitamin D3 pojedinačno redukuju formiranje osteoblasta preko inhibicije aktivnosti alkalne fosfataze i njene ekspresije kada su korišćeni u visokim dozama. Od velikog značaja je činjenica da je kombinacija ova tri agensa sa upola manjim koncentracijama izazvala efekat smanjenja aktivnosti *AF*

i *GLI1* iRNK uporediv sa visokim, individualnim dozama. Ovaj kooperativni efekat ATO, Lov i Vitamina D3 sugerše da inhibitori deluju na različitim tačkama Hedgehog signalnog puta što može objasniti povećanu efikasnost kombinacije ovih lekova na suzbijanje osteogeneze. Redukovana koncentracija ovih agensa može potencijalno poboljšati selektivnost novog leka i smanjiti neželjene sekundarne efekte kod ljudi.

## 5. ZAKLJUČAK

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je mehanizam nastanka heterotopne osifikacije kao i uspostavljanje mogućnosti koncipiranja novog tretmana za HO. Na osnovu prikazanih eksperimentalnih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

Na osnovu pokazanih rezultata može se zaključiti da gubitak *GNAS* gena dovodi do HO putem aktivacije Hedgehog (Hh) signalnog puta. Ovaj pronalazak je od velikog značaja za razumevanje funkcije *GNAS* gena u regulaciji signalnih puteva koji dovode do različitih fenotipa koštanog sistema.

U ovom radu je takođe pokazano da gubitak funkcije *GNAS* gena u mezenhimskim matičnim ćelijama dovodi do progresivne HO u mišjem POH modelu. Specifično, pokazano je da je mehanizam osifikacije intramembranski i da se matične ćelije direktno diferenciraju u osteoblaste, bez prethodnog formiranja hondrocita.

Ovaj rad predstavlja značajan doprinos boljem razumevanju kako mutacije *GNAS* gena (njegova aktivacija kao i gubitak) izazivaju dve potpuno različite bolesti (FD i POH) ukazujući na signalne puteve koji bivaju aktivirani kao što je (Wnt/ $\beta$ -catenin i Hh). Kako ova dva signalna mehanizma dovode do različitih bolesti skeletnog sistema, ovaj rad ukazuje na značaj veoma kontrolisane aktivnosti  $G\alpha_s$  pomoću GPCR proteina, kako u prostoru tako i u vremenu i njegovu važnu ulogu u limitaciji formiranja kostiju isključivo u granicama skeletnog sistema.

Dokazano je da je Hedgehog signalni put i dovoljan i neophodan za razvitak HO. Shodno tome, pokazano je da se već poznati Hh inhibitori odobreni u drugim aplikacijama (kao na primer kancer) mogu preusmeriti za tretiranje HO.

U ovoj studiji je jasno pokazano da se ektopična kost u mekom tkivu formira diferencijacijom osteoblasta iz mezenhimskih matičnih ćelija.  $G\alpha_s$  je pronađen kao kritičan regulator diferencijacije osteoblasta iz MSC i kao važan faktor koji prostorno limitira formiranje kostiju samo pri skeletnom sistemu.

Takodje, pokazano je da su i drugi oblici defektne mineralizacije, kao *ENPP1* mutacija koja izaziva tzv. generalnu arterijsku infantilnu kalcifikaciju (GACI), posredovani Hh signalnim putem.

U radu je ispitana i mogućnost upotrebe kombinacije tri već poznata Hh inhibitora *in vitro* koji imaju komplementarno dejstvo na inhibiciju Hh signalnog puta i efikasno inhibiraju diferencijaciju MSC u osteoblaste.

Rezultati ispitivanja su pokazali da su ATO, Lovastatin i Vitamina D3 potentni inhibitori veoma brzog i ireverzibilnog procesa diferencijacije mezenhimalnih ćelija u osteoblaste, pokrenute Hh i ostalim osteogenim signalnim mehanizmima .

ATO, Lovastatin i Vitamina D3 pojedinačno redukuju formiranje osteoblasta preko inhibicije aktivnosti alkalne fosfataze i njene ekspresije kada su korišćeni u visokim dozama.

Kombinacija ova tri agensa sa upola manjim koncentracijama izaziva efekat smanjenja aktivnosti AF i *GLI1* iRNK uporediv sa visokim, individualnim dozama. Ovaj kooperativni efekat ATO, Lov i Vitamina D3 sugerise da inhibitori deluju na različitim tačkama Hedgehog signalnog puta što može objasniti povećanu efikasnost kombinacije ovih lekova na suzbijanje osteogeneze.

Redukovana koncentracija ovih agensa može potencijalno poboljšati selektivnost novog leka i smanjiti neželjene sekundarne efekte kod ljudi.

Ovi preliminarni rezultati otvaraju mogućnost novog pristupa u razvoju HO terapije, kao što su kombinovane terapije već odobrenih lekova u cilju smanjenja nuspojava i troškova razvoja novog leka. Ovi preliminarni rezultati pružaju nadu HO pacijentima za koje trenutno nema efikasne i bezbedne terapije.

