

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Sanja V. Srzentić

**Molekularni markeri poremećaja
koagulacije, inflamacije, apoptoze,
formiranja i remodelovanja koštanog
tkiva kod Leg-Kalve-Pertesove bolesti**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Sanja V. Srzentić

**Molecular markers of impaired
coagulation, inflammation, apoptosis,
formation and bone remodeling
processes in Legg-Calve-Perthes
disease**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

MENTORI:

dr Gordana Nikčević, viši naučni saradnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

dr Sonja Pavlović, naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Gordana Nikčević, viši naučni saradnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

dr Sonja Pavlović, naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

dr Dušanka Savić Pavićević, vanredni profesor

Biološki fakultet,
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____ 2015. godine

Zahvalnica

Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu.

*Najveću zahvalnost dugujem svojim mentorima, **dr Sonji Pavlović** i **dr Gordani Nikčević**.*

*Zahvaljujem se **dr Sonji Pavlović** na ukazanom poverenju i prilici da se bavim naukom u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu. Hvala Vam što ste mi omogućili da realizujem svoju doktorsku disertaciju, na motivaciji, podršci, razumevanju i svemu čemu ste me naučili.*

*Zahvaljujem se mom neposrednom mentoru, **dr Gordani Nikčević** na ogromnoj motivaciji, pomoći i podršci koju mi je pružila prilikom izrade i pisanja ove teze kao i spremnosti da svoje znanje i iskustvo nesebično podeli sa mnom.*

***Dr Dušanki Savić Pavićević** sam zahvalna na korisnim savetima koje mi je davala tokom doktorskih studija, kao i prilikom pisanja teze, na ukazanom strpljenju i na oceni ovog rada.*

Kolegama iz Laboratorije za molekularnu biomedicinu se zahvaljujem na pomoći i podršci tokom rada, na korisnim savetima i spremnosti da podele svoje iskustvo sa mnom. Imala sam sreću da na radnom mestu steknem ne samo divne kolege, već i iskrene prijatelje, koji su bili moja podrška ne samo kada bi eksperimenti krenuli naopako već i u privatnom životu.

Veliko hvala i svim kolegama sa Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, jer su uvek bili spremni da mi pomognu i posavetuju me.

Molekularni markeri poremećaja koagulacije, inflamacije, apoptoze, formiranja i remodelovanja koštanog tkiva kod Leg-Kalve-Pertesove bolesti

REZIME

Leg-Kalve-Pertesova (LKP) bolest je idiopatska avaskularna osteonekroza epifize femura. Etiologija ove bolesti je nepoznata. Uprkos 100 godina istraživanja mehanizma njene patofiziologije i detaljnog opisivanja kliničkih i radioloških karakteristika, LKP bolest i dalje predstavlja jednu od najkontroverznijih bolesti u oblasti pedijatrijske ortopedije. Smatra se da je ova bolest multifaktorijalna, izazvana kombinacijom sredinskih i genetičkih faktora, ali se o genetičkim faktorima koji doprinose njenom razvoju vrlo malo zna. Glavni cilj ovog istraživanja je bio da se analiziraju molekularni markeri procesa koagulacije, inflamacije, apoptoze, formiranja i remodelovanja koštanog tkiva u LKP bolesti. Rezultati ovog istraživanja mogu doprineti identifikovanju prediktivnih genetičkih i molekularnih markera, što bi pomoglo u postavljanju dijagnoze i razvoju novih terapijskih pristupa, koji bi omogućili skraćenje perioda tokom kojeg je glava femura podložna deformitetu.

Koagulacioni faktori su bili prvi genetički faktori za koje se pretpostavilo da bi mogli doprineti razvoju LKP bolesti, međutim dobijeni su kontroverzni rezultati. Zbog toga je jedan od ciljeva ovog istraživanja bio analiza asocijacije varijanti gena čiji produkti učestvuju u procesu koagulacije: *Faktor V* G1691A (Leiden mutacija) (rs6025), *Faktor II* G20210A (rs1799963), *MTHFR* C677T (rs1801133) i *PAI-1* 4G/5G (rs1799889) sa pojavom LKP bolesti kod pacijenata iz Srbije. Navedene genske varijante su analizirane PCR-RFLP metodom i direktnim sekvenciranjem PCR

fragmenta. Poređenjem učestalosti genotipova i alela navedenih genskih varijanti između grupe pacijenata i kontrolne grupe nije pronađena statistički značajna razlika.

Pokazano je da je inflamacija prisutna tokom razvoja LKP bolesti, ali još uvek se vrlo malo zna o njenom uticaju na patofiziologiju ove bolesti. Do sada nisu rađena istraživanja o uticaju varijanti gena čiji produkti učestvuju u procesu inflamacije, na razvoj LKP bolesti. S obzirom na to da je dobro poznato da inflamacija utiče na remodelovanje kostiju, pretpostavljeno je da bi ona mogla doprineti patološkoj neravnoteži procesa resorpcije i formiranja koštanog tkiva, koja je prisutna tokom razvoja LKP bolesti. Potencijalni uticaj poremećaja inflamatornog odgovora je ispitan analizom asocijacije genskih varijanti markera inflamacije: *IL-6* [G-174C (rs1800795), G-597A (rs1800797)]; *IL-3* [C-16T (rs31480), C132T (rs40401)]; *TNF- α* G-308A (rs1800629) i *TLR4* [Asp299Gly (rs4986790), Thr399Ile (rs4986791)] sa pojavom LKP bolesti. Navedene genske varijante su analizirane PCR-RFLP metodom i direktnim sekvenciranjem PCR fragmenta. Takođe, analiziran je nivo ekspresije *IL-6* i *TNF- α* gena qRT-PCR metodom u našoj grupi pacijenata.

Najznačajniji rezultat ovog dela istraživanja je da su nosioci heterozigotnog genotipa *IL-6* -174GC/-597GA bili značajno manje zastupljeni u grupi pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu i da je rizik za nastanak LKP bolesti 2.49 puta manji kod nosilaca navedenog genotipa (OR=2.49, 95% CI=1.00–6.21). U skladu sa ovim, grupa LKP pacijenata nije bila u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži za analizirane varijante *IL-6* gena, jer je bilo više homozigotnih a manje heterozigotnih nosilaca.

Sa druge strane, poređenje učestalosti genotipova i alela u grupi pacijenata sa kontrolnom grupom nije pokazalo statistički značajnu razliku za *IL-3*, *TNF- α* i *TLR4* analizirane genske varijante. Takođe, nije pronađena statistički značajna razlika nivoa ekspresije ni *IL-6* niti *TNF- α* gena pri poređenju grupe pacijenata sa kontrolnom grupom.

S obzirom da LKP bolest spada u grupu retkih bolesti, sa ograničenim brojem pacijenata dijagnostikovanih u Srbiji, relativno mala grupa pacijenata je bila dostupna za studije genetičkih asocijacija. Stoga smatramo da naše rezultate dobijene analizom zastupljenosti genskih varijanti kod LKP pacijenata treba interpretirati sa oprezom i kao

preliminarne. Ipak, istraživanja na tzv. maloj skali, kao što je ovo, mogu biti korisna za meta-analize i za planiranje budućih istraživanja, s obzirom da daju informacije o relevantnim kliničkim podacima i potrebnom broju uzoraka za istraživanja na velikoj skali. Mada su naši rezultati dobijeni analizom relativno malog broja uzoraka, ona donose novi pogled na LKP bolest i mogu uticati na pravce budućih istraživanja i bolje razumevanje ove bolesti. Zbog svega navedenog, smatramo da bi navedene analize trebalo ponoviti na većim grupama LKP pacijenata.

Poznato je da poremećaj procesa apoptoze može dovesti do neadekvatnog imunskog odgovora kao i do patološkog procesa remodelovanja koštanog tkiva. Uprkos ovim saznanjima, proces apoptoze do sada nije ispitivan u LKP bolesti. Jedan od ciljeva ovog rada je bio da se ispituju glavni medijatori apoptoze kao potencijalni uzročnici ove bolesti. Analizirali smo nivoe ekspresije markera unutrašnjeg: *Bax*, *Bcl-2* i *Bcl2L12*, i spoljašnjeg: *Fas* i *FasL* apoptotskog puta qRT-PCR metodom kod LKP pacijenata.

Naši rezultati su pokazali značajno povišen nivo ekspresije proapoptotskog faktora *Bax*. Što je još bitnije, odnos nivoa ekspresije *Bax* / *Bcl-2* gena, za koji je poznato da određuje apoptotski status ćelije, je bio značajno povišen u grupi pacijenata. Ovaj rezultat ukazuje da poremećaj apoptoze može doprineti neravnoteži procesa remodelovanja koštanog tkiva kod LKP pacijenata. S obzirom na to, apoptotski faktori bi mogli postati markeri za procenu statusa i prognoze ove bolesti, kao i potencijalne mete za ciljanu terapiju.

Drugi deo ovog rada je bio fokusiran na istraživanja vezana za terapijski kapacitet mezenhimskih matičnih ćelija (MMĆ), koje se mogu diferencirati u veliki broj ćelijskih tipova. Upotreba MMĆ u terapiji avaskularne osteonekroze i drugih bolesti skeletnog sistema je pokazala vrlo dobre rezultate. MMĆ se mogu izolovati iz mnogobrojnih organa, ali adipozno tkivo je vrlo privlačan izvor, jer je lako pristupačno i iz njega se može izolovati veliki broj ovih ćelija. Pored toga, MMĆ su imunoprivilegovane, imaju snažan imunosupresorni efekat koji doprinosi reparaciji tkiva i, što je izuzetno bitno, ne dovode do formiranja teratoma. Navedene osobine čine ove ćelije vrlo pogodnim kandidatima za upotrebu u regenerativnoj i genskoj terapiji, posebno kada su u pitanju bolesti na čiji razvoj značajno utiče proces inflamacije.

Takođe, pokazano je da se terapijski kapacitet ovih ćelija može značajno povećati kada se u njih uvede specifični transgen.

Cilj ovog dela istraživanja je bio gajenje i transfekcija MMĆ izolovanih iz adipoznog tkiva psa. U ovoj studiji su korišćena dva transfekciona reagensa, čija dejstva se zasnivaju na različitim mehanizmima, i optimizovani su uslovi za tranzijentnu transfekciju MMĆ. Takođe, primenom optimizovanih uslova, pokazana je uspešna ekspresija humanog antiinflamatornog citokina IL-10 sa plazmidnog vektora transfekovanog u MMĆ psa. Ovime su ostvareni uslovi koji omogućavaju dalja istraživanja koja se odnose na poboljšanje ćelijske terapije i ciljane dostave različitih bioloških agenasa na obolela mesta.

Ključne reči: Leg-Kalve-Pertesova bolest, varijante gena, koagulacioni faktori, inflamacija, apoptoza, remodelovanje koštanog tkiva, mezenhimske matične ćelije, tranzijentna transfekcija

Naučna oblast: Molekularna biologija eukariota

Uža naučna oblast: Molekularna genetika i ćelijska terapija

UDK broj: 577.21: [616.71 – 007.1 : 575.22] (043.3)

**Molecular markers of impaired coagulation, inflammation,
apoptosis, formation and bone remodeling processes in
Legg-Calve-Perthes disease**

ABSTRACT

Legg-Calve-Perthes (LCP) disease is the idiopathic avascular osteonecrosis of the hip in children, with an unknown etiology. Despite nearly 100 years of detailed characterization of its clinical and radiological features, as well as a research devoted to the pathophysiology of this disease, LCP disease still remains one of the most controversial conditions in pediatric orthopedics. The prevailing view is that LCP disease is a multifactorial, caused by a combination of environmental and genetic factors, but the contribution of genetic factors remains largely unknown. The main objective of this study was to analyse the molecular markers of coagulation, inflammation, and apoptosis processes, as well as formation and bone remodeling in LCP disease. The obtained knowledge could contribute to the identification of the predictive genetic and molecular markers that would help in the diagnosis and development of new therapeutic approaches that would shorten the period during which the femoral head is susceptible to deformation.

Coagulation factors were the first genetic factors suspected to have a role in the pathogenesis of this disease, but studies have shown inconsistent results. For this reason, one of the aims of this study was to analyse the association of variants of genes involved in coagulation: *FV G1691A* (Leiden mutation) (rs6025), *FII G20210A* (rs1799963), *MTHFR C677T* (rs1801133) and *PAI-1 4G/5G* (rs1799889), with LCP disease, in a patient group from Serbia. These genetic variants were determined by PCR-RFLP and direct sequencing methods. When genotype and allele frequencies of

these genetic variants were compared among patient and control groups, no significant differences were observed.

Inflammation has been noted to be present during development of LCP disease, but its role in the pathogenesis of this disease has not been studied extensively. Also, genetic studies related to inflammation haven't been performed in LCP disease so far. Since it is well known that inflammation influences bone remodeling, we assumed it could contribute to the pathological uncoupling of bone resorption and formation, which occurs during the development of this disease. The potential contribution of impaired inflammation processes on LCP disease has been assessed by analysing the association of variants in immune response genes: *IL-6* [G-174C (rs1800795), G-597A (rs1800797)], *IL-3* [C-16T (rs31480), C132T (rs40401)], *TNF- α* G-308A (rs1800629) and *TLR4* [Asp299Gly (rs4986790), Thr399Ile (rs4986791)]. These genetic variants were determined by PCR-RFLP and direct sequencing methods. Also, we analysed the level of mRNA of *IL-6* and *TNF- α* genes, by qRT-PCR technique, in our group of patients.

The main result of this part of the study is that a statistically significant decrease of heterozygote subjects for *IL-6* G-174C/G-597A was found in the LCP patient group in comparison to controls. Carriers of this *IL-6* heterozygote genotype have a 2.49 fold decreased risk of developing LCP disease (OR=2.49, 95% CI=1.00–6.21). In line with this was the finding that the patient group for analysed variant of *IL-6* gene wasn't in Hardy-Weinberg equilibrium since there were more homozygotes and less heterozygotes observed than expected.

On the other hand, no statistically significant differences were found between patient and control groups for *IL-3*, *TNF- α* or *TLR4* analysed gene variants. Also, the comparison of the expression level of *IL-6* and *TNF- α* between patient and control groups didn't show any significant difference.

Since LCP disease is a rare disease with a limited number of patients diagnosed in Serbia, a relatively small group of patients was studied for genetic associative study and caution in interpretation of our findings is recommended. Thus, results obtained from analyses of frequencies of genetic variants in our group of patients should be

considered as preliminary. However, small scale studies, like this one, may be useful for meta-analyses or for planning future investigations providing information for large scale studies concerning sample size and relevant clinical information. The results of our study, although conducted on small sample size, might be useful for new research directions concerning better understanding of LCP disease. Based on our findings we propose the replication of these analyses in larger groups of LCP patients.

It is known that apoptosis plays an important role in both, the inflammatory process and in the development of pathological skeletal conditions, but none of the studies on LCP disease have questioned this mechanism so far. One of the aims of this study was to analyse major mediators involved in the apoptotic processes, as possible causative factors of LCP disease. We analysed the mRNA level of genes involved in the inner apoptotic pathway: *Bax*, *Bcl-2* and *Bcl2L12*, and the extrinsic apoptotic pathway: *Fas* and *FasL*, by qRT-PCR technique. Our results showed a significantly increased level of expression of proapoptotic factor *Bax*, and more importantly, a significantly higher *Bax* / *Bcl-2* ratio, which is predictive of cell fate, in the patient group. These results indicate that apoptosis could be one of the factors contributing to the lack of a balanced bone remodeling process in LCP patients. Thus, apoptotic factors may become the reliable biomarkers for the evaluation of the status or prognosis of LCP disease, as well as a potential targets for therapy.

The other part of this study was focused on research related to the therapeutic potential of mesenchymal stem cells (MSC), which have the ability to differentiate in many cell types. The use of MSC in therapy of avascular osteonecrosis and other diseases of the skeletal system has recently been regarded as a promising new approach. MSC could be isolated from many organs, but adipose tissue is very attractive, since it is an easily accessible abundant source of these cells. In addition, MSC are immunoprivileged, exhibit intense immunosuppressive activity that contributes to the reparative process and, what is very important, they show no detectable teratoma formation. These characteristics make them very good candidates for use in regenerative and gene therapy, especially for diseases in whose development inflammation plays important role. The therapeutic potential of these cells could be enhanced by genetic modifications which would lead to the expression of selected therapeutic transgenes.

The aim of this part of the study was to cultivate and transfect MSC isolated from canine adipose tissue. We used two transfection reagents, which have different mechanisms of action, and optimized conditions for the transient transfection of these cells. Also, by applying optimized conditions, we showed the successful expression of the human antiinflammatory cytokine IL-10 from the transiently introduced plasmid DNA vector into canine MSC. The results of this research on engineered MSC open the possibility for future studies related to the improvement of cell-based therapy and the targeted delivery of various biological agents to disease sites.

Keywords: Legg-Calve-Perthes disease, gene variants, coagulation factors, inflammation, apoptosis, bone remodeling, mesenchymal stem cells, transient transfection

Research area: Molecular biology of eukaryotes

Area of special interest: Molecular genetics and cell therapy

UDC number: 577.21: [616.71 – 007.1 : 575.22] (043.3)

SADRŽAJ

UVOD	1
LEG-KALVE-PERTESOVA BOLEST	2
<i>Patofiziologija, genetičke predispozicije i terapija LKP bolesti</i>	3
<i>Genetičke predispozicije za razvoj LKP bolesti</i>	5
POREMEĆAJI KOAGULACIJE I LKP BOLEST	6
<i>Hemostaza i hiperkoagulacija</i>	6
<i>Nasledni faktori rizika za trombofiliju</i>	8
INFLAMACIJA U LKP BOLESTI	12
<i>Osteoimunologija</i>	12
<i>Koštani makrofazi - OsteoMaks</i>	17
APOPTOZA U OSTEONEKROZI	18
<i>Unutrašnji apoptotski put</i>	18
<i>BAX i BCL-2</i>	19
<i>BCL2L12</i>	20
<i>Spoljašnji apoptotski put</i>	21
POTENCIJALNA UPOTREBA MEZENHIMSKIH MATIČNIH ČELIJA U LEČENJU BOLESTI SKELETNOG SISTEMA	24
<i>Osobine i podela matičnih ćelija</i>	24
<i>Osobine i poreklo mezenhimskih matičnih ćelija</i>	25
<i>Terapeutski kapacitet MMC</i>	27
<i>Potencijalna upotreba citokina IL-10 u ex vivo genskoj terapiji</i>	31
CILJEVI	33
MATERIJAL I METODE	36
<i>BIOLOŠKI MATERIJAL</i>	37
<i>Ispitanici</i>	37
<i>Ćelijske linije</i>	38
<i>Bakterijski soj</i>	38

<i>Plazmidni vektori</i>	38
METODE KORIŠĆENE ZA GENOTIPIZACIJU	38
<i>Izolacija DNK iz periferne krvi</i>	39
<i>Analiza DNK na agaroznom gelu</i>	39
<i>Identifikacija varijanti gena FV, FII, MTHFR, IL-6, TNF-α i TLR4</i>	40
<i>Identifikacija varijanti PAI-1 i IL-3 gena</i>	43
METODE KORIŠĆENE ZA ANALIZU NIVOVA EKSPRESIJE GENA	45
<i>Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi</i>	46
<i>Izolacija RNK iz MNČPK</i>	46
<i>Reverzna transkripcija</i>	47
<i>Kvantifikacija ekspresije gena qRT- PCR metodom</i>	49
UMNOŽAVANJE PLAZMIDA U BAKTERIJAMA	52
<i>Kultivisanje bakterija</i>	52
<i>Pripremanje E. Coli DH5α kompetentnih ćelija</i>	52
<i>Transformacija E. Coli DH5α kompetentnih ćelija</i>	53
<i>Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali</i>	54
<i>Izolovanje plazmidne DNK na velikoj skali</i>	54
<i>Čuvanje transformanata</i>	55
KULTIVISANJE ĆELIJSKIH LINIJA	56
<i>Kultivisanje HeLa ćelija</i>	56
<i>Izolacija, kultivisanje i diferencijacija MMĆ iz adipoznog tkiva psa</i>	57
<i>Izolacija MMĆ iz adipoznog tkiva</i>	57
<i>Kultivisanje MMĆ iz adipoznog tkiva psa</i>	58
<i>Osteogena diferencijacija MMĆ iz adipoznog tkiva psa</i>	58
<i>Bojenje Alizarin crvenom bojom</i>	59
<i>Hondrogena diferencijacija MMĆ iz adipoznog tkiva psa</i>	59
<i>Bojenje Alcian plavom bojom</i>	60
<i>Zamrzavanje i odmrzavanje adherentnih ćelija gajenih u kulturi</i>	61
<i>Tranzijentna transfekcija ćelija u kulturi</i>	62

<i>Tranzijentna transfekcija Lipofectamine 2000 reagensom</i>	62
<i>Tranzijentna transfekcija GeneCellin reagensom</i>	63
<i>Esej In situ β-galaktozidaznog bojenja</i>	64
<i>Merenje sekretovanog IL-10 nakon transfekcije MMĆ ELISA metodom</i>	65
STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	66
REZULTATI	67
ANALIZA ASOCIJACIJE GENSKIH VARIJANTI KOAGULACIONIH FAKTORA I MARKERA INFLAMACIJE SA LKP BOLEŠĆU	68
<i>Analiza asocijacije genskih varijanti koagulacionih faktora sa pojavom LKP bolesti</i>	68
<i>Analiza asocijacije genskih varijanti koagulacionih faktora i uzrasta LKP pacijenata kada se bolest javila</i>	69
<i>Analiza asocijacije genskih varijanti markera inflamacije sa pojavom LKP bolesti</i>	72
<i>Analiza asocijacije genskih varijanti markera inflamacije i uzrasta LKP pacijenata kada se bolest javila</i>	75
ISPITIVANJE EKSPRESIJE GENA KOJI UČESTVUJU U PROCESU INFLAMACIJE I APOPTOZE KOD LKP PACIJENATA	77
<i>Karakteristike pacijenata na čijim uzorcima su rađene analize ekspresije gena</i>	77
<i>Stratifikacija pacijenata za analize ekspresije gena</i>	78
<i>Ekspresija markera inflamacije kod LKP pacijenata</i>	78
<i>Ekspresija markera apoptoze kod LKP pacijenata</i>	80
<i>Ekspresija gena unutrašnjeg apoptotskog puta kod LKP pacijenata</i>	80
<i>Ekspresija gena spoljašnjeg apoptotskog puta kod LKP pacijenata</i>	82
IZOLACIJA, DIFERENCIJACIJA I TRANSFEKCIJA MEZENHIMSKIH MATIČNIH ĆELIJA	83
<i>Izolacija MMĆ iz adipoznog tkiva</i>	83
<i>Diferencijacija MMĆ adipoznog tkiva ka osteogenoj i hondrogenoj ćelijskoj liniji</i>	84
<i>Osteogena diferencijacija MMĆ izolovanih iz adipoznog tkiva psa</i>	84
<i>Hondrogena diferencijacija MMĆ izolovanih iz adipoznog tkiva psa</i>	85
<i>Optimizacija tranzijentne transfekcije MMĆ iz adipoznog tkiva</i>	86
<i>Uticao procesa zamrzavanja/odmrzavanja MMĆ iz adipoznog tkiva na njihovu morfologiju i proliferativni kapacitet</i>	90
<i>Uticao procesa zamrzavanja/odmrzavanja MMĆ iz adipoznog tkiva na efikasnost transfekcije</i>	90

<i>Tranzijentna transfekcija MMĆ plazmidom koji nosi gen za humani IL-10.....</i>	<i>91</i>
DISKUSIJA	93
<i>UTICAJ GENSKIH VARIJANTI KOAGULACIONIH FAKTORA NA POJAVU I RAZVOJ LKP BOLESTI</i>	<i>94</i>
<i>UTICAJ INFLAMACIJE NA LKP BOLEST.....</i>	<i>97</i>
<i>Asocijacija genskih varijanti markera inflamacije i LKP bolesti</i>	<i>97</i>
<i>Nivo ekspresije markera inflamacije kod LKP pacijenata.....</i>	<i>101</i>
<i>APOPTOZA KOD LKP PACIJENATA.....</i>	<i>104</i>
<i>IZOLACIJA, DIFERENCIJACIJA I TRANSFEKCIJA MEZENHIMSKIH MATIČNIH ČELIJA</i>	<i>107</i>
<i>Izolacija i diferencijacija MMĆ.....</i>	<i>107</i>
<i>Transfekcija MMĆ.....</i>	<i>108</i>
ZAKLJUČCI.....	112
LITERATURA.....	115

UVOD

LEG-KALVE-PERTESOVA BOLEST

Leg-Kalve-Pertesova bolest (LKP) je idiopatska avaskularna osteonekroza epifize femura u razvoju koja se javlja kod dece starosti od dve do 14. godina (Kim 2012). To je retka bolest čija incidenca značajno varira u različitim delovima sveta, od 1/250000 u Hong Kongu i 1/18000 u Velikoj Britaniji, do 1/3500 na Farskim Ostrvima (www.orpha.net, 24. april. 2015. godine). Po podacima iz sistematskog revijskog rada o epidemiologiji i demografiji LKP bolesti, koji je obuhvatio 144 publikacije, objavljenog 2011. godine, prosečna starost pacijenata kada se bolest javlja je 6.5 godina, a dečaci oboljevaju u proseku 4.4 puta češće nego devojčice. Bolest je u 90% slučajeva unilateralna i zastupljenost leve i desne strane tela su u proseku podjednake (Loder and Skopelja 2011).

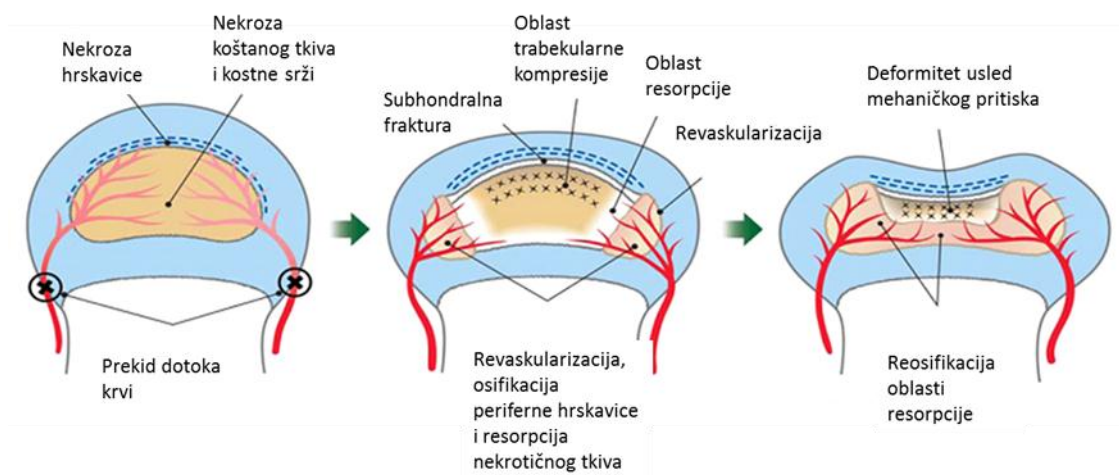
Ovu bolest su prvi put opisala, skoro istovremeno 1910. godine, nezavisno tri lekara: *G.C. Perthes* u Nemačkoj, *A.T. Legg* u Sjedinjenim Američkim Državama i *J. Calvé* u Francuskoj. Uprkos 100 godina istraživanja mehanizma njene patofiziologije i detaljne karakterizacije kliničkih i radioloških osobina, njena etiologija je i dalje nejasna (Nelitz, Lippacher et al. 2009). LKP bolest danas predstavlja jednu od najkontroverznijih bolesti u oblasti pedijatrijske ortopedije. Preovladava mišljenje da je ova bolest multifaktorijalna, izazvana kombinacijom sredinskih i genetičkih faktora.

Bitno je istaći da incidenca ove bolesti značajno varira među državama, gradovima, čak i među malim lokalnim oblastima, kao i etničkim grupama (Loder and Skopelja 2011, Perry and Hall 2011). Pored toga, zapaženo je da se bolest češće javlja kod dece iz nižih socioekonomskih klasa. U više studija je potvrđena asocijacija između zaostalog sazrevanja skeleta kod dece i LKP bolesti (Loder and Skopelja 2011). Pretpostavlja se da postoji veliki broj mogućih uzroka koji dovode do razvoja ove bolesti, kao što su repetitivne mikrotraume, inflamacija, vaskularna insuficijencija, trombofilija, izloženost duvanskom dimu, pušenje majke tokom trudnoće, mutacije u genu za kolagen tipa 2 (*COL2A1*), hiperaktivnost kod dece, poremećaj nivoa faktora

rasta sličnom insulinu – 3 (Loder, Schwartz et al. 1993, Matsumoto, Enomoto et al. 1998, Bahmanyar, Montgomery et al. 2008, Loder and Skopelja 2011, Kim 2012).

Patofiziologija, genetičke predispozicije i terapija LKP bolesti

Mada patofiziologija LKP bolesti i dalje nije potpuno jasna, na osnovu snimaka magnetnom rezonancom i rendgen aparatom, kao i na osnovu istraživanja na životinjskim model sistemima, opisane su faze razvoja ove bolesti: (1) sinovitis, (2) avaskularna, (3) fragmentaciona, (4) reosifikaciona i (5) rezidualna (Loder and Skopelja 2011) (Slika1).



Slika 1. Šematski prikaz patofizioloških promena u glavi femura tokom LKP bolesti. Preuzeto i modifikovano iz Kim 2010 (Kim 2010).

Bolest počinje sinovitisom, upalom sinovijalne membrane, koja traje nekoliko nedelja i praćena je bolom (Vukasinovic, Vucetic et al. 2008, Loder and Skopelja 2011). Nakon toga sledi avaskularna (inicijalna, kondenzaciona) faza, u kojoj dolazi do avaskularne nekroze koštanog tkiva, dok hrskavica zgloba nastavlja da raste, jer prima nutritivne komponente iz sinovijalne tečnosti, usled čega dolazi do kolapsa glave femura. Ovaj period traje šest do 12 meseci (Vukasinovic, Vucetic et al. 2008, Little and Kim 2011). Tokom fragmentacione (resorptivne) faze osteoklasti resorbuju nekrotično tkivo, ali ovaj proces nije odmah praćen osifikacijom kao u procesu normalnog remodelovanja kostiju. Stoga se smatra da je bolji naziv za ovu fazu - resorptivna (Little

and Kim 2011, Kim 2012). Karakteristika ove faze je prekomerna resorpcija, odnosno neuravnoteženost procesa formiranja koštanog tkiva i resorpcije, zbog čega glava femura postaje meka i podložna deformitetu usled mehaničkog pritiska (Little and Kim 2011, Kim 2012). Fragmentaciona faza traje oko godinu dana i u tom periodu se najčešće pojavljuje deformacija kuka (Little and Kim 2011). Zatim sledi reosifikaciona (restitucionna) faza, koja može trajati od tri do pet godina, u kojoj konačno dolazi do reosifikacije, odnosno formiranja novog koštanog tkiva (Kim and Herring 2011, Little and Kim 2011). Međutim, neusklađenost resorpcije i formiranja koštanog tkiva tokom fragmentacione faze čini glavu femura podložnom deformitetu usled mehaničkog pritiska, te ona posle reosifikacione faze ima izmenjen oblik (Little and Kim 2011). Postoje tri klasifikaciona sistema za određivanje prognoze LKP bolesti na osnovu radiografskih snimaka tokom fragmentacione faze. To su klasifikacija po Kateralu (*Catterall*), Salter-Tomsonu (*Salter-Thompson*) i Heringu (eng. *Herring lateral pillar*). Klasifikacija po Kateralu ima četiri kategorije (I, II, III, IV), po Salter-Tomsonu ima dve (A i B) a po Heringu četiri (A, B, B/C, C). U poslednje vreme se najčešće upotrebljava klasifikacija po Heringu (Kim and Herring 2011).

Istraživanja su pokazala da uzrast deteta kada se bolest javila značajno utiče na prognozu i da se mlađa deca brže i lakše oporavljaju. Pacijenti kod kojih se bolest javila pre šeste godine imaju bolju prognozu i u 80% slučajeva imaju dobre krajnje rezultate (Rosenfeld, Herring et al. 2007).

LKP bolest dovodi do trajnog deformiteta obolelog kuka, osteoartritisa i potrebe za ugradnjom veštačkog kuka. Zbog toga je cilj terapije LKP bolesti da se maksimalno smanji deformitet kuka koji nastaje tokom bolesti (Kim 2010). Bitno je istaći da neusklađenost resorpcije i formiranja koštanog tkiva čini da u glavi femura dominira hrskavičavo tkivo, što je čini podložnom deformitetu usled mehaničkog pritiska (Little and Kim 2011), te je zbog toga potrebno razviti terapijske pristupe koji bi skratili period tokom koga je oboleli kuk podložan deformitetu (Kim 2012).

Genetičke predispozicije za razvoj LKP bolesti

Kada su u pitanju genetičke predispozicije za razvoj ove bolesti, u mnogim studijama je prijavljena pozitivna porodična anamneza. Takođe, prijavljeno je i da se u nekim porodicama LKP bolest javljala u nekoliko generacija, kao i kod monozigotnih i dizigotnih blizanaca (Loder and Skopelja 2011).

Kod familijarnih slučajeva LKP bolesti u Japanu i Kini detektovano je prisustvo genske varijante G1170A u genu za kolagen tipa II (*COL2A1*) (Miyamoto, Matsuda et al. 2007, Su, Li et al. 2008), koja dovodi do zamene aminokiseline glicina serinom (Gli1170Ser). Moguće je da ova promena remeti strukturu kolagena i na taj način dovodi do slabljenja hrskavice, usled čega dolazi do povećanog pritiska na krvne sudove u njoj (Kim 2010). Nakon otkrića G1170A *COL2A1* genske varijante kod naslednih slučajeva u Aziji, analizirano je prisustvo te varijante u velikoj grupi sporadičnih slučajeva LKP bolesti, međutim, ona nije detektovana ni kod jednog pacijenta (Kenet, Ezra et al. 2008).

Iako je etiologija LKP bolesti i dalje nejasna, smatra se da je inicijalni događaj u razvoju ove bolesti ishemija u epifizi femura (Kim 2012). Zbog toga se pretpostavlja da bi razvoju ove bolesti mogli doprineti poremećaji koagulacije. *Glueck* i saradnici su 1994. godine ukazali na moguću povezanost LKP bolesti i trombofilije i hipofibrinolize. Ta studija je obuhvatila 8 pacijenata, od kojih je za 4 pokazano da imaju trombofiliju a za jednog da ima hipofibrinolizu (Glueck, Glueck et al. 1994). Nakon ove studije je usledio veliki broj istraživanja koja su se bavila uticajem poremećaja koagulacije na razvoj LKP bolesti. Najčešće su ispitivani nivoi proteina C i S, lipoprotein, antitrombin i varijante gena za Faktor V, protrombin (Faktor II), 5, 10 – metiltetrahidrofolat reduktazu (*MTHFR*) i β fibrinogen (Loder and Skopelja 2011). Rezultati ovih studija su bili nekonzistentni, pa je uticaj poremećaja koagulacije na razvoj LKP bolesti i dalje nejasan i zahteva dalje proučavanje.

Bitno je istaći da je inflamacija prisutna tokom razvoja LKP bolesti i da je moguće da ona doprinosi neravnoteži procesa remodelovanja, s obzirom na to da je poznato da faktori inflamacije utiču na diferencijaciju i funkciju osteoblasta i osteoklasta. Do sada nisu rađene studije o povezanosti varijanti gena uključenih u

navedene procese i ove bolesti, pa je jedan od ciljeva ovog rada bio da se, osim ranije ispitivanih varijanti gena koji učestvuju u procesu koagulacije, ispituju i genetički faktori koji učestvuju u inflamaciji kod LKP pacijenata.

POREMEĆAJI KOAGULACIJE I LKP BOLEST

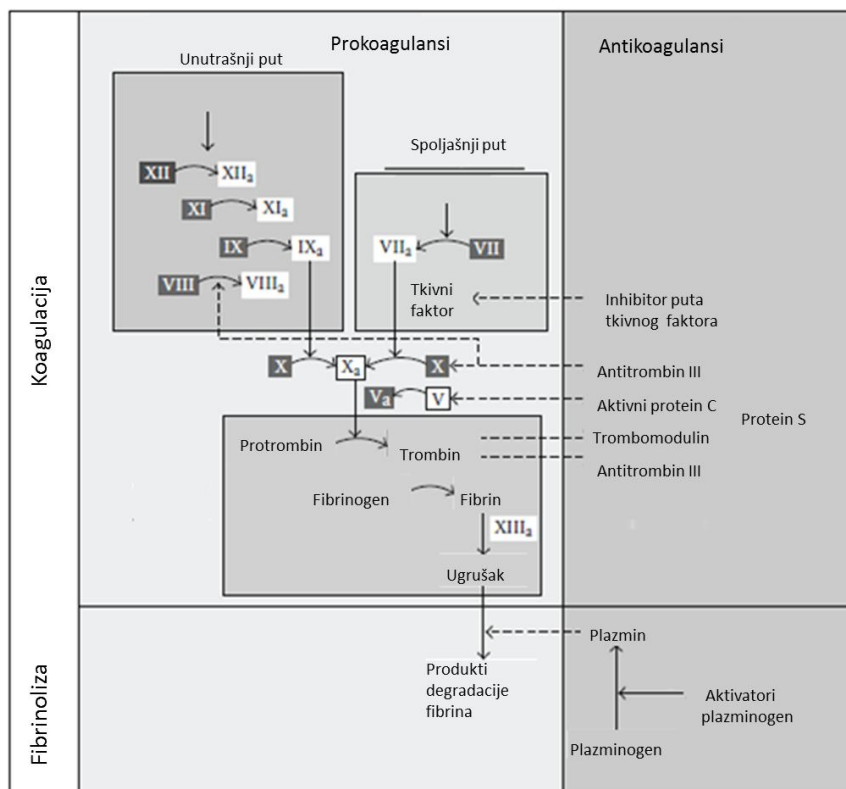
Kao što je ranije navedeno, smatra se da je inicijalni događaj koji dovodi do pojave LKP bolesti avaskularizacija epifize femura. S obzirom na to da je pokazano da na pojavu adultnih osteonekroza značajan uticaj ima trombofilija, pretpostavljeno je da bi ovi poremećaji mogli biti uzrok LKP bolesti (Glueck, Glueck et al. 1994). Pored toga, pokazano je da, promene koje se dešavaju u oboleloj glavi femura kod LKP pacijenata odgovaraju onima koje se dešavaju kod eksperimentalnih životinja kojima je hirurškim putem onemogućen dotok krvi u ovaj deo femura (Liu and Ho 1991, Kim 2012).

Hemostaza i hiperkoagulacija

Normalna hemostaza se postiže delikatnom ravnotežom protrombinskih i antitrombinskih procesa, u koje su uključene ćelijske komponente (ćelije krvnih sudova, trombociti) i solubilni proteini plazme (koagulacioni faktori, inhibitori koagulacije i fibrinolitički sistem) (Rosenberg and Aird 1999). Održavanjem hemostaze se sprečava gubitak krvi nakon povrede krvnog suda. Oštećenje endotela krvnih sudova dovodi do aktivacije trombocita, koja podrazumeva transport negativno naelektrisanih fosfolipida u membranu ovih ćelija, čime se stvara katalitička površina za komplekse koagulacionih faktora. Sistem za koagulaciju ima centralnu ulogu u stvaranju fibrina koji stabilizuje trombocitni ugrušak (Slika 2). Ovaj proces predstavlja niz enzimskih reakcija u kojima se neaktivni faktori koagulacije aktiviraju, po kaskadnom principu, što na kraju rezultuje stvaranjem fibrina, koji dovodi do formiranja fibrinskog ugruška, što

onemogućava gubitak krvi. Postoje dva puta koagulacione kaskade: unutrašnji – put kontaktne aktivacije i spoljašnji – put tkivnog faktora (TF) (Djordjevic 2014). Proces koagulacije je regulisan mehanizmima pozitivnih i negativnih povratnih sprega (Voetsch and Loscalzo 2004). Inhibicija procesa koagulacije je vrlo važna za održavanje hemostazne ravnoteže. Inhibitori faktora koagulacije su: antitrombin, protein C, protein S, trombomodulin (u interakciji sa trombinom) i drugi. Ovi proteini inaktiviraju specifične koagulacione faktore i obezbeđuju regulatorni mehanizam, koji kontroliše i ograničava proces formiranja ugruška. Sistem fibrinolize ima ulogu da uklanja fibrin iz cirkulacije, čime sprečava patološko produženje procesa zgrušavanja krvi. Glavni enzim ovog sistema je plazmin, koji razlaže fibrin u degradacione produkte, koji imaju antikoagulantna svojstva. Aktivnost plazmina reguliše nekoliko aktivatora i inhibitora: tkivni aktivator plazminogena (tPA), inhibitor aktivatora plazminogena (PAI-1 i PAI-2) i drugi (Degen 2001, Djordjevic 2014).

Kongenitalna i stečena hiperkoagubilna stanja nastaju usled neravnoteže antikoagulantnih i protrombinskih aktivnosti komponenti ovog kompleksnog procesa, odnosno, kada protrombinske aktivnosti dominiraju (Rosenberg and Aird 1999). Tada je hemostatski balans pomeren ka prekomernom formiranju ugruška u krvnom sudu. Ovo stanje dovodi do opstrukcije protoka krvi, venske i arterijske tromboze (Djordjevic 2014). Na Slici 2 su prikazani putevi aktivacije sistema koagulacije i mehanizmi inhibicije.



Slika 2. Koagulaciona i fibrinolitička kaskada. Slika je modifikovana i preuzeta iz Loder and Skopelja 2011 (Loder and Skopelja 2011).

Nasledni faktori rizika za trombofiliju

Trombofilija u najširem smislu obuhvata sva nasledna i stečena klinička stanja koja dovode do povećane sklonosti ka nastanku tromboze. Slučajevi familijarnih tromboza su ukazali na moguću ulogu naslednih faktora u patogenezi trombofilije. Genetičke abnormalnosti koje utiču na aktivnost, bioraspoloživost ili metabolizam određenih faktora koji učestvuju u procesu koagulacije, mogu pomeriti fiziološku ravnotežu ka razvoju tromboze (Voetsch and Loscalzo 2004). Pretpostavljeno je da bi intravaskularne tromboze mogle biti uzrok LKP bolesti (Glueck, Glueck et al. 1994).

Faktor V (FV) je protein koagulacionog sistema koji nije enzimski aktivan, već funkcioniše kao kofaktor. On je aktiviran trombinom i može da se veže za aktivirane trombocite. Aktivirani protein C (APC) deaktivira aktivirani FV (FVa) degradujući ga, što predstavlja jedan od osnovnih principa fiziološke inhibicije procesa koagulacije. Dahlback i saradnici su 1993. godine detektovali da u plazmi pacijenata koji imaju

familijarnu trombozu postoji rezistentnost na APC (Dahlback, Carlsson et al. 1993). Nakon toga je pokazano da je rezistencija na APC uzrokovana nukleotidnom zamenu G u A na poziciji 1691 u genu za FV (nazvanom *Leiden mutacijom*). Ova nukleotidna zamena dovodi do zamene arginina glutaminom na poziciji 506 u proteinu FV. Leiden mutacija onemogućava da APC preseče FVa na poziciji 506, usled čega se mutirani oblik FV inaktivira deset puta sporije od *wild-type* proteina, te nastavlja da aktivira koagulacionu kaskadu, dovodi do povišene proizvodnje trombina i hiperkoagulabilnog stanja (Rees, Cox et al. 1995, MacCallum, Bowles et al. 2014). Učestalost ove genske varijante je kod bele populacije evropskog porekla oko 3-7%. Kako bi se objasnila relativno visoka učestalost u ovim populacijama, sugerisano je da heterozigotni nosioci mogu imati prednost u preživljavanju zbog smanjenog krvarenja pri porođaju ili povredama, međutim to nije potvrđeno. Sa druge strane, ova genska varijanta nije detektovana u Jugoistočnoj Aziji, Japanu, Africi i kod autohtonih populacija u Australiji. Heterozigotni nosioci Leiden mutacije imaju tri do pet puta povišen rizik od pojave venskog tromboembolizma tokom života. Kod homozigotnih nosilaca Leiden mutacije je rizik za pojavu venskog tromboembolizma deset puta viši u odnosu na ljude koji nisu nosioci ove genske varijante (MacCallum, Bowles et al. 2014).

Zastupljenost ove genske varijante je analizirana kod LKP pacijenata. Rezultati nekih studija su pokazali da je *Faktor V* Leiden mutacija značajno zastupljenija kod dece obolele od LKP bolesti u odnosu na zdravu decu, kao i da nosioci homozigotnog genotipa imaju težu kliničku sliku (Glueck, Brandt et al. 1997, Arruda, Belangero et al. 1999, Balasa, Gruppo et al. 2004, Szepesi, Posan et al. 2004, Vosmaer, Pereira et al. 2010), mada u drugim studijama ta korelacija nije potvrđena (Lopez, Pons et al. 2005, Kenet, Ezra et al. 2008).

Protrombin (Faktor II - FII) je prekursor trombina, koji katalizuje prevođenje fibrinogena u fibrin. Zbog toga su protrombin i trombin jedni od ključnih molekula u održanju hemostazne ravnoteže, tako da promene na nivou ovih gena i proteina mogu značajno uticati na proces koagulacije. Ubrzo nakon otkrića FV Leiden mutacije, detektovan je polimorfizam u 3'-nekodirajućem regionu *FII* gena, koji dovodi do zamene G u A na 20210 poziciji – *FII* G20210A (Poort, Rosendaal et al. 1996). Ova genska varijanta je povezana sa povišenom koncentracijom FII u plazmi, što dovodi do

hiperkoagulabilnog stanja. Kod heterozigotnih nosilaca nivo FII u plazmi je povećan za oko 30%, dok je kod homozigotnih nosilaca povećan za oko 70% (MacCallum, Bowles et al. 2014). Međutim, ova genska varijanta je zastupljena i u zdravoj populaciji bele rase (1-6%). *FII G20210A* genska varijanta je detektovana kod šest do 18% pacijenata sa trombofilijom i smatra se da prisustvo ove varijante povećava rizik za razvoj dubokih venskih tromboza oko četiri puta (Djordjevic 2014).

Analizirana je asocijacija ove genske varijante i LKP bolesti u različitim populacijama, ali su rezultati bili nekonzistentni (Arruda, Belangero et al. 1999, Balasa, Gruppo et al. 2004, Lopez, Pons et al. 2005, Kenet, Ezra et al. 2008, Vosmaer, Pereira et al. 2010).

5, 10 – metiltetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) je enzim iz grupe flavoproteina, koji ima važnu ulogu u metabolizmu homocisteina. Enzim katalizuje redukciju 5, 10 – metiltetrahidrofolata u 5 – metiltetrahidrofolat, koji dalje omogućava konverziju homocisteina u metionin. Pokazano je da je hiperhomocisteinemija povezana sa kardiovaskularnim bolestima, aterosklerozom i trombozom. Hiperhomocisteinemija ima mnogobrojne negativne efekte i dovodi do endotelijalne disfunkcije, što utiče na aktivaciju trombocita i formiranje tromba (Voetsch and Loscalzo 2004). Povišen nivo homocisteina može biti posledica prisustva C677T varijante *MTHFR* gena. Ova zamena nukleotida dovodi do zamene alanina valinom na 222. poziciji u proteinu, za koju se pretpostavlja da je mesto vezivanja enzima za folnu kiselinu. Ala222Val forma MTHFR proteina je termolabilnija i ima manju enzimsku aktivnost (Voetsch and Loscalzo 2004). Ova genska varijanta ima vrlo visoku učestalost u svim populacijama koje su do sada analizirane. Iako homozigotnost za C677T varijantu *MTHFR* gena predstavlja najčešći uzrok blage do umerene hiperhomocisteinemije, nije potvrđena jasna asocijacija ove genske varijante i trombofilije. Dok su studije u nekim populacijama pokazale oko 3 puta povećan rizik za razvoj bolesti koronarnih arterija i ishemičnog šloga kod nosilaca *MTHFR* 677TT genotipa, druge studije, nisu pronašle nikakvu asocijaciju (Fletcher and Kessling 1998, Kelly, Rosand et al. 2002). Moguće objašnjenje kontradiktornih rezultata je, da na nivo homocisteina u organizmu utiče kako aktivnost MTHFR enzima, odnosno prisustvo C677T *MTHFR* genske varijante, tako i nivo folata (Voetsch and Loscalzo 2004).

Neke studije su pokazale asocijaciju C677T varijante *MTHFR* gena sa adultnim osteonekrozama, ali su rezultati bili nekonzistentni (Kutlar, Kutlar et al. 2001, Chai, Zhang et al. 2015). Do sada nije pokazana asocijacija navedene genske varijante i LKP bolesti (Arruda, Belangero et al. 1999, Balasa, Gruppo et al. 2004, Lopez, Pons et al. 2005, Kenet, Ezra et al. 2008).

Inhibitor aktivatora plazminogena-1 (PAI-1) reguliše aktivnost plazmina. Najčešće proučavana varijanta *PAI-1* gena je 4G/5G insercija/delecija na poziciji -675 u promotoru, koja je povezana sa nivoom PAI-1 proteina u plazmi. Pokazano je da je alelska varijanta 4G povezana sa višim nivoom PAI-1 u plazmi (Dawson, Wiman et al. 1993, Festa, D'Agostino et al. 2003), što može dovesti do supresije fibrinolize i povišenog rizika za pojavu tromboze. U nekim studijama je pokazana asocijacija povišenog nivoa ovog proteina u plazmi sa osteonekrozom (French, Hamilton et al. 2008).

Po našem saznanju, do sada je samo u jednoj studiji analizirano prisustvo ove genske varijante kod LKP pacijenata i nije pokazana značajna asocijacija sa ovom bolešću (Balasa, Gruppo et al. 2004).

INFLAMACIJA U LKP BOLESTI

Mada je odavno primećeno da je proces inflamacije prisutan u LKP bolesti (Vegter 1987, Hochbergs, Eckerwall et al. 1998), nije rađeno mnogo istraživanja o ulozi inflamatornih faktora u njenoj patofiziologiji. Bitno je istaći da su inflamatorne promene prisutne tokom razvoja LKP bolesti, a najizraženije su tokom fragmentacione faze, kada dolazi do neusklađenosti resorpcije i formiranja koštanog tkiva (Dillman and Hernandez 2009, Little and Kim 2011, Kim 2012). Analizom snimaka magnetnom rezonancom je zaključeno da je inflamacija sinovijalne membrane izraženija i da duže traje kod pacijenata koji imaju težu kliničku sliku i lošiju prognozu (Hochbergs, Eckerwall et al. 1998).

Osteoimunologija

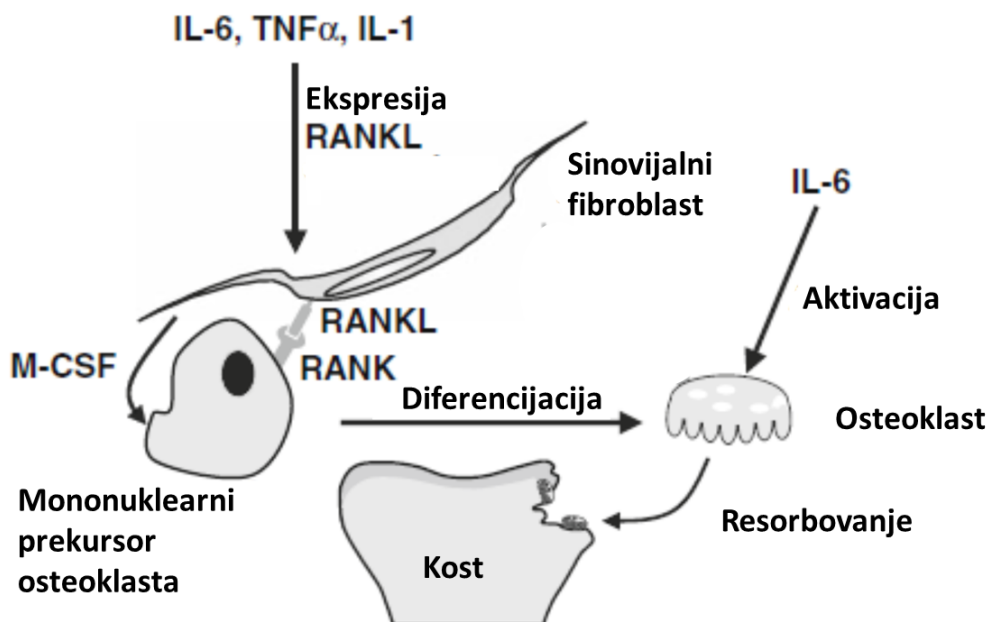
Dva osnovna ćelijska tipa koja se nalaze u koštanom tkivu su osteoklasti i osteoblasti, od čije aktivnosti zavisi struktura i gustina kostiju. Tokom poslednjih decenija je pokazano da mnogobrojni citokini koji se proizvode tokom inflamacije utiču na formiranje i aktivnost osteoklasta i osteoblasta, što je dovelo do razvoja nove interdisciplinarnе oblasti nazvane *osteoimunologija*. Poznato je da kod bolesnika koji imaju autoimuna ili maligna oboljenja dolazi do patološkog gubitka koštanog tkiva (Walsh, Kim et al. 2006). Istraživanja vezana za bolesti skeletnog sistema, kao što su reumatoidni artritis (Feldmann, Brennan et al. 1996), osteoporoza (Jilka, Hangoc et al. 1992, Poli, Balena et al. 1994) i periodontitis (Wada, Maeda et al. 2004) su ukazala da visok nivo inflamatornih citokina inhibira formiranje koštanog tkiva. Takođe je pokazano da kod pacijenata sa osteonekrozom glave femura dolazi do inflamacije sinovijalnog tkiva (Rabquer, Tan et al. 2009). Gubitak koštanog tkiva može biti posledica supresije formiranja ili povišenog nivoa resorpcije koštanog tkiva, ili kombinacije oba mehanizma (Edwards and Williams 2010).

Glavni stimulatori osteoklastogeneze su faktor stimulacije rasta kolonija makrofaga (eng. *Macrophage Colony-Stimulating Factor*; *M-CSF*) i ligand receptora aktivatora nuklearnog faktora-kB (eng. *Receptor Activator of Nuclear Factor-kB Ligand*; *RANKL*), koji indukuju diferencijaciju progenitorskih mononuklearnih ćelija u multijedarne osteoklaste. M-CSF i RANKL produkuju osteoblasti / osteociti, sinovijalni i periodentalni fibroblasti, T limfociti i njihova ekspresija je regulisana pro- i antiinflamatornim citokinima. RANKL ostvaruje svoju funkciju vezivanjem za receptor aktivatora nuklearnog faktora-kB (eng. *Receptor Activator of Nuclear Factor-kB*; *RANK*) (Souza and Lerner 2013).

Pokazano je da povišen nivo proinflamatornih citokina, u koje spadaju interleukin 6 (IL-6) i faktor nekroze tumora - α (eng. *Tumor Necrosis Factor- α* ; *TNF- α*) dovodi do gubitka koštane mase (Ding, Parameswaran et al. 2008).

IL-6 je plejotropni citokin koji učestvuje u procesima inflamacije, hematopoeze, onkogeneze i regulacije metabolizma kostiju (Manolagas 1998, Naka, Nishimoto et al. 2002, Edwards and Williams 2010). Glavni je aktivator akutne inflamatorne faze odgovora jetre i resorbovanja koštanog tkiva (Edwards and Williams 2010). Povišen nivo IL-6 je karakteristika sistemskog juvenilnog hroničnog artritisa (Fishman, Faulds et al. 1998), reumatoidnog artritisa (Hirano, Matsuda et al. 1988) i osteoporoze (Jilka, Hangoc et al. 1992, Poli, Balena et al. 1994). *IL-6* nije konstitutivno eksprimiran, već je visoko inducibilan i eksprimiran je u odgovoru na mnoge inflamatorne stimulse kao što su IL-1, *TNF- α* i produkti bakterija i viralne infekcije (Terry, Loukaci et al. 2000). Ovaj citokin se vezuje za IL-6 membranski receptor (mIL-6R), koji mora ostvariti interakciju sa glikoproteinom 130 (gp130), kako bi došlo do signalne transdukcije. Pored membranske, postoji i solubilna forma receptora za IL-6 (sIL-6R), koja takođe može da interaguje sa gp130, na ćelijama koje nemaju membranski IL-6R, što omogućava značajno proširivanje ćelijskih tipova kojima se prenosi signaliziranje posredovano IL-6 (Ohsugi and Kishimoto 2008). Prvi put je ukazano na uticaj IL-6 na resopciju koštanog tkiva kada je pokazano da je produkcija ovog proteina povišena pod uticajem signalnih molekula koji podstiču resopciju, kao što su IL-1, *TNF- α* i lipopolisaharid (LPS) u MC3T3-E1 osteoblastnoj ćelijskoj liniji. Pored toga, na mišjem model sistemu je primećeno da primenom rekombinantnog proteina IL-6 dolazi do

povećanja broja osteoklasta i povišene resorpcije kostiju. Pokazano je da citokin IL-6 indukuje osteoklastogenezu stimulirajući produkciju RANKL u osteoblastima i sinovijalnim fibroblastima, kao i direktnim efektom na progenitore osteoklasta (Souza and Lerner 2013) (Slika 3).



Slika 3. Efekat inflamatornih citokina na resorbovanje kostiju. Slika je modifikovana i preuzeta iz *Edwards and Williams 2010* (Edwards and Williams 2010).

Fishman i saradnici su 1998. godine pokazali da polimorfizam na poziciji -174 u promotoru gena *IL-6* utiče na nivo ekspresije ovog gena, kao i da je asociran sa sistemskim juvenilnim hroničnim artritismom (*Fishman, Faulds et al. 1998*). Nakon toga je pokazano da u promotorskom regionu *IL-6* gena postoje četiri polimorfizma nukleotidne sekvence (eng. *Single Nucleotide Polymorphism –SNP*), dva koja su vrlo česta: G- 597GA, G-174C, i dva izuzetno retka: G-572C, A-373T. Ovi polimorfizmi utiču na ekspresiju *IL-6* gena kroz veoma kompleksne interakcije. Najčešće je ispitivano prisustvo varijante G-174G *IL-6* gena i pronađena je njena asocijacija sa mnogim bolestima (*Fishman, Faulds et al. 1998, Pascual, Nieto et al. 2000, Garnero, Borel et al. 2002, Kamarainen, Solovieva et al. 2008*).

TNF- α je član citokinske superfamilije koja se sastoji od više od 20 članova, u koje između ostalih spadaju TNF- α , TNF- β i RANKL. TNF- α može biti membranski protein, a postoji i solubilna forma, koja nastaje sečenjem membranske odgovarajućom metaloproteinazom. Obe forme ovog citokina se mogu vezati i aktivirati TNF receptore. Dobro je poznato da je TNF- α proinflamatorni citokin i da je primena terapije antitelima na ovaj molekul vrlo uspešna u lečenju inflamatornih oboljenja kao što su reumatoidni artritis i inflamatorna bolest creva. Pokazano je da ovaj citokin ima centralnu ulogu u fiziologiji koštanog sistema, jer stimuliše osteoklastogenezu dok simultano inhibira formiranje i aktivnost osteoblasta (Nanes 2003, Lacey, Simmons et al. 2009). Još uvek nije potpuno jasno da li TNF- α može stimulisati osteoklastogenezu direktnim dejstvom na progenitore osteoklasta, ali je detaljno pokazano da ovaj citokin indirektno, utičući na povećanu sintezu RANKL u stromalnim ćelijama i osteoblastima, stimuliše osteoklastogenezu (Slika 3) (Souza and Lerner 2013). TNF- α ima ključnu ulogu u patogenezi destrukcije zgloba i koštanog tkiva koja se odvija u različitim inflamatornim bolestima (Buchan, Barrett et al. 1988, Feldmann, Brennan et al. 1996, Nair, Meghji et al. 1996, Assuma, Oates et al. 1998, Merkel, Erdmann et al. 1999).

Wilson i saradnici su 1992. godine prijavili polimorfizam nukleotida u promotoru *TNF- α* gena na poziciji -308 (G-308A), za koji je sugerisano da dovodi do višeg nivoa ekspresije ovog gena (Wilson, di Giovine et al. 1992, Wilson, Symons et al. 1997). Nakon toga je u mnogim studijama analizirana asocijacija ove genske varijante sa različitim bolestima kao i njen uticaj na ekspresiju ovog citokina, ali su rezultati bili kontroverzni (Brinkman, Huizinga et al. 1997, Huang, Pirskanen et al. 1999, Kroeger, Steer et al. 2000, Fernandes, Koneru et al. 2002, Li, Gauderman et al. 2006, Karimi, Goldie et al. 2009, Mekinian, Tamouza et al. 2011).

„Toll-like” receptori (TLR) predstavljaju najznačajniju familiju receptora imunskog sistema koji prepoznaju patogene. Ova familija ima oko deset članova koji učestvuju u odbrani organizma od bakterija, virusa, gljiva i protozoa (von Aulock, Schroder et al. 2003, Akira and Takeda 2004). Članovi ove familije su transmembranski receptori koji imaju ekstraćelijski domen bogat leucinom i unutarćelijski signalni domen (von Aulock, Schroder et al. 2003).

Jedan od najproučavanijih receptora iz ove klase je TLR4, koji je aktiviran lipopolisaharidom (LPS) Gram-negativnih bakterija (Hoshino, Takeuchi et al. 1999, Beutler, Du et al. 2001). Na model sistemu pacova je pokazano da se intravenskim tretiranjem LPS-om i intramuskularnim sintetičkim kortikosteroidom (metilprednizolonom), može indukovati osteonekroza epifize femura, preko aktivacije TLR4 receptora. U navedenom istraživanju je pokazano da je pri takvom tretmanu kod pacova došlo do značajno povišenog nivoa proinflamatornih citokina, među kojima su TNF- α i IL-6 (Okazaki, Nishitani et al. 2009).

Detektovane su dve značajne ne-sinonimne genske varijante *TLR4* gena. To su tranzicija A / G koja dovodi do zamene asparaginske kiseline glicinom na aminokiselinskoj poziciji 299 (Asp299Gli) i tranzicija C / T koja dovodi do promene treonina u izoleucin na poziciji 399 (Thr399Ile). Pokazano je da one dovode do izmenjenog TLR4 odgovora, kao i izmenjene ekspresije citokina koji su regulisani ovim receptorom (Ferwerda, McCall et al. 2008).

Interleukin 3 (IL-3) je citokin za koji je dobro poznato da utiče na proliferaciju, diferencijaciju i funkciju ćelija sve tri hematopoetske loze. Njegov drugi naziv je faktor rasta multipnih kolonija (*eng. Multi-colony stimulating factor (multi-CSF)*) (Harant and Lindley 1998). Nedavno je pokazano da ovaj citokin ima bitnu ulogu u inhibiciji diferencijacije i funkcije osteoklasta, što za posledicu ima snižen nivo resorpcije koštanog tkiva. Na model sistemu miša je pokazano da IL-3 inhibira diferencijaciju osteoklasta indukovanu citokinom TNF- α , tako što deluje na TNF receptore 1 i 2 (Yogesha, Khapli et al. 2005). Kod ljudi je zapaženo da IL-3 inhibira diferencijaciju osteoklasta kako kod pacijenata obolelih od osteoporoze, tako i kod zdravih (Gupta, Barhanpurkar et al. 2010). Pokazano je da je anti-osteolitički efekat citokina IL-3 zavisian od doze i ireverzabilan (Yogesha, Khapli et al. 2005, Gupta, Barhanpurkar et al. 2010).

Bazna promena C u T na poziciji 132 u *IL-3* genu dovodi do zamene aminokiselina, prolina serinom, na poziciji 27 (Pro27Ser) u IL-3 proteinu. *In vitro* analizom je pokazano da 27Ser varijanta proteina IL-3, dovodi do višeg nivoa proizvodnje citokina IL-4 i TNF- α u eritroleukemijskoj ćelijskoj liniji TF-1, u odnosu na 27Pro varijantu (Schweiger, Stern et al. 2001). Pored ove genske varijante, vrlo često

je analizirana i C-16T promotorska varijanta *IL-3* gena, za koju je u svim, do sad urađenim studijama, pokazano da je u kompletnoj ili perfektnoj gametskoj neravnoteži vezanosti (eng. *linkage disequilibrium*) sa 132T *IL-3* varijantom, i za koju se pretpostavlja da bi mogla uticati na nivo ekspresije ovog gena varijantom (Jeong, Navani et al. 1998, Yamada, Tanaka et al. 2001, Park, Kim et al. 2004, Chu, Dong et al. 2009).

Koštani makrofazi - OsteoMaks

Integritet koštanog tkiva zavisi od ravnoteže aktivnosti osteoblasta, koji formiraju koštano tkivo, i osteoklasta, koji vrše resorpciju (Nagase, Iwasawa et al. 2009). Pored ovih ćelija, pokazano je da na integritet koštanog tkiva utiče još jedna ćelijska populacija, poreklom od monocitne ćelijske loze, koja je zastupljena u koštanom tkivu. U pitanju su rezidentni, koštani makrofazi, koji se nazivaju OsteoMaks (eng. *OsteoMacs*). OsteoMaks čine približno šestinu ukupnih ćelija unutar koštanog tkiva (Chang, Raggatt et al. 2008). Oni su interkalirani među ćelije koštanog tkiva i učestvuju u promovisanju sinteze matriksa od strane osteoblasta i /ili mineralizaciji tkiva, kroz sekreciju velikog broja osteo-aktivirajućih faktora (Pettit, Chang et al. 2008). Pokazano je da smanjen broj rezidentnih makrofaga dovodi do poremećaja u procesu izlječenja i formiranja koštanog tkiva (Chang, Raggatt et al. 2008).

APOPTOZA U OSTEONEKROZI

Apoptoza je proces programirane ćelijske smrti i smatra se najefikasnijim načinom odstranjivanja neželjenih ćelija iz živog tkiva. To je normalan fiziološki proces kojim ćelije izvršavaju „samoubistvo”. Tokom apoptoze dolazi do različitih morfoloških promena ćelije, karakterističnih za ovaj proces. Ćelije mogu umirati i procesom nekroze, koji se odvija kroz bubrenje i pucanje ćelije. Za razliku od apoptoze, nekroza može dovesti do inflamatornog odgovora i oštećenja okolnog tkiva (Alberts, Johnson et al. 2002).

Istraživanje na uzorcima osteonekrotičnog tkiva epifize femura pacijenata obolelih od osteonekroze je pokazalo da značajan broj ćelija umire procesom apoptoze i da nije zastupljena isključivo nekroza, kao tip ćelijske smrti (Calder, Buttery et al. 2004). Pored toga, apoptotska tela i DNK fragmentacija su primećene u osteocitima i ćelijama kostne srži u epifizi femura zahvaćenoj ishemičnom nekrozom na model sistemu pacova (Boss and Misselevich 2003).

Proces apoptoze je regulisan unutrašnjim (mitohondrijskim) i spoljašnjim putevima, koji se u određenim koracima ukrštaju (Strasser, Jost et al. 2009).

Unutrašnji apoptotski put

Unutrašnji put aktivacije apoptoze je regulisan BCL-2 familijom, koja predstavlja grupu evolutivno konzervisanih apoptotskih proteina. *Bcl-2* gen je prvi put otkriven u humanim B ćelijskim limfomima (eng. *B cell lymphoma - BCL*), odakle i potiče njegovo ime. U tim ćelijama je ovaj gen bio translociran, usled čega je došlo do njegove prekomerne ekspresije, što je za posledicu imalo otpornost ćelija na signale smrti. Nakon toga je u mnogim studijama pokazano da povišena ekspresija ovog gena može da odloži ili spreči apoptozu u velikom broju ćelijskih tipova, te je zaključeno da je BCL-2 antiapoptotski protein. Članovi BCL-2 familije se odlikuju prisustvom barem jednog od četiri konzervisana *Bcl-2* homologa (BH) domena, koji su označeni sa BH1, BH2, BH3 i BH4, i koji odgovaraju α -heliksni segmentima (Burlacu 2003). Na osnovu strukturnih i funkcionalnih karakteristika, članovi BCL-2 familije se mogu

podeliti na 3 podfamilije. Antiapoptotska podfamilija, u koju spadaju BCL-2 i BCL-XL proteini, koji sadrže sva četiri BH domena (BH1-BH4). Proapoptotski proteini, kao što su BAX, BAK i BOK, koji sadrže BH1, BH2 i BH3 domene, i koji se nazvaju i višedomenskim, jer ostali proapoptotski proteini, kao što su BIM, BAD and BID imaju samo BH3 domen i označavaju se sa „samo BH3” (eng. *BH3-only*) (Packham and Stevenson 2005). Smatra se da je BH3 domen - „domen smrti”, jer ga sadrže svi proapoptotski proteini. BH domeni omogućavaju interakcije proteina BCL-2 familije, kroz formiranje homo- i hetero- dimera. To je jedan od glavnih mehanizama kojim proteini ove familije regulišu proces apoptoze. Od relativnog odnosa pro- i antiapoptotskih proteina zavisi ćelijska sudbina i reakcija na signale smrti (Burlacu 2003).

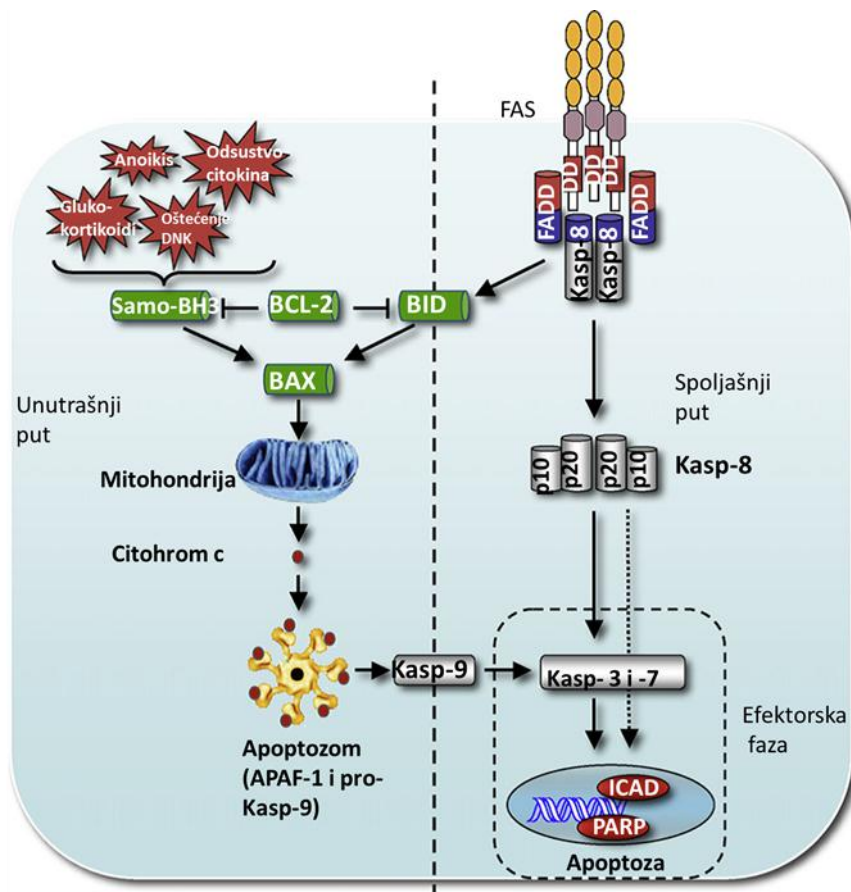
BAX i BCL-2

BAX i BCL-2 su glavni predstavnici pro- i anti -apoptotskih faktora. Kada nema signala smrti, ovi proteini su lokalizovani u različitim unutarćelijskim kompartmentima. BCL-2 protein je lokalizovan u spoljašnjoj membrani mitohondrija, membrni endoplazmatskog retikuluma i jedarnoj membrani, dok se BAX, kao i većina proapoptotskih proteina, nalazi u citosolu. Usled apoptotskog signala, dolazi do konformacione promene BAX proteina, akumulacije BAX-BAX homodimera i njihovog premeštanja iz citosola u membranu mitohondrija, čime se formiraju pore i povećava permeabilnost membrane (Burlacu 2003). BCL-2 protein je glavni antagonist BAX-a, koji neutrališe proapoptotski efekat BAX proteina, formirajući heterodimere sa njim (Sato, Hanada et al. 1994). U zavisnosti od toga da li u ćeliji dominiraju anti- ili proapoptotski proteini, ćelija će ići ka preživljavanju ili smrti. Kada u ćeliji dominiraju proapoptotski faktori, dolazi do povećane permeabilnosti membrane mitohondrija i citohrom C izlazi iz međumembranskog prostora mitohondrija u citosol. Usled toga dolazi do formiranja apoptozoma i aktivacije inicijatorske kaspaze-9, posredstvom APAF-1 (eng. *Apoptotic protease activating factor 1*), koja proteolitičkom aktivnošću aktivira nizvodne efektorske kaspaze, što vodi ka smrti ćelije (Slika 4).

Kada je u pitanju skeletni sistem, pokazano je da je *Bcl-2* eksprimiran u osteoblastima, osteoklastima, hondrocitima i osteocitima. Nekoliko studija je pokazalo da je ovaj gen vrlo važan za održavanje integriteta skeletnog sistema. *Bcl-2^{-/-}* miševi imaju povećani volumen kostiju, uglavnom zbog smanjenja broja i disfunkcije osteoklasta. Takođe, funkcija osteoblasta je poremećena kod *Bcl-2^{-/-}* miševa. *Ex vivo* studije na osteoblastima i osteoklastima su pokazale da Bcl-2 promoviše diferencijaciju, aktivaciju i preživljavanje oba ćelijska tipa (Nagase, Iwasawa et al. 2009). *In vitro* istraživanje, rađeno na osteoblastnoj ćelijskoj liniji, u kome je apoptoza izazvana izlaganjem hipoksiji i deksometazonu je pokazalo da je apoptoza u osteoblastima regulisana unutrašnjim apoptotskim putem, tačnije odnosom BAX i BCL-2, a da je spoljašnji put imao zanemarljiv efekat (Zhu, Gao et al. 2011).

BCL2L12

Bcl2L12 gen je novotkriveni član BCL-2 familije, koji kodira protein sličan BCL-2 (eng. *BCL-2 Like 12*). Na osnovu *in silico* analize, zaključeno je da BCL2L12 protein sadrži BH2 domen, ali da ne sadrži BH1, BH3 i BH4 domene, mada je prisutan motiv sličan BH3 domenu. Takođe, kod ovog proteina odsustvuje i transmembranski domen. Kao što je ranije navedeno, BH3 domen je prisutan kod većine antiapoptotskih proteina. Poznat je još samo jedan, antiapoptotski predstavnik (BOO/DIVA) koji takođe ne sadrži BH3 domen i koji deluje preko mehanizma koji nije zavisen od dimerizacije. Pored BH2 domena, protein BCL2L12 sadrži i više prolinom bogatih oligopeptida (Scorilas, Kyriakopoulou et al. 2001). Ekspresija BCL2L12 je proučavana RT-PCR metodom, tokom apoptoze koja je indukovana upotrebom različitih hemoterapeutskih lekova na HL-60 ćelijskoj liniji humane akutne promijelocitne leukemije. Rezultati su pokazali značajne promene nivoa iRNK *BCL2L12* gena u zavisnosti od upotrebljenih apoptotskih inducera, kao i specifičnog indukovanog puta, što ukazuje na direktnu vezu promene nivoa *BCL2L12* iRNK i apoptoze (Thomadaki and Scorilas 2006). Po našim saznanjima, istraživanja o statusu ovog gena kod bolesti koštanog sistema još uvek nisu rađena.



Slika 4. Šema unutrašnjeg i spoljašnjeg apoptotskog puta u sisarskim ćelijama. Slika je modifikovana i preuzeta iz *Strasser, Jost et al. 2009* (Strasser, Jost et al. 2009).

Napomena: PARP (eng. *Poly (ADP-ribose) polymerase*); kaspazom aktivirana DNaza (DNase CAD- eng. *caspase-activated DNase*), inhibitor kaspazom aktivirane DNaze –ICAD (eng. *inhibitor of CAD*)

Spoljašnji apoptotski put

Spoljašnji apoptotski put se aktivira kroz vezivanje liganada za odgovarajuće „receptore smrti” što dovodi do niza događaja unutar ćelije, koji vode ka njenoj smrti (Slika 4). „Receptori smrti” su članovi TNF superfamilije receptora koja ima osam članova. Oni se odlikuju unutarćelijskim α – heliksnim interakcijama preko domena nazvanih „domeni smrti” (eng. *Death-domains* - DD) (Kovacic, Grcevic et al. 2010).

Glavni predstavnik ovih receptora je FAS (eng. *FS-7-associated surface antigen*), koji se naziva i APO-1 ili CD95. U pitanju je transmembranski protein koji je eksprimiran u mnogobrojnim tumorskim i zdravim ćelijama, uključujući B limfocite,

dendritske ćelije, timocite, makrofage, kardiomiocite, hepatocite i druge. Alternativnim iskrajanjem (eng. *alternative splicing*) nastaje solubilna varijanta FAS, koja nema transmembranski domen, već funkcioniše kao solubilni receptor. Solubilna varijanta ima regulatornu ulogu, koju vrši kroz kompetitivno vezivanje sa transmembranskom FAS formom za ligand (Kovacic, Grcevic et al. 2010).

Fiziološki ligand FAS receptora - FASL (CD95L) takođe pripada porodici TNF citokina (Suda, Takahashi et al. 1993). Nakon vezivanja FASL za FAS transmembranski receptor, dolazi do formiranja unutarćelijskog signalnog kompleksa koji indukuje smrt (DISC- eng. *death-inducing signaling complex*) (Strasser, Jost et al. 2009). Ovaj kompleks sadrži kaspazu 8, adapterski molekul - FADD (eng. *Fas-Associated protein with Death Domain*) i regulatorni molekul, c-FLIP (eng. *FLICE-like inhibitory protein*). Nakon formiranja DISC kompleksa dolazi do samo-obrade kaspaze-8, usled čega nastaje forma proteina koja aktivira efektorske kaspaze, koje seku vitalne proteine u ćeliji, što na kraju dovodi do smrti ćelije (Slika 4).

Ubrzo nakon identifikovanja *Fas* i *FasL* gena, i njihove uloge u apoptozi, rana istraživanja su pokazala da kod miševa sa mutacijom u *Fas* genu, koja dovodi do poremećene funkcije FAS proteina, dolazi do pojave stanja sličnih limfadenopatiji i sistemskog eritemskog lupusa (Watanabe-Fukunaga, Brannan et al. 1992). Takođe, za miševе koji su bili homozigotni nosioci mutacije u *FasL* genu, pokazano je da razvijaju poremećaj sličan limfadenopatiji i autoimunskim oboljenjima. Zatim je pokazano da su kod pacijenata koji boluju od autoimunog limfoproliferativnog sindroma prisutne mutacije u *Fas* genu (Straus, Jaffe et al. 2001). Na osnovu ovih i drugih istraživanja je zaključeno da FAS-FASL signalni put ima bitnu ulogu u kontroli imunskog sistema (Strasser, Jost et al. 2009). Nakon toga je usledio niz istraživanja koja su se bavila statusom ovih gena u različitim autoimunskim i inflamatornim bolestima.

Pokazano je da je apoptoza indukovana FAS receptorom izuzetno bitna za održavanje homeostaze T limfocita, posebno kada je u pitanju hronični imunski odgovor (Krammer 2000). Jasan pokazatelj značaja uloge FAS-FASL sistema u gašenju imunskog odgovora T ćelija bili su rezultati studije u kojoj je kod miševa izazvano stanje slično hroničnoj infekciji. Eksperimenti koji su urađeni na miševima, zaraženim tzv. „upornim“ virusima (npr. mišjim gama herpes virusom), pokazali su da je za

ubjanje aktiviranih T limfocita tokom hroničnog imunskog odgovora bila neophodna aktivacija kako FAS-FASL puta, tako i unutrašnjeg apoptotskog puta kroz BCL-2 proteinsku familiju (Strasser, Jost et al. 2009). Takođe, pokazano je da apoptoza makrofaga može biti regulisana FAS-FASL putem (Villena, Pinheiro et al. 2008).

Mnogobrojne studije su ispitivale ekspresiju *Fas* gena u ćelijama koje učestvuju u remodelovanju koštanog tkiva, osteoblastima i osteoklastima, ali su dobijeni različiti rezultati o nivou ekspresije ovog gena, u zavisnosti od stepena zrelosti ćelija. Evidentno je da je *Fas* gen eksprimiran i u osteoblastima i u osteoklastima, ali u različitom nivou u zavisnosti od stepena zrelosti ćelija i ostalih faktora koji utiču na ćelije (citokina, faktora rasta i sl.). Pretpostavlja se da su izvor FASL molekula, koji utiče na održavanje homeostaze kostiju, aktivirani T i B limfociti, monociti / makrofazi i NK (eng. *natural killer*) ćelije (Barry and Bleackley 2002). Pored toga, pokazano je da se nizak nivo *FasL* gena eksprimira u osteoblastima i osteoklastima (Kovacic, Grcevic et al. 2010).

Proces apoptoze utiče na životni vek ćelija inflamatornog sistema, kao i prekursora makrofaga nastanjenih u koštanom tkivu, koji imaju bitnu ulogu u održavanju homeostaze ovog tkiva. Poremećaj procesa apoptoze može dovesti do izmenjanog inflamatornog odgovora kao i patološkog remodelovanja koštanog tkiva u LKP bolesti.

POTENCIJALNA UPOTREBA MEZENHIMSKIH MATIČNIH ĆELIJA U LEČENJU BOLESTI SKELETNOG SISTEMA

U poslednje vreme se sprovodi sve veći broj kliničkih istraživanja o upotrebi mezenhimskih matičnih ćelija (MMC) u lečenju mnogih bolesti skeletnog sistema, uključujući i avaskularnu osteonekrozu (AVON), koja su dala vrlo povoljne rezultate. Ovaj pristup predstavlja jedan od najznačajnijih pravaca u oblasti regenerativne medicine i ubrzano se razvija, sa potencijalom da u skorijoj budućnosti dovede do vrhunskih terapijskih efekata.