## LITERATURA

- [1] Shore EM, Kaplan FS. Inherited human diseases of heterotopic bone formation. *Nat Rev Rheumatol.* 2010; 6:518–527
- [2] Meyers C, Lisiecki J, Miller S., Levin A. Fayad L. et al. Heterotopic ossification A comprehensive review. *JBMRPlus* 2019; DOI: 10.1002/jbm4.10172
- [3] Ranganathan K., Loder S., Agarwal S., Wong V., Forsberg J., Davis T., Wang S., James A., Levi B. Heterotopic ossification: Basic Science principles and clinical correlates, *Journal of Bone and Joint surgery*, 2015;97:1101-11
- [4] D.S. Edwards, K. Kuhn, B.K. Potter and J. Forsberg. Heterotopic ossification: a Review of Current Understanding, Treatment and Future, *Orthop Trauma*, 2016 V 30, N 10, S27-30 DOI: 10.1097/BOT.0000000000000666
- [5] Abston et al. Breath of relief: apparent pulmonary nodule due to heterotopic ossification. *Clinical case Report*, 2018; <https://doi.org/10.1002/ccr3.1378>
- [6] Dukes C.E.: Ossification in rectal cancer: (section of surgery: sub-section of proctology). *Proc. R. Soc. Med.* 1939; 32: pp. 1489-1494
- [7] Maeda M., et al: A case of hepatocellular carcinoma associated with ossification. A case report. *Cancer* 1986; 57: pp. 134-137
- [8] Plenge K.: Ossification in carcinoma. *Zentralbl Allg Pathol* 1955; 93: pp. 160-167
- [9] Yamamura-Idei Y., et al: Parathyroid hormone-related protein in gastric cancers with heterotopic ossification. *Cancer* 1993; 72: pp. 1849-185
- [10] M. Pacifici, Acquired and congenital forms of heterotopic ossification: new pathogenic insights and therapeutic opportunities. *Current Opinion in Pharmacology* **40** (2018) 51(<https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.03.007>)
- [11] Baird E, Kang Q. Prophylaxis of heterotopic ossification: an updated review *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 2009, 4:12doi:10.1186/1749-799X-4-12
- [12] Eisenstein N., Stapley S., Grover L. Post-traumatic heterotopic ossification: an old problem in need of new solution. *J Ortho Res* (2017) 1-8
- [13] Fischer JA, Egert F, Werder E, Born W. An inherited mutation associated with functional deficiency of the alpha-subunit of the guanine nucleotide-binding protein Gs in pseudo- and pseudopseudohypoparathyroidism, *J Clin Endocrinol Metab.* (1998)83(3)935-8
- [14] Brooker AF, Bowerman JW, Robinson RA, Riley RH, /jr. Ectopic ossification following total hip replacement. Incidence and method of classification. *J Bone Joint Surg Am* (1973)55, 1629-32

- [15] Potter BK<sup>1</sup>, Burns TC, Lacap AP, Granville RR, Gajewski DA. Heterotopic ossification following traumatic and combat-related amputations. Prevalence, risk factors, and preliminary results of excision. *J Bone Joint Surg Am.* 2007 Mar;89(3):476-86.DOI:[10.2106/JBJS.F.00412](https://doi.org/10.2106/JBJS.F.00412)
- [16] Alfieri KA, Forsberg JA, Potter BK. Blast injuries and heterotopic ossification. (2012) *Bone Joint Res* 1:174-9doi: [10.1302/2046-3758.18.2000102](https://doi.org/10.1302/2046-3758.18.2000102)
- [17] Hastings H 2nd, Graham TJ. The classification and treatment of heterotopic ossification about the elbow and forearm. *Hand Clin* 1994 Aug 10(3):417-37
- [18] Sullivan MP, Torres SJ, Mehta S, Ahn J. Heterotopic ossification after central nervous system trauma: a current review. *Bone Joint Res.* 2013 Mar;2(3):51-7
- [19] Reichei LM, Salisbury E, Moustoukas MJ, Davis AR, Olmsted-Davis E. Molecular mechanisms of heterotopic ossification. *J Hand Surg Am.* 2014 Mar;39(3):563-6
- [20] Matta JM, Siebenrock KA. Does Indomethacin reduce heterotopic bone formation after operations for acetabular fractures (1997) *J Bone Joint Surg. Vol 79-B*, 6
- [21] Ljubiša Jovašević, Izet Tutić: Patologija koštano zglobnog sistema , Kraljevo 2010
- [22] Shore EM, et al. Paternally inherited inactivating mutations of the GNAS1 gene in progressive osseous heteroplasia. *N Engl J Med.* 2002; 346:99–106. [PubMed: 11784876]
- [23] Agarwal S., Loder SJ, Cholak D. et al. Scleraxis lineage cells contribute to ectopic bone formation in muscle and tendon. *Stem Cells*, 2017;35(3):705-10  
DOI:[10.1002/stem.2515](https://doi.org/10.1002/stem.2515)
- [24] Agarwal S., Loder SL, Brownley C., et al. BMP signaling mediated by constitutively active Activin type I receptor (ACVR1) results in ectopic bone formation localized to distal extremity joints. *Dev Biol.* 2015; 400(2):202-9  
DOI:[10.1016/j.ydbio.2015.02.011](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.02.011)
- [25] Regard J, Malhotra D, Gvozdenovic-Jeremic J, et al. Activation of Hedgehog signaling by loss of GNAS causes heterotopic ossification. *Nat Med.* 2013; 19(11) 1505-12
- [26] Dey D, Bagarova J, Hatsell SJ et al. Two tissue-resident progenitor lineages drive distinct phenotypes of heterotopic ossification, *Sci Transl. Med.* 2016.;8(366):366ra163
- [27] Kan L., Peng CY, McGuire TL, Kessler JA. Glast-expressing progenitor cells contribute to heterotopic ossification. *Bone.* 2013;53(1)
- [28] Olmsted-Davis EA, Salisbury EA, Hoang D. et al. Progenitors in peripheral nerves launch heterotopic ossification. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(4);1109-19