Osobine i podela matičnih ćelija

Matične ćelije (MC) imaju sposobnost samoobnavljanja i sposobnost da se diferenciraju u zrele progenitorske ćelije, kao i u terminalno diferencirane specijalizovane ćelije. Na osnovu potencijala za diferencijaciju mogu se klasifikovati kao totipotentne, pluripotentne i multipotentne.

Totipotentne MC mogu da daju sve embrionalne i ekstra-embrionalne tipove ćelija. To su zigot i ćelije rane faze embrionalnog razvića, do morule (Das, Bonaguidi et al. 2008).

Pluripotentne MC imaju potencijal da se diferenciraju u ćelije sva tri klicina lista, ali se ne mogu diferencirati u ćelije ekstra embrionalnih omotača (Wagers and Weissman 2004). Ove ćelije se nalaze sa unutrašnje strane blastocista, kao i u kasnijem stadijumu razvoja humanih fetusa (5-9 nedelja razvoja) (Turnpenny, Spalluto et al. 2006). Nedavno je pokazano da se diferencirane somatske ćelije mogu genetičkim reprogramiranjem prevesti u pluripotentne MC, koje su nazvane indukovanim pluripotentnim MC (IPS- eng. *induced pluripotent stem*) (Zhang, Khan et al. 2012).

Multipotentne MC se mogu diferencirati u određeni broj ćelijskih linija. Ove ćelije se nalaze u fetalnom tkivu tokom razvoja fetusa ali i u organima i tkivima adultnih organizama. Dva osnovna tipa adultnih multipotentnih ćelija su hematopoetske i mezenhimske matične ćelije, mada su, u poslednje vreme pronađene različite vrste matičnih i prekursorskih ćelija u mnogim organima i tkivima. Smatra se da

multipotentne matične ćelije adultnih tkiva predstavljaju depo progenitorskih ćelija za repariranje tkiva i da učestvuju u održavanju tkivne i imunske homeostaze (Covas, Panepucci et al. 2008, da Silva Meirelles, Caplan et al. 2008).

Osobine i poreklo mezenhimskih matičnih ćelija

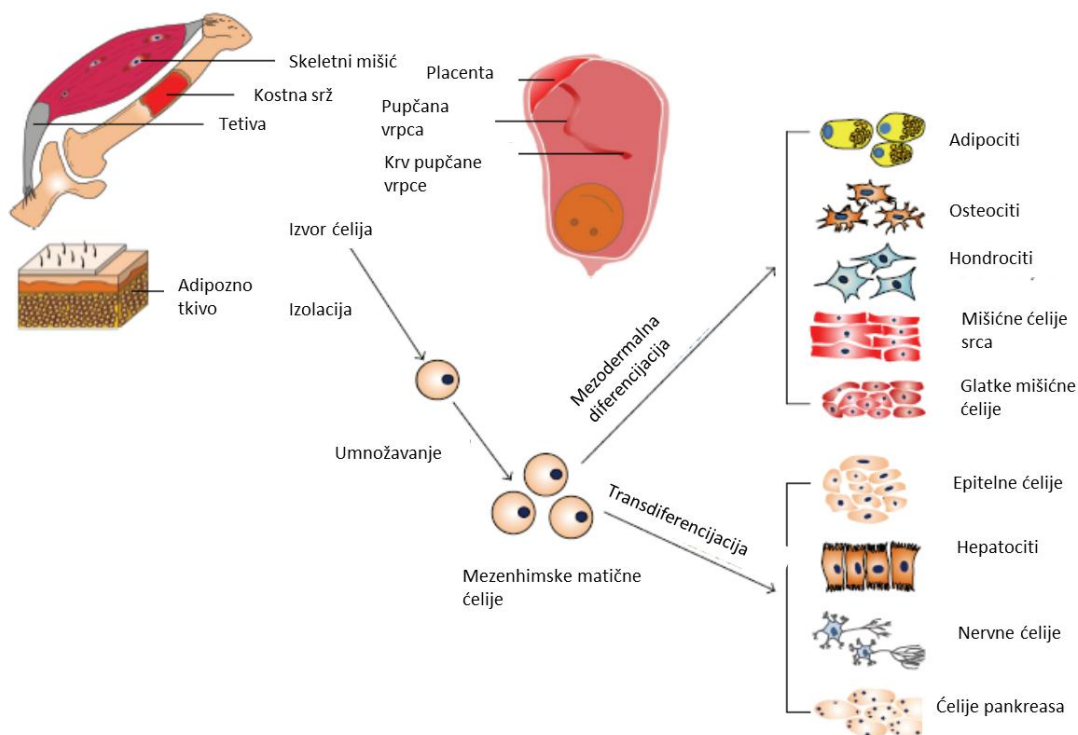
Friedenstein i saradnici su 1968. godine prvi put identifikovali mali broj heterogenih adherentnih ćelija iz kostne srži koje su posle početne faze mirovanja počele naglo da se umnožavaju. Nakon nekoliko pasaža u kulturi, ove ćelije su poprimile uniformnu, vretenastu morfologiju i pokazale sposobnost da se diferenciraju u kolonijama, koje su podsećale na male depozite kostiju ili hrskavice (*Friedenstein, Petrakova et al. 1968*). Pošto su ove ćelije prvi put izolovane iz strome kostne srži, nazvane su mezenhimske stromalne ćelije (eng. *mesenchymal stromal cells - MSC*), međutim, zbog potencijala da se diferenciraju u različite ćelijske linije, kasnije je u upotrebu ušao naziv mezenhimske matične ćelije (eng. *mesenchymal stem cell- MSC*), kao i multipotentne stromalne ćelije (eng. *Multipotent Stromal Cells*).

Populacije MMĆ izolovane iz različitih tkiva i na različite načine pokazuju određeni stepen fenotipske heterogenosti (*Ankrum and Karp 2010*). Komitet za mezenhimske i tkivne matične ćelije internacionalnog društva za ćelijsku terapiju (eng. *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy - ISCT*) je predložio kriterijume potrebne da bi se ćelije okarakterisale kao MMĆ: da imaju osobinu da se lepe za plastičnu podlogu u standardnim uslovima gajenja, da imaju potencijal da se diferenciraju u osteoblaste, hondroblaste i adipocite *in vitro* i da ekspimiraju površinske markere CD105, CD7 i CD90, a da ne ekspimiraju CD45, CD34, CD14 ili CD11b, CD79a ili CD 19 i HLA-DR (*Dominici, Le Blanc et al. 2006*).

Uprkos definiciji koju ISCT predlaže za karakterisanje MMĆ, pojam MMĆ treba široko posmatrati jer još uvek nisu u potpunosti definisane sve njihove karakteristike, s obzirom na intenzivna istraživanja u ovoj oblasti i konstantno prijavljivanje novih izvora ili osobina ovih ćelija. Karakterisanje i definisanje fenotipa MMĆ će još dugo predstavljati izazov (*Ankrum and Karp 2010*).

Nakon što je otkriveno da u kostnoj srži postoje MMĆ, usledio je niz istraživanja, koja su pokazala da se ćelije sa sličnim osobinama mogu izolovati i iz drugih adultnih tkiva, kao što je adipozno tkivo, tetive, periferna krv, skeletni mišići, trabekularne kosti i dr. Takođe, pokazano je da se MMĆ mogu izolovati i iz neonatalnih tkiva, kao što su pupčana vrpca, krv pupčane vrpce i određeni delovi placente (Zhang, Khan et al. 2012) (Slika 5).

Pored potencijala da se diferenciraju u koštano, hrskavičavo i adipozno tkivo, MMĆ se mogu diferencirati u veliki broj specijalizovanih mezenhimskih tkiva, kao što su npr. mišićne ćelijske linije - skeletne, glatke mišićne ćelije, kao i ćelije srčanog mišića. Zanimljivo je da se MMĆ mogu diferencirati i u ćelije koje nisu mezenhinskog porekla, kao što su ćelije slične neuronima, *in vitro*, i nakon implantiranja u mozak miša, *in vivo*. Takođe, ćelije slične hepatocitima se mogu dobiti diferencijacijom MMĆ u *in vitro* i *in vivo* uslovima (Zhang, Khan et al. 2012) (Slika 5).



Slika 5. Šematski prikaz tkiva koja su izvor MMĆ i ćelijskih tipova u koje se MMĆ mogu diferencirati. Slika je modifikovana i preuzeta iz Zhang, Khan et al. 2012 (Zhang, Khan et al. 2012).

Mada MMC imaju ograničeniji potencijal za diferencijaciju u odnosu na embrionalne i indukovane pluripotentne MC, one imaju mnogobrojne prednosti. Za embrionalne i indukovane pluripotentne MC je pokazano da lako formiraju teratome (Ma, Xie et al. 2014) i da dovode do imunskog odgovora pri transplantaciji u domaćina. Suprotno tome, MMC su imunoprivilegovane i parakrinom aktivnošću ispoljavaju imunosupresorni efekat koji doprinosi reparativnom procesu. Pored toga, za njih do sada nije pokazano da dovode do formiranja teratoma i zato se smatraju nerizičnim za primenu u ćelijskoj terapiji (Breitbach, Bostani et al. 2007). Takođe, one imaju visok migracioni potencijal tako da mogu lako da migriraju do mesta povrede u odgovarajućim tkivima. Navedene osobine ih čine odličnim kandidatima za klinička *in vivo* istraživanja (Zhang, Khan et al. 2012). Jedan od važnih aspekata zašto je upotreba ovih ćelija favorizovana u odnosu na embrionalne matične ćelije tiče se etičkih, pravnih i političkih implikacija (Ma, Xie et al. 2014).

Do sada je najveći broj istraživanja i kliničkih studija rađen sa MMC iz kostne srži. Međutim, proces uzorkovanja kostne srži je vrlo bolan i može biti rizičan (Zuk 2008). Pored toga, MMC čine samo 0.001-0.01% svih ćelija koje se nalaze u aspiratu kostne srži (Jones, Kinsey et al. 2002), tako da je nakon njihove izolacije potrebno mnogo vremena i pasaža, kako bi se ćelije umnožile. Zbog svega navedenog, poslednjih godina je u fokusu adipozno tkivo kao alternativni izvor MMC, koje su po svojim osobinama vrlo slične onima iz kostne srži. Subkutano adipozno tkivo je lako dostupno i sadrži veliki broj MMC, tako da postoji i mogućnost korišćenja sveže izolovanih ćelija, bez prethodnog umnožavanja, u terapijske svrhe (Norambuena, Khoury et al. 2012). Ove osobine čine adipozne MMC izuzetno pogodnim za potencijalnu ćelijsku i *ex vivo* gensku terapiju mnogih bolesti.

Terapeutski kapacitet MMC

Kao što je ranije navedeno, sve su aktuelnija istraživanja u oblasti regenerativne medicine koja se bave lečenjem povreda i različitih bolesti skeletnog sistema primenom MMC.

Što se tiče AVON, trenutno najzastupljeniji terapijski pristup koji se koristi u lečenju ranih stadijuma ove bolesti je dekompresija hirurškim uklanjanjem jezgra kosti

(Norambuena, Khoury et al. 2012). Kao što je već rečeno, AVON femura nastaje zbog nedostatka dotoka krvi u ovaj deo kosti, što dovodi do nekroze koštanog tkiva. Usled toga, hrskavica gubi svoju potporu i dolazi do kolapsa glave femura. Pored toga, kada dođe do nekroze koštanog tkiva, dolazi do lokalne inflamacije usled čega se stvara otok unutar kuka, koji dodatno sprečava vaskularizaciju tkiva. Smatra se da se reparacija koštanog tkiva nakon hirurške dekompresije otežano odvija jer kod pacijenata sa AVON postoji nedostatak progenitorskih ćelija u glavi femura (Orth, Rey-Rico et al. 2014). Stoga se u poslednje vreme u kliničkim studijama pristupilo primeni MMC u lečenju AVON, nakon hirurške dekompresije (Norambuena, Khoury et al. 2012).

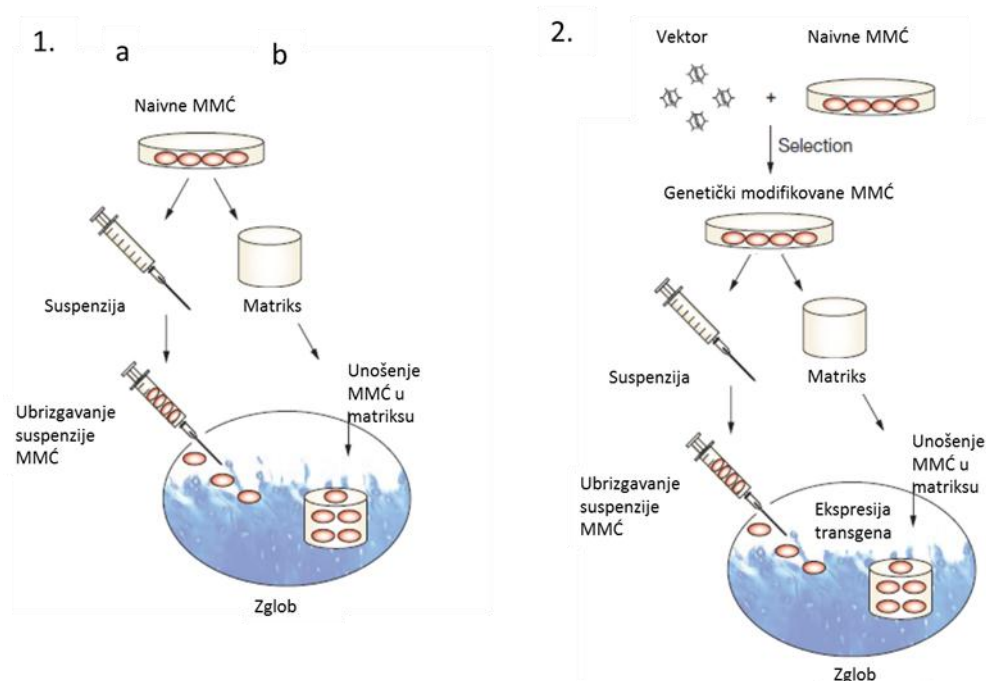
Prilikom upotrebe klasičnih terapijskih pristupa za lečenje AVON u 40% slučajeva se nakon određenog vremena javlja potreba za ugradnjom veštačkog kuka kod pacijenata. Kod pacijenata kod kojih je pored hirurške dekompresije, upotrebljena i terapija MMC, a koji su bili u ranoj (pre-kolapsnoj) fazi AVON, dobijeni su vrlo dobri rezultati. Pet godina nakon terapije, samo kod devet od 145 pacijenata je došlo do potrebe za ugradnjom veštačkog kuka. Studija iz 2009. godine, u kojoj je analiziran status 534 kuka kod pacijenata lečenih pomoću MMC, i koji su praćeni u proseku 13 godina, je pokazala da je progresija bolesti bila značajno umanjena u odnosu na grupu koja nije tretirana MMC (Orth, Rey-Rico et al. 2014). Slični rezultati su dobijeni u studiji objavljenoj 2013. godine i u kojoj je prijavljeno da je većina pacijenata nakon ubrizgavanja MMC osetila značajno smanjenje bola (Martin, Houdek et al. 2013, Orth, Rey-Rico et al. 2014).

Istraživanje na životinjskom AVON model sistemu je ukazalo na to da i kod mladih pacijenata obolelih od AVON najverovatnije postoji nedostatak progenitorskih ćelija u oboleloj glavi femura. Na osnovu ovoga je zaključeno da terapija MMC predstavlja potencijalni terapijski pristup za lečenje LKP bolesti, kao i ostalih AVON kod dece (Norambuena, Khoury et al. 2012). Primena MMC bi bila korisna kako zbog imunosupresornog efekta koji ove ćelije ispoljavaju, koji bi mogao smanjiti lokalnu inflamaciju i otok, tako i zbog činjenice da one mogu biti izvor progenitorskih ćelija koštanog tkiva ili stimulisati deobu i diferencijaciju lokalnih progenitorskih ćelija (Norambuena, Khoury et al. 2012, Mok, Leong et al. 2013).

Kada je u pitanju lečenje bolesti na čiji razvoj značajno utiče proces inflamacije, uključujući i bolesti skeletnog sistema, MMC predstavljaju izuzetno atraktivni terapijski

pristup. One mogu doprineti izlječenju ovih bolesti, jer naivne MMC kroz sintezu bioaktivnih molekula imaju imunosupresivni efekat, suprimiraju apoptozu i stimulišu angiogenezu (Ankrum and Karp 2010). Pored toga, s obzirom na to da su MMC imunoprivilegovane i lako pokretljive, one su posebno pogodne za upotrebu u *ex vivo* genskoj terapiji, kao nosači antiinflamatornih transgena. Genetičkim modifikacijama se može poboljšati terapijski kapacitet MMC na dva načina. Može se povećati ekspresija nekog od signalnih molekula koje ove ćelije svakako proizvode ili se mogu transfekovati tako da ekspimiraju protein koji MMC inače ne proizvode. Na taj način se može značajno proširiti broj bolesti za čiju terapiju bi ove ćelije mogle da se koriste (Porada and Almeida-Porada 2010).

Kada je u pitanju lečenje bolesti skeletnog sistema kao što su reumatoidni artritis i osteoartritis (u čijem razvoju inflamacija predstavlja bitan faktor), postoje dva osnovna potencijalna terapijska pristupa korišćenjem MMC (Slika 6). Naivne ili genetički modifikovane MMC se mogu dovesti na mesto upale ili u obliku suspenzije ćelija, ili korišćenjem matriksa (nosača) koji mogu biti sačinjeni od kolagena, alginatnog gela, fibrina, sintetičkih biodegradabilnih materijala itd (Noth, Steinert et al. 2008, Cucchiari, Venkatesan et al. 2012).



Slika 6. Pristupi u terapiji oboljenja zgloba korišćenjem MMC. Slika je modifikovana i preuzeta iz Noth, Steinert et al. 2008 (Noth, Steinert et al. 2008).

1. Dostavljanje naivnih MMC na obolelo mesto, (a) Naivne MMC se mogu dostaviti u oboleli zglob u obliku suspenzije ćelija, ubrizgavanjem; (b) ili korišćenjem matriksa; **2. Dostavljanje genetički modifikovanih MMC na obolelo mesto,** (a) MMC se nakon transfekcije specifičnim transgenom mogu dostaviti u oboleli zglob u obliku suspenzije ćelija, ubrizgavanjem, (b) ili

Uprkos tome što upotreba genetički modifikovanih MMC predstavlja vrlo privlačan i perspektivan terapijski pristup, prepreka koju je potrebno prevazići je pronalaženje bezbedne i efikasne metode za unošenje željenog gena u ćelije. Upotrebom viralnih vektora se postiže vrlo efikasna transfekcija, međutim ovi vektori imaju mnoge mane, kao što su imunogeni efekat i potencijalni rizik od štetne insercione mutageneze (Edelstein, Abedi et al. 2007, Park, Yang et al. 2012). Sa druge strane, korišćenjem ne-viralnih vektora se postiže niža efikasnost transfekcije, ali je njihova upotreba mnogo bezbednija, dovodi do tranzijentne ekspresije, njima se mogu uneti u ćeliju veći geni i lakše se proizvode, što ih čini vrlo privlačnim za kliničku upotrebu (Boura, Santos et al. 2013). Ne-viralni pristupi koji se upotrebljavaju za unos DNK u ćeliju su genski pištolj

(eng. *gene gun*), elektroporacija, hidrodinamički unos, sonoporacija, magnetofekcija. Osim navedenih, fizičkih pristupa, koriste se različiti sintetički nosači DNK, kao što su lipozomi, polimeri, pepetidi koji penetriraju u ćeliju i neorganske nanopartikule (Yin, Kanasty et al. 2014).

Potencijalna upotreba citokina IL-10 u ex vivo genskoj terapiji

Citokin IL-10 je vrlo potentan antiinflamatorni protein. Sekretuju ga različite ćelije imunskog sistema kao što su monociti, makrofazi, T limfociti (Th2 i regulatorne T ćelije), B limfociti, dendritske ćelije i mast ćelije. Smatra se da je njegova glavna biološka funkcija da ograniči i prekine inflamatorni odgovor, blokira sintezu proinflamatornih citokina i da reguliše diferencijaciju i proliferaciju različitih imunskih ćelija, kao što su T i B limfociti, NK ćelije, antigen-prezentujuće ćelije, mastociti i granulociti (Asadullah, Sterry et al. 2003).

Kada se nađu u inflamatornoj sredini, MMC ispoljavaju imunosupresorni i imunoregulatorni efekat tako što same sintetišu, ili stimulišu druge ćelije na sintezu signalnih molekula. Jedan od vrlo bitnih signalnih molekula preko koga MMC vrše imunoregulaciju je IL-10. MMC parakrinom aktivnošću indukuju povišenu sekreciju ovog citokina u dendritskim ćelijama i T limfocitima (Aggarwal and Pittenger 2005, Yang, Park et al. 2009). Kada su u pitanju bolesti skeletnog sistema, pokazano je da IL-10 ima značajnu ulogu, jer se npr. kod miševa koji su deficijentni za produkciju IL-10 javlja mnogo teža klinička slika reumatoidnog artritisa. Supresija produkcije IL-10 u sinovijalnim ćelijama dovodi do povišenog nivoa IL-1 i TNF- α , što ukazuje na to da ovaj citokin suprimira inflamaciju prisutnu u artritisu. Istraživanje u kome su na model sistemu miša sa inflamatornim artritisom indukovanim kolagenom, korišćene modifikovane MMC koje su prekomerno eksprimirale IL-10, je pokazalo da je ovaj terapijski pristup doveo do značajnog smanjenja simptoma kao i do sniženja nivoa citokina IL-6 u serumu (Choi, Yoo et al. 2008). Takođe, nedavno je na model sistemu miša pokazano da je primena MMC koje su tranzijentno eksprimirale citokin IL-10 dovela do značajnog smanjenja inflamacije upale uva (Levy, Zhao et al. 2013).

IL-10 je samo jedan od signalnih molekula koji je dobar kandidat za povećanje terapijskog kapaciteta MMC, a u literaturi su opisani i brojni drugi faktori koji su

korišćeni kao transgeni u *ex vivo* genskim terapijama različitih bolesti (Noth, Steinert et al. 2008).

CILJEVI

Leg-Kalve-Pertesova bolest (LKP) je idiopatska avaskularna osteonekroza epifize femura koja se javlja kod dece. Iako je ova bolest opisana pre nešto više od 100 godina, njena etiologija i patogeneza su i dalje nejasne. Smatra se da je LKP multifaktorijalna bolest, izazvana kombinacijom sredinskih i genetičkih faktora. Najveći broj do sada urađenih genetičkih studija vezanih za LKP bolest je bio fokusiran na ispitivanje faktora koji utiču na koagulaciju, međutim dobijeni su kontroverzni rezultati. Takođe, iako je poznato da je inflamacija prisutna tokom razvoja ove bolesti, kao i da faktori inflamacije značajano utiču na proces remodelovanja koštanog tkiva, vrlo malo se zna o njihovoj ulozi u patofiziologiji LKP bolesti. Poznato je da poremećaj procesa apoptoze može dovesti do neadekvatnog inflamatornog odgovora, kao i patološkog procesa remodelovanja koštanog tkiva. Uprkos ovim saznanjima, proces apoptoze do sada nije ispitivan u LKP bolesti.

U poslednje vreme se sprovodi sve veći broj kliničkih studija u kojima se za terapiju različitih bolesti skeletnog sistema koristi tretman autolognim mezenhimskim matičnim ćelijama (MMĆ). Subkutano adipozno tkivo predstavlja relativno lako pristupačan izvor velike količine ovih ćelija. Terapija upotrebom MMĆ je do sada dala pozitivne rezultate u mnogobrojnim kliničkim studijama, a takođe je pokazano da se terapijski kapacitet ovih ćelija može značajno povećati kada se u njih uvede specifični transgen.

Zbog svega navedenog, ciljevi ove studije su bili proučavanje genetičkih i molekularnih markera gorenavedenih procesa u LKP bolesti, kao i istraživanja vezana za poboljšanje terapijskog kapaciteta MMĆ. Ovi ciljevi su ostvareni kroz sledeće faze:

1. Analiza asocijacije genskih varijanti koagulacionih faktora: *FV* G1691A (Leiden mutacija) (rs6025), *FII* G20210A (rs1799963), *MTHFR* C677T (rs1801133) i *PAI-1* 4G/5G (rs1799889) sa pojavom LKP bolesti kod pacijenata iz Srbije.

2. Analiza asocijacije genskih varijanti markera inflamacije: *IL-6* [G-174C (rs1800795), G-597A (rs1800797)]; *IL-3* [C-16T (rs31480), C132T (rs40401)]; *TNF- α* G-308A (rs1800629) i *TLR4* [Asp299Gly (rs4986790), Thr399Ile (rs4986791)] sa pojavom LKP bolesti.

3. Analiza nivoa ekspresije markera inflamacije *IL-6* i *TNF- α* kod LKP pacijenata.

4. Analiza nivoa ekspresije markera unutrašnjeg (*Bax*, *Bcl-2* i *Bcl2L12*) i spoljašnjeg (*Fas* i *FasL*) apoptotskog puta kod LKP pacijenata.

5. Izolovanje, gajenje i tranzijentna transfekcija MMĆ iz adipoznog tkiva psa.

MATERIJAL I METODE

BIOLOŠKI MATERIJAL

Ispitanici

U ovo istraživanje je bilo uključeno 37 pacijenata obolelih od Leg-Kalve-Pertesove (LKP) bolesti, dijagnostikovanih na Institutu za hirurško ortopedske bolesti „Banjica” u Beogradu. Pacijenti su dijagnostikovani u periodu od 1988. do 2012. godine. Dijagnoza je postavljena na osnovu kliničkih kriterijuma (početak pojave bola, poremećen položaj zahvaćene noge i poremećaj hoda, ograničenje pokreta kuka - naročito unutrašnje rotacije, odsustvo kliničkih znakova koji ukazuju na traumu ili infekciju), ultrazvučnog ispitivanja (otok u zglobu, određivanje anteverzije vrata i glave butne kosti i orijentaciono određivanje kongruencije zgloba) i radiografskih snimaka (kondenzacije ili fragmentacije epifize centra osifikacije, gubitka sfernosti glave butne kosti). Dva pacijenta su imala bilateralnu bolest. Pacijenti su lečeni različitim metodama: pet je tretirano kožnim trakcijama, dok su ostali operisani odgovarajućim metodama (Salter osteotomija je izvedena kod 28 pacijenata, uključujući dva operisana bilateralno, Chiari osteotomija kod tri pacijenta i trostruka osteotomija karlice kod jednog pacijenta), u zavisnosti od njihove starosti, trajanja i težine bolesti.

U ovom istraživanju su korišćene tri različite kontrolne grupe, jednu je sačinjavalo 100 zdrave dece, drugu 50 zdravih ispitanika različite starosti i treću 11 zdravih dečaka i devojčica. Studija je odobrena odlukom Etičkog odbora Instituta za hirurško ortopedske bolesti „Banjica” u Beogradu.

Od kliničkih parametara evidentiranih u trenutku postavljanja dijagnoze, u ovom radu su korišćeni pol i uzrast pacijenata kada se bolest javila.

Periferna krv je uzorkovana sa 3.8% Na-citratom kao antikoagulansom u odnosu 9:1 i transportovana do Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo gde je vršena izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNČPK), DNK i RNK.

Ćelijske linije

U eksperimentima tranzijentne transfekcije i diferencijacije, korišćene su primarne ćelijske kulture mezenhimskih matičnih ćelija (MMĆ) izolovanih iz masnog tkiva psa. Za kontrolni eksperiment u optimizaciji tranzijentne transfekcije korišćena je permanentna humana ćelijska linija HeLa, poreklom iz humanog adenokarcinoma cerviksa, koja je komercijalno dostupna (American Type Culture collection, Manassas, VA 20108, USA - ATCC br. CCL2).

Bakterijski soj

Umnožavanje plazmida je vršeno korišćenjem bakterijskog soja *DH5 α* *Escherichia coli*.

Plazmidni vektori

U eksperimentima tranzijentne transfekcije korišćeni su sleđći plazmidi: pCH110 (Amersham Pharmacia), pBluescript (Stratagene), pCIneoIL-10 i pCIneoLacZ (pCIneoIL-10 i pCIneoLacZ su poklon od Odeljenja za oftalmologiju Medicinskog fakulteta u Lajpcigu, Nemačka, (Enzmann, Hollborn et al. 2001).

METODE KORIŠĆENE ZA GENOTIPIZACIJU

Za detekciju varijanti analiziranih gena korišćena je metoda PCR-RFLP (eng. *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*), koja se zasniva na lančanom umnožavanju regiona DNK od interesa i njihovom daljem analiziranju tretiranjem odgovarajućim restrikcionim endonukleazama (RE) (tzv reakcija „digestije“) i razdvajanju fragmenata dobijenih nakon digestije na gelu. Pored PCR-RFLP metode, korišćena je i metoda direktnog sekvenciranja PCR fragmenta.

Ovim metodama je prethodila izolacija DNK iz uzoraka krvi pacijenata i kontrolnih ispitanika.

Izolacija DNK iz periferne krvi

Za izolaciju DNK iz krvi korišćen je *QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)*, i postupak izolacije je vršen po uputstvu proizvođača. Na dno tube od 1.5 ml je sipano 20 μ l *Qiagen* proteaze, a zatim je dodato 200 μ l uzorka, 200 μ l pufera AL, nakon čega su promešani vorteksovanjem. Smeša se inkubirala u vodenom kupatilu 10 min na 56°C kako bi se obezbedilo liziranje ćelija i oslobađanje DNK od proteina. Nakon dodavanja 200 μ l 96-100% etanola, uzorak je promešan vorteksovanjem. Ovako pripremljen uzorak je nanet na *QIAamp Mini spin* kolonu, koja je onda centrifugirana na 8000 rpm, 1 min, nakon čega je eluat odbacivan. Kolona je zatim isprana sa 500 μ l pufera AW1 i centrifugirana na 8000 rpm, 1 min, a eluat je odbacivan. U sledećem koraku kolona je isprana sa 500 μ l pufera AW2 i centrifugirana na 14000 rpm, 3 min, nakon čega je eluat odbacivan. U poslednjem koraku kolona je prebačena u čistu tubu i dodato je 200 μ l pufera AE. Kolona je inkubirana 1 min na sobnoj temperaturi, a posle toga je DNK eluirana sa kolone centrifugiranjem na 8000 rpm, 1 min.

Koncentracija i čistoća DNK određene su merenjem na spektrofotometru *NanoVue (GE Healthcare Life sciences, Amersham, UK)*, po uputstvu za rad na aparatu.

Analiza DNK na agaroznom gelu

Analiza DNK je vršena na horizontalnom agaroznom gelu odgovarajuće koncentracije, obično između 2 - 4%, u zavisnosti od veličine molekula DNK koje treba razdvojiti. Kako bi se DNK fragmenti vizuelizovali, u gelove je pre polimerizacije dodavan etidijum bromid (finalne koncentracije 0.7 μ g/mL). Elektroforeza je vršena u TAE puferu (40 mM Tris, 20 mM sirćetna kiselina, 1 mM Na₂EDTA), pri naponu od 5 V/cm. Vizuelizacija DNK je vršena osvetljavanjem gela UV svetlom na CCD kameri sa *BioDocAnalyze* sistemom. Za određivanje veličine fragmenata DNK korišćeni su komercijalni DNK markeri od 100bp i 50bp, po potrebi.

Identifikacija varijanti gena *FV*, *FII*, *MTHFR*, *IL-6*, *TNF- α* i *TLR4*

Genske varijante *FV* G1691A, *FII* G20210A, *MTHFR* C677T, *IL-6* G-174C, G-597A, *TNF- α* G-308A, *TLR4* Asp299Gly, Thr399Ile su u ovoj studiji detektovane PCR-RFLP metodom. Prajmeri koji su korišćeni za umnožavanje sekvenci koje sadrže ispitivane genske varijante su navedeni u Tabeli 1.

Tabela 1. Prajmeri korišćeni za detekciju varijanti gena PCR-RFLP metodom

Gen	Genska varijanta	Sekvenca prajmera (5'-3' smer)	Ref.
<i>FV</i>	G1691A	F: TGCCCAGTGCTTAACAAGACC	(Djordjevic, Stankovic et al. 2012)
		R: TGTTATCACACTGGTGCTAA	
<i>FII</i>	G20210A	F: TCTAGAAACAGTTGCCTGGC	(Djordjevic, Stankovic et al. 2012)
		R: ATAGCACTGGGAGCATTGAAGC	
<i>MTHFR</i>	C677T	F: TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA	(Djordjevic, Stankovic et al. 2012)
		R: AGGACGGTGCGGTGAGAGTG	
<i>TLR 4</i>	Asp299Gly	F: GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG	(Lorenz, Frees et al. 2001)
		R: GATCAACCTTCTGAAAAGCATTCCCAC	
	Thr399Ile	F: GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGAGAA	
		R: ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGTTAAATGCT	
<i>TNF-α</i>	G-308A	F: AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT	(Wilson, di Giovine et al. 1992)
		R: AACTCCCCATCCTCCCTGCT	
<i>IL-6</i>	*G-174C / G-597A	F: GGAGTCACACACTCCACCT	(Pascual, Nieto et al. 2000)
		R: CTGATTGGAAACCTTATTAAG	

Napomena: nukleotidi koji su podvučeni predstavljaju mesta nukleotidne promene uvedene prajmerom. Ova promena se nalazi u okolini varijabilnog mesta od interesa i služi za formiranje sekvence koju restrikcioni enzim prepoznaje. * Prajmeri umnožavaju region koji sadrži oba varijabilna mesta. Skraćenice: F - (eng. *forward*) uzvodni prajmer, R - (eng. *reverse*) nizvodni prajmer, Ref - referenca

PCR smeša za umnožavanje fragmenata od interesa sastojala se od:

- 1 x PCR puffer (*Qiagen*)
- 1 x Q rastvor (*Qiagen*)
- 0.5 μ M prajmera (F i R)
- 0.5 U *Taq* polimeraze (*Kapa Biosystems, Wilmington, Massachusetts, USA*)
- 80 ng - 100 ng genomske DNK

PCR smeše za umnožavanje pojedinačnih genskih varijanti sadržale su specifičan par prajmera i specifičnu koncentraciju $MgCl_2$ i dNTP komponenti (Tabela 2). PCR reakcije su vršene u finalnoj zapremini od 25 μ l. Temperaturni PCR profil ovih reakcija razlikovao se samo u temperaturi anilinga (TA):

- 95°C - 5 min
 - 94°C - 30 s
 - TA - 30 s
 - 72°C - 30 s
 - 72°C - 5 min
- } 35 ciklusa

Temperature anilinga (TA) su prikazane u Tabeli 2, kao i finalne koncentracije $MgCl_2$ (*Qiagen*) i dNTP (*Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*), koje su korišćene za svaku PCR reakciju.

Tabela 2. Uslovi PCR reakcije za umnožavanje analiziranih genskih varijanti

Genska varijanta	TA (°C)	$MgCl_2$ (mM)	dNTP (mM)	Specifični PCR uslovi
<i>FV</i> G1691A	57	2.5	0.5	
<i>FII</i> G20210A	57	2.5	0.5	
<i>MTHFR</i> C677T	62	2.5	0.5	
<i>TLR4</i> Asp299Gly	55	2.5	0.25	
<i>TLR4</i> Thr399Ile	56.5	3.0	0.5	1 U <i>Taq</i>
<i>TNF-α</i> G-308A	56	2.75	0.5	1 μ M prajmera
<i>IL-6</i> G-174C	56	2.75	0.5	bez Q-rastvora
<i>IL-6</i> G-597A				

Nakon provere umnoženog produkta na 2% gelu, PCR produkti su tretirani odgovarajućim restrikcionim endonukleazama. RE u okviru PCR fragmenata prepoznaju specifične konsenzus sekvence u čijem se sastavu nalaze ispitivana varijabilna mesta. U zavisnosti od toga koja je varijanta prisutna, RE će iseći PCR fragment ili do sečenja neće doći. Sastavi smeša za digestiju finalne zapremine 20 µl optimizovani su prema uputstvu proizvođača (*Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*). U reakciji digestije PCR produkta korišćeni su puferi preporučeni od proizvođača. Za digestiju je upotrebljeno 2 U restrikcionog enzima i 7 - 10 µl PCR produkta. Smeša za digestiju je inkubirana 16 časova na 37°C, osim kada je korišćena *FastDigest* varijanta enzima, kada je inkubacija trajala 3 časa. U Tabeli 3 su za svaku analiziranu gensku varijantu prikazane očekivane dužine PCR produkata, restrikcioni enzimi, fragmenti koji nastaju sečenjem, kao i odgovarajući procenat gela korišćen za razdvajanje fragmenata.

Tabela 3. Podaci o dužinama PCR produkata i fragmenata koji nastaju nakon PCR-RFLP analize ispitivanih genskih varijanti

Gen	Varijanta	PCR (bp)	RE	RF (bp)	Agaroz (%)	Ref.
<i>FV</i>	G1691A	267	<i>MnI</i> I	G: 163+67+37 A: 200+67	3	(Djordjevic, Stankovic et al. 2012)
<i>FII</i>	G20210A	345	<i>Hind</i> III	G: 345 A: 322+23	4	(Djordjevic, Stankovic et al. 2012)
<i>MTHFR</i>	C677T	198	<i>Hinf</i> I	C: 198 T: 175+23	4	(Djordjevic, Stankovic et al. 2012)
<i>TLR4</i>	Asp299Gly	275	<i>Nco</i> I	Asp: 275 Gly: 249+36	3	(Lorenz, Frees et al. 2001)
	Thr399Ile	407	<i>Hinf</i> I	Thr: 407 Ile: 379+29	3	
<i>TNF-α</i>	G-308A	117	<i>NcoI</i>	G: 97+20 A: 117	4	(Wilson, di Giovine et al. 1992)
<i>IL-6</i>	G-174C	527	<i>HinIII</i>	G: 331+167+29 C: 331+122+45+29	3	(Pascual, Nieto et al. 2000)
	G-597A	527	<i>Fok</i> I*	G: 527 A: 461+66	2	

Skraćenice: RE - restrikciona endonukleaza, RF - restrikcioni fragmenti, Ref-referenca

* *Fast digest* enzim

Identifikacija varijanti PAI-1 i IL-3 gena

Za detekciju varijanti gena *PAI-1* (4G/5G) i *IL-3* (C-16T, C132T) korišćena je metoda direktnog sekvenciranja PCR produkata. Pre sekvenciranja, fragmenti DNK koji sadrže varijantna mesta umnoženi su PCR metodom. Sekvence prajmera za umnožavanje regiona od interesa navedene su u Tabeli 4.

Tabela 4. Prajmeri korišćeni za detekciju varijanti gena metodom direktnog sekvenciranja

Gen	Genska varijanta	Sekvenca prajmera (5'-3'smer)	Ref.
<i>PAI-1</i>	4G/5G	F: GTGCTTGAATCATCCCGAAAC	(Kim, Baek et al. 2008)
		R: TCTGGACCACCTCCAGGAAA	
<i>IL-3</i> *	C-16T / C132T	F: GCCAGGGTGTCCAGGTGAT	
		R: CATTGAGGTTGTTGAAGTCC	

Napomena: * prajmeri su dizajnirani na osnovu referentne sekvence NT_034772.6 sa sajta <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

PCR smeša finalne zapremine 25 µl je sadržala sledeće komponente:

- 1 x PCR puffer (*Qiagen*)
- 1 x Q rastvor (*Qiagen*)
- 2.5 mM MgCl₂ (*Qiagen*)
- 0.5 µM dNTP (*Thermo Scientific*)
- 0.5 µM prajmera (F i R)
- 1 U *Taq* polimeraze (*Kapa Biosystems, Wilmington, Massachusetts, USA*)
- 80 ng - 100 ng genomske DNK

Temperaturni profil PCR reakcija bio je:

- 95°C - 5 min
 - 94°C - 30 s
 - TA_{PAI-1} -60°C / TA_{IL-3} - 59°C - 30 s
 - 72°C - 30 s
 - 72°C - 5 min
- } 35 ciklusa

PCR produkti su potom proveravani elektroforezom u 2% agaroznom gelu. Ukoliko su na gelu detektovane očekivane dužine PCR produkata (628 bp za *PAI-1*, i 320 bp za *IL-3*), umnoženi fragmenti DNK su dalje pripremani za sekvenciranje.

U sledećem koraku je vršeno prečišćavanje PCR produkta na koloni korišćenjem *QIAquick PCR Purification* kita (*Qiagen*) prema uputstvu proizvođača. U mikrotubu sa PCR smešom je dodavano 85 µl PB pufera, nakon čega je smeša vorteksovana i centrifugirana tokom 5 s. Smeša je zatim nanošena na *QIAquick spin* kolonu i centrifugirana na 13000 rpm, 1 min da bi se umnoženi PCR produkt vezao za kolonu, a eluat je odbacivan. Nakon toga, kolona je ispirana sa 750 µl pufera PE i centrifugirana na 13000 rpm, 1 min. Posle odbacivanja eluata, kolona je dodatno centrifugirana na 13000 rpm, 1 min, da bi se oslobodila preostale tečnosti. *QIAquick* kolona je na kraju prebacivana u čistu mikrotubu od 1.5 ml i vršeno je eluiranje DNK sa kolone uz pomoć EB pufera, centrifugiranjem na 13000 rpm, 1 min.