- [29] Lounev VY, Ramachandran R, Wosczyzna MN, et al. Identification of progenitor cells that contribute to heterotopic skeletogenesis. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91(3):653-63
- [30] Medici D, Shore EM, Lounev VY, Kaplan FS, Kalluri R, Olsen BR. Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med.* 2010;16(12):1400-6
- [31] Magne D, Bougault C. What understanding tendon cell differentiation can teach us about pathological tendon ossification. *Histol Histopathology.* 2015;30(8) 901-10
- [32] Richards PJ, Braid JC, Carmont MR, Maffulli N. Achilles tendon ossification: pathology, imaging and aetiology. *Disabil Rehabil.* 2008; 30 (20-22):1651-65
- [33] Weinreb JH, Sheth C, Apostolakis J, et al. Tendon structure, disease and imaging. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014;4(1) 66-73
- [34] Medici D, Shore EM, Lounev VY, Kaplan FS, Kalluri R, Olsen BR. Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med* 2010 Dec;16 (12) 1400-6
- [35] Dilling CF, Wada AM, Lazard ZW, Salisbury EA, Gannon FH, Vadakkan TJ, Gao L, Hirschi K, Dickinson ME, Davis AR, Olmsted-Davis EA. Vessel formation is induced prior to the appearance of cartilage in BMP-2 mediated heterotopic ossification. *J Bone Miner Res* 2010 May 25(5):1147-56
- [36] Wang H et al. Cellular hypoxia promotes heterotopic ossification by amplifying BMP signaling. *J Bone Min Research.* 2016 31(9)1652-65
- [37] Agarwal S, Loder S, Brownley C. et al. Inhibition of HIF1alpha prevents both trauma induced and genetic heterotopic ossification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016 113(3)E338-47
- [38] Chen Y et al. Tumor necrosis factor-alpha stimulates human neutrophils to release preformed activin A. *Immunol Cell Biol* 2011. 89(8) 889-96
- [39] Baccarelli A. et al. Activin A serum levels and aging of the pituitary-gonadal axis: a cross-sectional study in middle-aged and elderly healthy subjects. *Exp Gerontol* 2001 36(8)1403-12
- [40] Ramirez DM, Ramirez MR, Reginato AM, Medici D. Molecular and cellular mechanisms of heterotopic ossification. *Histol Histopath* 2014 Oct 29(10)1281-5
- [41] Salisbury E., Rodenberg E., Sonnet C., Hipp J., Gannon FH., Vadakkan TJ., Dickinson ME, Olmsted-Davis EA, Davis AR. Sensory nerve induced inflammation contributes to heterotopic ossification. *J Cell Biochem* 2011 Oct 112 (10) 2748-58
- [42] Peterson JR., De La Rosa S., Sun H., Eboda O., Cilwa KE., Donneys A., Morris M., Buchman SR., Cederna PS., Krebsbach PH., Wang SC, Levi B. Burn injury enhances bone formation in heterotopic ossification model. *Ann Surg* 2014 259 (5) 993-8

- [43] Hayashi et al. BMP-SMAD-ID promoted reprogramming to pluripotency by inhibiting p16/INK4A-dependent senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016 113 (46) 13057-13062
- [44] Phomphutkul C, Wu KY, Auyeung V, Chen Q., Gruppuso PA. mTOR signaling contributes to chondrocyte differentiation. *Dev Dyn.* 2008;237(3):702-12
- [45] Hino K, Horigome K., Nishio M., et al. Activin A enhances mTOR signaling to promote aberrant chondrogenesis in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Clin invest.* 2017; 127(9):3339-52
- [46] Quershi AT, Dey D, Sanders EM, et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin signaling with rapamycin prevents trauma induced heterotopic ossification. *Am J Pathol.* 2017; 187(11);2536-45
- [47] Jiang H, Chen Y, Chen G, et al. Leptin accelerates the pathogenesis of heterotopic ossification in rat tendon tissues via mTORC1 signaling. *J Cell Physiol.* 2018;233(2) 1017-28
- [48] Semenza GL. Hypoxia inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med.* 2001; 7(8) 345-50
- [49] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci.* 2009; 122(Pt20) 3589-94
- [50] Wang Y., Wang C, Deng L, et al. The hypoxia inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest.* 2007;117(6)1616-26
- [51] Weston AD, Chandraratna RA, Torchia J, Underhill TM. Requirement for RAR-mediated gene repression in skeletal progenitor differentiation. *J Cell Biol.* 2002;158(1)39-51
- [52] Weston AD, Rosen V, Chandraratna RA, Underhill TM. Regulation of skeletal progenitor differentiation by the BMP and retinoid signaling pathways. *J Cell Biol.* 2000; 148(4)679-90
- [53] Cash DE, Bock CB, Schughart K, Linney E, Underhill TM. Retinoic acid receptor alpha function in vertebrate limb skeletogenesis; a modulator of chondrogenesis. *J Cell Biol.* 1997;136 (2) 445-57
- [54] Shimono K, Morrison TN, Tung WE, et al. Inhibition of ectopic bone formation by a selective retinoic acid receptor alpha-agonist; a new therapy for heterotopic ossification? *J orthop Res.* 2010;28(2) 271-7