Nakon prečišćavanja, umnoženi PCR produkt je pripremljen za reakciju ugradnje fluorescentno obeleženih dideoksi nukleotidtrifosfata (ddNTP). Za ovu reakciju korišćen je samo jedan prajmer (Tabela 4), i to nizvodni u oba slučaja. Obeleženi ddNTP nakon ugradnje u DNK lanac zaustavljaju PCR reakciju. Na ovaj način se dobijaju fragmenti različite dužine obeleženi različitim fluorescentnim bojama koji odgovaraju poziciji i tipu nukleotida na 3' kraju fragmenta. Ovi obeleženi PCR fragmenti se razdvajaju kapilarnom elektroforezom na sekvenceru, a detekcijom fluorescentnih boja direktno se očitava redosled nukleotida u analiziranoj sekvenci.

Smeša za reakciju sekvenciranja, finalne zapremine 8 μ l, sadržala je sledeće komponente:

- 3-10 ng prečišćenog PCR produkta (za dužine 200-500bp)
- Prajmer za sekvenciranje (finalna koncentracija 3.2 pmol)
- 3 μ l Ready Reaction Mix (*Applied Biosystems*)

Temperaturni profil PCR reakcije za sekvenciranje bio je:

- 96°C - 1 min
 - 96°C - 10 s
 - 50°C - 5 s
 - 60°C - 4 min
 - 4°C - ∞
- } 25 ciklusa

Nakon završene reakcije sekvenciranja uzorak je prečišćavan precipitacijom Na-acetatom. U 8 μ l smeše je dodato 40 μ l 0,1 M Na-acetata pH 5,2 rastvorenog u etanolu. Nakon toga je vršeno centrifugiranje na 13000 rpm, 20 min, a supernatanta je odlivan. Talog je potom ispran sa 200 μ l 70% etanola, nakon čega je uzorak centrifugiran na 13000 rpm, 10 min, posle čega je supernatant uklanjan. Ovaj korak je ponavljan dva puta. Nakon toga, talog je u potpunosti osušen i rastvaran u 25 μ l formamida (*HiDi Formamide, Applied Biosystems*). Ovako pripremljen uzorak je korišćen za kapilarnu elektroforezu na aparatu *3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. Dobijene sekvence analizirane su uz upotrebu programa *Sequencing Analysis Software v5.3.2 (Applied Biosystems)*.

METODE KORIŠĆENE ZA ANALIZU NIVOVA EKSPRESIJE GENA

Nivo ekspresije selektovanih gena je analiziran jednom varijantom *real-time* PCR metode, tzv. qRT-PCR metodom (eng. *quantitative Reverse Transcription-PCR*). Ova metoda omogućava merenje količine PCR produkta u toku svakog PCR ciklusa, tj. u realnom vremenu, a kao matrica za amplifikaciju specifične sekvence se koristi

cDNK. qRT-PCR metodi prethodile su metode za izolaciju RNK iz mononuklearnih ćelija periferne krvi, kao i metoda reverzne transkripcije.

Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi

Kako bi se izolovale MNČPK, u koje spadaju limfociti i monociti, korišćeni su sveži uzorci pune venske krvi. Izolacija je vršena centrifugiranjem na gradijentu, za koju je korišćen rastvor fikola (*Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Life sciences*), koji ima manju gustinu od eritrocita i granulocita, a veću gustinu od mononuklearnih ćelija. Centrifugiranjem su razdvojene ćelije, tako što su mononuklearne ćelije ostajale u međufazi, između fikola i vodene faze, dok su eritrociti i granulociti bili na dnu tube.

Uzorak krvi (razblažene u fiziološkom rastvoru, 0.9% NaCl, u odnosu 1:1), nanošen je na 3 ml fikola, prethodno dodatog u tubu od 10 ml. Uzorak je zatim nanošen na fikol, tako da se dve faze ne bi mešale. Posle centrifugiranja (1500 rpm, 25 min, bez kočenja), prikupljan je sloj mononuklearnih ćelija i prenošen u čistu tubu od 10 ml, u koju je zatim dodato 8 ml 1 x pufera PBS (eng. *Phosphate Buffered Saline*; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) i sadržaj je promešan invertovanjem tube. Nakon centrifugiranja (1500 rpm, 15 min) i odlivanja supernatanta, talog je rastvaran u 1 ml *TRI Reagent* rastvora (*Life Technologies*). Nakon toga je uzorak čuvan na -80°C.

Izolacija RNK iz MNČPK

Za izolaciju RNK iz MNČPK je korišćen *TRI Reagent* rastvor (*Life Technologies*) prema uputstvu proizvođača. *TRI Reagent* je monofazni rastvor fenola i guanidin-izotiocijanata, a proces izolacije predstavlja unapređen klasični metod izolacije RNK definisan od strane *Chomczynski* i saradnika (*Chomczynski and Sacchi* 1987).

MNČPK koje su resuspendovane u *TRI Reagent* rastvoru su pre izolacije kratko topljene na sobnoj temperaturi, nakon čega se vršilo liziranje ćelija provlačenjem kroz iglu promera 0.7 mm. Liziran uzorak je ostavljan na sobnoj temperaturi 5-10 min, a

zatim je dodavano 200 µl hloroforma, smeša se snažno mućkala, a zatim ostavljala da stoji 5-15 min. Uzorak je zatim centrifugiran (12000 rcf, 15 min, +4°C), nakon čega su se jasno izdvajale faze: gornja, vodena faza u kojoj se nalazi RNK, interfaza i donja, organska faza u kojoj se nalaze DNK i proteini. Vodena faza je prebačena u novu tubu u kojoj je mešana sa 1 ml izopropanola invertovanjem tube, posle čega je ostavljena da stoji 10-15 min na sobnoj temperaturi u cilju precipitacije RNK. Smeša je zatim centrifugirana (12000 rcf, 15 min, +4°C), a zatim je supernatant uklonjen dekantovanjem, a talog opran sa 1 ml hladnog 70% DEPC-etanola (etanol razblažen destilovanom vodom tretiranom 0.1% dietilpirokarbonatom - DEPC). 0.1% rastvor DEPC vode je prethodno pripremljen tako što je inkubiran na 37°C preko noći, nakon čega je autoklaviran 1 sat na 100°C. Nakon prečišćavanja etanolom, uzorak je centrifugiran (12000 rcf, 10 min, +4°C), etanol u supernatantu je pažljivo uklonjen, a talog osušen na sobnoj temperaturi. Talog RNK je rastvoren u DEPC-vodi.

Koncentracija i čistoća RNK su određene spektrofotometrijski, korišćenjem aparata *NanoVue (GE Healthcare Life sciences, Amersham, UK)*, po uputstvu za rad na aparatu. Uzorak je do dalje upotrebe čuvan na -80°C.

Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija je vršena po protokolu za RevertAid Reverse Transcriptase, (*Thermo Scientific Waltham, Massachusetts, USA*).

Nakon izolacije RNK iz MNČPK, sintetisana je cDNK metodom reverzne transkripcije. Za sintezu je pripremljena reakciona smeša ukupnog volumena od 20 µl sledećeg sastava:

- 1 ili 0.8 µg (0.8 µg za IL-6 i TNF- α) RNK
- 5 µM random-hexamer prajmera (*Thermo Scientific*)
- 1 x RT pufera (*Thermo Scientific*)
- 20 U Ribo-Lock RNaznog inhibitora (*Thermo Scientific*)
- 1 mM dNTP (*Thermo Scientific*)
- 200 U RevertAid reverzne transkriptaze (*Thermo Scientific*)

Reakciona smeša je pripremana u dva koraka. U prvom koraku je pravljena smeša RNK i random-hexamer prajmera u volumenu od 11 μ l, nakon čega se smeša inkubirala 5 min na 70°C, a zatim prebacivala na led. U drugom koraku je ovoj smeši dodato po 9 μ l smeše koja se sastojala iz RT pufera, Ribo-Lock RNaznog inhibitora, dNTP i RevertAid reverzne transkriptaze. Finalna smeša je inkubirana 10 min na 25°C, a zatim 1 h na 42°C, nakon čega je reakcija zaustavljena inkubiranjem 10 min na 70°C.

Kvalitet sintetisane cDNK je proveren umnožavanjem regiona konstitutivno ekspimiranog gena *Abl*. Na ovaj način je indirektno potvrđen integritet RNK korišćene za sintezu cDNK i efikasnost reverzne transkripcije. Za umnožavanje su korišćeni prajmeri Ia i D (Tabela 5).

Tabela 5. Prajmeri korišćeni za proveru kvaliteta cDNK

Naziv	Sekvenca (5' - 3' smer)
Ia	ATCTGCCTGAAGCTGGTGGGCT
D	TGTGATTATAGCCTAAGACCCGGAG

Reakciju volumena 25 μ l činile su sledeće komponente:

- 1 μ l cDNK
- 1 x PCR pufer (*Qiagen*)
- 1 x Q rastvor (*Qiagen*)
- 3 mM MgCl₂ (*Qiagen*)
- 0.2 μ M dNTP (*Thermo Scientific*)
- 0.4 μ M prajmera (uzvodni i nizvodni)
- 1 U *Taq* polimeraze (*KAPA Biosystems*)

Ukoliko je u PCR reakciji umnožen fragment dužine od 277 bp, smatralo se da je cDNK odgovarajućeg kvaliteta za analizu ekspresije qRT-PCR metodom. Takva cDNK je čuvana na -20°C do dalje upotrebe.

Kvantifikacija ekspresije gena qRT-PCR metodom

Za merenje nivoa ekspresije gena u uzorcima MNČPK je korišćena qRT-PCR metoda sa komparativnom ddCt analizom (Livak and Schmittgen 2001). Za normalizaciju sintetisane cDNK u uzorcima je korišćena endogena kontrola gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (*GAPDH*), a kao kalibrator je odabrana medijana normalizovanih vrednosti za ekspresiju gena u MNČPK zdravih ispitanika. Svi eksperimenti su rađeni u duplikatu. Ukoliko su se Ct vrednosti (ciklus u kojem je intenzitet fluorescencije prešao zadati prag intenziteta) za isti uzorak značajno razlikovale, eksperiment je ponavljan u duplikatu.

Relativna vrednost količine ekspresije ciljnog (*target*) gena dobijena je korišćenjem formule: $Q = 2^{-ddCt}$, gde je $ddCt = dCt_{uzorak} - dCt_{kalibrator} = (Ct_{target} - Ct_{endogena\ kont.}) - (Ct_{target,kalibrator} - Ct_{endogena\ kont.,\ kalibrator})$.

Nivoi ekspresije gena *TNF- α* , *IL-6*, *Bcl-2*, *Bax*, *Bcl2L12* su praćeni upotrebom *Sybr-Green* tehnike (protokol po uputstvu *KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal, KAPA Biosystems*). Ekspresije gena *Fas* i *FasL* su praćene upotrebom *TaqMan* tehnike (protokol po uputstvu *KAPA PROBE FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal, KAPA Biosystems*). Nukleotidne sekvence *TNF- α* , *IL-6*, *Bcl-2*, *Bax*, *Bcl2L12* i *GAPDH* prajmera navedene su u Tabeli 6. Ekspresija *Fas* i *FasL* gena je analizirana korišćenjem komercijalno dostupnih *TaqMan Gene Expression Assay*-a (Tabela 6).

Tabela 6. Prajmeri, probe i eseji korišćeni za qRT-PCR analizu

Naziv	Sekvenca prajmera i probe (5' - 3' smer), naziv eseja
<i>TNF-α</i>	F: CCCAGGCAGTCAGATCATCTTC
	R: AGCTGCCCTCAGCTTGA
<i>IL-6</i>	F: GCAAAGAGGCACTGGCAGAA
	R: GGCAAGTCTCCTCATTGAATCC
<i>Bax</i>	F: TGGCAGCTGACATGTTTTCTG
	R: TCACCCAACCACCCTGGTCTT
<i>Bcl</i>	F: TCGCCCTGTGGATGACTGA
	R: CAGAGACAGCCAGGAGAAATC
<i>Bcl2L12</i>	F: CCCTCGGCCTTGCTCTCT
	R: GGGCCACCAAAGCATAGAAG
<i>GAPDH</i> (<i>Syber</i>)	F: GTGAAGGTCGGAGTCAACG
	R: TGAGGTCAATGAAGGGGTC
<i>Fas</i>	TaqMan Gene Expression Assay - Hs00163653_m1
<i>FasL</i>	TaqMan Gene Expression Assay - Hs00181225_m1
<i>GAPDH</i> (<i>TaqMan</i>)	F: GAAGGTGAAGGTCGGAGT
	R: GAAGATGGTGATGGGATTTC
	*FAM-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-TAMRA

Napomena: * označava *GAPDH* probu korišćenu u *TaqMan* qRT-PCR analizi. FAM - fluorescentna reporterska boja; TAMRA - "kvenčerska" boja. F - uzvodni (*forward*) i R - nizvodni (*reverse*).

Reakciona smeša za umnožavanje *TNF- α* , *IL-6*, *Bcl-2*, *Bax*, *Bcl2L12* i *GAPDH* *Sybr-Green* metodom imala je finalni volumen od 10 μ l i sastojala se od komponenti:

- 20 ng cDNK
- 1 x *Kapa Syber Fast Universal qPCR Master Mix*
- 1 x *ROX Low* referentne boje
- Prajmera: *TNF- α* : 300 nM F i R prajmera; *IL-6*: 300 nM F i R prajmera; *Bcl2*, *Bax* i *Bcl2L12*: 50 nM F i R prajmera; *GAPDH*: 400 nM F i R prajmera

Temperaturni profil korišćen tokom analize je za sve navedene gene bio isti:

- 2 min / 50°C
- 3 min / 95°C
- 40 ciklusa:
 - 15 s / 95°C
 - 1 min / 60°C (aniling)

Reakciona smeša za umnožavanje *Fas* i *FasL* gena *TaqMan* metodom imala je volumen od 10 μ l i sastojala se od sledećih komponenti:

- 20 ng cDNK
- 1 x *KAPA PROBE FAST Universal qPCR Master Mix (KAPA Biosystems)*
- 1 x *ROX Low* referentne boje (*KAPA Biosystems*)
- Prajmera: 1 x *Fas (FasL) TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems)*; *GAPDH*: 300 nM F i R prajmera i 200 nM probe

Temperaturni profil reakcije korišćene za amplifikaciju *Fas*, *FasL* i *GAPDH* bio je:

1. 2 min / 50°C
2. 3 min / 95°C
3. 40 ciklusa:
 - 15 s / 95°C
 - 1 min / 60°C

Nivoi ekspresije analiziranih gena su mereni na aparatu 7500 Real-time PCR (*Applied Biosystems*).

UMNOŽAVANJE PLAZMIDA U BAKTERIJAMA

Kultivisanje bakterija

U toku rada sa bakterijama neophodno je održati sterilne uslove. Iz tog razloga, se rad odvija u neposrednoj blizini plamenika. Takođe, svi rastvori, posude (petri šolje, menzure, itd.) i alatke (eza, nastavak, čačkalica, itd.) moraju biti sterilni.

E. coli bakterije soja *DH5α* kultivisane su u tečnom, LB (*Luria-Bertani*) medijumu (1% tripton, 1% NaCl, 0.5% ekstrakt kvasca) ili na čvrstoj, LA podlozi (1% tripton, 1% NaCl, 0.5% ekstrakt kvasca, 1.5% bakto-agar). Svi medijumi za kultivisanje se sterilišu autoklaviranjem. Bakterije su gajene na temperaturi od 37⁰C. Kako bi se obezbedio selektivni rast transformanata, u tečni i čvrsti medijum je dodat odgovarajući antibiotik. S obzirom da pCIneoIL-10 i pCIneoLacZ plazmidi nose rezistenciju na ampicilin, ovaj antibiotik je dodavan u medijum u finalnoj koncentraciji 80 µg/ml.

Pripremanje E. Coli DH5α kompetentnih ćelija

Ovom metodom se bakterije pripremaju za transformaciju stranom DNK. Ćelijska membrana bakterija treba da se učini propustljivijom, a da se pritom ne umanjuje vijabilnost ćelija i njihova sposobnost razmnožavanja (Maniatis 1989). Sa čvrste, LA podloge su pojedinačne bakterijske kolonije prenešene u 5 ml tečnog LB medijuma bez antibiotika (*DH5α* soj ne poseduje rezistenciju na antibiotike). Zatim su kultivisane preko noći, uz aeraciju, na 37⁰C. Narednog dana, je inokulisan 1 ml prekononoćne kulture u svež LB medijum (20 ml). Nakon toga su bakterije gajene na 37⁰C do postizanja gustine od 0.3 - 0.5 OD, što se određuje merenjem spektrofotometrom na talasnoj dužini

od 600 nm. Bakterije iz ove kulture su razblažene inokuliranjem (2 ml) u svež tečni LB medijum (20 ml). Rast bakterijske kulture je nastavljen na 37⁰C do gustine od 0.5 OD_{600nm} (na ovaj način se dobija veliki broj bakterijskih ćelija koje su u eksponencijalnoj fazi rasta). Zatim je kultura centrifugirana na 6000 rpm/10 min/+4⁰C (Sorvall centrifuga, rotor SS-34) i dobijeni talog bakterija resuspendovan u 10 ml hladnog 0.1 M CaCl₂, pa inkubiran na ledu 10 min i ponovo centrifugiran pri istim uslovima. Bakterijski talog je resuspendovan u 2 ml ohlađenog rastvora sačinjenog od 85% 0.1 M CaCl₂ i 15% glicerola. Kompetentne bakterijske ćelije su čuvane u alikvotima od 200 µl na -80⁰C.

Poželjno je izvršiti proveru vijabilnosti kompetentnih ćelija njihovim zasejavanjem na neselektivnu LA podlogu. Takođe, poželjno je isprobati kompetentnost dobijenih bakterija njihovom transformacijom plazmidom koji nosi rezistenciju na antibiotik i zasejavanjem na odgovarajuću selektivnu podlogu.

Transformacija E. Coli DH5a kompetentnih ćelija

Bakterije se u ovom postupku, zbog svoje velike reproduktivne sposobnosti, koriste kao recipijenti strane DNK koju replikuju jednako efikasno kao i svoju sopstvenu (Cohen, Chang et al. 1972).

Kompetentne ćelije (200 µl) su otopljene na ledu i dodata im je plazmidna DNK uz veoma pažljivo, blago mešanje, a zatim su inkubirane 30 min na ledu. Smeša je prebačena u ugrejanu tubu i inkubirana na 42⁰C / 2 min, a zatim na ledu / 10 min (izlaganjem smeše temperaturnom šoku propustljivost bakterijskih membrana dostiže maksimum, što omogućava efikasnu transformaciju). Transformisanim bakterijama je dodato 800 µl tečnog LB medijuma, bez antibiotika i omogućen im je rast u aerisanim uslovima na 37⁰C / 30-60 min. Oporavak je nastavljen dodavanjem 1 ml svežeg LB medijuma sa antibiotikom i gajenjem u aerisanim uslovima na 37⁰C/1-2 sata. Alikvot bakterijske kulture (20-100 µl) je razmazan po čvrstoj LA podlozi, koja sadrži antibiotik. Rast bakterija se odvijao preko noći na 37⁰C, posle čega se uočavaju pojedinačne kolonije na petri šoljama.

Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali

Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali je vršeno prema uputstvu *QIAprep Spin Miniprep Kit-a*.

Pojedinačne bakterijske kolonije su zasejavane u 5 ml tečnog LB medijuma sa ampicilinom i inkubirane preko noći na 37°C uz aeraciju na 180 rpm. Prekonoćne kulture su prebacivane u mikrotube i centrifugirane na 13000 rpm u toku 5 min. Bakterijski talog je resuspendovan vorteksovanjem u 250 µl pufera P1. Zatim je dodavano 250 µl pufera P2, praćeno invertovanjem tube 4 do 6 puta. Zatim je dodavano 350 µl pufera N3, nakon čega je takođe bilo neophodno momentalno i temeljno promešati sadržaj na isti način. Navedeni koraci su omogućili lizu bakterijskih ćelija. Potom je smeša centrifugirana na 13000 rpm u toku 10 min. Supernatant koji sadrži plazmidnu DNK je direktnim presipanjem iz mikrotube nanošen na QIAprep kolonu. Nakon toga je vršeno centrifugiranje na 13000 rpm u toku 1 min i eluat je odbacivan. U ovom koraku DNK je ostala vezana za kolonu i potrebno ju je isprati od nečistoća. Stoga je na kolonu prvo dodato 0.5 ml pufera PB praćeno centrifugiranjem u toku 1 min. Dodavanjem 0.75 ml pufera PE i centrifugiranjem na 13000 rpm u toku 1 min DNK je dalje bila oslobađana od nečistoća. Posle svakog od do sada navedenih centrifugiranja, eluat je odbacivan. Da bi se odstranili i poslednji tragovi pufera, kolona je ponovo centrifugirana na 13000 rpm u toku 1 min. Kolona je na kraju prebačena u čistu mikrotubu u koju će biti eluirana DNK. Na kolonu je tada dodato 100 µl pufera EB koji će osloboditi DNK sa kolone. Nakon inkubacije od 1 min na sobnoj temperaturi, DNK je eluirana centrifugiranjem na 13000 rpm u trajanju od 1 min.

Izolovanje plazmidne DNK na velikoj skali

Za dobijanje velike količine plazmidne DNK dobrog kvaliteta, potrebne za eksperimente transfekcije, korišćen je *QIAGEN Plasmid Purification Maxi Kit*.

Pojedinačne bakterijske kolonije su zasejavane u 250 ml tečnog LB medijuma sa ampicilinom i inkubirane preko noći na 37°C uz aeraciju na 180 rpm. Prekonoćna kultura je prebačena u sterilnu plastičnu tubu i potom centrifugirana na 6000rpm u toku

20 min na +4°C (*Sorvall* centrifuga, rotor GS-3) nakon čega je talog resuspendovan u 10 ml pufera P1 koji obezbeđuje lizu bakterijskih ćelija. Svi koraci su bili izvođeni na ledu. Nakon što je talog u potpunosti rastvoren, sadržaj je prebačen u sterilnu plastičnu tubu od 30 ml, u koju je zatim dodato 10 ml pufera P2 a sadržaj pomešan invertovanjem tube 4 do 6 puta. Nakon toga, smeša je inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi. Zatim je dodato 10 ml pufera P3 nakon čega je smeša temeljno promešana invertovanjem tube 4 do 6 puta a potom inkubirana na ledu u toku 20 min. Smeša je zatim centrifugirana na 13000 rpm u toku 30 min na +4°C (*Sorvall* centrifuga, rotor SS-34). Za to vreme je *Qiagen* kolona pripremljena propuštanjem 10 ml pufera QBT, koji uz pomoć sile gravitacije prolazi kroz kolonu. Nakon centrifugiranja je supernatant u kome se nalazi plazmidna DNK naliven u prethodno pripremljenu *Qiagen* kolonu. Nakon prolaska supernatanta, plazmidna DNK ostaje vezana za kolonu. Sledi ispiranje vezane DNK od nečistoća dodavanjem 30 ml pufera QC, što je ponovljeno dva puta. Kolona je zatim postavljena na sterilnu staklenu epruvetu od 30 ml radi elucije. U sledećem koraku je DNK eluirana sa kolone dodavanjem 15 ml pufera QF. DNK je potom precipitirana dodavanjem 10.5 ml izopropanola a potom centrifugirana na 8000 rpm u toku 30 min na +4°C (*Sorvall* centrifuga, rotor SS-34). Supernatant je pažljivo odliven, a DNK talog ispran sa 5 ml 70% etanola. Nakon centrifugiranja na 8000 rpm u toku 10 min, supernatant je uklonjen, a DNK talog osušen i rastvoren u 200 µl 1xTE.

Čuvanje transformanata

Transformanti mogu biti vijabilni nekoliko nedelja ako se čuvaju na čvrstim, selektivnim LA podlogama, u petri šoljama zatvorenim parafilmom, na +4°C, okrenutime poklopcem na dole. Kako bi se transformanti čuvali duži vremenski period, prave se glicerolski stokovi koji sadrže 150 µl sterilnog 100% glicerola i 850 µl tečne prekonoćne kulture. Glicerolski stokovi su vijabilni nekoliko godina na -20°C i duži niz godina na -80°C (Maniatis 1989).

KULTIVISANJE ĆELIJSKIH LINIJA

U eksperimentima tranzijentne transfekcije korišćena je permanentna humana ćelijska linija HeLa i primarne MMĆ izolovane iz adipoznog tkiva psa. Obe linije spadaju u adherentne ćelije - lepe se za podlogu i rastu dok se ne formira konfluentni sloj ćelija na površini posude za kultivisanje. Za gajenje ćelija su korišćeni odgovarajući medijumi koji su navedeni u odeljcima koji slede.

Kultivisanje HeLa ćelija

HeLa ćelije su gajene u medijumu koji se sastojao od DMEM-a sa niskim sadržajem glukoze (*DMEM low glucose, GlutaMAX™, Gibco, Life Technologies*), 10% fetalnog telećeg seruma (*FCS, PAA Laboratories*), 1x neesencijalnim aminokiselinama (*Gibco, Life Technologies*) i 1x mešavine antibiotika (*Penicillin Streptomycin, Gibco, Life Technologies*) (u daljem tekstu: medijum za gajenje HeLa ćelija) na 37°C i 5% CO₂. Pasažiranje ćelija je vršeno pri konfluentnosti od približno 80%, svaka 3 - 4 dana. Nakon usisavanja medijuma vakumom, ćelijski sloj je ispiran PBS-om. Nakon toga je izvršeno odvajanje ćelija od podloge dodavanjem 1x tripsina, rastvorenog u PBS-u (*Trypsin - EDTA Solution, Gibco, Life Technologies*). Nakon kraćeg delovanja enzima (oko 2 min) na 37°C, reakcija je zaustavljena dodavanjem medijuma sa serumom u odnosu 1:5 prema dodatoj količini tripsina. Ćelije su temeljno resuspendovane i potom subkultivisane u odgovarajućem odnosu (najčešće u odnosu 1:5). U slučaju pripreme za eksperiment transfekcije, ćelije su nakon resuspendovanja izbrojane. Ćelije su brojane pod mikroskopom pomoću hemocitometra. Korišćena je *Bürker-Türk*-ova pločica, prema uputstvu proizvođača. Pri brojanju je korišćena boja tripan-plavo (0.1%) koja omogućava razlikovanje živih od mrtvih ćelija - tripan-plavo ulazi u mrtve ćelije i boji ih, dok žive ćelije ostaju svetle, sa zlatnim oreolom.

Izolacija, kultivisanje i diferencijacija MMĆ iz adipoznog tkiva psa

Izolacija MMĆ iz adipoznog tkiva

Nakon uzorkovanja, adipozno tkivo je bilo smešteno u PBS u tubi od 50 ml, na sobnoj temperaturi tokom 24 sata. Nakon toga je PBS pažljivo izvađen pipetom, i zamenjen PBS-om sa 1x antibiotikom-antimikotikom (A/A) (*Antibiotic-Antimycotic, Gibco, Life Technologies*), volumena koji odgovara volumenu tkiva, i potom je tuba invertovana nekoliko puta. Korak je ponovljen četiri do pet puta, dok PBS (sa 1x A/A) nije bio čist, bez tragova krvi, pri čemu je u poslednjem koraku uzorak ostavljen u PBS-u. Potom je uzorak sa PBS-om centrifugiran 2 minuta na 1200g, kako bi se uklonili preostali eritrociti. Potom je PBS uklonjen pipetom, a u tubu sa tkivom dodavan 0.1% rastvor kolagenaze (*Collagenase from Clostridium histolyticum, Type I-A, Sigma-Aldrich*), rastvorene u DMEM-u sa niskim sadržajem glukoze i 1x A/A, volumena koji odgovara volumenu tkiva. Nakon toga je uzorak inkubiran na 37°C tokom 60 minuta, uz snažno mućkanje u trajanju od 5 do 10 sekundi na svakih 15 minuta. Nakon završetka perioda digestije kolagenazom, tkivo bi trebalo da ima tzv. konzistenciju nalik supi. Kolagenaza je potom neutralizovana dodavanjem DMEM-a sa niskim sadržajem glukoze, sa 10% FCS i 1x A/A, u volumenu koji odgovara volumenu rastvora kolagenaze, nakon čega je vršeno mešanje invertovanjem. Potom je uzorak centrifugiran na 1200g tokom 10 minuta, nakon čega je odliven masni čep i supernatant. Talog sa ćelijama je zatim resuspendovan u medijumu koji se sastoji od DMEM-a sa niskim sadržajem glukoze (*DMEM low glucose, GlutaMAX™, Gibco, Life Technologies*), 10% FCS i 1xA/A (u daljem tekstu medijum za gajenje MMĆ), nakon čega je uzorak fitriran kroz 100 µm filter. Ćelije su nakon toga brojane pod mikroskopom pomoću hemocitometra na isti način kao i HeLa ćelije. Zatim su zasejane u gustini $6 \times 10^4 / \text{cm}^2$ u sterilan plastični sud za adherentne ćelije, u medijumu za gajenje MMĆ i gajene na 37°C i 5% CO₂. Medijum je promenjen nakon 7 dana kako bi se odstranile sve ćelije koje se nisu zalepile za podlogu suda.

Kultivisanje MMC iz adipoznog tkiva psa

Ćelijama je medijum za gajenje menjan na svaka 3-4 dana, uz prethodno ispiranje PBS-om. Pasažiranje ćelija je vršeno pri konfluentnosti od približno 80%. Nakon usisavanja medijuma vakuumom, ćelije su ispirane dva puta PBS-om. Nakon toga je izvršeno odvajanje ćelija od podloge dodavanjem 0.5 x tripsina, rastvorenog u PBS-u. Nakon kraćeg delovanja enzima (od 1 do 2 min) na 37°C, reakcija je zaustavljena dodavanjem medijuma sa serumom u odnosu 1:5 prema dodatoj količini tripsina. Ćelije su temeljno resuspendovane i potom subkultivisane. Nakon brojanja ćelija pod mikroskopom, ćelije su zasađivane u gustini $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ u sterilan plastični sud za adherentne ćelije, odgovarajućih dimenzija (u zavisnosti od potrebnog broja ćelija za dalje eksperimente).

Osteogena diferencijacija MMC iz adipoznog tkiva psa

Ćelije su zasejavane u sterilne plastične ploče za adherentne ćelije sa 24 bunarića sa ravnim dnom (*Sarstedt, Njuton, NC, SAD*), u gustini 6×10^4 ćelija po bunariću, u medijumu za gajenje. Nakon 24 do 72 časa, odnosno kada su ćelije dostizale konfluentnost oko 100%, ispirane su PBS-om i dodavan im je osteogeni medijum (po protokolu za osteogenu diferencijaciju sa sajta - <http://www.promocell.com>).

Osteogeni medijum se sastojao od standardnog medijuma za gajenje MMC sa dodatim inducerima:

1. L - askorbinskom kiselinom (*L-Ascorbic acid 2 - phosphate, Sigma-Aldrich*) - finalne koncentracije 50 μM
2. dinatrijum β - glicerofosfatom (*β -Glycerophosphate disodium salt hydrate, Sigma-Aldrich*) - finalne koncentracije 10mM
3. deksametazonom (*Dexamethasone, powder, Sigma-Aldrich*, pripremljenog prema uputstvu proizvođača)- finalne koncentracije 0,1 μM .

Protokol za osteogeni medijum je preuzet iz publikacije (Mesimaki, Lindroos et al. 2009). Osteogeni medijum je menjan dva puta nedeljno tokom osteogene diferencijacije u trajanju od 21 dan. Tokom tog perioda, ćelije su gajene u standardnim uslovima na 37°C i 5% CO₂.

Bojenje Alizarin crvenom bojom

Kako bi se vizuelizovali ekstraćelijski depoziti kalcijuma, formirani tokom osteogene diferencijacije, nakon tri nedelje kultivisanja u osteogenom medijumu, ćelije su fiksirane i bojene *Alizarin crvenom* bojom.

Da bi se fiksirale, ćelije su isprane PBS-om i zatim fiksirane u rastvoru 10% formalina u PBS-u. Dodavan je rastvor 10% formalina u zapremini koja je bila dovoljna da pokrije dno bunarića i ćelije su inkubirane u njemu minimum 30 minuta, na sobnoj temperaturi. Zatim su isprane destilovanom vodom dva puta i nanošen je 2% rastvor *Alizarin crvenog* (*Alizarin Red S, Sigma Aldrich*) u kome su inkubirane tokom 45 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku (po protokol za osteogenu diferencijaciju sa sajta - <http://www.promocell.com>). Nakon intenzivnog ispiranja u destilovanoj vodi, da bi se uklonilo nespecifično bojenje, prisustvo crvene boje je ukazivalo na deponovane soli kalcijuma. Ćelije su nakon bojenja fotografisane na invertnom mikroskopu.

Hondrogena diferencijacija MMC iz adipoznog tkiva psa

Kako bi se diferencirale u hondrogeni ćelijski tip, neophodno je da se ostvare uslovi u kojima MMC mogu da produkuju matriks nalik hrskavičavom, odnosno da ćelije formiraju trodimenzionalnu strukturu (Wei, Sun et al. 2007).

Da bi se postigli ti uslovi, ćelije su zasađene u sterilnim plastičnim mikrotitar pločama sa 96 bunarića U-oblika, za ćelije u suspenziji (*Sarstedt, NC, SAD*). Ćelije su zasejavane u gustini 1×10^5 do 3×10^5 ćelija po bunariću, u medijumu za gajenje. Nakon 24 do 48 časova, ćelije su formirale sferoidne strukture, i tada im je medijum zamenjen

hondrogenim medijumom ili kontrolnim medijumom (protokol za hondrogenu diferencijaciju sa sajta - <http://www.promocell.com>).

Hondrogeni medijum se sastojao od DMEM-a sa visokim sadržajem glukoze (*DMEM, high glucose, GlutaMAX™, Gibco, Life technologies*), bez FCS-a u koji su bili dodati induceri:

1. 1x ITS (1.00 mg/mL insulin, 0.55 mg/mL transferin, 0.5 µg/mL natrijum selenit, 50mg/mL BSA; *ITS+1 Liquid Media Supplement (100×), Sigma-Aldrich*)
2. L-askorbinska kiselina (*L-Ascorbic acid 2 - phosphate, Sigma-Aldrich*) - finalna koncentracija 50µg/ml
3. TGF-β 3 (eng, *Transforming Growth Factor β 3; TGF-β 3-E. coli human recombinant, Sigma-Aldrich*) - finalna koncentracija 10 ng/ml
4. deksametazon (*Dexamethasone, powder, Sigma-Aldrich*, pripremljenog prema uputstvu proizvođača)- finalna koncentracija 0,1µM.

Kontrolni medijum nije sadržao inducere. Sastav hondrogenog medijuma je preuzet iz publikacije (Vidal, Robinson et al. 2008). Medijum je menjan na svaka tri do četiri dana tokom hondrogene diferencijacije u trajanju od 21 dan. Zamena medijuma se mora vršiti vrlo pažljivo, jer sferoidne strukture nisu prilepljene za dno bunarića. Tokom perioda diferencijacije, ćelije su gajene u standardnim uslovima na 37°C i 5% CO₂.

Bojenje Alcian plavom bojom

In vitro hondrogeni potencijal MMĆ iz adipoznog tkiva psa, ispitan je na osnovu sposobnosti ćelija da stvaraju sulfatisane glikozaminoglikane, čija sinteza je osobina hondrocita. Tri nedelje nakon gajenja MMĆ u opisanim uslovima za hondrogenu diferencijaciju, ćelije su fiksirane i bojene *Alcian plavom* bojom, koja specifično boji sulfatisane glikozaminoglikane.

Nakon što je odvađen medijum, sferoide su pažljivo isprane PBS-om dva puta i zatim fiksirane inkubiranjem u rastvoru 10% formalina PBS-u, 60 minuta na sobnoj

temperaturi. Zatim su sferoide pažljivo dva puta isprane destilovanom vodom. Nakon toga je na njih nanešen rastvor *Alcian plave* boje, koji se sastojao od: 60 ml etanola (98 - 100%) sa 40 ml sirćetne kiseline (98 - 100%) i 10 mg *Alcian plave* boje (*Alcian Blue 8 GX dye, Sigma- Aldrich*). Sferoide su bile inkubirane u ovom rastvoru tokom noći, na sobnoj temperaturi, u mraku. Nakon inkubacije je uklonjen rastvor za bojenje i sferoide su inkubirane u rastvoru za odbojavanje (koji se sastoji od etanola (98 - 100%) i sirćetne kiseline (98 - 100%) u odnosu 1.5:1), 20 minuta. Zatim je uklonjen rastvor za odbojavanje i dodat PBS (po protokol za hondrogenu diferencijaciju sa sajta - <http://www.promocell.com>). Sferoide su nakon bojenja fotografisane na invertnom mikroskopu.

Zamrzavanje i odmrzavanje adherentnih ćelija gajenih u kulturi

Zamrzavanje je vršeno u fazi logaritamskog rasta ćelija pri čemu su bile pripremljene na sledeći način: ćelije su isprane od medijuma, tripsinizovane i potom centrifugirane 5 min na 300g. Nakon pažljivog usisavanja medijuma, ćelijski talog je resuspendovan u medijumu za zamrzavanje (za HeLa -10% dimetilsufoksid (DMSO) i 90% FCS; za MMĆ – 10% DMSO, 10% DMEM sa niskim sadržajem glukoze, 80% FCS). DMSO ima krioprotektivnu ulogu, jer obezbeđuje vezivanje vode i time smanjuje verovatnoću stvaranja kristala leda koji mogu da oštete ćelije. Ćelijska suspenzija je razdeljivana u kriotube i potom podvrgnuta postupnom zamrzavanju, u posudi koja obezbeđuje hlađenje za 1°C po minutu u zamrzivaču na -80°C (*Cryo 1°C Freezing Containers, Nalgene*) i posle 24 časa kriotube sa ćelijama su smeštane u tečni azot.

MMĆ je bilo neophodno izbrojati nakon tripsinizacije, kako bi se zamrzle u optimalnoj gustini što omogućava njihovo najbolje preživljavanje. Optimalna gustina je od 1×10^6 do 2×10^6 ćelija po ml medijuma za zamrzavanje (Yu, Floyd et al. 2011).

Odmrzavanje ćelija je vršeno brzo, prenoseći ih iz tečnog azota (-196°C) na sobnu temperaturu i rastvaranjem u prethodno zagrejanom medijumu na 37°C. Brzim otapanjem kristalne strukture nestaju i smanjuje se opasnost da probiju ćelijske membrane. DMSO koji je prisutan u medijumu za zamrzavanje je inertan u medijumu za gajenje ćelija, ali ipak postoji mogućnost da svojim prisustvom dovede do promene

njihovih prvobitnih karakteristika. Zbog toga medijum zamenjen svežim oko 16 časova nakon odmrzavanja ćelija.

Tranzijentna transfekcija ćelija u kulturi

S obzirom na to da MMC spadaju u ćelije koje se tesko transfekuju, u ovom radu je vršena optimizacija tranzijentne transfekcije MMC. Poređena je efikasnost kao i uticaj na preživljavanje ćelija korišćenjem dva transfekciona reagensa, čija dejstva se zasnivaju na različitim mehanizmima. Korišćeni su *Lipofectamine 2000* reagens (*Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent, Life Technologies*), koji funkcioniše na principu lipozoma i *GeneCellin* reagens (*BCC, BioCellChallenge, Francuska*) koji funkcioniše na principu nanočestica. Za optimizaciju transfekcije je korišćen pCH110 plazmid. Ćelijska linija HeLa je korišćena kao kontrola u ovim eksperimentima, a vektor pBluescript kao kontrolni vektor.

Tranzijentna transfekcija Lipofectamine 2000 reagensom

Lipofectamine 2000 reagens formira komplekse oko DNK i stapajući se sa ćelijskom membranom, eukariotskim ćelijama doprema stranu DNK u ćeliju.

U plastične sterilne ploče za adherentne ćelije sa 24 bunarića sa ravnim dnom (*Sarstedt, Njuton, NC, SAD*), zasejano je 5×10^4 ćelija HeLa / MMC u 0.5ml medijumu za gajenje, bez antibiotika / antimikotika. Ćelije su gajene 24 časa u standardnim uslovima. Narednog dana, ćelijama je dodat medijum za transfekciju. Kako bi se odredili optimalni uslovi za transfekciju, korišćene su dve varijante medijuma za transfekciju: 1. medijum za gajenje ćelija bez antibiotika / antimikotika; 2. medijum za gajenje ćelija bez FCS-a i bez antibiotika / antimikotika. Potom je pristupljeno pripremi transfekcione smeše. Najpre je plazmidna DNK rastvorena u 50 μ l OptiMEM-a (*Invitrogen, Life Technologies*). Zatim je određena količina transfekcionog reagensa rastvorena u 50 μ l Opti-MEM-a, smeša je blago promešana i inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi. Količine transfekcionog reagensa i plazmidne DNK koje su

korišćene tokom optimizacije transfekcije su prikazane u Tabeli 7. Na kraju su ove dve smeše sjedinjene, blago promešane i inkubirane 20 min, čime je omogućeno formiranje kompleksa između transfektionog reagensa i DNK. Nakon isteka ovog vremena, u pojedinačni bunarić dodavano je, kap po kap, 100 μ l transfeksione smeše. Ploča sa 24 bunarića je zatim blago zaljuljana da bi se medijum bolje sjedinio sa transfeksionom smešom. Čelije su u prisustvu transfeksione smeše inkubirane 4 časa, zatim su ispirane PBS-om, nakon čega im je dodat svež medijum. Transfekovane ćelije su gajene 48 časova u standardnim uslovima, pre nego što se pristupilo sledećem eksperimentu (*In situ* β -galaktozidaznom bojenju).

Tabela 7. Varijante protokola koje su korišćene prilikom optimizacije tranzijentne transfekcije *Lipofectamine 2000* reagensom

Oznaka protokola	Količina reagensa	Količina plazmida	FCS
PUP	2 μ l	0.8 μ g	+
A1	2.5 μ l	1 μ g	—
A2	2.5 μ l	1 μ g	+

Skraćenica: PUP - Po uputstvu proizvođača

Tranzijentna transfekcija GeneCellin reagensom

GeneCellin reagens funkcioniše na principu nanočestica i po informacijama koje dostavlja proizvođač, upotreba ovog reagensa nema toksičan efekat na ćelije.

U plastične sterilne ploče za adherentne ćelije sa 24 bunarića sa ravnim dnom (*Sarstedt, Njuton, NC, SAD*), zasejano je 5×10^4 ćelija HeLa / MMĆ u 0.5 ml medijuma za gajenje, bez antibiotika / antimikotika. Čelije su gajene 24 časa u standardnim uslovima. Narednog dana, ćelijama je dodat medijum za transfekciju. Kako bi se odredili optimalni uslovi za transfekciju, korišćene su dve varijante medijuma, kao pri transfekciji *Lipofectamine 2000* reagensom. Potom je pripremljena transfeksiona smeša. U 100 μ l DMEM-a sa niskim sadržajem glukoze je rastvorena plazmidna DNK, zatim je

u tu smešu dodata određena količina transfekcionog reagensa. Količine medijuma za transfekciju, transfekcionog reagensa i plazmidne DNK koje su korišćene tokom optimizacije transfekciju su prikazane u Tabeli 8. Transfeksiona smeša je zatim vorteksovana 15 sekundi i nakon toga inkubirana 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon isteka ovog vremena, u pojedinačni bunar dodavano je, kap po kap, 100 μ l transfeksione smeše. Ploča sa 24 bunarića je zatim blago zaljuljana da bi se medijum bolje sjedinio sa transfekcionom smešom. Čelije su u prisustvu transfeksione smeše inkubirane u standardnim uslovima. Uzorcima koji su transfekovani po protokolu B2 iz Tabele 8, posle 3 časa je dodato 200 μ l medijuma za transfekciju, a onima koji su transfekovani po protokolu B1 je pored toga dodat i FCS u finalnoj koncentraciji 10%. Medijum nije menjan i transfekovane ćelije su gajene 48 časova u standardnim uslovima, pre nego što se pristupilo sledećem eksperimentu (*In situ* β -galaktozidaznom bojenju i / ili prikupljanju medijuma za ELISA esej).

Tabela 8. Varijante protokola koje su korišćene prilikom optimizacije tranzijentne transfekcije *GeneCellin reagensom*

Oznaka protokola	Količina reagensa	Količina plazmida	FCS	Količina medijuma #
PUP	2 μ l	0.5 μ g	+	500 μ l
B1	5 μ l	1 μ g	—	200 μ l
B2	5 μ l	1 μ g	+	200 μ l

Napomena: # Količina medijuma za transfekciju; PUP - Po uputstvu proizvođača

Esej In situ β -galaktozidaznog bojenja

U eksperimentima optimizacije transfekcije je korišćen pCH110 plazmid, jer on nosi *LacZ* gen sa koga se eksprimira enzim β -galaktozidaza. Ovaj enzim prilikom *in situ* bojenja, razlaže supstrat X-gal (5-bromo-4-hloro-3-indolil β -D-galactopiranozid) u nerastvorljivi plavo-zeleni precipitat, koji je vidljiv pod mikroskopom. Ovom metodom se vizuelizuje efikasnost transfekcije.

Ćelijama je uklonjen medijum i isprane su PBS-om. Zatim su fiksirane inkubacijom u rastvoru 2% formaldehida, 0.2% gluteraldehida u PBS-u, na sobnoj temperaturi. Nakon toga ćelije su isprane PBS-om tri puta i nanešen je rastvor za bojenje, koji se sastojao od rastvora 0.1% X-gal-a, 5mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 5mM $K_4[Fe(CN)_6]$, 2mM $MgCl_2$ u PBS-u. Ćelije su inkubirane preko noći u rastvoru za bojenje na 37°C, nakon čega su fotografisane na invertnom mikroskopu.

Merenje sekretovanog IL-10 nakon transfekcije MMC ELISA metodom

Nakon što su optimizovani uslovi za transfekciju, (najefikasnija transfekcija je postignuta korišćenjem B2 protokola iz Tabele 8) MMC iz adipoznog tkiva psa su transfekovane pCIneoIL-10 i pCIneoLacZ plazmidima. Vektor pCIneoIL-10 nosi gen za humani *IL-10*, dok pCIneoLacZ nosi gen za β -galaktozidazu.

Supernatanti transfekovanih i ne-transfekovanih (kontrolnih) MMC su nakon sakupljanja centrifugirani na 12000 g, 5 min i potom čuvani na -80° C. Izvođenje ELISA (eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) metode za određivanje koncentracije humannog IL-10 urađeno je sa reagensima i prema protokolu obezbeđenom od proizvođača (korišćen je kit *Human IL-10 DuoSet, R&D Systems*). Protokol se sastojao od oblaganja bunarića ploče od 96 mesta sa ravnim dnom (*Costar, Sigma*) mišijim monoklonskim antitelima specifičnim za humani IL-10, preko noći na sobnoj temperaturi. Zatim je ispiran svaki bunarić rastvorom za ispiranje (0.05% Tween u K-PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , pH 7.2-7.4)), nakon čega je vršeno blokiranje antitela tokom 1sata sa 1% rastvorom serumskog albumina govečeta (bovin serum albumin, BSA) u K-BSA, nakon čega je vršeno ispiranje (Tween/K-PBS). U sledećem koraku su dodati uzorci sakupljeni u eksperimentima i uzorci sa standardizovanom dvostruko opadajućom koncentracijom IL-10, koji su obezbeđeni od starne proizvođača i inkubirani tokom 2 časa, nakon čega je sledilo ispiranje (Tween/K-PBS), pa inkubacija tokom 1 časa sa kozijim monoklonskim antitelom, koje je konjugovano sa biotinom i specifično je za humani IL-10. Ponovo izvršeno ispiranje (Tween/K-PBS). Sledeći korak je bila inkubacija sa rastvorom Streptavidin-HRP enzima tokom 20 minuta, pa ispiranje (Tween/K-PBS) a

zatim inkubacija sa supstratom (1:1 mešavina H₂O₂ i tetrametilbenzidina) maksimalno 20 minuta. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 2N H₂SO₄. Apsorbanca je očitavana na spektrofotometru (*Behring ELISA Processor II*) korišćenjem filtera 450 nm i korekcijom talasne dužine oduzimanjem apsorbance izmerene na filteru 570 nm. Količina citokina (u pg/ml) je određivana u odnosu na standardnu krivu napravljenu na osnovu vrednosti izmerenih u uzorcima sa standardizovanim dvostruko opadajućim koncentracijama citokina, korišćenjem TableCurve 2D softvera.

STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Dobijeni rezultati su obrađeni statističkim testovima koji su prikazani u tabelama i graficima. Od deskriptivnih statističkih parametara korišćeni su: srednja vrednost i standardna devijacija, interkvartalni opseg i medijana vrednosti. Za ispitivanje veze između kategorijskih promenljivih korišćeni su neparametarski testovi: Hi-kvadrat test nezavisnosti (χ^2 - test) i Fišerov egzaktni test. Tabela kontigencije 2x2 korišćena je za računanje količnika verovatnoće (eng. *odds ratio* - OR) sa odgovarajućim 95% intervalom poverenja (eng. *confidence interval* - CI). Za svaki analizirani genski lokus ispitano je da li distribucija genotipova prati Hardi-Vajnbergovu ravnotežu upotrebom Hi-kvadrat testa nezavisnosti. Od statističkih testova za poređenje grupa korišćen je Man-Vitnjev test (Test sume rangova). Nivo statističke značajnosti je bio $P < 0.05$, a svi testovi su bili nedirekcioni (dvostrani). Statistička analiza je urađena korišćenjem SPSS v.21 (*IBM SPSS Statistics, Chicago, USA*) programa. Vrednosti gametske neravnoteže vezanosti među genskim varijantama (eng. *linkage disequilibrium*), D' i r^2 , su dobijene korišćenjem *Haploview* programa, Verzije 4.2 (Barrett, Fry et al. 2005).

REZULTATI

ANALIZA ASOCIJACIJE GENSKIH VARIJANTI KOAGULACIONIH FAKTORA I MARKERA INFLAMACIJE SA LKP BOLEŠĆU

Analiza asocijacije genskih varijanti koagulacionih faktora sa pojavom LKP bolesti

S obzirom na to da je LKP bolest idiopatska avaskularna osteonekroza proksimalne epifize femura, prve genetičke studije rađene na uzorcima pacijenata obolelih od LKP bolesti su bile vezane za prisustvo genskih varijanti koje dovode do hiperkoagulacije. U prilog ovim istraživanjima išla je i činjenica da promene koje se dešavaju kod pacijenata odgovaraju onima koje su primećene u animalnim modelima, gde se hirurškim putem dovodi do prekida dotoka krvi u glavu femura. Međutim, genetičke studije asocijacije koagulacionih faktora i LKP bolesti su dale kontroverzne rezultate. Stoga je u ovom radu ispitivano prisustvo genskih varijanti *F V* (Leiden mutacija, G1691A (rs6025), *F II* G20210A (rs1799963), *MTHFR* C677T (rs1801133) i *PAI-1* 4G/5G (rs1799889) kod pacijenata obolelih od LKP bolesti u srpskoj populaciji. Analizirana je asocijacija ovih genskih varijanti sa pojavom bolesti.

U ovoj studiji je korišćena grupa koja se sastojala od 37 LKP pacijenata, 29 muškog i osam ženskog pola. Prosečna starost pacijenata kada se bolest javila je bila 5.89 godina (SD-2.31), a prosečna starost pri uzorkovanju 9.16 godina (SD-5.18). Kod 16 pacijenata je bolešću bila zahvaćena desna strana tela, kod 19 pacijenata leva strana tela, a kod 2 pacijenta je bolest bila bilateralna. Za poređenje učestalosti navedenih genskih varijanti *FV*, *F II*, i *MTHFR* kod LKP pacijenata i zdravih osoba, korišćena je kontrolna grupa koja se sastojala od 100 zdrave dece, 46 dečaka i 54 devojčice, čija je prosečna starost bila 9.5 godina (SD- 0.5) (Djordjevic, Stankovic et al. 2012). Asocijacija učestalosti navedene genske varijante *PAI-1* sa pojavom LKP bolesti analizirana je korišćenjem druge kontrolne grupe, koja se sastojala od 35 muških i 15 ženskih osoba, čija je prosečna starost bila 29.92 godine (SD- 12.74).

Rezultati analize genskih varijanti koagulacionih faktora kod pacijenata obolelih od LKP bolesti su prikazani u Tabeli 9. Distribucije svih genotipova su bile u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži. Poređenje učestalosti genotipova i alela u grupi pacijenata sa kontrolnom grupom nije pokazalo statistički značajnu razliku ni za jednu

od analiziranih genskih varijanti. Za *Faktor V* Leiden mutaciju i *Faktor II* G20210A gensku varijantu nije pronađen ni jedan homozigotni nosilac u grupi pacijenata niti u kontrolnoj grupi.

Tabela 9. Distribucija genotipova i alela genskih varijanti koagulacionih faktora kod LKP pacijenata i kontrolne grupe

Genska varijanta	Genotip	Pacijenti br.=37 (učestalost)	Kontrole br.=100 (učestalost)	OR (95% CI)	P vrednost
<i>FV Leiden</i> <i>G1691A</i>	GG	35 (0.94)	92 (0.92)	0.65 (0.13 – 3.24)	0.72
	GA	2 (0.60)	8 (0.80)		
	AA	0	0		
Učestalost alela	G	0.97	0.96	0.67 (0.13-3.21)	0.73
	A	0.03	0.04		
<i>GG vs. GA+AA</i>					
<i>FII G20210A</i>	GG	35 (0.94)	99 (0.99)	5.65 (0.49 – 64.33)	0.17
	GA	2 (0.60)	1 (0.01)		
	AA	0	0		
Učestalost alela	G	0.97	0.99	2.75 (0.38 – 19.88)	0.57
	A	0.03	0.01		
<i>GG vs. GA+AA</i>					
<i>MTHFR</i> <i>C677T</i>	CC	19 (0.51)	33 (0.33)	0.46 (0.21 – 1.00)	0.07
	CT	12 (0.32)	54 (0.54)		
	TT	6 (0.16)	13 (0.13)		
Učestalost alela	C	0.68	0.60	0.72 (0.41 – 1.26)	0.26
	T	0.32	0.40		
<i>CC vs. CT+TT</i>					
Genska varijanta	Genotip	Pacijenti broj=37 (učestalost)	Kontrole broj=50 (učestalost)	OR (95% CI)	P vrednost
<i>PAI-1</i> <i>4G/5G</i>	5G/5G	9 (0.24)	8 (0.16)	0.45 (0.16 – 1.31)	0.20
	4G/5G	22 (0.59)	27 (0.54)		
	4G/4G	6 (0.16)	15 (0.30)		
Učestalost alela	5G	0.54	0.43	0.64 (0.35 -1.17)	0.17
	4G	0.46	0.57		
<i>5G/5G + 4G/5G vs. 4G/4G</i>					

Napomena: OR- eng. *Odds Ratio*; CI- Interval poverenja (eng. *Confidence Interval*); P vrednosti su izračunate Fišerovim egzaktnim testom

Analiza asocijacije genskih varijanti koagulacionih faktora i uzrasta LKP pacijenata kada se bolest javila

Za analizu asocijacije prisustva genskih varijanti koagulacionih faktora i uzrasta pacijenata kada se bolest javila napravljena je podela na dve grupe: grupu pacijenata kod kojih se bolest javila pre pete godine i u petoj godini i grupu pacijenata kod kojih se

bolest javila nakon pete godine života. Odlučeno je da se na ovaj način pristupi analizi zbog toga što je iz literature poznato da kod LKP pacijenata kod kojih se bolest javila nakon pete godine, period izlječenja duže traje i javljaju se teže komplikacije (Rosenfeld, Herring et al. 2007). Rezultati poređenja učestalosti genskih varijanti koagulacionih faktora između ove dve grupe pacijenata prikazani su u Tabeli 10. Ovom analizom nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova i alela ni za jednu od analiziranih genskih varijanti, između ove dve grupe pacijenata. Zanimljivo je da su svi pacijenti kod kojih se bolest javila nakon pete godine života bili homozigotni nosioci učestalijih alela za genske varijante *Faktor V G1691A* i *Faktor II G20210A*, dok je u podgrupi pacijenata kod kojih se bolest javila ranije bilo po dva nosioca heterozigotnog genotipa za navedene varijante.

Tabela 10. Distribucija genotipova i alela genskih varijanti koagulacionih faktora u grupama LKP pacijenata kod kojih se bolest javila pre i posle pete godine

Genska varijanta	Genotip	Grupa uzrasta ≤5 god. broj=20 (učestalost)	Grupa uzrasta >5 god. broj=17 (učestalost)	OR (95% CI)	P vrednost
FV Leiden G1691A	GG	18 (0.90)	17 (1.00)	1.94 (1.41 – 2.68)	0.49
	GA	2 (0.10)	0		
	AA	0	0		
Učestalost alela	G	0.95	0.50	0.05 (0.02-0.14)	2.10
	A	0.05	0.50		
GG vs. GA+AA					
FII G20210A	GG	18 (0.90)	17 (1.00)	1.94 (1.41 – 2.68)	0.49
	GA	2 (0.10)	0		
	AA	0	0		
Učestalost alela	G	0.95	0.50	0.05 (0.02-0.14)	2.10
	A	0.05	0.50		
GG vs. GA+AA					
MTHFR C677T	CC	10 (0.50)	9 (0.53)	1.13 (0.31 – 4.11)	1.00
	CT	6 (0.30)	6 (0.35)		
	TT	4 (0.20)	2 (0.12)		
Učestalost alela	C	0.65	0.70	1.26 (0.69 – 2.27)	0.54
	T	0.35	0.30		
CC vs. CT+TT					
Genska varijanta	Genotip	Grupa starosti ≤5 god. broj=20 (učestalost)	Grupa starosti >5 god. broj=17 (učestalost)	OR (95% CI)	P vrednost
PAI-1 4G/5G	5G/5G	4 (0.20)	5 (0.29)	0.19 (0.02 – 1.80)	0.19
	4G/5G	11 (0.55)	11 (0.65)		
	4G/4G	5 (0.25)	1 (0.6)		
Učestalost alela	5G	0.51	0.62	1.56 (0.89 -2.75)	0.15
	4G	0.49	0.38		
5G/5G + 4G/5G vs. 4G/4G					

Napomena: OR- eng. *Odds Ratio*; CI- Interval poverenja (eng. *Confidence Interval*); P vrednosti su izračunate Fišerovim egzaktnim testom

Analiza asocijacije genskih varijanti markera inflamacije sa pojavom LKP bolesti

Inflamacija je prisutna u svim fazama razvoja LKP bolesti, a najizraženija je u fragmentacionoj, kada je proces remodelovanja koštanog tkiva neuravnotežen. Istraživanja vezana za druge bolesti skeletnog sistema, pre svega osteoporozi i reumatoidni artritis, su pokazala značajan uticaj inflamacije na remodelovanje koštanog tkiva. Kao što je navedeno u Uvodu, nivo citokina IL-6, IL-3 i TNF- α utiče na proces remodelovanja koštanog tkiva. TLR4 je receptor koji prepoznaje patogene i koji usled aktivacije lipopolisaharidom (LPS) Gram-negativnih bakterija dovodi do imunskog odgovora kroz aktivaciju niza citokina među kojima su TNF- α i IL-6.

S obzirom na to da u literaturi nema podataka o uticaju različitih varijanti gena koji učestvuju u procesu inflamacije na pojavu i razvoj LKP bolesti, u ovoj studiji su analizirane genske varijante: za *IL-6* [G-174C (rs1800795), G-597A(rs1800797)]; za *IL-3* [C-16T (rs31480), C132T (rs40401)]; za *TNF- α* G-308A (rs1800629) i za *TLR4* [Asp299Gly (rs4986790), Thr399Ile (rs4986791)]. Navedene genske varijate su odabrane za analizu jer je pokazano da utiču na nivo ekspresije ovih gena ili na aktivnost proteina koje ovi geni kodiraju.

Genotipizacija varijanti markera inflamacije je vršena na istoj grupi LKP pacijenata koja je korišćena za analizu genskih varijanti koagulacionih faktora. Za poređenje učestalosti ovih genskih varijanti kod LKP pacijenata i zdravih kontrola, korišćena je ista kontrolna grupa kao i za analizu asocijacije *PAI-1* gena sa pojavom LKP bolesti. Rezultati analize genskih varijanti markera inflamacije kod pacijenata obolelih od LKP bolesti su prikazani u Tabeli 11.

Tabela 11. Distribucija genotipova i alela genskih varijanti markera inflamacije kod LKP pacijenata i kontrolne grupe

Genska varijanta	Genotip	Pacijenti br.=37 (učestalost)	Kontrole br.=50 (učestalost)	OR (95% CI)	P vrednost
IL-3 C-16T/C132T	CC/CC	18 (48.6)	25 (50.0)	1.06 (0.45 – 2.47)	1*
	CT/CT	17 (45.9)	24 (48.0)		
	TT/TT	2 (5.4)	1 (0.02)		
Učestalost alela	C/C	0.72	0.74	1.11 (0.59-2.07)	0.87*
	T/T	0.28	0.26		
CC vs. CT+TT					
TNF-α G-308A	GG	23 (0.62)	38 (0.76)	1.93 (0.76 – 4.88)	0.24*
	GA	13 (0.35)	11 (0.22)		
	AA	1 (0.03)	1 (0.02)		
Učestalost alela	G	0.80	0.87	1.67 (0.78 - 3.58)	0.25*
	A	0.20	0.13		
GG vs. GA+AA					
TLR4 Asp299Gly	Asp/Asp	30 (0.81)	45 (0.90)	2.10 (0.61 – 7.24)	0.23 [#]
	Asp/Gly	6 (0.16)	5 (0.10)		
	Gly/Gly	1 (0.03)	0 (0.00)		
Učestalost alela	Asp	0.89	0.95	2.30 (0.72 - 7.35)	0.15 [#]
	Gly	0.11	0.05		
Asp/Gly+Gly/Gly vs. Asp/Asp					
TLR4 Thr399Ile	Thr/Thr	29 (0.78)	45 (0.90)	2.48 (0.74 – 8.33)	0.13 [#]
	Thr/Ile	7 (0.19)	5 (0.10)		
	Ile/Ile	1 (0.03)	0 (0.00)		
Učestalost alela	Thr	0.88	0.95	2.63 (0.84 - 8.20)	0.09 [#]
	Ile	0.12	0.05		
Thr/Ile+Ile/Ile vs. Thr/Thr					
IL-6 G- 174C/G-597A	GG/GG	19 (0.51)	18 (0.36)	0.69 (0.23 – 2.05)	0.50 [#]
	GC/GA	10 (0.27)	24 (0.48)		
	CC/AA	8 (0.22)	8 (0.16)		
Učestalost alela	G/G	0.65	0.60	0.81 (0.43 – 1.51)	0.51 [#]
	C/A	0.35	0.40		
GG/GG+GC/GA vs. CC/AA					

Napomena: OR- eng. *Odds Ratio*; CI- Interval poverenja (eng. *Confidence Interval*); P* vrednosti su izračunate Fišerovim egzaktnim testom; P[#] vrednosti su izračunate Hi-kvadrat testom (χ^2 - test)

IL-3, TNF- α , TLR4

Poređenje učestalosti genotipova i alela u grupi pacijenata sa kontrolnom grupom nije pokazalo statistički značajnu razliku za *IL-3*, *TNF- α* i *TLR4* analizirane genske varijante. Distribucije genotipova za *IL-3*, *TNF- α* i *TLR4* gene su bile u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži.

Analiza gametske neravnoteže vezanosti (eng. *linkage disequilibrium*) je pokazala da su varijante gena *TLR4*, Asp299Gly (rs4986790) i Thr399Ile (rs4986791), u našoj grupi pacijenata bile u kompletnoj gametskoj neravnoteži vezanosti ($D'=1.0$, $r^2=0.92$). Perfektna gametska neravnoteža vezanosti je primećena između C-16T i C132T varijanti *IL-3* gena, kao i između G-174C i G-597A varijanti *IL-6* gena ($D'=1.0$, $r^2=1.0$). Svi ispitanici koji su bili homozigoti za *IL-3*-16CC bili su homozigoti i za *IL-3* 132CC, a svi ispitanici koji su bili homozigoti za *IL-3* -16TT bili su homozigoti za *IL-3* 132TT, u skladu sa time, ispitanici koji su bili heterozigoti za *IL-3* -16CT bili su heterozigoti i za *IL-3* 132CT. Situacija je bila ista za *IL-6* G-174C i G-597A genotipove. Stoga su se *IL-3* C-16T i C132T, kao i *IL-6* G-174C i G-597A genotipovi i aleli pojavljivali sa identičnom učestalošću u grupi pacijenata i u kontrolnoj grupi.

IL-6

Učestalosti alela -174G / -597G i -174C / -597A *IL-6* gena su bile slične u grupi pacijenata i kontrolnoj grupi, stoga, kako je bilo očekivano, nije detektovana statistički značajna razlika ($P = 0.51$; Tabela 11). Takođe, poređenje distribucije genotipova prema prisustvu alela G (G -174GG / -597GG i -174GC / -597GA vs. -174CC / -597AA) među pacijentima i kontrolama nije pokazalo značajnu razliku ($P = 0.50$; Tabela 11). Međutim, učestalost *IL-6* heterozigota (-174GC / -597GA) je bila veća, dok su učestalosti oba tipa homozigota (-174GG / -597GG i -174CC / -597AA) bile niže u grupi pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, i ova razlika je bila statistički značajna ($P = 0.047$; Tabela 12). Prema ovim rezultatima, nosioci heterozigotnog genotipa *IL-6* -174GC / -597GA imaju 2.49 puta smanjen rizik za nastanak LKP bolesti (OR = 2.49, 95% CI = 1.00-6.21; Tabela 12). Štaviše, grupa pacijenata nije bila u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži za *IL-6* G-174C / G-597A genske varijante. Bilo je više oba tipa homozigotnih nosilaca (-174GG / -597GG i -174CC / -597AA) i manje heterozigotnih nosilaca (-174GC / -597GA) nego što bi se očekivalo u grupi pacijenata ($P = 0.01$; Tabela 13). Nasuprot ovim rezultatima, kontrolna grupa je bila u kompletnoj Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži, odnosno uočene vrednosti su bile identične očekivanim (Tabela 13). Činjenica da samo grupa pacijenata nije bila u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži, zbog manje zastupljenosti heterozigotnih nosilaca, podržava našu konstataciju da heterozigotni nosioci imaju manju šansu za razvoj LKP bolesti.

Tabela 12. Odnos heterozigota i homozigota za G-174C/G-597A varijante *IL-6* gena

<i>IL-6</i> genska varijanta	LKP pacijenti br=37 (učestalost)	Kontrole br=50 (učestalost)	OR (95% CI)	P vrednost
GC/GA	10 (0.27)	24 (0.48)	2.49 (1.00- 6.21)	0.047
GG/GG + CC/AA	27 (0.73)	26 (0.52)		

P vrednost je izračunata Hi-kvadrat testom (χ^2 - test)

Tabela 13. Hardy-Vajnbergova ravnoteža za G-174C/G-597GA varijante *IL-6* gena za grupu LKP pacijenata i kontrolnu grupu

Genotip	LKP pacijenti br.=37			Kontrole br.=50		
	Očekivano (O)	Dobijeno (D)	Razlika (O-D)	Očekivano (O)	Dobijeno (D)	Razlika (O-D)
-174GG/-597GG	15.57	19	+ 3	18	18	0
-174GC/-597GA	16.86	10	-7	24	24	0
-174CC/-597AA	4.57	8	+ 3	8	8	0

Analiza asocijacije genskih varijanti markera inflamacije i uzrasta LKP pacijenata kada se bolest javila

Kako bismo analizirali asocijaciju genskih varijanti markera inflamacije i uzrasta pacijenata kada se bolest javila, pacijenti su podeljeni na isti način kao i za analizu genskih varijanti faktora koagulacije (na grupu pacijenata kod kojih se bolest javila pre pete godine i u petoj godini i grupu pacijenata kod kojih se bolest javila nakon pete godine života). Rezultati dobijeni poređenjem učestalosti genskih varijanti markera inflamacije između ove dve grupe pacijenata prikazani su u Tabeli 14. Nije pronađena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova i alela ni za jednu od analiziranih genskih varijanti između ove dve grupe pacijenata.

Tabela 14. Distribucija genotipova i alela genskih varijanti markera inflamacije u grupama LKP pacijenata kod kojih se bolest javila pre i posle pete godine

Genska varijanta	Genotip	Grupa uzrasta ≤5 broj=20 (učestalost)	Grupa uzrasta >5 broj=17 (učestalost)	OR (95% CI)	P vrednost
IL-3 C-16T/C132T	CC/CC	10 (0.50)	8 (0.47)	0.89 (0.24 – 3.24)	1.00*
	CT/CT	10 (0.50)	7 (0.41)		
	TT/TT	0 (0.00)	2 (0.12)		
Učestalost alela	C/C	0.75	0.68	0.71 (0.38 - 1.31)	0.35*
	T/T	0.75	0.32		
CC vs. CT+TT					
TNF-α G-308A	GG	14 (0.70)	9 (0.53)	0.48 (0.12 – 1.86)	0.29 [#]
	GA	5 (0.25)	8 (0.47)		
	AA	1 (0.05)	0 (0.00)		
Učestalost alela	G	0.83	0.76	0.69 (0.22 - 2.15)	0.52 [#]
	A	0.17	0.24		
GG vs. GA+AA					
TLR4 Asp299Gly	Asp/Asp	16 (0.80)	14 (0.82)	1.17 (0.22 – 6.14)	1.00*
	Asp/Gly	3 (0.15)	3 (0.18)		
	Gly/Gly	1 (0.05)	0 (0.00)		
Učestalost alela	Asp	0.87	0.91	1.48 (0.33 - 6.69)	0.72*
	Gly	0.13	0.09		
Asp/Gly+Gly/Gly vs. Asp/Asp					
TLR4 Thr399Ile	Thr/Thr	15 (0.75)	14 (0.82)	1.56 (0.31 – 7.75)	0.70*
	Thr/Ile	4 (0.20)	3 (0.18)		
	Ile/Ile	1 (0.05)	0 (0.00)		
Učestalost alela	Thr	0.85	0.91	1.82 (0.41 - 7.92)	0.50*
	Ile	0.15	0.09		
Thr/Ile+Ile/Ile vs. Thr/Thr					
IL-6 G-174C/G-597A	GG/GG	10 (0.50)	9 (0.53)	2.36 (0.47 – 11.82)	0.43*
	GC/GA	7 (0.35)	3 (0.18)		
	CC/AA	3 (0.15)	5 (0.29)		
Učestalost alela	G/G	0.67	0.62	0.77 (0.30 - 2.05)	0.6 [#]
	C/A	0.33	0.38		
GG/GG+GC/GA vs. CC/AA					

Napomena: OR- eng. *Odds Ratio*; CI- Interval poverenja (eng. *Confidence Interval*); P* vrednosti su izračunate Fišerovim egzaktnim testom; P[#] vrednosti su izračunate Hi-kvadrat testom (χ^2 - test)

**ISPITIVANJE EKSPRESIJE GENA KOJI UČESTVUJU U PROCESU
INFLAMACIJE I APOPTOZE KOD LKP PACIJENATA**

Karakteristike pacijenata na čijim uzorcima su rađene analize ekspresije gena

Od ukupno 37 pacijenata kojima je urađena genotipizacija, za 6 pacijenata nisu bili dostupni uzorci RNK, tako da se grupa koja je korišćena za analizu ekspresije gena sastojala od 31 pacijenta. Karakteristike pacijenata čiji uzorci su korišćeni za analizu nivoa ekspresije gena koji učestvuju u procesu inflamacije i apoptoze, relativnom kvantifikacijom iRNK, su navedene u Tabeli 15. Kontrolna grupa za ova ispitivanja sastojala se od 11 dece, šest dečaka i pet devojčica, čija je prosečna starost bila 6.39 godina (SD-3.86).

Tabela 15. Karakteristike LKP pacijenata kod kojih je analizirana ekspresija gena koji učestvuju u procesu inflamacije i apoptoze

Broj LKP pacijenata	31
Starost pri uzorkovanju (godine)	Srednja vrednost 7.52 (SD-2.83).
Pol	
muški	25
ženski	6
Faza bolesti u kojoj su pacijenti uzorkovani	
sinovitis	0
avaskularna	6
fragmentaciona	14
reosifikaciona	8
rezidualna	3

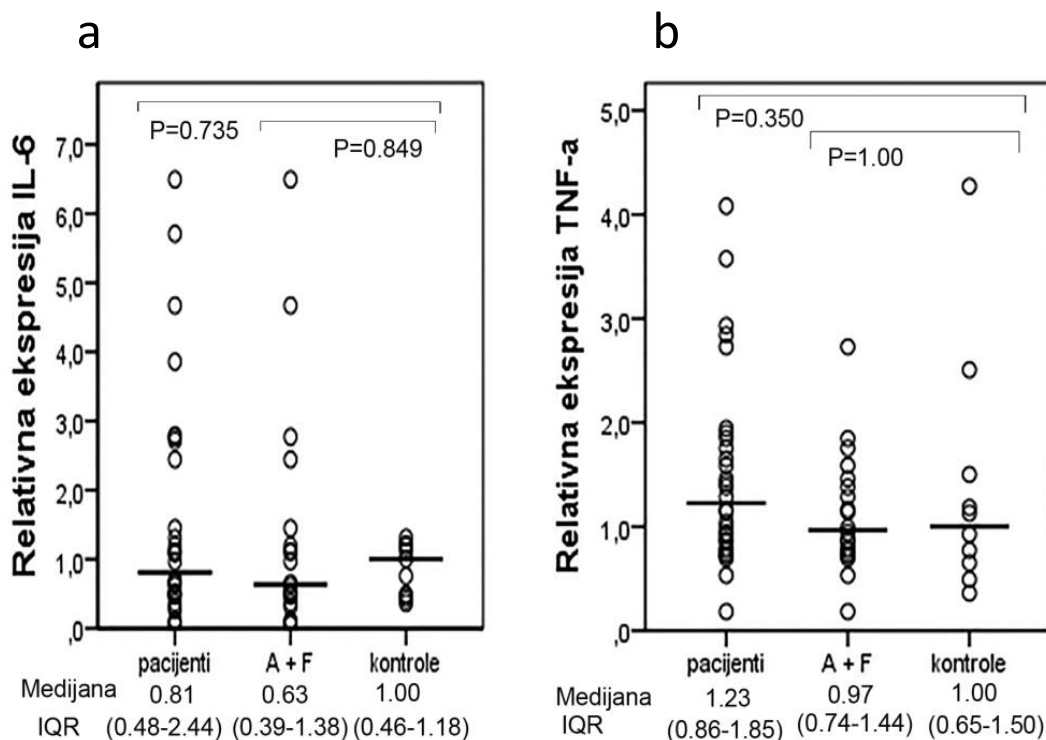
Skraćenica: SD- Standardna devijacija

Stratifikacija pacijenata za analize ekspresije gena

Kako je navedeno u Tabeli 15, LKP pacijenti su uzorkovani u različitim fazama bolesti. Svi pacijenti su uzorkovani samo jedanput, tokom naznačene faze bolesti. Kao što je pomenuto u Uvodu, jedan od najvažnijih faktora u patofiziologiji LKP bolesti je neravnoteža između procesa resorpcije i formiranja koštanog tkiva, koja je najistaknutija tokom fragmentacione faze bolesti. Naša pretpostavka je bila da bi povišen nivo ekspresije inflamatornih gena i/ili poremećen process apoptoze u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MNČPK) LKP pacijenata, posebno tokom fragmentacione faze, kao i tokom avaskularne faze koja joj prethodi, mogao doprineti nedostatku novoformiranog koštanog tkiva. Stoga je, u cilju testiranja te hipoteze, formirana podgrupa pacijenata koji su uzorkovani u avaskularnoj i fragmentacionoj fazi (označena kao A + F podgrupa pacijenata), i korišćena je za poređenje nivoa ekspresije gena, paralelno sa kompletnom grupom pacijenata (grupom od trideset jednog pacijenta). A + F podgrupa pacijenata se sastojala od 15 dečaka i 5 devojčica, prosečne starosti 6.10 godina (SD-1.69).

Ekspresija markera inflamacije kod LKP pacijenata

Kako bismo ispitali asocijaciju nivoa ekspresije inflamatornih gena sa LKP bolešću, analizirali smo nivoe ekspresije gena *IL-6* i *TNF- α* u MNČPK pacijenata i kontrolne grupe. Poređenje kompletne grupe pacijenta i A + F podgrupe sa kontrolnom grupom nije pokazalo statistički značajne razlike u ekspresiji ni *IL-6* niti *TNF- α* gena (Slika 7 a, b). Pošto je u ranije rađenim studijama sugerisano da promotorske varijante *IL-6* G-174C i *TNF- α* G-308A utiču na nivo ekspresije ovih gena (Wilson, Symons et al. 1997, Fishman, Faulds et al. 1998) analizirali smo asocijaciju prisustva navedenih promotorskih genskih varijanti i nivoa ekspresije *IL-6* i *TNF- α* gena kod LKP pacijenata. Kompletna grupa pacijenata (31 pacijent) je podeljena u dve podgrupe, prema prisustvu i odsustvu određenog alela, kao što je označeno u Tabeli 16. Rezultat ove analize nije pokazao postojanje statistički značajne razlike u nivou ekspresije ni *IL-6* niti *TNF- α* gena među grupama pacijenata podeljenim na osnovu prisustva određenog alela (Tabela 16).



Slika 7. Relativna ekspresija markera inflamacije kod LKP pacijenata i kontrola. (a) IL-6, (b) TNF- α

Napomena: kompletna grupa pacijenata (31 pacijent) je označena sa "pacijenti", podgrupa pacijenata uzorkovanih u avaskularnoj i fragmentacionoj fazi je označena sa "A+F", kontrolna grupa je označena sa "kontrola"; Medijana je označena crticom na grafiku; IQR- Interkvartilni opseg (eng. *Interquartile Range*); P vrednosti su izračunate Man-Vitnijevim testom (Test sume rangova)

Tabela 16. Asocijacija promotorskih varijanti gena IL-6 i TNF- α (IL-6 G-174C / TNF- α G-308A) i nivoa ekspresije ovih gena kod LKP pacijenata

Gen	Podela pacijenata na osnovu genotipa	Medijana nivoa ekspresije		P vrednost
		Prisustvo G/A	Odsustvo G/A	
IL-6	Prisustvo G (23) vs. odsustvo G (8)	0.758	0.968	0.520
TNF- α	Prisustvo A (12) vs. odsustvo A (19)	1.322	1.166	0.857

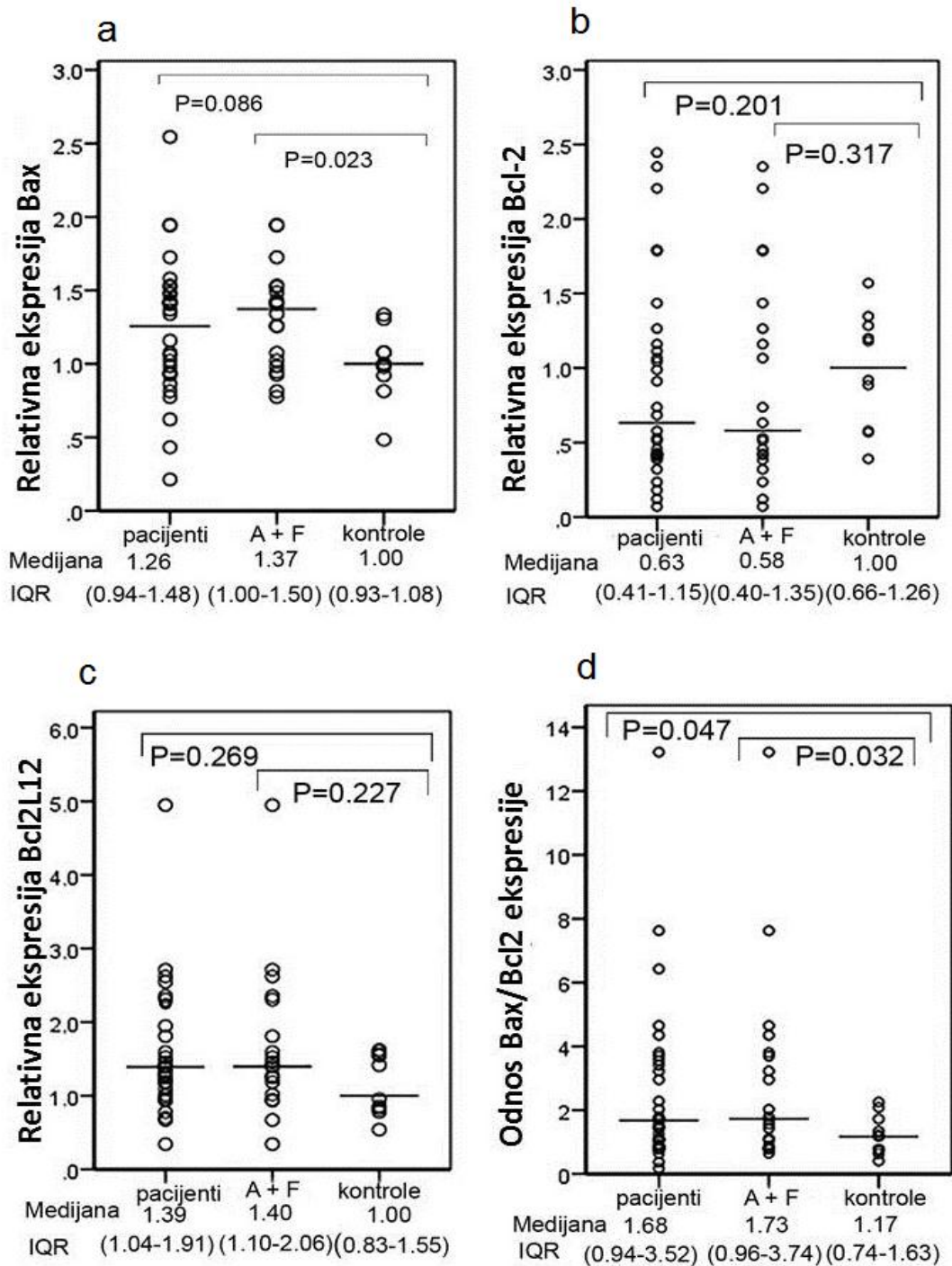
P vrednost je izračunata Man-Vitnijevim testom (Test sume rangova)

Ekspresija markera apoptoze kod LKP pacijenata

Na životni vek MNČPK u značajnoj meri utiče nivo ekspresije gena unutrašnjeg i spoljašnjeg apoptotskog puta. Poremećen nivo ekspresije ovih gena može uticati na apoptozu MNČPK što bi moglo dovesti do poremećenog inflamatornog procesa. Takođe, jedna frakcija MNČPK su monociti, koji su prekursori makrofaga nastanjenih u koštanom tkivu, OsteoMaks (eng. *OsteoMacs*). Ove ćelije imaju bitnu ulogu u održavanju homeostaze koštanog tkiva. Pokazano je da sistemski, kao i lokalno, nizak nivo makrofaga dovodi do usporenog procesa izlječenja i formiranja koštanog tkiva. Po našim saznanjima, procesi apoptoze do sada nisu ispitivani kod LKP pacijenata, pa su, s obzirom na njihov značaj za homeostazu koštanog tkiva, bili uključeni u sledeći deo naših istraživanja.