- [55] Shimono K, Tung WE, Macolino C, et al. Potent inhibition of heterotopic ossification by nuclear retinoic acid receptor-gamma agonist. *Nat Med* 2011;17(4) 454-60
- [56] Chakkalakai SA, Uchibe K, Convente MR, et al. Palovarotene inhibits heterotopic ossification and maintains limb mobility and growth in mice with the human ACVR1 (R206H) fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) mutation. *J Bone Miner Res.* 2016;31(9)1666-75
- [57] Lees-Shepard JB, Nicholas SE, Stoessel SJ et al. Palovarotene reduces heterotopic ossification in juvenile FOP mice but exhibits pronounced skeletal toxicity, *Elife* 2018:7
- [58] Pavey GJ, Quershi AT, Tomasino AM, et al. Targeted stimulation of retinoic acid receptor-gamma mitigates the formation of heterotopic ossification in an established blast-related traumatic injury model. *Bone*, 2016;90;159-67
- [59] Gejman PV, Weinstein LS, Martinez M, Spiegel AM, Cao Q, Hsieh WT, Hoehe MR, Gershon ES Genetic mapping of the Gs-alpha subunit gene (GNAS1) to the distal long arm of chromosome 20 using a polymorphism detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics*, 1991, 9(4):782-3
- [60] Kan C, Chen L, Hu Yu, et al. Gli1-labeled adult mesenchymal stem/progenitor cells and hedgehog signaling contribute to endochondral heterotopic ossification. *Bone* 2018, 109:71-9
- [61] Kaplan FS, Kobori JA, Orellana C, et al. Multi-system involvement in a severe variant of fibrodysplasia ossificans progressiva (ACVR1 c.772G>A; R258G): A report of two patients. *Am J Med Genet A.* 2015;167A(10):2265-2271. doi:10.1002/ajmg.a.37205
- [62] Hosoya T. et al. Naturally Occurring Small-Molecule Inhibitors of Hedgehog/GLI-Mediated Transcription. *ChemBio Chem*, 2008;9(7) 1072-1082  
<https://doi.org/10.1002/cbic.200700511>
- [63] Buck R.C, Regeneration of tendon. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 1953. 66(1):1-18
- [64] McClure, J. The effect of diphosphonates on heterotopic ossification in regenerating Achilles tendon of the mouse. *J Pathol*, 1983;239(4) 419-30
- [65] Michelsson JE, Videman T, Langenskiold A. Changes in bone formation during immobilization and development of experimental osteoarthritis. *Acta Orthop Scand* 1977. 48:443-49
- [66] Urist, M.R. Bone formation by autoinduction. *Science*, 1965. 150(3698) 893-9
- [67] Schneider DJ et al. The Frank Stinchfield Award. Inhibition of heterotopic ossification with radiation therapy in an animal model. *Clin Orthop Relat Res*, 1998 (355) 35-46

- [68] Zaccalini PS, Urist MR. Traumatic periosteal proliferations in rabbits. The enigma of experimental myositis ossificans traumatica. *J Trauma*. 1964 May;4:344-57.
- [69] Tannous, O. Et al. Heterotopic ossification after extremity blast amputation in a Sprague-Dawley rat animal model. *J Orthop Trauma*. 2011 25(8):506-10
- [70] Heinen J.H, Jr., Dabbs GH, Mason HA. The experimental production of ectopic cartilage and bone in the muscles of rabbits. *J Bone Surg A* 1949. 31A(4) 765-75
- [71] Shore EM, et al. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat Genet*, 2006. 38(5):525-7
- [72] Kan L et al. Transgenic mice overexpressing BMP 4 develop a fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) like phenotype. *Am J Pathol* 2004. 165(4) 1107-15
- [73] Fukuda T et al. Generation of a mouse with conditionally activated signaling through the BMP receptor, ALK2. *Genesis*, 2006 44(4) 159-67
- [74] Chakkalakal SA et al. An Acvr1 R206H knock in mouse has fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Bone Miner Res*, 2012;27(8) 1746-56
- [75] Pignolo RJ, et al. Heterozygous inactivation of Gnas in adipose-derived mesenchymal progenitor cells enhances osteoblast differentiation and promotes heterotopic ossification. *J Bone Miner Res*. 2011; 26:2647-2655
- [76] Chen M et al. Increased glucose tolerance and reduced adiposity in the absence of fasting hypoglycemia in mice with liver-specific Gs $\alpha$  deficiency. *J Clin Invest*. 2005 Nov 1; 115(11): 3217-3227
- [77] Logan M, et al. Expression of Cre Recombinase in the developing mouse limb bud driven by a Prxl enhancer. *Genesis*. 2002;33:77-80.
- [78] Yu K, et al. Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth. *Development*. 2003;130:3063-3074.
- [79] Nelson DK, Williams T. Frontonasal process-specific disruption of AP-2alpha results in postnatal midfacial hypoplasia, vascular anomalies, and nasal cavity defects. *Dev Biol*. 2004;267:72-92
- [80] Corrales JD, Blaess S, Mahoney EM, Joyner AL. The level of sonic hedgehog signaling regulates the complexity of cerebellar foliation. *Development*. 2006;133:1811-1821
- [81] Mao J, et al. A novel somatic mouse model to survey tumorigenic potential applied to the Hedgehog pathway. *Cancer research*. 2006;66:10171-10178.
- [82] Serrano RL, Yu W, Terkeltaub R. Mono allelic and bi-allelic ENPP1 deficiency promote post-injury neointimal hyperplasia associated with increased C/EBP homologous protein expression. *Arteriosclerosis* 2014 233, 493-502