Ekspresija gena unutrašnjeg apoptotskog puta kod LKP pacijenata

Da bismo odredili obrazac ekspresije gena unutrašnjeg apoptotskog puta u LKP bolesti, detektovali smo nivoe ekspresije gena *Bax*, *Bcl-2* i *Bcl2L12* u MNČPK pacijenata i kontrolne grupe. Nije bilo značajne razlike u nivou ekspresije *Bax* gena, između kompletne grupe pacijenata i kontrolne grupe (Slika 8 a.), ali nivo ekspresije *Bax* gena je bio značajno viši u A + F podgrupi pacijenta u odnosu na kontrolnu grupu ($P = 0.023$, Slika 8 a). Nije pronađena statistički značajna razlika u nivoima ekspresije gena *Bcl-2* niti *Bcl2L12* između ispitivanih grupa (Slika 8 b, c). S obzirom na to da je sugerisano da je zapravo odnos nivoa ekspresije *Bax* i *Bcl-2* gena, pre nego njihovi zasebni nivoi ekspresije, bitan za prognozu sudbine ćelije (Oltvai, Milliman et al. 1993), takođe smo odredili odnos nivoa ekspresije ova dva gena. Naši rezultati su pokazali da je odnos nivoa ekspresije *Bax* / *Bcl-2* gena bio značajno viši u kompletnoj grupi pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu ($P = 0.047$, Slika 8 d). Takođe, odnos nivoa *Bax* / *Bcl-2* ekspresije je bio značajno viši u A + F podgrupi pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu ($P = 0.032$, Slika 8 d).

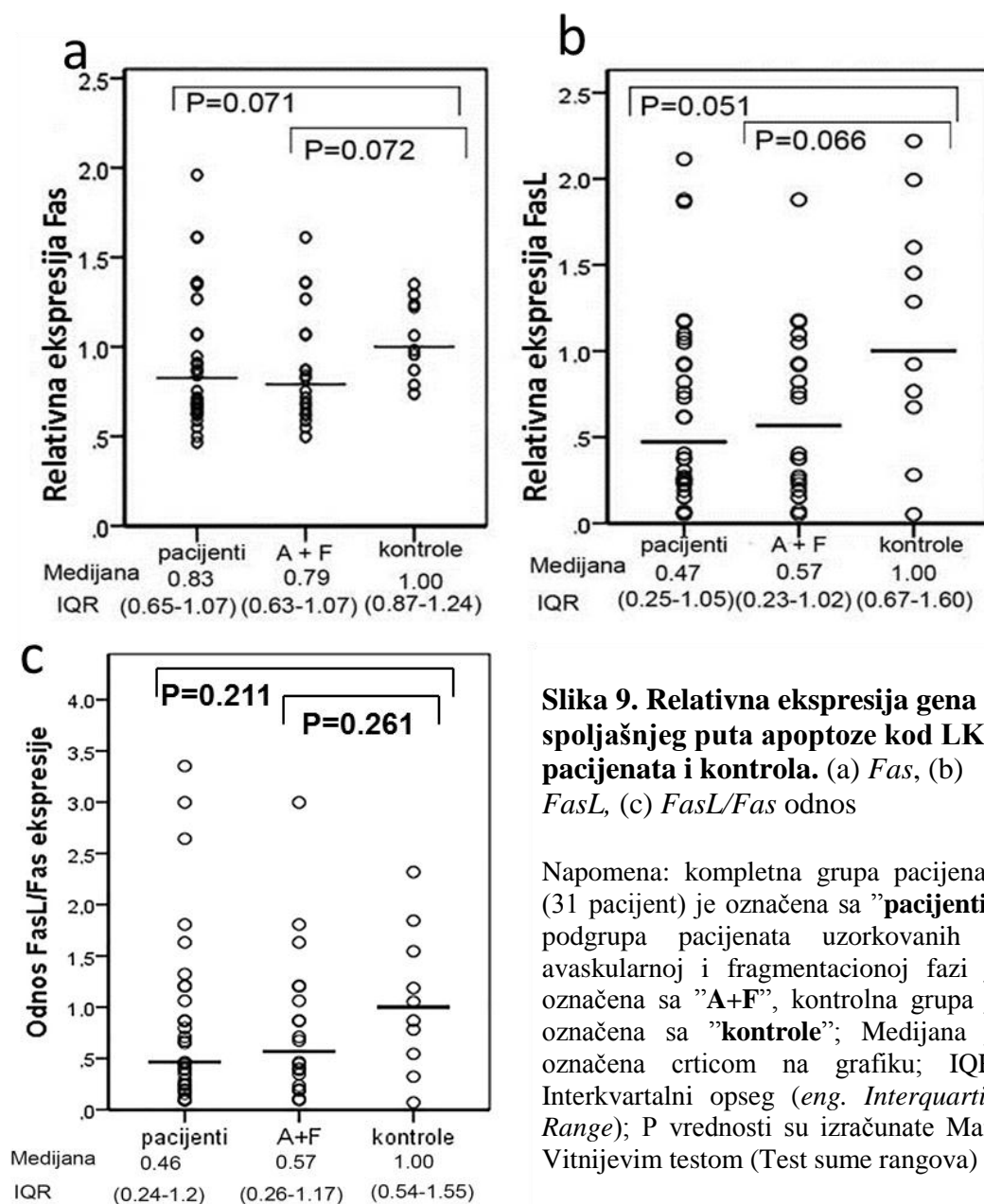


Slika 8. Relativna ekspresija gena unutrašnjeg puta apoptoze kod LKP pacijenata i kontrola. (a) Bax, (b) Bcl-2, (c) Bcl2L12, (d) Bax/Bcl-2 odnos

Napomena: kompletna grupa pacijenata (31 pacijent) je označena sa "pacijenti", podgrupa pacijenata uzorkovanih u avaskularnoj i fragmentacionoj fazi je označena sa "A+F", kontrolna grupa je označena sa "kontrole"; Medijana je označena crticom na grafiku; IQR- Interkvartilni opseg (eng. *Interquartile Range*); P vrednosti su izračunate Man-Vitnijevim testom (Test sume rangova)

Ekspresija gena spoljašnjeg apoptotskog puta kod LKP pacijenata

Kako bismo odredili obrazac ekspresije gena spoljašnjeg apoptotskog puta u LKP bolesti, detektovali smo nivoe ekspresije gena *Fas* i *FasL* u MNČPK pacijenata i kontrolne grupe. Poređenje nivoa ekspresije ovih gena u kompletnoj grupi pacijenata, kao i u A + F podgrupi, sa kontrolnom grupom, nije pokazalo statistički značajnu razliku ni za *Fas* ni za *FasL* gen, kao ni za odnos ekspresije ova dva gena (Slika 9 a, b,c).



Slika 9. Relativna ekspresija gena spoljašnjeg puta apoptoze kod LKP pacijenata i kontrola. (a) *Fas*, (b) *FasL*, (c) *FasL/Fas* odnos

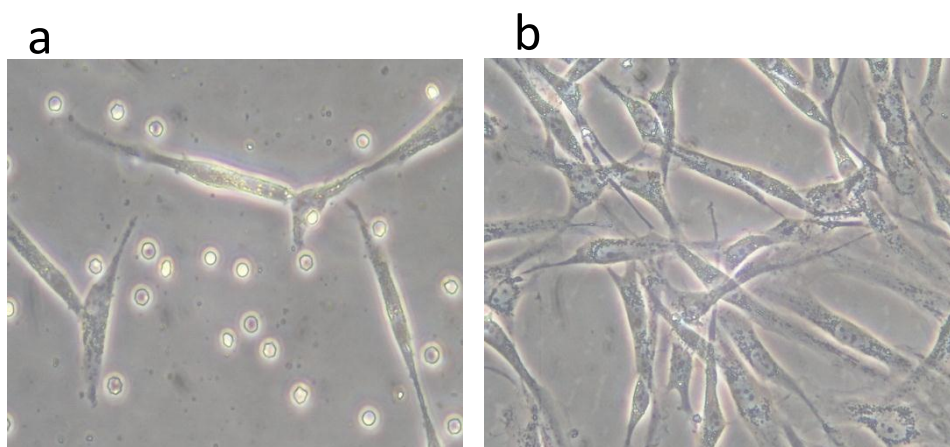
Napomena: kompletna grupa pacijenata (31 pacijent) je označena sa "pacijenti", podgrupa pacijenata uzorkovanih u avaskularnoj i fragmentacionoj fazi je označena sa "A+F", kontrolna grupa je označena sa "kontrole"; Medijana je označena crticom na grafiku; IQR-Interkvartilni opseg (eng. *Interquartile Range*); P vrednosti su izračunate Man-Vitnijevim testom (Test sume rangova)

IZOLACIJA, DIFERENCIJACIJA I TRANSFEKCIJA MEZENHIMSKIH MATIČNIH ĆELIJA

U poslednje vreme se sprovodi sve veći broj kliničkih studija u kojima se koristi tretman autolognim mezenhimskim matičnim ćelijama (MMĆ) za lečenje različitih oboljenja skeletnog sistema, uključujući i avaskularnu osteonekrozu. Ove ćelije mogu da se diferenciraju u veliki broj različitih tkiva, uključujući koštano i hrskavičavo. Dva najzastupljenija izvora MMĆ koja se danas koriste su kostna srž i adipozno tkivo.

Izolacija MMĆ iz adipoznog tkiva

Subkutano adipozno tkivo predstavlja lako pristupačan izvor velike količine adipoznih MMĆ. Karakteristike koje definišu MMĆ su morfologija slična fibroblastima, adhezija za plastičnu podlogu u standardnim uslovima gajenja u ćelijskoj kulturi i sposobnost da se diferenciraju u osteoblaste, hondroblaste i adipocite (ref ISCT). Mezenhimске matične ćelije su uspešno izolovane iz uzoraka adipoznog tkiva pasa i konja, po protokolu opisanom u poglavlju Materijal i metode (Slika 10).



Slika 10. Kultura MMĆ izolovanih iz adipoznog tkiva psa. (a) 48 sati nakon izolacije; (b) 7 dana nakon izolacije. (uveličanje 20X)

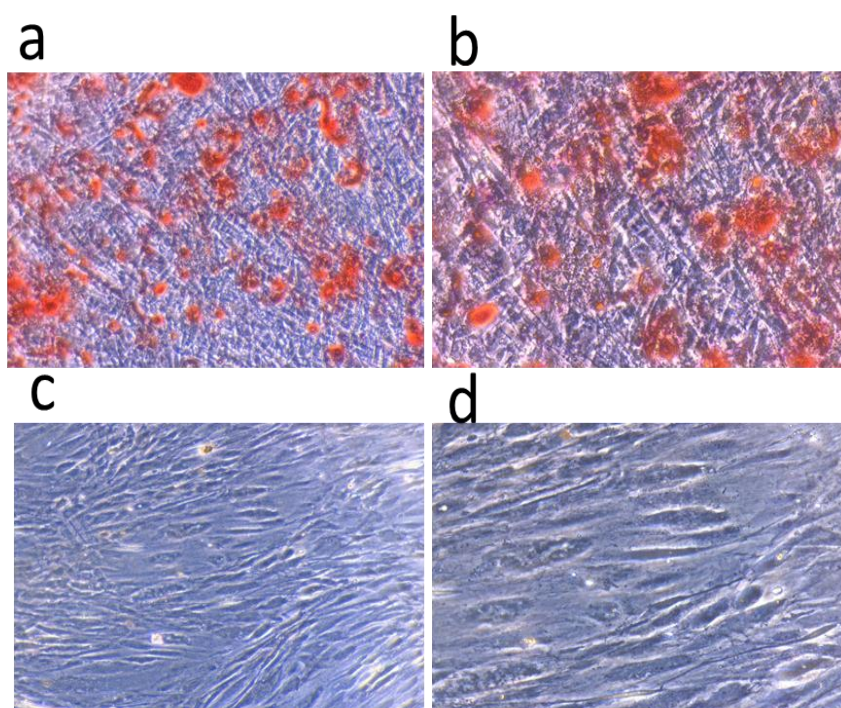
Sa Slike 10. se vidi da se 48h nakon izolacije određeni broj MMĆ zalepio za plastičnu podlogu i da imaju morfologiju tipičnu za MMĆ, sličnu fibroblastima. U medijumu ima i ćelija koje se još uvek nisu zalepile, one imaju loptast oblik. Sedam dana nakon izolacije, ćelije imaju morfologiju sličnu fibroblastima i umnožile su se, a fotografisane su po ispiranju i dodavanju svežeg medijuma .

Diferencijacija MMĆ adipoznog tkiva ka osteogenoj i hondrogenoj ćelijskoj liniji

Kako bismo potvrdili potencijal za diferencijaciju MMĆ izolovanih iz adipoznog tkiva psa, ćelije su indukovane na diferencijaciju ka osteogenoj i hondrogenoj ćelijskoj liniji.

Osteogena diferencijacija MMĆ izolovanih iz adipoznog tkiva psa

Tri nedelje nakon gajenja MMĆ u osteogenom medijumu, ćelije su fiksirane i obojene Alizarin crvenom bojom, kojom se boje ekstraćelijski depoziti kalcijuma (Slika 11).

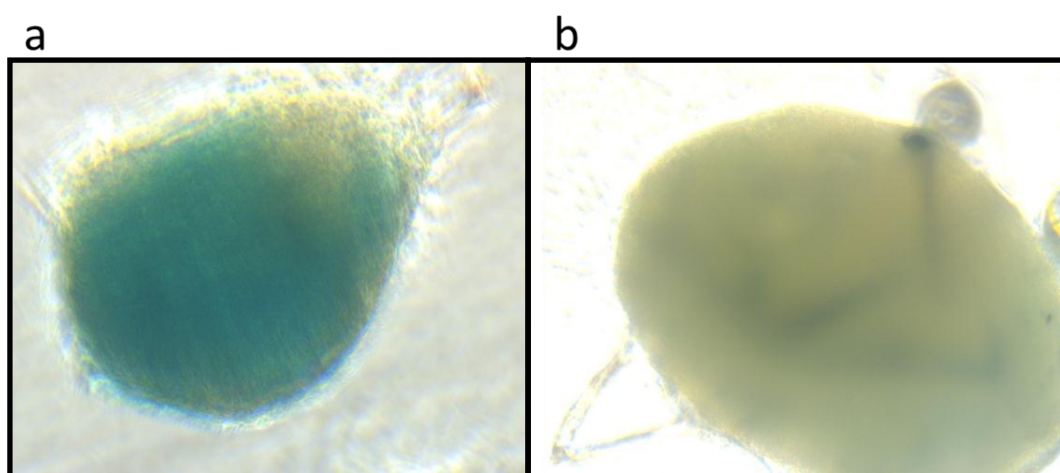


Slika 11. *In vitro* diferencijacija MMĆ izolovanih iz adipoznog tkiva psa u osteogenu ćelijsku liniju. (a, b) uzorak MMĆ koji je tri nedelje gajen u osteogenom medijumu; (c,d) kontrolni uzorak, koji je tri nedelje gajen u standardnom medijumu za ekspanziju. (a i c- uveličanje 10X, b i d- uveličanje 20X)

Sa Slike 11. se vidi da su se MMĆ izolovane iz adipoznog tkiva psa uspešno diferencirale u osteogenu ćelijsku liniju. U indukovanom uzorku MMĆ je specifičnim bojenjem *Alizarin crvenim* pokazano prisustvo ekstraćelijskih depozita kalcijuma, čija sinteza je karakteristična za osteoblaste. Sa druge strane, u kontrolnom uzorku nije bilo ekstraćelijskih depozita kalcijuma i specifičnog bojenja *Alizarin crvenom* bojom.

Hondrogena diferencijacija MMĆ izolovanih iz adipoznog tkiva psa

Kako bi se MMĆ diferencirale u hondrogeni ćelijski tip, osim odgovarajuće kompozicije medijuma, ćelije su zasađene i gajene u mikrotitar pločama za ćelije u suspenziji sa bunarićima U-oblika. U tim uslovima MMĆ mogu da formiraju sferoidne, trodimenzionalne strukture, takozvani mikropelet (eng. *micropellet*), što je neophodan uslov da bi se ćelije diferencirale u hondrogeni ćelijski tip. Naime, opisanim pristupom se formira *in vitro* model koji imitira tzv. pre-hrskavičavu kondenzaciju, koja se dešava tokom embrionalnog razvića, za koju je karakteristična povećana interakcija među ćelijama i produkcija matriksa nalik hrskavičavom (Wei, Sun et al. 2007). Tri nedelje nakon gajenja MMĆ u opisanim uslovima, ćelije su fiksirane i bojene *Alcian plavom* bojom, koja specifično boji sulfatisane glikozaminoglikane, koji su sastavni deo matriksa hrskavice. (Slika 12).



Slika 12. *In vitro* diferencijacija MMĆ izolovanih iz adipoznog tkiva psa u hondrogenu ćelijsku liniju. (a) mikropelet MMĆ koji je tri nedelje gajen u

hondrogenom medijumu; (b) kontrolni uzorak, mikropelet koji je tri nedelje gajen u medijumu bez hondrogenih inducera. (uvećanje 10X)

Na Slici 12. se vidi da su se MMĆ izolovane iz adipoznog tkiva psa uspešno diferencirale u hondrogenu ćelijsku liniju. Nakon bojenja oba uzorka *Alcian plavom* bojom, vidi se specifično plavo bojenje, samo u uzorku koji je gajen u medijumu sa hondrogenim inducerima, koje ukazuje na produkciju sulfatisanih glikozaminoglikana, što je karakteristika hondroblasta.

Optimizacija tranzijentne transfekcije MMĆ iz adipoznog tkiva

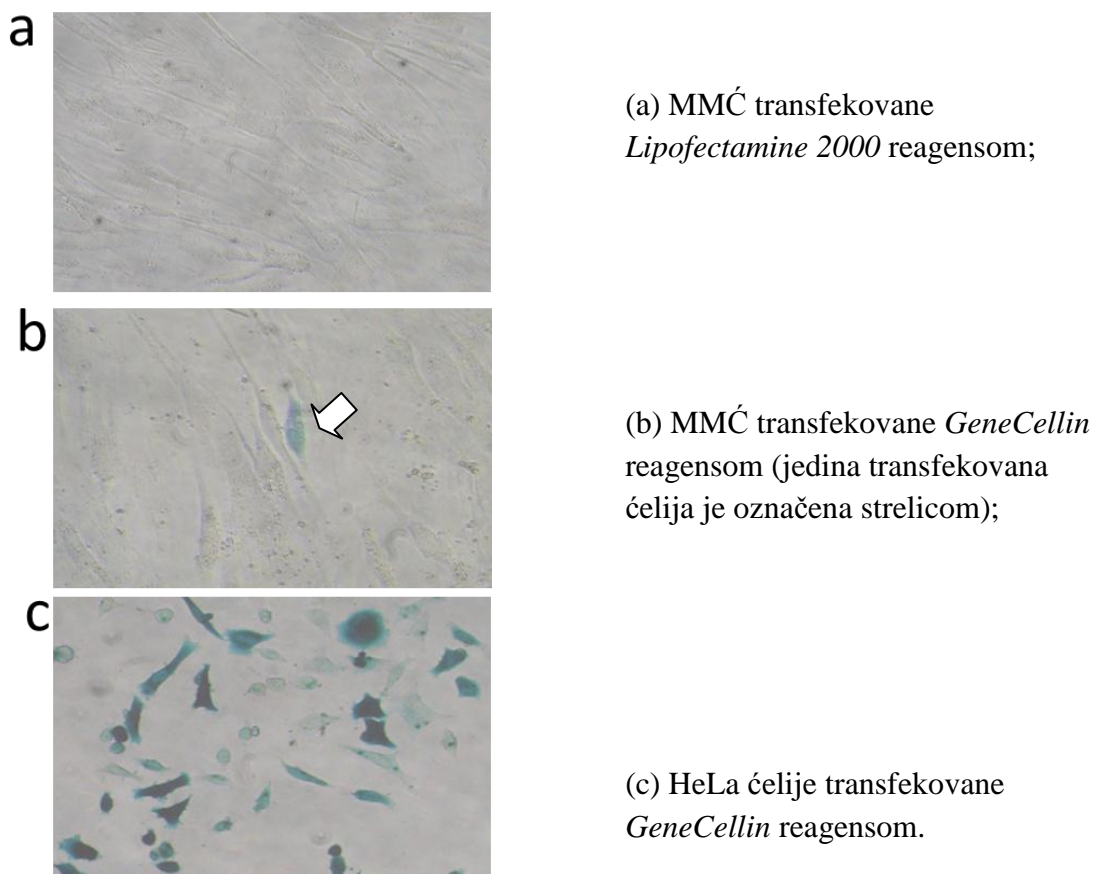
Mnoge do sada urađene kliničke studije lečenja bolesti hrskavičavog i koštanog tkiva korišćenjem autolognih MMĆ su dale pozitivne rezultate. Pored toga, pokazano je da terapijski kapacitet ovih ćelija može značajno da se poveća kada one ekspimiraju i specifični transgen. Za potencijalni tretman inflamatornih bolesti skeletnog sistema korišćenjem MMĆ, tranzijentna transfekcija ovih ćelija je metoda izbora, jer je kod navedenih bolesti potrebno lokalno, tokom kraćeg vremenskog perioda primeniti određeni terapeutikr (Park, Ries et al. 2003). Takođe, fokus ovih istraživanja je usmeren na korišćenje plazmidnih DNK vektora sa kojih se ekspimiraju željeni transgen, s obzirom da je njihovo korišćenje mnogo bezbednije u odnosu na viralne vektore (Yin, Kanasty et al. 2014). Međutim, efikasnost transfekcije koja se postiže korišćenjem plazmidnih vektora za tranzijentnu transfekciju je generalno niska, a poznato je da MMĆ spadaju u grupu ćelija koje se teško transfekuju. Zbog toga je ovaj deo istraživanja bio posvećen optimizaciji tranzijentne transfekcije MMĆ. U tu svrhu su korišćena dva transfekciona reagensa, čija dejstva se zasnivaju na različitim mehanizmima.

MMĆ adipoznog tkiva psa su transfekovane korišćenjem *Lipofectamine 2000* reagensa, koji funkcioniše na principu lipozoma i *GeneCellin* reagensa, koji funkcioniše na principu nanočestica - nanoportera (eng. *nanoporters*). Poredili smo postignutu efikasnost transfekcije, kao i uticaj korišćenih reagensa na preživljavanje ćelija.

U eksperimentima optimizacije transfekcije je korišćen pCH110 plazmid. Ovaj vektor nosi *LacZ* gen sa koga se ekspimiraju β -galaktozidaza, koja prilikom *in situ*

bojenja, razlaže supstrat (X-gal) u nerastvorljivi plavo-zeleni precipitat. Ovo bojenje ćelija je vidljivo pod mikroskopom i na taj način se vizuelizuje efikasnost transfekcije. Permanentna humana ćelijska linija HeLa, je korišćena kao kontrola u ovim eksperimentima, a vektor pBluescript kao kontrolni vektor.

Primena oba transfekciona reagensa po predloženim uputstvima proizvođača, nije dala rezultate. Preciznije, korišćenjem *Lipofectamine 2000* reagensa nije došlo do transfekcije MMĆ (Slika 13 a), a pri korišćenju *GeneCellin* reagensa je detektovana samo jedna transfekovana ćelija na celoj površini bunarića (Slika 13 b). Kontrolna transfekcija HeLa ćelija, pod istim uslovima korišćenja *GeneCellin* reagensa, je bila uspešna (Slika 13 c).



Slika 13. Transfekcija MMĆ iz adipoznog tkiva psa *Lipofectamine 2000* i *GeneCellin* reagensima po protokolima proizvođača. (uveličanje 10X)

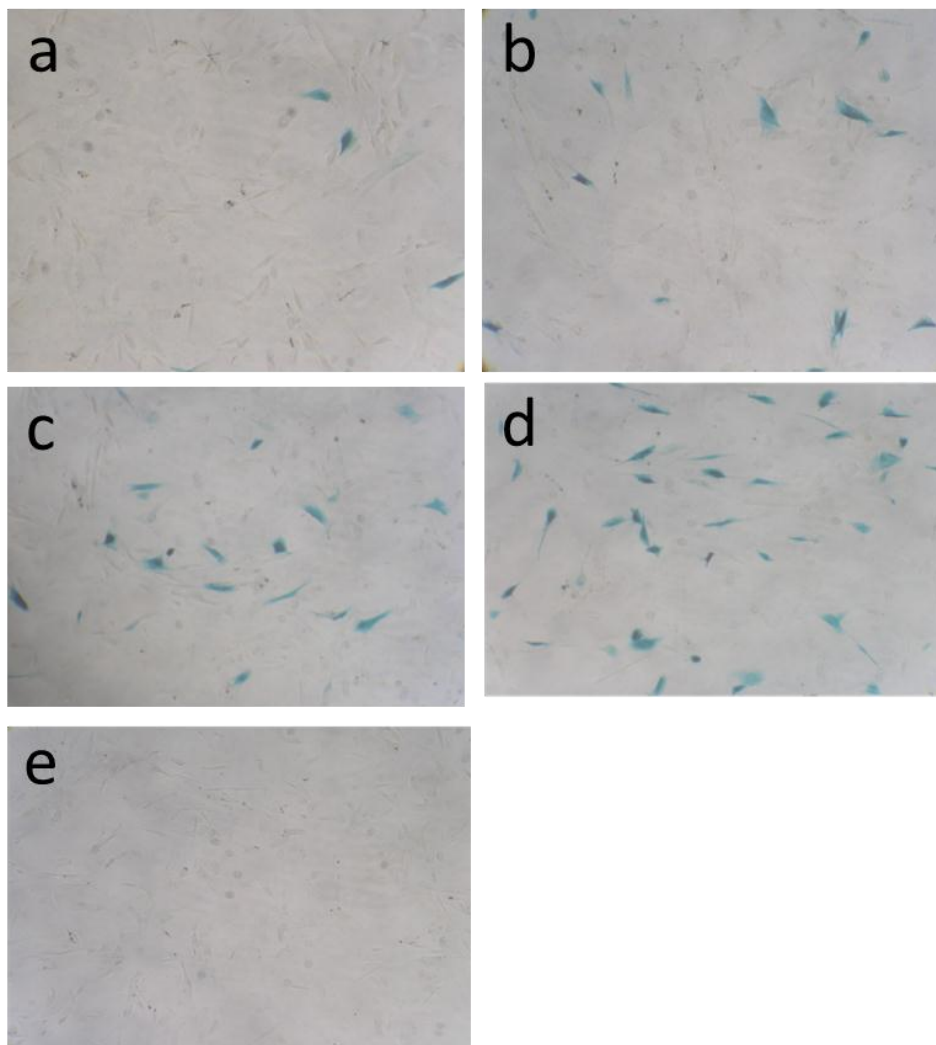
Sa obzirom na to da primenom protokola po uputstvima proizvođača (PUP), nismo uspeli da transfekujemo MMC, odlučili smo se na nekoliko koraka modifikacije. Variranje komponenti prilikom optimizacije transfekcije *Lipofectamine 2000* reagensom bilo je u okviru predloženih modifikacija od strane proizvođača, dok su promene uvedene prilikom testiranja *GeneCellin* reagensa bile van predloženih modifikacija od strane proizvođača. Detalji korišćenih protokola su prikazani u Tabeli 17.

Tabela 17. Varijante protokola koje su korišćene prilikom optimizacije tranzijentne transfekcije MMC iz adipoznog tkiva psa

Transfekcioni reagens	Oznaka protokola	Količina reagensa	Količina plazmida	FCS	Količina medijuma #	Odgovrajuća slika *
<i>Lipofectamine 2000</i>	PUP	2 µl	0.8 µg	+	600 µl	Slika 13 a
	A1	2.5 µl	1 µg	—	600 µl	Slika 14 a
	A2	2.5 µl	1 µg	+	600 µl	Slika 14 b
<i>GeneCellin</i>	PUP	2 µl	0.5 µg	+	600 µl	Slika 13 b
	B1	5 µl	1 µg	—	300 µl	Slika 14 c
	B2	5 µl	1 µg	+	300 µl	Slika 14 d

Napomena: # tokom procesa transfekcije; *nakon *in situ* β-galaktosidaznog bojenja
Skrećenice: FCS - serum fetusa govečeta (eng. *fetal calf serum*), PUP - Po uputstvu proizvođača

Povećanje količine *Lipofectamine 2000* reagensa i količine plazmida, kao i uklanjanje FCS-a tokom transfekcije MMC, doveli su do umiranja velikog broja ćelija, a efikasnost transfekcije je bila niska (Slika 14 a, b). Kada je u pitanju reagens *GeneCellin*, povećali smo količinu reagensa i količinu plazmida, a smanjili količinu medijuma tokom transfekcije i pokušali transfekciju u odsustvu i prisustvu FCS-a (Slika 14 c, d).

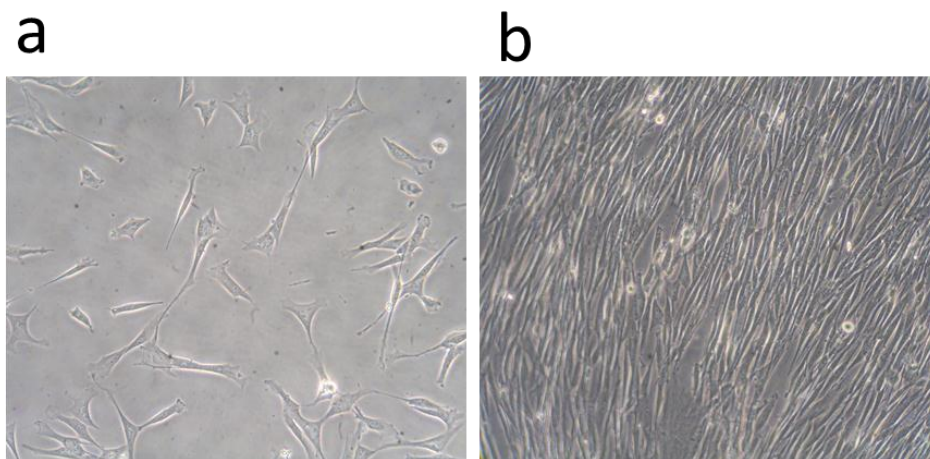


Slika 14. Optimizacija transfekcije MMĆ iz adipoznog tkiva psa *Lipofectamine 2000* i *GeneCellin* reagensima. (a) MMĆ transfekovane *Lipofectamine 2000* reagensom po modifikovanom protokolu A1; (b) MMĆ transfekovane *Lipofectamine 2000* reagensom po modifikovanom protokolu A2; (c) MMĆ transfekovane *GeneCellin* reagensom, po modifikovanom protokolu B1; (d) MMĆ transfekovane *GeneCellin* reagensom, po modifikovanom protokolu B2 ; (e) MMĆ transfekovane kontrolnim pBluescript plazmidom *GeneCellin* reagensom, po modifikovanom protokolu B2. (uveličanje 10X)

Nakon ovih eksperimenata smo zaključili da se najviša efikasnost transfekcije, kao i bolje preživljavanje ćelija postiže kada je transfekcija *GeneCellin* reagensom vršena u medijumu u prisustvu FCS-a. Na ovaj način su optimizovani uslovi za tranzijentnu transfekciju MMĆ iz adipoznog tkiva psa i oni su korišćeni u daljem radu.

Uticaj procesa zamrzavanja/odmrzavanja MMC iz adipoznog tkiva na njihovu morfologiju i proliferativni kapacitet

Nakon izolacije MMC iz adipoznog tkiva pasa i njihove ekspanzije, ćelije su zamrzavane i čuvane u tečnom azotu. Na Slici 15 prikazane su MMC nakon odmrzavanja.

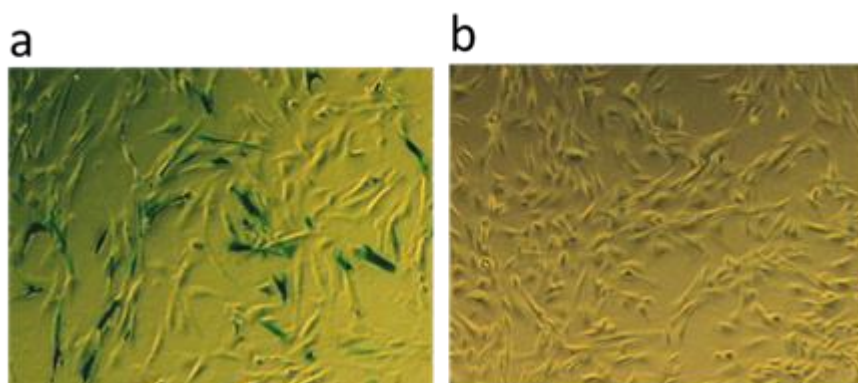


Slika 15. MMC iz adipoznog tkiva psa nakon odmrzavanja. (a) MMC 24 sata nakon odmrzavanja; (b) MMC 8 dana nakon odmrzavanja. (uveličanje 10X)

Sa Slike 15. se vidi da ćelije 24sata nakon odmrzavanja imaju morfologiju tipičnu za MMC, sličnu fibroblastima. Proces zamrzavanja / odmrzavanja nije uticao na potencijal MMC za deobu, tako da su ćelije nakon 8 dana gajenja u standardnom medijumu za ekspanziju dostigle oko 90% konfluentnosti.

Uticaj procesa zamrzavanja/odmrzavanja MMC iz adipoznog tkiva na efikasnost transfekcije

Kako bismo ispitali da li proces zamrzavanja/odmrzavanja MMC utiče na efikasnost transfekcije i njihovo preživljavanje tokom transfekcije, ćelije su nakon odmrzavanja transfekovane pCH110 plazmidom, po optimizovanom B2 protokolu za *GeneCellin* reagens (Slika 16).



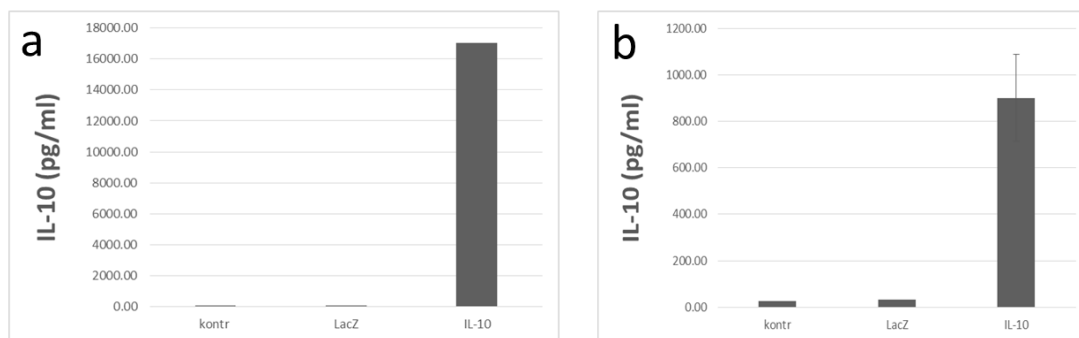
Slika 16. Provera efikasnosti transfekcije MMČ iz adipoznog tkiva psa nakon njihovog zamrzavanja/odmrzavanja. (a) MMČ transfekovane pCH110 plazmidom; (b) kontrolni, netransfekovan uzorak MMČ. (uveličanje 10X)

Posle navedenog eksperimenta zaključeno je da proces zamrzavanja / odmrzavanja nema uticaja na efikasnost transfekcije MMČ, tj. da je nivo transfekcije ovih ćelija sličan onom koji je postignut korišćenjem istog transfekcionog protokola na sveže izolovanim MMČ.

Tranzijentna transfekcija MMČ plazmidom koji nosi gen za humani IL-10

Pokazano je da je IL-10 citokin sa veoma potentnim antiinflamatornim efektom (Moore, de Waal Malefyt et al. 2001). To ga čini izuzetno zanimljivim kandidatom za korišćenje u *ex vivo* genskoj terapiji bolesti u kojima proces inflamacije ima bitnu ulogu, među kojima su i bolesti skeletnog sistema (Choi, Yoo et al. 2008, Noth, Steinert et al. 2008, Levy, Zhao et al. 2013). Stoga je cilj ovog dela istraživanja bio da se ispita tranzijentna ekspresija humanog IL-10 sa plazmidnog DNK vektora uvedenog u MMČ iz adipoznog tkiva psa.

U tu svrhu su MMČ izolovane iz adipoznog tkiva psa transfekovane pCIneoIL-10 plazmidom koji nosi humani gen za *IL-10*. Korišćen je *GeneCellin* reagens po optimizovanom protokolu B2. Paralelno je vršena i transfekcija pCIneoLacZ plazmidom, koja je služila kao kontrola. Ekspresija humanog IL-10 je merena *ELISA* metodom, 48 sati nakon transfekcije, kada se očekuje najviši nivo sekretovanog IL-10 (Enzmann, Hollborn et al. 2001). Ovaj eksperiment je urađen dva puta, na MMČ poreklom od istog donora. Dobijeni rezultati su predstavljeni na Slici 17.



Slika 17. Merenje nivoa sekretovanog IL-10 proteina *ELISA* metodom nakon transfekcije MMĆ iz adipoznog tkiva psa pCIneoIL-10 plazmidom. (a) eksperiment I; (b) eksperiment II. Napomena: netransfekovani uzorak MMĆ je označen sa „kontr”, uzorak MMĆ transfekovan pCIneoLacZ plazmidom označen sa „LacZ”, uzorak MMĆ transfekovan pCIneoIL-10 plazmidom je označen sa „IL-10”

Dobijeni rezultati su pokazali da se pod navedenim uslovima tranzijentne transfekcije MMĆ iz adipoznog tkiva psa plazmidom pCIneoIL-10 uspešno eksprimira humani citokin IL-10. U kontrolnim uzorcima, koji nisu transfekovani, kao i u uzorcima transfekovanim pCIneoLacZ plazmidom, nivo detektovanog IL-10 je bio zanemarljiv. Zanimljivo je da je nivo sekretovanog IL-10 bio značajno različit u dva zasebna eksperimenta tranzijentne transfekcije MMĆ.

DISKUSIJA

UTICAJ GENSKIH VARIJANTI KOAGULACIONIH FAKTORA NA POJAVU I RAZVOJ LKP BOLESTI

Leg-Kalve–Pertesova bolest je idiopatska avaskularna osteonekroza epifize femura kod dece koja rastu. Urađene su mnogobrojne studije sa ciljem da se razjasni priroda i uzrok LKP bolesti, međutim ona i dalje ostaje jedna od najkontroverznijih bolesti u pedijatrijskoj ortopediji (Kim 2012, Perry 2013). Iako se i dalje ne zna njen uzrok, opšte prihvaćeno mišljenje je da je inicijalni događaj u razvoju LKP bolesti prekid dotoka krvi u proksimalnoj epifizi femura (Kim 2012).

Uloga genetičkih faktora uključenih u proces koagulacije koji bi mogli da doprinesu poremećaju lokalne cirkulacije je opširno proučavana, za razliku od ostalih genskih varijanti koje bi mogle doprineti razvoju ove bolesti. Studije vezane za poremećaje koagulacije kod LKP pacijenata su dale različite rezultate u različitim populacijama.

Pokazano je da je *Faktor V* Leiden mutacija u heterozigotnom ili homozigotnom obliku značajno zastupljenija kod dece obolele od LKP bolesti u odnosu na zdravu decu (Glueck, Brandt et al. 1997). Holandska studija je ukazala na to da je učestalost *Faktor V* Leiden mutacije, kao i ređeg alela *Faktor II* gena povišena kod obolelih od LKP bolesti (Vosmaer, Pereira et al. 2010). U istraživanju rađenom u Mađarskoj je u grupi od 47 pacijenata, kod 5 pacijenata detektovano prisustvo *Faktor V* Leiden mutacije, od čega su 4 bili homozigotni nosioci. U istom istraživanju je pokazano da nosioci homozigotnog genotipa za *Faktor V* Leiden mutaciju imaju najtežu kliničku sliku bolesti (spadaju u grupu IV po klasifikaciji po Kateralu) (Szepesi, Posan et al. 2004). Studija urađena na pacijentima brazilske nacionalnosti pokazala je statistički značajnu asocijaciju samo *Faktor V* Leiden mutacije sa LKP bolešću, dok asocijacija nije pronađena za *Faktor II* G20210A i *MTHFR* C677T genske varijante (Arruda, Belangero et al. 1999). Slične rezultate su dobili Balasa i saradnici. Oni su pronašli asocijaciju *Faktor V* Leiden mutacije i LKP bolesti, ali ne i asocijaciju sa *Faktor II* 20210G>A, *MTHFR* C677T i *PAI-1* 4G/5G genskim varijantama (Balasa, Gruppo et al. 2004). Sa druge strane, Lopez i

Kenet i saradnici, nisu pronašli asocijaciju *Faktor V* Leiden mutacije, *Faktor II* G20210A niti *MTHFR* C677T genskih varijanti sa LKP bolešću u svojim istraživanjima (Lopez, Pons et al. 2005, Kenet, Ezra et al. 2008).

U nedavno urađenoj meta-analizi su sumirani konfliktni rezultati iz prethodnih studija u kojima je analizirana asocijacija *Faktor V* G1691A (Leiden mutacija), *Faktor II* G20210A i *MTHFR* C677T genskih varijanti i LKP bolesti (Woratanarat, Thaveeratitharm et al. 2014). Ovo istraživanje je obuhvatilo 12 studija, 7 iz Evrope, 3 iz Severne i 2 iz Južne Amerike, koje su zadovoljavale sve kriterijume da budu obrađene meta-analizom. Pokazano je da je *Faktor V* Leiden mutacija statistički značajno povezana sa LKP bolešću. Naime, po rezultatima ove meta-analize, nosioci ređe zastupljenog alela - A imaju oko tri puta veću šansu da obole od LKP bolesti nego nosioci češće zastupljenog alela - G. To bi značilo da je prisustvo Leiden mutacije uzrok 3% slučajeva LKP bolesti u pedijatrijskoj populaciji. Takođe, ova meta-analiza je ukazala na mogućnost da nosioci ređe zastupljenog alela - A *Faktor II* gena imaju 1.5 puta povećan rizik da obole od LKP bolesti u odnosu na nosioce češće zastupljenog alela - G, iako ovaj rezultat nije bio statistički značajan. Sa druge strane, ova studija nije ukazala ni na kakvu povezanost genske varijante *MTHFR* C677T i LKP bolesti.

U našoj grupi bolesnika nismo našli statistički značajnu povezanost genskih varijanti *Faktor V* G1691A (Leiden mutacija), *Faktor II* 20210G>A, *MTHFR* C677T i *PAI-1* 4G/5G sa LKP bolešću. Zanimljivo je da za *Faktor V* Leiden mutaciju i *Faktor II* G20210A gensku varijantu nije pronađen ni jedan homozigotni nosilac ređeg alela, kako u grupi pacijenata tako ni u kontrolnoj grupi. Takođe, analiza asocijacija genskih varijanti koagulacionih faktora sa uzrastom LKP pacijenata kada se bolest javila nije pokazala postojanje značajne razlike učestalosti analiziranih genskih varijanti među mlađom i starijom podgrupom pacijenata. Ipak, bitno je istaći da su svi pacijenti kod kojih se bolest javila nakon pete godine života, bili homozigotni nosioci učestalijih alela za genske varijante *Faktor V* G1691A i *Faktor II* G20210A, dok je u podgrupi pacijenata kod kojih se bolest javila ranije bilo po dva nosioca heterozigotnog genotipa za navedene varijante.

Slično našim rezultatima, *Vosmaer* i saradnici nisu pronašli značajnu razliku u sklonosti ka trombofiliji između starije i mlađe grupe pacijenata, mada je zastupljenost *Faktor V* Leiden mutacije bila nešto viša u mlađoj grupi pacijenata (kod kojih se bolest javila pre pete godine i u petoj godini) (*Vosmaer, Pereira et al. 2010*).

Rezultati meta-analize su ukazali na značajnu povezanost *Faktor V* Leiden mutacije sa LKP bolešću, iako neke studije, koje su bile obuhvaćene ovom meta-analizom i koje su urađene na relativno velikom broju uzoraka nisu pokazale značajnu asocijaciju navedene genske varijante sa ovom bolešću (*Lopez, Pons et al. 2005, Kenet, Ezra et al. 2008*). Stoga, treba imati u vidu da razlike u etničkom poreklu mogu biti razlog kontroverznim rezultatima. Nedostatak ovog dela našeg istraživanja je relativno mali broj ispitanika. Potrebno je nastaviti istraživanje o uticaju poremećaja koagulacije na LKP bolest, kako na većoj grupi pacijenata iz Srbije, tako i na većim grupama pacijenata drugih nacionalnosti. Bolje razumevanje uloge hiperkoagulacije u razvoju LKP bolesti bi moglo dovesti do poboljšanja terapije pacijenata. Lekari bi pacijentima sa *Faktor V* Leiden mutacijom ili nekim drugim koagulacionim poremećajem mogli dati terapiju antikoagulansima na samom početku bolesti. Kod adultnih osteonekroza je pokazano da terapija antikoagulansima može usporiti progresiju bolesti (*Arlet and Ficat 1968*). Na taj način bi se moglo skratiti vreme akutne faze bolesti. S obzirom na to da ima podataka da homozigotni nosioci *Faktor V* Leiden mutacije imaju težu kliničku sliku, kod njih bi se ranom hirurškom intervencijom, na vreme mogao sprečiti nastanak ozbiljnog deformiteta.

UTICAJ INFLAMACIJE NA LKP BOLEST

Mada se smatra da je inicijalni događaj u početku razvoja LKP bolesti prekid dotoka krvi u proksimalnoj epifizni femura, koji dovodi do ishemične nekroze koštanog tkiva, LKP bolest nije avaskularna osteonekroza sama po sebi, već posledica njene komplikacije (Vukasinovic, Vucetic et al. 2008, Kim 2012). Nakon ishemične nekroze slede patološke strukturne promene u butnoj kosti koja je u procesu rasta, karakteristične za opšteprihvatačene faze patofiziologije LKP bolesti, koje su opisane u Uvodu (Kim 2012).

Neusklađenost između procesa resorpcije i formiranja koštanog tkiva, koja je najizraženija tokom fragmentacione faze bolesti, ima važnu ulogu u razvoju teškog deformiteta obolelog kuka (Kim 2012). Bitno je istaći da su inflamatorne promene u LKP bolesti najizraženije tokom fragmentacione faze, kada je najizraženija i neravnoteža u procesu remodelovanja (Dillman and Hernandez 2009, Little and Kim 2011).

Na osnovu saznanja da inflamatorni citokini inhibiraju formiranje kostiju i stimulišu resorpciju, dobijenih pre svega iz istraživanja vezanih za reumatoidni artritis i osteoporozi (Lacey, Simmons et al. 2009, Walsh, Reinwald et al. 2009, Edwards and Williams 2010), prepostavili smo, da bi isti mehanizam mogao biti odgovoran za poremećeno formiranje koštanog tkiva koje se javlja u patogenezi LKP bolesti.

Asocijacija genskih varijanti markera inflamacije i LKP bolesti

Jedan od ciljeva ovog rada je bio da se ispita zastupljenost različitih varijanti *IL-6*, *IL-3*, *TNF- α* i *TLR4* gena, koji učestvuju u imunskom odgovoru, kod LKP pacijenata, što do sada nije ispitivano ni u jednoj populaciji.

Analizirane su dve značajne ne-sinonimne genske varijante *TLR4* gena, Asp299Gln i Thr399Ile, koje dovode do izmenjenog *TLR4* odgovora, kao i do izmenjene ekspresije citokina koji su regulisani ovim receptorom (Ferwerda,

McCall et al. 2008). Ove dve genske varijante su kosegregirale (bile su u kompletnoj gametskoj neravnoteži vezanosti, *eng. linkage disequilibrium*) u našoj grupi pacijenata i u kontrolnoj grupi, što je bilo u skladu sa rezultatima drugih studija (Montes, Asensi et al. 2006, Ferwerda, McCall et al. 2007, Ferwerda, McCall et al. 2008, Douville, Lissitsyn et al. 2010).

Ima malo istraživanja o uticaju Asp299Gli i Thr399Ile varijanti *TLR4* gena na kvalitet građe kostiju i njihovi rezultati su kontroverzni. Studija rađena na uzorcima žena obolelih od osteoporoze je pokazala da nosioci heterozigotnih genotipova imaju manju gustinu kostiju (*eng. bone mineral density -BMD*) u odnosu na homozigotne nosioce češćih genskih varijanti (Ozkan, Deveci et al. 2012). Sa druge strane, studija rađena na uzorcima žena starijeg životnog doba nije ukazala ni na kakvu vezu između *TLR4* genotipa i gustine kostiju ili pojave osteoporoze (Santos, Lera et al. 2006). Rezultati eksperimenata rađenih na životinjama su pokazali da miševi koji imaju ređu varijantu *TLR4* genotipa imaju viši sadržaj minerala u kostima i veće kosti u odnosu na *wild-type* miševe, sa kojima su po ostalim genetičkim osobinama identični (Johnson, Riggs et al. 2004). Naša pretpostavka je bila da bi *TLR4* Asp299Gli i Thr399Ile genske varijante, zbog svog efekta na ekspresiju gena imunskog odgovora, mogle uticati na remodelovanje koštanog tkiva i na razvoj LKP bolesti. Međutim, rezultati ove studije nisu pokazali značajnu asocijaciju navedenih genskih varijanti sa LKP bolešću, niti sa uzrastom pacijenata kada se bolest javila.

U okviru ovog dela istraživanja, analizirali smo prisustvo promotorske varijante -308A *TNF- α* gena kod LKP pacijenata, za koju je sugerisano da dovodi do višeg nivoa ekspresije *TNF- α* (Braun, Michel et al. 1996, Rudwaleit, Siegert et al. 2001). Različite studije su pokazale da je prisustvo ovog alela asocirano sa reumatoidnim artritismom (Brinkman, Huizinga et al. 1997), astmom (Li, Gauderman et al. 2006, Zhang, Zhang et al. 2006), sepsom (Teuffel, Ethier et al. 2010), sistemskim eritemskim lupusom (Lee, Harley et al. 2006) i mnogim drugim inflamatornim bolestima. S obzirom na činjenicu da *TNF- α* pozitivno utiče na formiranje osteoklasta i inhibira diferencijaciju osteoblasta (Nanes 2003, Lacey, Simmons et al. 2009), očekivali smo da nosioci *TNF- α* -308A alela mogu biti

značajno češće zastupljeni u LKP grupi pacijenata nego u kontrolnoj grupi. Ipak, naši rezultat nisu pokazali značajnu razliku između učestalosti *TNF- α* G-308A genske varijante u grupi pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, nije pronađena asocijacija ove genske varijante sa uzrastom LKP pacijenata kada se bolest javila.

S obzirom na to da je pokazano da citokin IL-3 ima važne funkcije u procesu koštanog „prometa” (eng. *bone turnover*) (Yogesha, Khapli et al. 2005), kao i da 27Ser varijanta proteina IL-3, koju kodira 132T varijanta *IL-3* gena, dovodi do višeg nivoa proizvodnje inflamatornih citokina IL-4 i TNF α (Schweiger, Stern et al. 2001), analizirali smo zastupljenost ove genske varijante kod LKP pacijenata. Takođe, analizirali smo i zastupljenost -16T promotorske varijante *IL-3* gena, za koju je u velikom broju studija pokazano da je bila u kompletnoj ili perfektnoj gametskoj neravnoteži vezanosti sa 132T *IL-3* genskom varijantom (Jeong, Navani et al. 1998, Yamada, Tanaka et al. 2001, Park, Kim et al. 2004, Chu, Dong et al. 2009). I u našem istraživanju su ove dve genske varijante bile u gametskoj neravnoteži vezanosti (perfektnoj) u kontrolnoj i u grupi pacijenata.

Različite studije su pokazale jaku povezanost genskih varijanti C-16T i 132T *IL-3* gena sa inflamatornim bolestima, reumatoidnim artritisom (Yamada, Tanaka et al. 2001), Grejvs-Bazedovljevom bolešću (Chu, Dong et al. 2009) i astmom i atopijom (Park, Kim et al. 2004). Asocijacija ovih varijanti *IL-3* gena sa LKP bolešću nije pronađena u našoj grupi pacijenata, kao ni njihova asocijacija sa uzrastom LKP pacijenata kada se bolest javila.

Zanimljivo je napomenuti da je učestalost -16C / 132C alela *IL-3* gena bila mnogo viša u našoj grupi pacijenata, kao i u kontrolnoj grupi, u poređenju sa studijama iz Azije (Yamada, Tanaka et al. 2001, Park, Kim et al. 2004, Chu, Dong et al. 2009), što je u skladu sa rezultatima studije koja je takođe urađena na uzorcima ispitanika bele rase (Jeong, Navani et al. 1998).

Kada je u pitanju gen *IL-6*, analizirali smo zastupljenost promotorskih varijanti G-174C i G-597A, za koje je pokazano da utiču na transkripcionu regulaciju ovog gena (Terry, Loukaci et al. 2000). Prijavljeno je da su ove genske

varijante povezane sa povišenim nivoom IL-6 proteina u plazmi (Fishman, Faulds et al. 1998, Hulkkonen, Pertovaara et al. 2001, Jones, Brull et al. 2001, Jerrard-Dunne, Sitzer et al. 2003), kao i sa pojavom različitih oboljenja kostiju i zglobova: juvenilni hronični artritis, reumatoidni artritis, osteoartritis, gubitak koštane mase kod žena nakon menopauze (Fishman, Faulds et al. 1998, Pascual, Nieto et al. 2000, Garnero, Borel et al. 2002, Kamarainen, Solovieva et al. 2008). Analizirane genske varijante *IL-6* gena su bile u gametskoj neravnoteži vezanosti u kontrolnoj i grupi pacijenata, što je u skladu sa rezultatima drugih studija (Pascual, Nieto et al. 2000, Garnero, Borel et al. 2002, Vasku, Vasku et al. 2004, Kamarainen, Solovieva et al. 2008, Cussigh, Falletti et al. 2011).

Naši rezultati su pokazali da su nosioci heterozigotnog genotipa -174GC/-597GA *IL-6* gena manje zastupljeni u grupi pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, grupa LKP pacijenata nije bila u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži, jer je bilo više homozigotnih a manje heterozigotnih nosilaca, za razliku od kontrolne grupe, koja je bila u kompletnoj ravnoteži. Pored toga, naša kontrolna grupa je imala distribuciju genotipova sličnu drugim kontrolnim grupama koje su činili pripadnici bele rase (Fishman, Faulds et al. 1998, Garnero, Borel et al. 2002, Nordstrom, Gerdhem et al. 2004, Vasku, Vasku et al. 2004). Dakle, iz navedenih rezultata je zaključeno da nosioci heterozigotnog genotipa -174GC/-597GA *IL-6* gena imaju manju verovatnoću za razvoj LKP bolesti nego nosioci oba tipa homozigotnog genotipa (-174GG/-597GG i -174CC/-597AA).

Prednost heterozigota za *IL-6* -597/-174 genske varijante nije prijavljena ni u jednoj studiji do sada. Kontroverzni rezultati su dobijeni analizama korelacije *IL-6* -174 GG genotipa i / ili prisustva G alela i CC genotipa sa nivoom IL-6 u plazmi (Fishman, Faulds et al. 1998, Hulkkonen, Pertovaara et al. 2001, Jones, Brull et al. 2001, Jerrard-Dunne, Sitzer et al. 2003, Cozen, Gill et al. 2004), kao i sa kvalitetom građe kostiju (Lorentzon, Lorentzon et al. 2000, Garnero, Borel et al. 2002, Nordstrom, Gerdhem et al. 2004). Jedno od mogućih objašnjenja prednosti heterozigota, zapaženoj u našoj studiji, može biti dvostruka uloga citokina IL-6. U literaturi su opisani proinflamatorni kao i antiinflamatorni efekti ovog citokina (Wong, Campbell et al. 2003). Pošto je IL-6 plejotropni citokin, uključen u imunski

odgovor i remodelovanje kostiju, prednost heterozigota može biti rezultat boljeg balansiranja ovih procesa.

Nivo ekspresije markera inflamacije kod LKP pacijenata

Nakon analize zastupljenosti genskih varijanti markera inflamacije, analiziran je nivo ekspresije *IL-6* i *TNF- α* gena u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MNČPK) LKP pacijenata.

Kao što je ranije pomenuto, jedan od najvažnijih faktora u patofiziologiji LKP bolesti je neravnoteža između procesa resorpcije i formiranja koštanog tkiva, koja je najistaknutija tokom fragmentacione faze bolesti. Zbog toga smo pretpostavili da bi povišen nivo ekspresije *IL-6* i *TNF- α* gena u MNČPK LKP pacijenata, posebno tokom fragmentacione faze, kao i avaskularne faze koja joj prethodi, mogao doprineti nedostatku novoformiranog koštanog tkiva. Kako je navedeno u poglavlju Rezultati, paralelno je poređen nivo ekspresije *IL-6* i *TNF- α* gena u kontrolnoj grupi sa kompletnom grupom pacijenata (31 pacijent) i sa A + F podgrupom pacijenata (pacijenti koji su uzorkovani u avaskularnoj i fragmentacionoj fazi). Ovim analizama nije pronađena statistički značajna razlika nivoa ekspresije ni *IL-6* niti *TNF- α* gena ni u jednoj grupi pacijenata, u odnosu na kontrolnu grupu.

Do sada je samo u jednom, nedavno objavljenom istraživanju analiziran nivo ekspresije inflamatornih gena kod LKP pacijenata. U tom istraživanju je na uzorcima sinovijalne tečnosti 13 pacijenata ispitan nivo 27 različitih inflamatornih citokina i faktora koji su povezani sa inflamacijom, među kojim su bili *IL-6* i *TNF- α* . Rezultati ovog istraživanja su pokazali značajno povišen nivo ekspresije proteina *IL-6* u sinovijalnoj tečnosti LKP pacijenata, dok nivo *TNF- α* nije bio povišen (Kamiya, Yamaguchi et al. 2015). S obzirom na to da je *IL-6* visoko inducibilan gen na čiju ekspresiju utiču mnogobrojni inflamatorni stimuli, kao i da je njegova ekspresija tkivno specifična (Terry, Loukaci et al. 2000), različiti rezultati dobijeni u našem istraživanju, rađenom na MNČPK, i istraživanju rađenom na sinovijalnoj tečnosti LKP pacijenata nisu neočekivani.

Pored poređenja nivoa ekspresije *IL-6* i *TNF- α* gena među grupama pacijenata i kontrola, takođe smo poredili nivoe ekspresije ovih gena među pacijentima sa različitim genotipom, jer su ranije studije sugerisale da promotorske varijante koje smo analizirali utiču na ekspresiju ovih gena. Kada je kompletna grupa pacijenata podeljena na dve podgrupe, prema prisustvu određenog alela (prema prisustvu alela G za *IL-6*; prema prisustvu alela A za *TNF- α*), poređenje nivoa ekspresije ove dve podgrupe pacijenata nije ukazalo na postojanje statistički značajne razlike u nivou ekspresije *IL-6* i *TNF- α* gena.

Rezultati *in vitro* funkcionalnih analiza su sugerisali da -308A alel *TNF- α* gena utiče na nivo ekspresije (Wilson, Symons et al. 1997, Kroeger, Steer et al. 2000). Urađen je veliki broj studija koje su analizirale asocijaciju ove genske varijante sa mnogobrojnim bolestima, kao i sa nivoom ekspresije *TNF- α* gena *in vitro* i *in vivo*, međutim, dobijeni su kontroverzni rezultati (Huang, Pirskanen et al. 1999, Fernandes, Koneru et al. 2002, Karimi, Goldie et al. 2009). Sistematski revijski rad, u kome je urađena i meta-analiza funkcionalnih analiza vezanih za -308A *TNF- α* gensku varijantu, nije potvrdio postojanje asocijacije ove genske varijante i iRNK ili proteinskog nivoa *TNF- α* (Mekinian, Tamouza et al. 2011). Iako su rezultati ove meta-analize pokazali da navedena genska varijanta ne utiče na nivo ekspresije *TNF- α* gena, treba uzeti u obzir da je navedena studija obuhvatila 21 publikaciju a da je isključila 24, koje nisu mogle biti statistički obrađene tim pristupom.

U studijama u kojima je analizirana korelacija G-174C varijante *IL-6* gena i nivoa citokina *IL-6* u krvnoj plazmi dobijeni su veoma različiti rezultati. *Fishman* i saradnici su uradili prvo istraživanje o navedenoj korelaciji. Oni su pokazali da u grupi zdravih ljudi, nosioci C alela imaju značajno niži nivo *IL-6* u plazmi (Fishman, Faulds et al. 1998). U studiji rađenoj na obolelima od Sjorgenovog sindroma je pokazano da nosioci -174G alela imaju značajno viši nivo *IL-6* u plazmi, ali samo u grupi pacijenata, dok u grupi zdravih ljudi ova korelacija nije pronađena (Hulkkonen, Pertovaara et al. 2001). Sa druge strane, u dvema studijama su dobijeni suprotni rezultati. Naime, kod pacijenata sa aneurizmom abdominalne aorte i kod pacijenata sa arterosklerozom, nosioci -174CC genotipa su imali značajno viši nivo *IL-6* u plazmi (Jones, Brull et al. 2001, Jerrard-Dunne, Sitzer et

al. 2003). Rezultati istraživanja rađenog na uzorcima zdravih ljudi, kod kojih je inravenskim unosom lipopolisaharida izazvana sistemska inflamacija nisu pokazali korelaciju između G-174C varijante *IL-6* gena i nivoa ovog citokina u plazmi (Endler, Marsik et al. 2004).

Kontradiktorni rezultati koji su dobijeni u navedenim istraživanjima se verovatno mogu objasniti činjenicom da u promotorskom regionu *IL-6* gena postoje četiri polimorfizma nukleotidne sekvence, pa je potrebno posmatrati efekat određenog haplotipa, a ne zasebnog polimorfizma na ekspresiju gena. Naime, pokazano je da polimorfizmi u promotoru *IL-6* gena ne utiču na ekspresiju ovog gena kroz jednostavan aditivni mehanizam, već kroz veoma kompleksne interakcije koje zavise od haplotipa. Takođe, pokazano je da postoji razlika u uticaju određenog haplotipa na nivo ekspresije *IL-6* gena u različitim ćelijskim tipovima, što ukazuje na to da je uticaj haplotipova tkivno specifičan. Pored toga, treba imati u vidu da je gen *IL-6* visoko inducibilan pa zbog toga nivo ovog citokina u organizmu u određenom trenutku zavisi od velikog broja različitih faktora (Terry, Loukaci et al. 2000).

Naša studija je prva u kojoj je analizirana asocijacija genskih varijanti markera inflamacije sa LKP bolešću i koja je pokazala postojanje asocijacije između G-174C / G-597A *IL-6* genotipa i pojave ove bolesti. Imajući to u vidu, kao i činjenicu da su rezultati nedavno objavljene studije pokazali da je nivo *IL-6* citokina značajno povišen u uzorcima sinovijalne tečnosti LKP pacijenata (Kamiya, Yamaguchi et al. 2015), trebalo bi nastaviti istraživanja u ovom smeru. Nedostatak našeg istraživanja je relativno mali broj pacijenata za asocijativnu studiju, kao i činjenica da smo ispitali dva najčešća polimorfizma koja se nalaze u promotoru *IL-6* gena, a pokazano je da postoje još dva, ređe zastupljena (Terry, Loukaci et al. 2000). U daljim istraživanjima bi bilo poželjno uraditi asocijativnu studiju haplotipova *IL-6* gena i to na većoj grupi LKP pacijenata. Takođe, potrebno je uraditi analize koje bi razjasnile efekat citokina *IL-6* u sinovijalnoj tečnosti na proces remodelovanja koštanog tkiva kod LKP pacijenata. Ako bi se pokazalo da inflamacija značajno doprinosi neravnoteži remodelovanja tokom patofiziologije LKP bolesti, potencijalna antiinflamatorna terapija bi mogla doprineti skraćanju trajanja bolesti kao i smanjenju nivoa deformiteta obolelog kuka. Potencijalna

terapija bi bila lokalna upotreba bioloških agenasa, kao što su antitela na IL-6 ili druge inflamatorne citokine, ako bi se pokazalo da doprinose patofiziologiji LKP bolesti. Takođe, najnoviji pristupi u tretmanu ove i sličnih bolesti skeletnog sistema uključuju lokalno unošenje mezenhimskih matičnih ćelija (MMĆ), s obzirom na njihov značajan imunosupresorni efekat. Osim primene ovih, tzv. naivnih MMĆ, ispituju se i mogućnosti za korišćenje MMĆ čiji je terapijski kapacitet poboljšan uvođenjem specifičnih imunosupresornih transgena. O navedenim pristupima će biti više rečeno u poslednjem delu Diskusije.

APOPTOZA KOD LKP PACIJENATA

Poznato je da je apoptoza osteoblasta i osteoklasta strogo regulisana, i da ima važnu ulogu u održavanju fiziološkog remodelovanja kostiju, kao i u razvoju patoloških stanja skeleta (Nagase, Iwasawa et al. 2009). Međutim, proces apoptoze do sada nije ispitan kod LKP pacijenata. Poremećen proces apoptoze u MNČPK LKP pacijenata, posebno tokom fragmentacione faze, kao i tokom avaskularne faze, koja joj prethodi, bi mogao biti jedan od faktora koji utiču na proces nepravilnog repariranja koštanog tkiva, koji je najizraženiji tokom fragmentacione faze. Nepravilno remodelovanje koštanog tkiva u velikoj meri doprinosi razvoju teškog deformiteta obolelog kuka, kao posledice LKP bolesti (Kim 2010).

Spoljašnji apoptotski put u kome FAS-FASL sistem ima ključnu ulogu, je uključen u regulaciju koštanog „prometa” i može predstavljati bitnu vezu između imunskog sistema i kostiju, kako u fiziološkim, tako i u patološkim procesima (Wu, McKenna et al. 2003).

S obzirom na to da su *Fas* i *FasL* geni eksprimirani u osteoblastima i osteoklastima, smatra se da ovaj apoptotski put značajno utiče na proces remodelovanja i homeostaze koštanog tkiva. Mnogobrojne studije su ukazale na povezanost poremećaja FAS-FASL sistema kod reumatidnog artritisa (Peng 2006). Pokazano je da je nivo solubilnog FASL proteina u plazmi pacijenata obolelih od reumatoidnog artritisa značajno niži u odnosu na kontrolnu grupu (Szodoray, Jellestad et al. 2003), kao i da je nivo iRNK *FasL* gena u MNČPK pacijenata

obolelih od iste bolesti niži u odnosu na kontrolnu grupu (Grcevic, Jajic et al. 2010).

U ovoj studiji nismo detektovali značajnu razliku u nivoima ekspresije gena spoljašnjeg apoptotskog puta, *Fas* i *FasL*, kao ni odnosa nivoa ekspresije ova dva gena, između grupe pacijenata i kontrolne grupe.

Međutim, naša studija je ukazala na značaj unutrašnjeg apoptotskog puta u patofiziologiji LKP bolesti. Naime, našli smo značajno povišen nivo ekspresije proapoptotskog faktora *Bax* u MNČPK u podgrupi pacijenata koji su uzorkovani u avaskularnoj i fragmentacionoj fazi bolesti (A + F podgrupi). Pored toga, odnos nivoa ekspresije *Bax* / *Bcl-2* gena je bio značajno viši u kompletnoj grupi pacijenata, kao i u podgrupi pacijenata koji su uzorkovani u avaskularnoj i fragmentacionoj fazi bolesti (A + F podgrupi) u odnosu na kontrolnu grupu.

Dobro je poznato da je integritet koštanog tkiva rezultat delikatne ravnoteže aktivnosti osteoblasta, koji formiraju koštano tkivo, i osteoklasta, koji vrše resorpciju (Nagase, Iwasawa et al. 2009). Rezultati istraživanja rađenog na osteoblastnoj ćelijskoj liniji MC3T3-E1, u kome je u ćelijskoj kulturi izazvana apoptoza izlaganjem ćelija hipoksiji i deksometazonu (što je model koji odgovara avaskularnoj osteonekrozi (AVON) indukovanoj steroidima), su pokazali da spoljašnji apoptotski put ima zanemarljivu ulogu u apoptozi izazvanoj na ovaj način. Sa druge strane, rezultati ove studije su ukazali na to da je apoptoza u osteoblastima regulisana unutrašnjim apoptotskim putem. Tačnije, detektovan je povišen nivo iRNK *Bax* gena a snižen nivo iRNK *Bcl-2* gena, prilikom izlaganja ćelija hipoksiji i deksometazonu (Zhu, Gao et al. 2011).

Relativno nova istraživanja su pokazala da je pored osteoklasta, u koštanom tkivu zastupljena još jedna ćelijska populacija poreklom od monocita - rezidentni makrofagi, koji se nazivaju OsteoMaks (eng. *OsteoMacs*). Ove ćelije imaju važnu ulogu u održavanju homeostaze koštanog tkiva (Pettit, Chang et al. 2008). Pored toga, istraživanja su pokazala da sistemski, kao i lokalno, smanjen broj makrofaga dovodi do usporenja procesa izlečenja i formiranja koštanog tkiva (Chang, Raggatt et al. 2008).

Pošto je pokazano da povišeni odnos BAX / BCL-2 ubrzava apoptotski proces (Oltvai, Milliman et al. 1993), objašnjenje rezultata naše studije bi moglo

biti da poremećaj procesa apoptoze, koji je detektovan u MNČPK LKP pacijenata, doprinosi patološkom remodelovanju obolele epifize femura, putem značajnog smanjenja broja rezidentnih koštanih makrofaga.

Naše istraživanje je prvo u kome je analiziran status markera apoptoze kod LKP pacijenata i koje je ukazalo na značaj poremećaja unutrašnjeg apoptotskog puta na razvoj ove bolesti. Dobijeni rezultati otvaraju nova pitanja u vezi patofiziologije LKP bolesti. Zbog toga bi bilo poželjno da se u budućim istraživanjima ove analize urade na većim grupama LKP pacijenata, kao i da se ispita status ostalih gena koji učestvuju u procesu apoptoze. Ako se i u drugim istraživanjima pokaže da je proces apoptoze u MNČPK poremećen kod LKP pacijenata, apoptotski faktori bi mogli postati pouzdani markeri za procenu statusa ili prognoze bolesti, kao i potencijalne mete za ciljanu terapiju.

IZOLACIJA, DIFERENCIJACIJA I TRANSFEKCIJA MEZENHIMSKIH MATIČNIH ĆELIJA

Mezenhimske matične ćelije (MMC) kroz sintezu različitih bioaktivnih molekula vrše supresiju imunskog odgovora, kada se nađu na mestu zahvaćenom inflamacijom (Ma, Xie et al. 2014). Pored toga, pretpostavlja se da ove ćelije mogu da se integrišu u tkivo, kao i da parakrinom aktivnošću stimulišu deobu i diferencijaciju lokalnih progenitorskih ćelija (Quevedo, Hatzistergos et al. 2009, Porada and Almeida-Porada 2010, Mok, Leong et al. 2013). Zbog navedenih osobina, MMC su vrlo pogodne za primenu u terapiji mnogih bolesti, posebno onih na čiji razvoj utiče proces inflamacije, među kojima su bolesti i povrede skeletnog sistema. Takođe, ove ćelije se mogu koristiti i kao nosači terapijskih transgena pomoću kojih se željeni protein može dostaviti na obolelo mesto. Do sada su najviše ispitivane MMC izolovane iz kostne srži, međutim uzorkovanje kostne srži je vrlo invanzivna i rizična metoda, dok adipozno tkivo predstavlja mnogo pristupačniji izvor velike količine MMC (Zuk 2008).

Izolacija i diferencijacija MMC

Katz, Zuk i saradnici u bili prvi koji su pokazali da se iz humanih lipoaspirata mogu izolovati multipotentne ćelije - adipozne mezenhimske matične ćelije (eng. *adipose mesenchymal stem cells- A(M)SC* (Katz, Lull et al. 1999, Zuk, Zhu et al. 2001). Nakon otkrića matičnih ćelija u adipoznom tkivu, mnoge grupe su nezavisno jedne od drugih razvile različite pristupe za izolaciju ovih ćelija (Gronthos, Franklin et al. 2001, Gimble and Guilak 2003, Katz, Tholpady et al. 2005, Boquest, Noer et al. 2006).

U ovom istraživanju je za izolaciju MMC iz adipoznog tkiva korišćen protokol koji se zasniva na principu enzimske digestije i sačinjen je od koraka iz protokola objavljenih u različitim publikacijama (opisan je u poglavlju Materijal i

metode). Ovim pristupom je postignuta uspešna izolacija MMĆ iz adipoznog tkiva pasa i konja. Izolovane ćelije poseduju osobine karakteristične za MMĆ, kao što su adhezija za plastičnu podlogu i vretenasta morfologija slična fibroblastima (Dominici, Le Blanc et al. 2006). Pored toga, ove ćelije su uspešno diferencirane u osteogenu i hondogenu ćelijsku liniju. Usled intenzivnih istraživanja u oblasti MMĆ koja se sprovode u poslednje vreme, razvijeno je više različitih pristupa za njihovu osteogenu i hondrogenu diferencijaciju (Vater, Kasten et al. 2011). Sve je više komercijalnih medijuma za indukciju, koji sadrže sve neophodne komponente za odgovarajuću liniju diferencijacije i očekuje se da će njihova upotreba doprineti standardizaciji ove metodologije. U našem istraživanju je diferencijacija u osteogeni i hondrogeni ćelijski tip izvršena primenom najčešće korišćenih protokola (Vater, Kasten et al. 2011).

Transfekcija MMĆ

S obzirom na to da su MMĆ imunoprivilegovane, kao i da se iz adipoznog tkiva mogu lako izolovati i koristiti velike količine autoloških MMĆ, one predstavljaju vrlo pogodne nosače za *ex vivo* gensku terapiju. Kada se genetički modifikovane MMĆ koriste za lečenje bolesti u kojima je potrebno da se specifični transgen eksprimira samo tokom kraćeg vremenskog perioda, vektori koji se ne integrišu u genom, kao što su adenoviralni i plazmidni, su odgovarajući izbor (Park, Ries et al. 2003). Međutim, iako se korišćenjem adenoviralnih vektora postiže bolja efikasnost transfekcije, njihova upotreba je rizična jer mogu imati imunogeni efekat (Park, Yang et al. 2012). Kada je potrebno da se terapijski transgen tranzijentno eksprimira, korišćenje plazmidnih vektora je mnogo bezbediji pristup. Problem koji treba prevazići, kako bi se plazmidni vektori mogli koristiti u terapijske svrhe je niska efikasnost transfekcije. Zbog toga su u poslednje vreme mnoga istraživanja usmerena na pronalaženje efikasnog načina za unos gena u ćeliju, čija upotreba ne bi bila rizična i koji bi prevazišao navedena ograničenja (Madeira, Mendes et al. 2010).

U ovom istraživanju smo poredili efikasnost transfekcije i preživljavanje ćelija tokom transfekcije, korišćenjem dva transfekciona reagensa čija dejstva se

zasnivaju na različitim mehanizmima, *Lipofectamine 2000* reagensa, koji funkcioniše na principu lipozoma i *GeneCellin* reagensa, koji funkcioniše na principu nanočestica. S obzirom na to da primenom protokola po uputstvima proizvođača nismo uspjeli da transfekujemo MMĆ, primenili smo različite modifikacije.

Odlučili smo se da modifikujemo protokol za *Lipofectamine 2000*, kako je opisano u Tabeli 17 iz Rezultata, jer je prema podacima iz studije, koja se bavila optimizacijom uslova za transfekciju MMĆ iz humane kostne srži, najviši nivo ekspresije reporterskog gena postignut pod tim uslovima (Madeira, Mendes et al. 2010). Ove promene su bile u opsegu preporučenih modifikacija protokola od strane proizvođača. U navedenoj studiji je prijavljeno da korišćena količina *Lipofectamine 2000* reagensa nije negativno uticala na preživljavanje ćelija, međutim, u našim eksperimentima je ta količina transfekcionog reagensa prouzrokovala smrt velikog broja ćelija.

Kada je u pitanju *GeneCellin* reagens, mada u uputstvu proizvođača nije preporučeno da se povećava količina reagensa prilikom transfekcije, mi smo dobili izuzetno poboljšanje efikasnosti transfekcije tim pristupom - 2.5 puta smo povećali količinu reagensa u dva puta manjoj zapremini medijuma. Na taj način smo optimizovali uslove za transfekciju MMĆ, a povećanje koncentracije transfekcionog reagensa nije imalo vidljivi efekat na morfologiju i preživljavanje ćelija.

Optimizacijom tranzijentne transfekcije MMĆ iz adipoznog tkiva psa su uspostvaljeni uslovi koji omogućavaju unošenje različitih gena u ove ćelije. Jedan od potencijalnih terapijskih transgena za lečenje inflamatornih bolesti je *IL-10*. Ovaj interleukin spada u veoma potentne imunosupresorne citokine (Moore, de Waal Malefyt et al. 2001), koga MMĆ proizvode u zanemarljivoj nivou (Yoo, Jang et al. 2009). U ovom istraživanju smo MMĆ transfekovali vektorom koji nosi gen za humani *IL-10* i detektovali visok nivo sekretovanog citokina IL-10 u medijumu u kome su ćelije gajene. Zanimljivo je istaći da smo u dva nezavisna eksperimenta transfekcije MMĆ poreklom od istog donora, detektovali značajno različit nivo proteina IL-10. Ovaj rezultat ukazuje na to da je izuzetno bitno

optimizovati i standardizovati uslove za potencijalnu gensku terapiju korišćenjem MMC čiji je terapijski kapacitet poboljšan uvođenjem specifičnih transgena.

Kada je u pitanju IL-10, bilo bi od velikog značaja uspostaviti odgovarajući pristup za *ex vivo* gensku terapiju ovim citokinom. Neki od najvažnijih razloga za to leže u činjenici da IL-10 utiče na veliki broj imunskih procesa (Moore, de Waal Malefyt et al. 2001) i da ima potencijal za korišćenje u terapiji mnogih bolesti (Li and He 2004, Aggarwal and Pittenger 2005, Min, Kim et al. 2007, Marlow, van Gent et al. 2013). Zatim, pokazano je da primena rekombinantnog proteina IL-10 u terapijske svrhe nije dala željene rezultate. Naime, poluživot IL-10 u krvotoku je kratak, u opsegu od jednog do oko tri časa, i pitanje je da li ovaj citokin, pri sistemske primeni, uspeva da dođe do mesta u organizmu gde je njegovo dejstvo potrebno (Li and He 2004, Rachmawati, Beljaars et al. 2011). Iz tog razloga je u kliničkim studijama primenjivana visoka koncentracija rekombinantnog proteina IL-10, ali je taj pristup doveo do neželjenih reakcija kod pacijenata (Tilg, van Montfrans et al. 2002). Upotrebom tranzijentno transfekovanih MMC vektorom koji nosi gen za *IL-10* bi se navedeni problemi mogli prevazići, jer bi se modifikovane MMC koje sekretuju standardizovanu količinu IL-10 mogle lokalno primeniti. U prilog ovom pristupu idu i rezultati nedavnih istraživanja koja su ukazala na to da MMC unešene u organizam relativno kratko žive i da je njihov mehanizam dejstva tzv. „*hit and run*”, odnosno da tokom kratkog perioda po tretmanu parakrinom aktivnošću ispolje svoj efekat. Osim toga, u slučajevima kada nije moguće lokalno primeniti modifikovane MMC, pristup koji se predlaže je da se u ove ćelije, pored terapijskog gena, unesu i geni koji će omogućiti da ćelije ciljano stignu do obolelog mesta (tzv. *homing* geni) (Levy, Zhao et al. 2013).

Takođe, jedan od smerova u kome se najnovija istraživanja iz ove oblasti kreću je potencijalna upotreba samo sekretoma MMC, što ima određene prednosti u odnosu na uvođenje živih MMC u organizam. Naime, iako rezultati velikog broja studija, kliničkih ispitivanja i rada na animalnim modelima, pokazuju da pri upotrebi MMC ne dolazi do formiranja teratoma, terapijskim pristupom bez ubrizgavanja ovih ćelija u organizam bi se taj potencijalni rizik potpuno izbegao (Maumus, Jorgensen et al. 2013). Smatramo da bi se upotreba sekretoma transfekovanih MMC, u kome se osim ekstraćelijskih vezikula naivnih MMC

nalaze i produkti odabranih terapijskih transgena, mogla predstavljati najoptimalniji terapijski pravac za lečenje različitih skeletnih i mnogih drugih oboljenja, pogotovo onih na čiji tok značajno utiče proces inflamacije.