- [83] Nagy A, Gerstsenstein M, Vintersten K, Behringer R. Alcian blue staining of the mouse fetal cartilaginous skeleton. Cold Spring Harb Protoc. 2009 doi: 10.1101/pdb.prot5169.
- [84] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. Methods. 2001;25:402–408
- [85] Yang Y, Topol L, Lee H, Wu J. Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation. Development. 2003;130:1003–1015
- [86] Storm EE, Kingsley DM. GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. Dev Biol. 1999;209:11–27.
- [87] Nakashima K, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell. 2002;108:17–29
- [88] Regard JB, et al. Wnt/beta-catenin signaling is differentially regulated by Galpha proteins and contributes to fibrous dysplasia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108:20101–20106
- [89] Hill TP, Spater D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. Dev Cell. 2005;8:727–738.
- [90] Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. Dev Cell. 2005;8:739–750
- [91] Hu H, et al. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. Development. 2005;132:49–60
- [92] Holmen SL, et al. Essential role of beta-catenin in postnatal bone acquisition. J Biol Chem. 2005;280:21162–21168
- [93] Logan CY, Nusse R. The wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol. 2004;20:781–810.
- [94] Keely SL, Jr, Corbin JD, Park CR. On the question of translocation of heart cAMP-dependent protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975;72:1501–1504.
- [95] Seamon K, Daly JW. Activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin does not require the guanine nucleotide regulatory protein. J Biol Chem. 1981;256:9799–9801
- [96] Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. Genes Dev. 2001;15:3059–3087
- [97] Wang B, Fallon JF, Beachy PA. Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. Cell. 2000;100:423–434

- [98] Tuson M, He M, Anderson KV. Protein kinase A acts at the basal body of the primary cilium to prevent Gli2 activation and ventralization of the mouse neural tube. *Development*. 138:4921–4930
- [99] Zhang Q, et al. Multiple Ser/Thr-rich degrons mediate the degradation of Ci/Gli by the Cul3-HIB/SPOP E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:21191–21196
- [100] Pan Y, Wang C, Wang B. Phosphorylation of Gli2 by protein kinase A is required for Gli2 processing and degradation and the Sonic Hedgehog-regulated mouse development. *Dev Biol*. 2009;326:177–189.
- [101] Taipale J, et al. Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature*. 2000;406:1005–1009
- [102] Kim J, Lee JJ, Gardner D, Beachy PA. Arsenic antagonizes the Hedgehog pathway by preventing ciliary accumulation and reducing stability of the Gli2 transcriptional effector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:13432–13437
- [103] Lauth M, Bergstrom A, Shimokawa T, Toftgard R. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:8455–8460.
- [104] Bai CB, Joyner AL. Gli1 can rescue the in vivo function of Gli2. *Development*. 2001;128:5161–5172
- [105] Joeng KS, Long F. The Gli2 transcriptional activator is a crucial effector for Ihh signaling in osteoblast development and cartilage vascularization. *Development*. 2009;136:4177–4185.
- [106] Shore EM, et al. Paternally inherited inactivating mutations of the GNAS1 gene in progressive osseous heteroplasia. *N Engl J Med*. 2002;346:99–106
- [107] Mao J, et al. A novel somatic mouse model to survey tumorigenic potential applied to the Hedgehog pathway. *Cancer Res*. 2006;66:10171–10178
- [108] Day TF, Yang Y. Wnt and hedgehog signaling pathways in bone development. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90(1):19–24
- [109] Joeng KS, Schumacher CA, Zylstra-Diegel CR, Long F, Williams BO. Lrp5 and Lrp6 redundantly control skeletal development in the mouse embryo. *Dev Biol*. 2011
- [110] Holmen SL, et al. Decreased BMD and limb deformities in mice carrying mutations in both Lrp5 and Lrp6. *J Bone Miner Res*. 2004;19:2033–2040.
- [111] de Boer J, et al. Wnt signaling inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone*. 2004;34:818–826
- [112] Cho HH, et al. Endogenous Wnt signaling promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation in human adipose derived stromal cells. *Tissue Eng*. 2006;12:111–121

- [113] Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2004;93:1210–1230.
- [114] Chen Y, et al. Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing. *PLoS Med.* 2007;4:e249.
- [115] Kim JB, et al. Bone regeneration is regulated by wnt signaling. *J Bone Miner Res.* 2007;22:1913–1923.
- [116] Cooper KL, et al. Initiation of proximal-distal patterning in the vertebrate limb by signals and growth. *Science.* 2011;332:1083–1086
- [117] Rosello-Diez A, Ros MA, Torres M. Diffusible signals, not autonomous mechanisms, determine the main proximodistal limb subdivision. *Science.* 2011;332:1086–1088
- [118] Ruoshi Xu, Khan S, Zhou T., Gao B., Zhou Y., Zhou X., Yang Y. Galpha s signaling controls intramembranous ossification during cranial bone development by regulating both Hedgehog and Wnt/beta-catenin signaling. *Bone Research* (2018)1-15
- [119] Ruoshi Xu., Hu J., Zhou X., Yang Y. Heterotopic ossification : Mechanistic insights and clinical challenges . *Bone* (2018)109:134-42
- [120] Cong Q., Xu R., Yang Y. Galpha s signaling in skeletal development , homeostasis and diseases. *Current topics in Developmental Biology*, (2019)Vol 133;281-307
- [121] Goding, J. W., Grobden, B. and Slegers, H.(2003). Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim. Biophys. Acta* **1638**, 1-19. doi:10.1016/S0925-4439(03)00058-
- [122] Goding, J. W., Terkeltaub, R., Maurice, M., Deterre, P., Sali, A. and Belli, S. I. (1998). Ecto-phosphodiesterase/pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: structure and function of the PC-1 family. *Immunol. Rev.* **161**, 11-26. doi:10.1111/j.1600-065X.1998.tb01568
- [123] Bertrand, J., Nitschke, Y., Fuerst, M., Hermann, S., Schäfers, M., Sherwood, J., Nallessio, G., Ruether, W., Rutsch, F., Dell'Accio, F. et al.(2012). Decreased levels of nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 are associated with cartilage calcification in osteoarthritis and trigger osteoarthritic changes in mice. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 1249-1253. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200892
- [124] Stefan, C., Jansen, S. and Bollen, M.(2005). NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 542-550doi:10.1016/j.tibs.2005.08.005
- [125] Ruf, N., Uhlenberg, B., Terkeltaub, R., Nürnberg, P. and Rutsch, F.(2005). The mutational spectrum of ENPP1 as arising after the analysis of 23 unrelated patients

with generalized arterial calcification of infancy (GACI). *Hum. Mutat.* **25**, 98. doi:10.1002/humu.9297

[126] Rutsch, F., Ruf, N., Vaingankar, S., Toliat, M.R., Suk, A., Höhne, W., Schauer, G., Lehmann, M., Roscioli, T., Schnabel, D. et al. (2003). Mutations in ENPP1 are associated with 'idiopathic' infantile arterial calcification. *Nat. Genet.* **34**, 379-381. doi:10.1038/ng1221

[127] Nitschke, Y. and Rutsch, F. (2012). Generalized arterial calcification of infancy and pseudoxanthoma elasticum: two sides of the same coin. *Front. Genet.* **3**, 302. doi:10.3389/fgene.2012.00302

[128] Babij, P., Roudier, M., Graves, T., Han, C.-Y. E., Chhoa, M., Li, C.-M., Juan, T., Morony, S., Grisanti, M., Li, X. et al. (2009). New variants in the Enpp1 and Ptpn6 genes cause low BMD, crystal-related arthropathy, and vascular calcification. *J Bone Miner. Res.* **24**, 1552-1564. doi:10.1359/jbmr.090417

[129] Harmey, D., Hesse, L., Narisawa, S., Johnson, K. A., Terkeltaub, R. and Millán, J. L. (2004). Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by akp2, enpp1, and ank: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *Am. J. Pathol.* **164**, 1199-1209. doi:10.1016/S0002-9440(10)63208-7

[130] Zhang, J., Dymont, N. A., Rowe, D. W., Siu, S. Y., Sundberg, J. P., Uitto, J. and Li, Q. (2016). Ectopic mineralization of cartilage and collagen-rich tendons and ligaments in Enpp1<sup>asj-2</sup> mice. *Oncotarget* **7**, 12000-12009.

[131] Lin AC, Seeto BL, Bartoszko JM, Khoury MA, Whetstone H, Ho L, Hsu C, Ali SA, Alman BA. Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis. *Nat Med.* 2009 Dec;15(12):1421-5. doi: 10.1038/nm.2055. Epub 2009 Nov 15.

[132] Kingston Kinglun Mak, Miao-Hsueh Chen, Timothy F. Day, Pao-Tien Chuang, Yingzi Yang Wnt/ $\beta$ -catenin signaling interacts differentially with Ihh signaling in controlling endochondral bone and synovial joint formation *Development* 2006 **133**: 3695-3707; doi: 10.1242/dev.02546

[133] Bai, C. B., Auerbach, W., Lee, J. S., Stephen, D. and Joyner, A. L. (2002). Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development* **129**, 4753-4761

[134] Pao-Tien Chuang & Andrew P. McMahon Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein (1999) *Nature* v. 397, pages 617-621

[135] L V Goodrich, R L Johnson, L Milenkovic, J A McMahon, and M P Scott. Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. (1996) *Genes*

- [136] Jiang J, Struhl G.(1995): Protein kinase A and hedgehog signaling in *Drosophila* limb development. *Cell*, **80**(4): 563-572
- [137] Jiang J., Hui C.C. (2008): Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell.*,**15**(6):801-812
- [138] Tuson M, He M, Anderson K.V.(2011): Protein kinase A act as the basal body of the primary cilium to prevent Gli2 activation and ventralization of the mouse neural tube. *Development* **138**(22):4921-4930
- [139] Riobo NA, and Manning DR. Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. *Biochem J.*(2007)**40**, 369-379
- [140] J.Y. Tang , T.Y. Xiao TY, Oda Y, Chang KS, Shpall E, Wu A, P.L. So, J. Hebert, D. Bikle, E.H. Jr Epstein, *Cancer Prev Res (Phila)*. **5** (2011) 744  
(<https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0285>)
- [141] A. Uhmann, H. Neimann, B. Lammering, C. Henkel, I. Hess, F. Nitzki, A. Fritsch, N. Prüfer, A. Rosenberger, C. Dullin, A. Schraepler, J. Reifenberger, S. Schweyer, T. Pietsch, F.Strutz, W. Schulz-Schaeffer, H. Hahn, *Mol Cancer Ther.* **10** (2011) 2179  
(<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0422>)
- [142] B. Linder, S. Webere, K. Dittmann, J. Adamski, H. Hahn, A. Uhmann, *J Biol Chem.* **290**(2015) 19614 (<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.646141>)
- [143] Sun W, Sanderson P.E, Zheng W.(2016): Drug combination therapy increases successful drug repositioning. *Drug Discovery Today.*, **21**(7):1189-1195
- [144] R. Siffert, *J Exp Med.* **93** (1951) 415 (PMID: 14832392).
- [145] H.C. Tenenbaum, J.N.M. Heersche, *JNCalcif Tissue Int.* **34** (1982) 76  
(<https://doi.org/10.1007/BF02411212>)
- [146] Wang Y, Zu J, DeLuca HF Identification of the Vitamin D receptor in osteoblast and chondrocytes, but not osteoclasts in mouse bone. *J Bone Miner Res.* 2014 Mar;**29**(3):685-92. doi: 10.1002/jbmr.2081

# SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO	5
2.1 Epidemiologija Heterotopne osifikacije	5
2.2 Klinička slika stečene forme HO	8
2.3 Klinička slika genetske forme HO	10
2.4 Klinički faktori rizika	14
2.4.1 Artoplastika kuka	14
2.4.2 Prelomi	14
2.4.3 Povreda kičmene moždine	14
2.4.4 Termičke povrede	15
2.5 Patologija	15
2.6 Prevencija i tretman HO	17
2.6.1 Profilaktički pristup zračenjem	18
2.6.2 Profilaktički pristup sa NSAID	18
2.6.3 Terapija primenom fizikalne terapije	19
2.6.4 Terapija hirurškim zahvatom	19
2.7 Ćelijski molekularni mehanizam heterotopne osifikacije	21
2.7.1 Ćelije prekursori HO	23
2.7.2 Lokalno mikrokruženje	25
2.7.3 Signalni putevi koji su uključeni u nastanak HO	26
2.7.3.1 BMP signalni put	26
2.7.3.2 mTOR signalni put	27
2.7.3.3 Hipoksijom indukovani faktor (HIF)	28
2.7.3.4 Receptori signalnog puta retinoidne kiseline	28
2.7.3.5 GNAS	30
2.7.3.6 Hedgehog signalni put	32
2.8 Animalni modeli	34
2.8.1 Model Ahilove tetive	34
2.8.2 Imobilizacioni model	34
2.8.3 Model sa implantom	35
2.8.4 Model operacije kuka	35
2.8.5 Model indukovane traume	36
2.8.6 Iritantan model injekcije	36
2.8.7 Modeli nasledne forme HO	37
2.8.7.1 FOP model	37
2.8.7.2 POH model	37
2.9 Razvoj buduće terapije za HO	38
3. EKSPERIMENTALNI DEO	40



3.1	Materijal i metode	40
3.1.1	Materijali	40
3.1.1.1	Hedgehog inhibitori	40
3.1.1.2	Animalni modeli i ćelijske linije	41
3.1.1.2.1	Miševi	41
3.1.1.2.2	Humani uzorci	43
3.1.1.2.3	Mišje mezenhimske stromalne ćelije	43
3.1.1.2.4	Humane ćelije koštane srži	43
3.1.1.2.5	Adeno Cre rekombinantni virus	43
3.1.1.3	Hemikalije, enzimi, anititela, medijumi za kultivaciju ćelija	
3.1.2	Metode	45
3.1.2.1	Metoda za generisanje POH fenotipa kod <i>Gas<sup>sf/f</sup></i> miša	45
3.1.2.2	Izolacija i kultivacija mišjih mezenhimskih stromalnih ćelija koštane srži	46
3.1.2.3	Izolacija, kultivacija mišjih potkožnih mezenhimskih progenitorskih ćelija	47
3.1.2.4	Izolacija i kultivacija humanih ćelija koštane srži	48
3.1.2.5	Detekcija Alkalne fosfataze (AF) biomineralnim esejom u mezenhimalnim progenitorskim ćelijama	48
3.1.2.6	Priprema i bojenje skeleta alizarin crveno/alcian plavo bojenjem	49
3.1.2.7	Von Kosa bojenje	50
3.1.2.8	Alizarin S crveno bojenje	50
3.1.2.9	Imunohistohemija	51
3.1.2.10	Kvantitativni PCR u realnom vremenu	51
3.1.2.11	GNAS PCR za genetski mišji model POH	53
3.1.2.12	In situ hibridizacija i X-gal bojenje	54
3.1.2.13	Imunobojenje	54
3.1.2.14	Kultura embionanih ćelija udova	54
3.1.2.15	Merenje nivoa cAMP	55
3.1.2.16	Statistika	55
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	56
4.1	Gubitak obe kopije <i>GNAS</i> gena rezultira u fenotipu koji oslikava POH i ispoljava skeletne anomalije ove bolesti	57
4.2	Gubitak <i>GNAS</i> promovise ektopičnu diferencijaciju osteoblasta	60
4.3	Gnas je neophodan za inhibiciju Hh signala	65
4.4	Aktivacija Hh signalnog puta je dovoljan i neophodan uslov da izazove HO	69
4.5	Gubitak ektonukleotid pirofosfatne fosfodiesteraze (ENPP1) ima za rezultat povišenu aktivnost Hh signalnog puta	76
4.6	Preusmeravanje određenih medikamenata za primenu u lečenju retke genetske bolesti- progresivne heteroplastične osifikacije	79

4.7. Kombinacija arsen trioksida, vitamina D3 i statina efikasno sprečava osteogenezu i kod normalnih (WT) BMSC	86
5. ZAKLJUČAK	93
6. LITERATURA	95

## BIOGRAFIJA AUTORA

Jelena Gvozdrenović-Jeremić (rođena Gvozdrenović) rođena je 1. Septembra 1969. godine u Beogradu. Osnovnu školu „Ćirilo i Metodije“ u Beogradu završila je sa odličnim uspehom, kao i srednju „XI Gimnaziju“-smer Mikrobiologija u Beogradu. Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, na Odseku za hemijsko i biohemijsko inženjerstvo, upisala je školske 1988/89 godine. Diplomirala je 6. Maja 1994. godine na Katedri za Biohemijsko inženjerstvo sa ocenom 10 na diplomskom radu i prosečnom ocenom tokom studija 8,70 čime je stekla zvanje inženjera biohemijskog inženjerstva i biotehnologije. U maju 1994 zapošljava se u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo kao istraživač saradnik na projektu: Proizvodnja Rekombinantnog insulina finansiranog of Ministarstva nauke Srbije.

Magistarske studije upisala je 1994/1995 godine. Magistarski rad pod nazivom: „Optimizacija parametara proizvodnje rekombinantne penicilin G amidaze u *E.coli* “ odbranila je sa ocenom 10 pod rukovodstvom prof. Dr Josipa Barasa decembra 1998.

Godine 1998. dobija poziciju istraživača na Ijova Stejt Univerzitetu gde se bavi ekspresijom i proizvodnjom rekombinantnih proteina u kvascu, bakterijama i biljkama. Projekat je bio finansiran od strane kompanije ‘Prodigene’. Od decembra 2002. godine prihvata poziciju Naučnog istraživača i Menadžera laboratorije na Wayne State University u Detroitu gde je finansirana sa projekta Nacionalnog instituta za zdravlje.

Evropskom projektu ‘3D Repertoire’ se priključuje 2006 u EMBL (European Molecular Biology Laboratory) u Hejdelbergu kao rukovodilac Fermentacione jedinice koja je odgovorna za proizvodnju rekombinantno eksprimiranih proteina u kvascu za potrebe otkrivanja kristalografske strukture proteina i interakcija protein-protein ili protein-lipid.

Godine 2009. dobija priliku da se priključi projektu na Nacionalnom Institutu za zdravlje u Vašingtonu (DC), gde provodi više od šest godina radeći istraživanja iz biologije razvitka kostiju i naslednih bolesti kostiju. Aktivno učestvuje u otkrivanju uloge Wnt i Hedgehog signalnog mehanizma i njihovim ulogama u različitim bolestima kod ljudi. Godine 2016. kao osnivač i glavni naučni rukovodilac “Nostopharma” kompanije nastavlja istraživanja u smeru otkrivanja nove terapije za patološki rast kostiju.

Školske 2016/2017 godine upisala je doktorske akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu, studijski program Biohemijsko inženjerstvo i Biotehnologija, pod mentorstvom prof. dr Ljiljane Mojovic.

## **RADOVI PROISTEKLI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE:**

### **Radovi objavljeni u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a)**

1. Regard JB, Malhotra D, Gvozdenovic-Jeremic J, Josey M, Chen M, Weinstein L, Shore E, Kaplan F, Yang Y, *Activation of Hedgehog signaling by loss of GNAS causes heterotopic ossification*, Nature Medicine (2013) 19 (11) pp.1505-1512. doi: 10.1038/nm.3314, IF(2013)=28.054, ISSN: 1078-8956.

### **Radovi objavljeni u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21)**

2. Jin Y, Cong Q, Gvozdenovic-Jeremic J, Hu J. Zhang Y, Terkeltaub R, Yang Y, *Enpp1 inhibits ectopic joint calcification and maintains articular chondrocytes by repressing Hedgehog signaling*, Development (2018) 145, doi: 10.1242/dev.164830, IF(2017)=5.413, ISSN: 0950-1991.

### **Radovi objavljeni u međunarodnom časopisu (M23)**

3. Gvozdenovic-Jeremić J, Mojović L, *Drug repositioning for a rare genetic disorder progressive osseous heteroplasia (POH)*, Genetika (2019) vol 51(1) pp. 347-355, doi:10.2298/GENSR1901357G, IF(2017)=0.392, ISSN: 0534-0012.
4. Gvozdenovic-Jeremić J, Vert-Wong K, Mojović L, *Antiosteogenic effect of Arsenic trioxide, Cholecalciferol, Lovastatin or their combination in vitro*. J. Serb.Chem Soc (2019), accepted, IF (2017)=0.392, ISSN: 0534-0012.

### **Radovi saopšteni radovi na naučnom skupu**

5. Gvozdenovic-Jeremić J, Jin Y, *Hedgehog signaling is upregulated in articular cartilage of enpp1 mutant mice*. Working Together at the Frontiers of Science and Technologies to Eradicate Cartilage Disease (2015), Gordon March 22 - 27, 2015, Galveston Texas.
6. Gvozdenovic-Jeremić J, Vert-Wong K, *Novel formulation for the treatment of HO associated with aberrant HH signaling activity* (2017), SOMOS conference, Scottsdale, Arizona, Dec 2017.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Јелена Гвозденовић-Јерemiћ

Број индекса 4035/16

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

“МЕХАНИЗАМ НАСТАНКА ХЕТЕРОТОПНЕ ОСИФИКАЦИЈЕ И КОНЦИПИРАЊЕ  
ОДГОВАРАЈЋЕГ ТРЕТМАНА”

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Јелена Гвозденовић Јеремић

Број индекса: 4035/16

Студијски програм: БИОТЕХНОЛОГИЈА

Наслов рада: “МЕХАНИЗАМ НАСТАНКА ХЕТЕРОТОПНЕ ОСИФИКАЦИЈЕ И  
КОНЦИПИРАЊЕ ОДГОВАРАЈЋЕГ ТРЕТМАНА”

Ментор Др. Љиљана Мојовић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

"МЕХАНИЗАМ НАСТАНКА ХЕТЕРОТОПНЕ ОСИФИКАЦИЈЕ И КОНЦИПИРАЊЕ ОДГОВАРАЈЋЕГ ТРЕТМАНА"

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.