ZAKLJUČCI

1. U ispitivanoj grupi LKP pacijenata iz Srbije, nije pronađena asocijacija učestalosti genskih varijanti: *Faktor V* G1691A (Leiden mutacija) (rs6025), *Faktor II* G20210A (rs1799963), *MTHFR* C677T (rs1801133) i *PAI-1* 4G/5G (rs1799889) sa pojavom LKP bolesti.

2. Analiza gametske neravnoteže vezanosti (eng. *linkage disequilibrium*) je pokazala da su varijante gena *TLR4*, Asp299Gly (rs4986790) i Thr399Ile (rs4986791), u ispitivanoj grupi pacijenata bile u kompletnoj neravnoteži. Perfektna gametska neravnoteža je primećena između C-16T i C132T varijanti *IL-3* gena, kao i između G-174C i G-597A varijanti *IL-6* gena.

3. Nosioци heterozigotnog genotipa -174GC/-597GA *IL-6* gena su bili značajno manje zastupljeni u grupi pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu ($P=0.047$), i rizik za nastanak LKP bolesti je 2.49 puta manji kod nosilaca navedenog genotipa ($OR=2.49$, 95% $CI=1.00-6.21$). U skladu sa ovim, grupa LKP pacijenata nije bila u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži, jer je bilo više homozigotnih a manje heterozigotnih nosilaca.

4. Nije pronađena asocijacija *IL-3* [C-16T (rs31480), C132T (rs40401)]; *TNF- α* G-308A (rs1800629) i *TLR4* [Asp299Gly (rs4986790), Thr399Ile (rs4986791)] genskih varijanti sa pojavom LKP bolesti.

5. Rezultate dobijene analizom asocijacije učestalosti odabranih genskih varijanti kod LKP pacijenata treba posmatrati kao preliminarne, s obzirom na to da je ovo retka bolest i da je relativno mali broj uzoraka bio dostupan za analizu. Zbog toga smatramo da bi navedene analize trebalo ponoviti na većim grupama LKP pacijenata. Ipak, naši rezultati donose novi pogled na LKP bolest i mogu uticati na pravce budućih istraživanja i bolje razumevanje ove bolesti.

6. Nije pronađena statistički značajna razlika nivoa ekspresije ni *IL-6* niti *TNF- α* gena u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MNČPK) pri poređenju kompletne grupe pacijenata sa kontrolnom grupom, kao i pri poređenju podgrupe pacijenata uzorkovanih u avaskularnoj i fragmentacionoj fazi sa kontrolnom

grupom. Takođe, nije pronađena značajna korelacija promotorskih genotipova za *IL-6* i *TNF- α* sa nivoom iRNK ovih gena unutar grupe pacijenata.

7. Nije detektovana značajna razlika u nivoima ekspresije gena spoljašnjeg apoptotskog puta, *Fas* i *FasL*, kao ni odnosa nivoa ekspresije ova dva gena, između grupe pacijenata i kontrolne grupe.

8. Nivo ekspresije proapoptotskog faktora *Bax* u MNČPK u podgrupi pacijenata koji su uzorkovani u avaskularnoj i fragmentacionoj fazi bolesti je bio značajno povišen. Što je još bitnije, odnos nivoa ekspresije *Bax* / *Bcl-2* gena je bio značajno viši u kompletnoj grupi pacijenata, kao i u podgrupi pacijenata koji su uzorkovani u avaskularnoj i fragmentacionoj fazi bolesti u odnosu na kontrolnu grupu. Ovaj rezultat ukazuje da poremećaj apoptoze može doprineti razvoju LKP bolesti. S obzirom na to, apoptotski faktori bi mogli postati markeri za procenu statusa i prognoze ove bolesti, kao i potencijalne mete za ciljanu terapiju.

9. Uspostavljeni su uslovi za uspešnu tranzijentnu transfekciju MMČ iz adipoznog tkiva psa korišćenjem reagensa na bazi nanočestica. Primenom optimizovanih uslova, pokazana je uspešna ekspresija humanog antiinflamatornog citokina *IL-10* sa plazmidnog vektora transfekovanog u MMČ psa. Ovime su ostvareni uslovi koji omogućavaju dalja istraživanja koja se odnose na poboljšanje ćelijske terapije i ciljane dostave različitih bioloških agenasa na obolela mesta.

LITERATURA

- Aggarwal, S. and M. F. Pittenger (2005). "Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses." Blood **105**(4): 1815-1822.
- Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **4**(7): 499-511.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, M. Roberts and P. Walter (2002). Molecular Biology of the Cell. 4th Edition.
- Ankrum, J. and J. M. Karp (2010). "Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back." Trends Mol Med **16**(5): 203-209.
- Arlet, J. and P. Ficat (1968). "[Diagnosis of primary femur head osteonecrosis at stage 1 (preradiologic stage)]." Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot **54**(7): 637-648.
- Arruda, V. R., W. D. Belangero, M. C. Ozelo, G. B. Oliveira, R. G. Pagnano, J. B. Volpon and J. M. Annichino-Bizzacchi (1999). "Inherited risk factors for thrombophilia among children with Legg-Calve-Perthes disease." J Pediatr Orthop **19**(1): 84-87.
- Asadullah, K., W. Sterry and H. D. Volk (2003). "Interleukin-10 therapy--review of a new approach." Pharmacol Rev **55**(2): 241-269.
- Assuma, R., T. Oates, D. Cochran, S. Amar and D. T. Graves (1998). "IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis." J Immunol **160**(1): 403-409.
- Bahmanyar, S., S. M. Montgomery, R. J. Weiss and A. Ekbom (2008). "Maternal smoking during pregnancy, other prenatal and perinatal factors, and the risk of Legg-Calve-Perthes disease." Pediatrics **122**(2): e459-464.
- Balasa, V. V., R. A. Gruppo, C. J. Glueck, P. Wang, D. R. Roy, E. J. Wall, C. T. Mehlman and A. H. Crawford (2004). "Legg-Calve-Perthes disease and thrombophilia." J Bone Joint Surg Am **86-A**(12): 2642-2647.
- Barrett, J. C., B. Fry, J. Maller and M. J. Daly (2005). "Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps." Bioinformatics **21**(2): 263-265.
- Barry, M. and R. C. Bleackley (2002). "Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death." Nat Rev Immunol **2**(6): 401-409.

- Beutler, B., X. Du and A. Poltorak (2001). "Identification of Toll-like receptor 4 (Tlr4) as the sole conduit for LPS signal transduction: genetic and evolutionary studies." J Endotoxin Res **7**(4): 277-280.
- Boquest, A. C., A. Noer and P. Collas (2006). "Epigenetic programming of mesenchymal stem cells from human adipose tissue." Stem Cell Reviews **2**(4): 319-329.
- Boss, J. H. and I. Misselevich (2003). "Osteonecrosis of the femoral head of laboratory animals: the lessons learned from a comparative study of osteonecrosis in man and experimental animals." Vet Pathol **40**(4): 345-354.
- Boura, J. S., F. D. Santos, J. M. Gimble, C. M. Cardoso, C. Madeira, J. M. Cabral and C. L. Silva (2013). "Direct head-to-head comparison of cationic liposome-mediated gene delivery to mesenchymal stem/stromal cells of different human sources: a comprehensive study." Hum Gene Ther Methods **24**(1): 38-48.
- Braun, N., U. Michel, B. P. Ernst, R. Metzner, A. Bitsch, F. Weber and P. Rieckmann (1996). "Gene polymorphism at position -308 of the tumor-necrosis-factor-alpha (TNF-alpha) in multiple sclerosis and its influence on the regulation of TNF-alpha production." Neurosci Lett **215**(2): 75-78.
- Breitbach, M., T. Bostani, W. Roell, Y. Xia, O. Dewald, J. M. Nygren, J. W. Fries, K. Tiemann, H. Bohlen, J. Hescheler, A. Welz, W. Bloch, S. E. Jacobsen and B. K. Fleischmann (2007). "Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts." Blood **110**(4): 1362-1369.
- Brinkman, B. M., T. W. Huizinga, S. S. Kurban, E. A. van der Velde, G. M. Schreuder, J. M. Hazes, F. C. Breedveld and C. L. Verweij (1997). "Tumour necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease?" Br J Rheumatol **36**(5): 516-521.
- Buchan, G., K. Barrett, M. Turner, D. Chantry, R. N. Maini and M. Feldmann (1988). "Interleukin-1 and tumour necrosis factor mRNA expression in rheumatoid arthritis: prolonged production of IL-1 alpha." Clin Exp Immunol **73**(3): 449-455.
- Burlacu, A. (2003). "Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins." J Cell Mol Med **7**(3): 249-257.

- Calder, J. D., L. Buttery, P. A. Revell, M. Pearse and J. M. Polak (2004). "Apoptosis--a significant cause of bone cell death in osteonecrosis of the femoral head." J Bone Joint Surg Br **86**(8): 1209-1213.
- Chai, W., Z. Zhang, M. Ni, P. Geng, Z. Lian, G. Zhang, L. L. Shi and J. Chen (2015). "Genetic association between methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and risk of osteonecrosis of the femoral head." Biomed Res Int **2015**: 196495.
- Chang, M. K., L. J. Raggatt, K. A. Alexander, J. S. Kuliwaba, N. L. Fazzalari, K. Schroder, E. R. Maylin, V. M. Ripoll, D. A. Hume and A. R. Pettit (2008). "Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo." J Immunol **181**(2): 1232-1244.
- Choi, J. J., S. A. Yoo, S. J. Park, Y. J. Kang, W. U. Kim, I. H. Oh and C. S. Cho (2008). "Mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-10 attenuate collagen-induced arthritis in mice." Clin Exp Immunol **153**(2): 269-276.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.
- Chu, X., C. Dong, R. Lei, L. Sun, Z. Wang, Y. Dong, M. Shen, Y. Wang, B. Wang, K. Zhang, L. Yang, Y. Li, W. Yuan, H. Song, L. Jin, M. Xiong and W. Huang (2009). "Polymorphisms in the interleukin 3 gene show strong association with susceptibility to Graves' disease in Chinese population." Genes Immun **10**(3): 260-266.
- Cohen, S. N., A. C. Chang and L. Hsu (1972). "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(8): 2110-2114.
- Covas, D. T., R. A. Panepucci, A. M. Fontes, W. A. Silva, Jr., M. D. Orellana, M. C. Freitas, L. Neder, A. R. Santos, L. C. Peres, M. C. Jamur and M. A. Zago (2008). "Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts." Exp Hematol **36**(5): 642-654.
- Cozen, W., P. S. Gill, S. A. Ingles, R. Masood, O. Martinez-Maza, M. G. Cockburn, W. J. Gauderman, M. C. Pike, L. Bernstein, B. N. Nathwani, M. T. Salam, K. L.

- Danley, W. Wang, J. Gage, S. Gundell-Miller and T. M. Mack (2004). "IL-6 levels and genotype are associated with risk of young adult Hodgkin lymphoma." Blood **103**(8): 3216-3221.
- Cucchiari, M., J. K. Venkatesan, M. Ekici, G. Schmitt and H. Madry (2012). "Human mesenchymal stem cells overexpressing therapeutic genes: from basic science to clinical applications for articular cartilage repair." Biomed Mater Eng **22**(4): 197-208.
- Cussigh, A., E. Falletti, C. Fabris, D. Bitetto, S. Cmet, E. Fontanini, S. Bignulin, E. Fornasiere, E. Fumolo, R. Minisini, M. Pirisi and P. Toniutto (2011). "Interleukin 6 promoter polymorphisms influence the outcome of chronic hepatitis C." Immunogenetics **63**(1): 33-41.
- da Silva Meirelles, L., A. I. Caplan and N. B. Nardi (2008). "In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells." Stem Cells **26**(9): 2287-2299.
- Dahlback, B., M. Carlsson and P. J. Svensson (1993). "Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(3): 1004-1008.
- Das, S., M. Bonaguidi, K. Muro and J. A. Kessler (2008). "Generation of embryonic stem cells: limitations of and alternatives to inner cell mass harvest." Neurosurg Focus **24**(3-4): E4.
- Dawson, S. J., B. Wiman, A. Hamsten, F. Green, S. Humphries and A. M. Henney (1993). "The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells." J Biol Chem **268**(15): 10739-10745.
- Degen, J. L. (2001). "Genetic interactions between the coagulation and fibrinolytic systems." Thromb Haemost **86**(1): 130-137.
- Dillman, J. R. and R. J. Hernandez (2009). "MRI of Legg-Calve-Perthes disease." AJR Am J Roentgenol **193**(5): 1394-1407.
- Ding, C., V. Parameswaran, R. Udayan, J. Burgess and G. Jones (2008). "Circulating levels of inflammatory markers predict change in bone mineral density and resorption in older adults: a longitudinal study." J Clin Endocrinol Metab **93**(5): 1952-1958.

- Djordjevic, V., M. Stankovic, V. Brankovic-Sreckovic, L. Rakicevic, T. Damnjanovic, N. Antonijevic and D. Radojkovic (2012). "Prothrombotic genetic risk factors in stroke: a possible different role in pediatric and adult patients." Clin Appl Thromb Hemost **18**(6): 658-661.
- Djordjevic, V. P., I. Radojkovic, D. (2014). "Molecular Basis of Thrombophilia." J Med Biochem **33**: 22–27.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop and E. Horwitz (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-317.
- Douville, R. N., Y. Lissitsyn, A. F. Hirschfeld, A. B. Becker, A. L. Kozyrskyj, J. Liem, N. Bastien, Y. Li, R. E. Victor, M. Sekhon, S. E. Turvey and K. T. HayGlass (2010). "TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms: no impact on human immune responsiveness to LPS or respiratory syncytial virus." PLoS One **5**(8): e12087.
- Edelstein, M. L., M. R. Abedi and J. Wixon (2007). "Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update." J Gene Med **9**(10): 833-842.
- Edwards, C. J. and E. Williams (2010). "The role of interleukin-6 in rheumatoid arthritis-associated osteoporosis." Osteoporos Int **21**(8): 1287-1293.
- Edwards, C. J. and E. Williams (2010). "The role of interleukin-6 in rheumatoid arthritis-associated osteoporosis." Osteoporos Int **21**(8): 1287-1293.
- Endler, G., C. Marsik, C. Joukhadar, R. Marculescu, F. Mayr, C. Mannhalter, O. F. Wagner and B. Jilma (2004). "The interleukin-6 G(-174)C promoter polymorphism does not determine plasma interleukin-6 concentrations in experimental endotoxemia in humans." Clin Chem **50**(1): 195-200.
- Enzmann, V., M. Hollborn, K. Poschinger, P. Wiedemann and L. Kohen (2001). "Immunosuppression by IL-10-transfected human retinal pigment epithelial cells in vitro." Curr Eye Res **23**(2): 98-105.
- Feldmann, M., F. M. Brennan and R. N. Maini (1996). "Role of cytokines in rheumatoid arthritis." Annu Rev Immunol **14**: 397-440.
- Fernandes, H., B. Koneru, N. Fernandes, M. Hameed, M. C. Cohen, E. Raveche and S. Cohen (2002). "Investigation of promoter polymorphisms in the tumor necrosis

- factor-alpha and interleukin-10 genes in liver transplant patients." Transplantation **73**(12): 1886-1891.
- Ferwerda, B., M. B. McCall, S. Alonso, E. J. Giamarellos-Bourboulis, M. Mouktaroudi, N. Izagirre, D. Syafruddin, G. Kibiki, T. Cristea, A. Hijmans, L. Hamann, S. Israel, G. ElGhazali, M. Troye-Blomberg, O. Kumpf, B. Maiga, A. Dolo, O. Doumbo, C. C. Hermsen, A. F. Stalenhoef, R. van Crevel, H. G. Brunner, D. Y. Oh, R. R. Schumann, C. de la Rúa, R. Sauerwein, B. J. Kullberg, A. J. van der Ven, J. W. van der Meer and M. G. Netea (2007). "TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(42): 16645-16650.
- Ferwerda, B., M. B. McCall, K. Verheijen, B. J. Kullberg, A. J. van der Ven, J. W. Van der Meer and M. G. Netea (2008). "Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms." Mol Med **14**(5-6): 346-352.
- Festa, A., R. D'Agostino, Jr., S. S. Rich, N. S. Jenny, R. P. Tracy and S. M. Haffner (2003). "Promoter (4G/5G) plasminogen activator inhibitor-1 genotype and plasminogen activator inhibitor-1 levels in blacks, Hispanics, and non-Hispanic whites: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study." Circulation **107**(19): 2422-2427.
- Fishman, D., G. Faulds, R. Jeffery, V. Mohamed-Ali, J. S. Yudkin, S. Humphries and P. Woo (1998). "The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis." J Clin Invest **102**(7): 1369-1376.
- Fletcher, O. and A. M. Kessling (1998). "MTHFR association with arteriosclerotic vascular disease?" Hum Genet **103**(1): 11-21.
- French, D., L. H. Hamilton, L. A. Mattano, Jr., H. N. Sather, M. Devidas, J. B. Nachman, M. V. Relling and G. Children's Oncology (2008). "A PAI-1 (SERPINE1) polymorphism predicts osteonecrosis in children with acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group." Blood **111**(9): 4496-4499.
- Friedenstein, A. J., K. V. Petrakova, A. I. Kurolesova and G. P. Frolova (1968). "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues." Transplantation **6**(2): 230-247.

- Garnero, P., O. Borel, E. Sornay-Rendu, F. Duboeuf, R. Jeffery, P. Woo and P. D. Delmas (2002). "Association between a functional interleukin-6 gene polymorphism and peak bone mineral density and postmenopausal bone loss in women: the OFELY study." Bone **31**(1): 43-50.
- Gimble, J. M. and F. Guilak (2003). "Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential." Cytotherapy **5**(5): 362-369.
- Glueck, C. J., G. Brandt, R. Gruppo, A. Crawford, D. Roy, T. Tracy, D. Stroop, P. Wang and A. Becker (1997). "Resistance to activated protein C and Legg-Perthes disease." Clin Orthop Relat Res(338): 139-152.
- Glueck, C. J., H. I. Glueck, D. Greenfield, R. Freiberg, A. Kahn, T. Hamer, D. Stroop and T. Tracy (1994). "Protein C and S deficiency, thrombophilia, and hypofibrinolysis: pathophysiologic causes of Legg-Perthes disease." Pediatr Res **35**(4 Pt 1): 383-388.
- Greivic, D., Z. Jajic, N. Kovacic, I. K. Lukic, V. Velagic, F. Grubisic, S. Ivcevic and A. Marusic (2010). "Peripheral blood expression profiles of bone morphogenetic proteins, tumor necrosis factor-superfamily molecules, and transcription factor Runx2 could be used as markers of the form of arthritis, disease activity, and therapeutic responsiveness." J Rheumatol **37**(2): 246-256.
- Gronthos, S., D. M. Franklin, H. A. Leddy, P. G. Robey, R. W. Storms and J. M. Gimble (2001). "Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells." J Cell Physiol **189**(1): 54-63.
- Gupta, N., A. Barhanpurkar, G. Tomar, R. Srivastava, S. Kour, S. Pote, G. Mishra and M. Wani (2010). "IL-3 Inhibits Human Osteoclastogenesis and Bone Resorption through Downregulation of c-Fms and Diverts the Cells to Dendritic Cell Lineage." J Immunol **185**: 2261-2272.
- Hirano, T., T. Matsuda, M. Turner, N. Miyasaka, G. Buchan, B. Tang, K. Sato, M. Shimizu, R. Maini, M. Feldmann and et al. (1988). "Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis." Eur J Immunol **18**(11): 1797-1801.
- Hochbergs, P., G. Eckerwall, N. Egund, K. Jonsson and H. Wingstrand (1998). "Synovitis in Legg-Calve-Perthes disease. Evaluation with MR imaging in 84 hips." Acta Radiol **39**(5): 532-537.

- Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda and S. Akira (1999). "Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product." *J Immunol* **162**(7): 3749-3752.
- Huang, D. R., R. Pirskanen, G. Matell and A. K. Lefvert (1999). "Tumour necrosis factor-alpha polymorphism and secretion in myasthenia gravis." *J Neuroimmunol* **94**(1-2): 165-171.
- Hulkkonen, J., M. Pertovaara, J. Anttonen, A. Pasternack and M. Hurme (2001). "Elevated interleukin-6 plasma levels are regulated by the promoter region polymorphism of the IL6 gene in primary Sjogren's syndrome and correlate with the clinical manifestations of the disease." *Rheumatology* **40**(6): 656-661.
- Jeong, M. C., A. Navani and J. R. Oksenberg (1998). "Limited allelic polymorphism in the human interleukin-3 gene." *Mol Cell Probes* **12**(1): 49-53.
- Jerrard-Dunne, P., M. Sitzer, P. Risley, D. A. Steckel, A. Buehler, S. von Kegler and H. S. Markus (2003). "Interleukin-6 promoter polymorphism modulates the effects of heavy alcohol consumption on early carotid artery atherosclerosis: the Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS)." *Stroke* **34**(2): 402-407.
- Jilka, R. L., G. Hangoc, G. Girasole, G. Passeri, D. C. Williams, J. S. Abrams, B. Boyce, H. Broxmeyer and S. C. Manolagas (1992). "Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6." *Science* **257**(5066): 88-91.
- Johnson, G. B., B. L. Riggs and J. L. Platt (2004). "A genetic basis for the "Adonis" phenotype of low adiposity and strong bones." *FASEB J* **18**(11): 1282-1284.
- Jones, E. A., S. E. Kinsey, A. English, R. A. Jones, L. Straszynski, D. M. Meredith, A. F. Markham, A. Jack, P. Emery and D. McGonagle (2002). "Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells." *Arthritis Rheum* **46**(12): 3349-3360.
- Jones, K. G., D. J. Brull, L. C. Brown, M. Sian, R. M. Greenhalgh, S. E. Humphries and J. T. Powell (2001). "Interleukin-6 (IL-6) and the prognosis of abdominal aortic aneurysms." *Circulation* **103**(18): 2260-2265.
- Kamarainen, O. P., S. Solovieva, T. Vehmas, K. Luoma, H. Riihimaki, L. Ala-Kokko, M. Mannikko and P. Leino-Arjas (2008). "Common interleukin-6 promoter

- variants associate with the more severe forms of distal interphalangeal osteoarthritis." Arthritis Res Ther **10**(1): R21.
- Kamiya, N., R. Yamaguchi, N. S. Adapala, E. Chen, D. Neal, J. O'Brien, A. Thoveson, P. Gudmundsson, C. Brabham, O. Aruwajoye, H. Drissi and H. K. Kim (2015). "Legg-Calve-Perthes Disease Produces Chronic Hip Synovitis and Elevation of Interleukin-6 in the Synovial Fluid." J Bone Miner Res.
- Karimi, M., L. C. Goldie, M. N. Cruickshank, E. K. Moses and L. J. Abraham (2009). "A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a reassessment of -308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system." Eur J Hum Genet **17**(11): 1454-1462.
- Katz, A. J., R. Llull, M. H. Hedrick and J. W. Futrell (1999). "Emerging approaches to the tissue engineering of fat." Clin Plast Surg **26**(4): 587-603, viii.
- Katz, A. J., A. Tholpady, S. S. Tholpady, H. Shang and R. C. Ogle (2005). "Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells." Stem Cells **23**(3): 412-423.
- Kelly, P. J., J. Rosand, J. P. Kistler, V. E. Shih, S. Silveira, A. Plomaritoglou and K. L. Furie (2002). "Homocysteine, MTHFR 677C-->T polymorphism, and risk of ischemic stroke: results of a meta-analysis." Neurology **59**(4): 529-536.
- Kenet, G., E. Ezra, S. Wientroub, D. M. Steinberg, N. Rosenberg, D. Waldman and S. Hayek (2008). "Perthes' disease and the search for genetic associations: collagen mutations, Gaucher's disease and thrombophilia." J Bone Joint Surg Br **90**(11): 1507-1511.
- Kim, H. (2010). "Legg-Calvé-Perthes Disease." J Am Acad Orthop Surg **18**: 676-686.
- Kim, H. K. (2010). "Legg-Calve-Perthes disease." J Am Acad Orthop Surg **18**(11): 676-686.
- Kim, H. K. (2012). "Pathophysiology and new strategies for the treatment of Legg-Calve-Perthes disease." J Bone Joint Surg Am **94**(7): 659-669.
- Kim, H. K. (2012). "Pathophysiology and new strategies for the treatment of Legg-Calve-Perthes disease." J Bone Joint Surg Am **94**(7): 659-669.
- Kim, H. K. and J. A. Herring (2011). "Pathophysiology, classifications, and natural history of Perthes disease." Orthop Clin North Am **42**(3): 285-295, v.

- Kim, T. H., J. I. Baek, J. M. Hong, S. J. Choi, H. J. Lee, H. J. Cho, E. K. Park, U. K. Kim and S. Y. Kim (2008). "Significant association of SREBP-2 genetic polymorphisms with avascular necrosis in the Korean population." BMC medical genetics **9**: 94.
- Kovacic, N., D. Grcevic, V. Katavic, I. K. Lukic and A. Marusic (2010). "Targeting Fas in osteoresorptive disorders." Expert Opin Ther Targets **14**(10): 1121-1134.
- Krammer, P. H. (2000). "CD95's deadly mission in the immune system." Nature **407**(6805): 789-795.
- Kroeger, K. M., J. H. Steer, D. A. Joyce and L. J. Abraham (2000). "Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism." Cytokine **12**(2): 110-119.
- Kutlar, A., F. Kutlar, I. Turker and C. Tural (2001). "The methylene tetrahydrofolate reductase (C677T) mutation as a potential risk factor for avascular necrosis in sickle cell disease." Hemoglobin **25**(2): 213-217.
- Lacey, D., P. Simmons, S. Graves and J. Hamilton (2009). "Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation." Osteoarthritis Cartilage. **17**(6): 735-742.
- Lee, Y. H., J. B. Harley and S. K. Nath (2006). "Meta-analysis of TNF-alpha promoter -308 A/G polymorphism and SLE susceptibility." Eur J Hum Genet **14**(3): 364-371.
- Levy, O., W. Zhao, L. J. Mortensen, S. Leblanc, K. Tsang, M. Fu, J. A. Phillips, V. Sagar, P. Anandakumaran, J. Ngai, C. H. Cui, P. Eimon, M. Angel, C. P. Lin, M. F. Yanik and J. M. Karp (2013). "mRNA-engineered mesenchymal stem cells for targeted delivery of interleukin-10 to sites of inflammation." Blood **122**(14): e23-32.
- Li, M. C. and S. H. He (2004). "IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **10**(5): 620-625.
- Li, Y. F., W. J. Gauderman, E. Avol, L. Dubeau and F. D. Gilliland (2006). "Associations of tumor necrosis factor G-308A with childhood asthma and wheezing." Am J Respir Crit Care Med **173**(9): 970-976.
- Little, D. and H. Kim (2011). "Future biologic treatments for Perthes disease." Orthop Clin North Am **42**(3): 423-427.

- Liu, S. L. and T. C. Ho (1991). "The role of venous hypertension in the pathogenesis of Legg-Perthes disease. A clinical and experimental study." J Bone Joint Surg Am **73**(2): 194-200.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Loder, R. T., E. M. Schwartz and R. N. Hensinger (1993). "Behavioral characteristics of children with Legg-Calve-Perthes disease." J Pediatr Orthop **13**(5): 598-601.
- Loder, R. T. and E. N. Skopelja (2011). "The epidemiology and demographics of legg-calve-perthes' disease." ISRN Orthop **2011**: 504393.
- Lopez, C., M. N. Pons and E. Morgenroth (2005). "Evaluation of microscopic techniques (epifluorescence microscopy, CLSM, TPE-LSM) as a basis for the quantitative image analysis of activated sludge." Water Res **39**(2-3): 456-468.
- Lorentzon, M., R. Lorentzon and P. Nordstrom (2000). "Interleukin-6 gene polymorphism is related to bone mineral density during and after puberty in healthy white males: a cross-sectional and longitudinal study." J Bone Miner Res **15**(10): 1944-1949.
- Lorenz, E., K. L. Frees and D. A. Schwartz (2001). "Determination of the TLR4 genotype using allele-specific PCR." Biotechniques **31**(1): 22-24.
- Ma, S., N. Xie, W. Li, B. Yuan, Y. Shi and Y. Wang (2014). "Immunobiology of mesenchymal stem cells." Cell Death Differ **21**(2): 216-225.
- MacCallum, P., L. Bowles and D. Keeling (2014). "Diagnosis and management of heritable thrombophilias." BMJ **349**: g4387.
- Madeira, C., R. D. Mendes, S. C. Ribeiro, J. S. Boura, M. R. Aires-Barros, C. L. da Silva and J. M. Cabral (2010). "Nonviral gene delivery to mesenchymal stem cells using cationic liposomes for gene and cell therapy." J Biomed Biotechnol **2010**: 735349.
- Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, New York: Cold Spring Harbor
- Manolagas, S. C. (1998). "The role of IL-6 type cytokines and their receptors in bone." Ann N Y Acad Sci **840**: 194-204.

- Marlow, G. J., D. van Gent and L. R. Ferguson (2013). "Why interleukin-10 supplementation does not work in Crohn's disease patients." World J Gastroenterol **19**(25): 3931-3941.
- Martin, J. R., M. T. Houdek and R. J. Sierra (2013). "Use of concentrated bone marrow aspirate and platelet rich plasma during minimally invasive decompression of the femoral head in the treatment of osteonecrosis." Croat Med J **54**(3): 219-224.
- Matsumoto, T., H. Enomoto, K. Takahashi and S. Motokawa (1998). "Decreased levels of IGF binding protein-3 in serum from children with Perthes' disease." Acta Orthop Scand **69**(2): 125-128.
- Maumus, M., C. Jorgensen and D. Noel (2013). "Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: role of secretome and exosomes." Biochimie **95**(12): 2229-2234.
- Mekinian, A., R. Tamouza, S. Pavy, N. Gestermann, M. Ittah, X. Mariette and C. Miceli-Richard (2011). "Functional study of TNF-alpha promoter polymorphisms: literature review and meta-analysis." Eur Cytokine Netw **22**(2): 88-102.
- Merkel, K. D., J. M. Erdmann, K. P. McHugh, Y. Abu-Amer, F. P. Ross and S. L. Teitelbaum (1999). "Tumor necrosis factor-alpha mediates orthopedic implant osteolysis." Am J Pathol **154**(1): 203-210.
- Mesimaki, K., B. Lindroos, J. Tornwall, J. Mauno, C. Lindqvist, R. Kontio, S. Miettinen and R. Suuronen (2009). "Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells." Int J Oral Maxillofac Surg **38**(3): 201-209.
- Min, C. K., B. G. Kim, G. Park, B. Cho and I. H. Oh (2007). "IL-10-transduced bone marrow mesenchymal stem cells can attenuate the severity of acute graft-versus-host disease after experimental allogeneic stem cell transplantation." Bone Marrow Transplant **39**(10): 637-645.
- Miyamoto, Y., T. Matsuda, H. Kitoh, N. Haga, H. Ohashi, G. Nishimura and S. Ikegawa (2007). "A recurrent mutation in type II collagen gene causes Legg-Calve-Perthes disease in a Japanese family." Human genetics **121**(5): 625-629.
- Mok, P. L., C. F. Leong and S. K. Cheong (2013). "Cellular mechanisms of emerging applications of mesenchymal stem cells." Malays J Pathol **35**(1): 17-32.

- Montes, A. H., V. Asensi, V. Alvarez, E. Valle, M. G. Ocana, A. Meana, J. A. Carton, J. Paz, J. Fierer and A. Celada (2006). "The Toll-like receptor 4 (Asp299Gly) polymorphism is a risk factor for Gram-negative and haematogenous osteomyelitis." Clin Exp Immunol **143**(3): 404-413.
- Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman and A. O'Garra (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." Annu Rev Immunol **19**: 683-765.
- Nagase, Y., M. Iwasawa, T. Akiyama, Y. Kadono, M. Nakamura, Y. Oshima, T. Yasui, T. Matsumoto, J. Hirose, H. Nakamura, T. Miyamoto, P. Bouillet, K. Nakamura and S. Tanaka (2009). "Anti-apoptotic molecule Bcl-2 regulates the differentiation, activation, and survival of both osteoblasts and osteoclasts." J Biol Chem **284**(52): 36659-36669.
- Nagase, Y., M. Iwasawa, T. Akiyama, Y. Kadono, M. Nakamura, Y. Oshima, T. Yasui, T. Matsumoto, J. Hirose, H. Nakamura, T. Miyamoto, P. Bouillet, K. Nakamura and S. Tanaka (2009). "Anti-apoptotic molecule Bcl-2 regulates the differentiation, activation, and survival of both osteoblasts and osteoclasts." The Journal of biological chemistry **284**(52): 36659-36669.
- Nair, S. P., S. Meghji, M. Wilson, K. Reddi, P. White and B. Henderson (1996). "Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions." Infect Immun **64**(7): 2371-2380.
- Naka, T., N. Nishimoto and T. Kishimoto (2002). "The paradigm of IL-6: from basic science to medicine." Arthritis Res **4 Suppl 3**: S233-242.
- Nanes, M. (2003). "Tumor necrosis factor- α : molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology." Gene **321**: 1-15.
- Nelitz, M., S. Lippacher, R. Krauspe and H. Reichel (2009). "Perthes disease: current principles of diagnosis and treatment." Dtsch Arztebl Int **106**(31-32): 517-523.
- Norambuena, G. A., M. Khoury and C. Jorgensen (2012). "Mesenchymal stem cells in osteoarticular pediatric diseases: an update." Pediatr Res **71**(4 Pt 2): 452-458.
- Nordstrom, A., P. Gerdhem, H. Brandstrom, F. Stiger, U. Lerner, L. Lorentzon, K. Obrant, P. Nordstrom and K. Akesson (2004). "Interleukin-6 promoter polymorphism is associated with bone quality assessed by calcaneus ultrasound and previous fractures in a cohort of 75-year-old women
" Osteoporos Int **15**: 820-826.

- Noth, U., A. F. Steinert and R. S. Tuan (2008). "Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy." Nat Clin Pract Rheumatol **4**(7): 371-380.
- Ohsugi, Y. and T. Kishimoto (2008). "The recombinant humanized anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab, an innovative drug for the treatment of rheumatoid arthritis." Expert Opin Biol Ther **8**(5): 669-681.
- Okazaki, S., Y. Nishitani, S. Nagoya, M. Kaya, T. Yamashita and H. Matsumoto (2009). "Femoral head osteonecrosis can be caused by disruption of the systemic immune response via the toll-like receptor 4 signalling pathway." Rheumatology **48**(3): 227-232.
- Oltvai, Z. N., C. L. Milliman and S. J. Korsmeyer (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." Cell **74**(4): 609-619.
- Orth, P., A. Rey-Rico, J. K. Venkatesan, H. Madry and M. Cucchiaroni (2014). "Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair." Stem Cells Cloning **7**: 1-17.
- Ozkan, Z. S., D. Deveci and H. Yuce (2012). "Investigation of Association Between TLR4 Gene Polymorphisms and Osteoporosis in Postmenopausal Turkish Women." Int J Endocrinol Metab **10**(1): 418-422.
- Packham, G. and F. K. Stevenson (2005). "Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia." Immunology **114**(4): 441-449.
- Park, B. L., L. H. Kim, Y. H. Choi, J. H. Lee, T. Rhim, Y. M. Lee, S. T. Uh, H. S. Park, B. W. Choi, S. J. Hong, C. S. Park and H. D. Shin (2004). "Interleukin 3 (IL3) polymorphisms associated with decreased risk of asthma and atopy." J Hum Genet **49**(10): 517-527.
- Park, H. J., F. Yang and S. W. Cho (2012). "Nonviral delivery of genetic medicine for therapeutic angiogenesis." Adv Drug Deliv Rev **64**(1): 40-52.
- Park, J., J. Ries, K. Gelse, F. Kloss, K. von der Mark, J. Wiltfang, F. W. Neukam and H. Schneider (2003). "Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer: a comparison of adenoviral vectors and liposomes." Gene Ther **10**(13): 1089-1098.

- Pascual, M., A. Nieto, L. Mataran, A. Balsa, D. Pascual-Salcedo and J. Martin (2000). "IL-6 promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis." Genes Immun **1**(5): 338-340.
- Peng, S. L. (2006). "Fas (CD95)-related apoptosis and rheumatoid arthritis." Rheumatology (Oxford) **45**(1): 26-30.
- Perry, D. C. (2013). "Unravelling the enigma of Perthes disease." Ann R Coll Surg Engl **95**(5): 311-316.
- Perry, D. C. and A. J. Hall (2011). "The epidemiology and etiology of Perthes disease." Orthop Clin North Am **42**(3): 279-283, v.
- Pettit, A. R., M. K. Chang, D. A. Hume and L. J. Raggatt (2008). "Osteal macrophages: a new twist on coupling during bone dynamics." Bone **43**(6): 976-982.
- Poli, V., R. Balena, E. Fattori, A. Markatos, M. Yamamoto, H. Tanaka, G. Ciliberto, G. A. Rodan and F. Costantini (1994). "Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion." Embo J **13**(5): 1189-1196.
- Poort, S. R., F. R. Rosendaal, P. H. Reitsma and R. M. Bertina (1996). "A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis." Blood **88**(10): 3698-3703.
- Porada, C. D. and G. Almeida-Porada (2010). "Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery." Adv Drug Deliv Rev **62**(12): 1156-1166.
- Quevedo, H. C., K. E. Hatzistergos, B. N. Oskouei, G. S. Feigenbaum, J. E. Rodriguez, D. Valdes, P. M. Pattany, J. P. Zambrano, Q. Hu, I. McNiece, A. W. Heldman and J. M. Hare (2009). "Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(33): 14022-14027.
- Rabquer, B., G. Tan, P. Shaheen, G. Haines III, A. Urquhart and A. Koch (2009). "Synovial Inflammation in Patients with Osteonecrosis of the Femoral Head." Clin Transl Sci **2**(4): 273-278.
- Rachmawati, H., L. Beljaars, C. Reker-Smit, H. I. Bakker, A. M. Van Loenen-Weemaes, M. N. Lub-De Hooge and K. Poelstra (2011). "Intravenous administration of recombinant human IL-10 suppresses the development of anti-thy 1-induced glomerulosclerosis in rats." PDA J Pharm Sci Technol **65**(2): 116-130.

- Rees, D. C., M. Cox and J. B. Clegg (1995). "World distribution of factor V Leiden." Lancet **346**(8983): 1133-1134.
- Rosenberg, R. D. and W. C. Aird (1999). "Vascular-bed--specific hemostasis and hypercoagulable states." N Engl J Med **340**(20): 1555-1564.
- Rosenfeld, S. B., J. A. Herring and J. C. Chao (2007). "Legg-calve-perthes disease: a review of cases with onset before six years of age." J Bone Joint Surg Am **89**(12): 2712-2722.
- Rudwaleit, M., S. Siebert, Z. Yin, J. Eick, A. Thiel, A. Radbruch, J. Sieper and J. Braun (2001). "Low T cell production of TNFalpha and IFNgamma in ankylosing spondylitis: its relation to HLA-B27 and influence of the TNF-308 gene polymorphism." Ann Rheum Dis **60**(1): 36-42.
- Santos, J. L., L. Lera, F. Perez-Bravo and C. Albala (2006). "Adiposity and bone mineral density of Chilean elderly women in relation to toll-like receptor 4 gene polymorphisms." Ann Hum Biol **33**(5-6): 585-592.
- Sato, T., M. Hanada, S. Bodrug, S. Irie, N. Iwama, L. H. Boise, C. B. Thompson, E. Golemis, L. Fong, H. G. Wang and et al. (1994). "Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(20): 9238-9242.
- Schweiger, A., D. Stern, I. C. Lohman, M. Baldini, F. D. Martinez and M. Halonen (2001). "Differences in proliferation of the hematopoietic cell line TF-1 and cytokine production by peripheral blood leukocytes induced by 2 naturally occurring forms of human IL-3." J Allergy Clin Immunol **107**(3): 505-510.
- Scorilas, A., L. Kyriakopoulou, G. M. Yousef, L. K. Ashworth, A. Kwamie and E. P. Diamandis (2001). "Molecular cloning, physical mapping, and expression analysis of a novel gene, BCL2L12, encoding a proline-rich protein with a highly conserved BH2 domain of the Bcl-2 family." Genomics **72**(2): 217-221.
- Souza, P. P. and U. H. Lerner (2013). "The role of cytokines in inflammatory bone loss." Immunol Invest **42**(7): 555-622.
- Strasser, A., P. J. Jost and S. Nagata (2009). "The many roles of FAS receptor signaling in the immune system." Immunity **30**(2): 180-192.
- Straus, S. E., E. S. Jaffe, J. M. Puck, J. K. Dale, K. B. Elkon, A. Rosen-Wolff, A. M. Peters, M. C. Sneller, C. W. Hallahan, J. Wang, R. E. Fischer, C. M. Jackson,

- A. Y. Lin, C. Baumler, E. Siegert, A. Marx, A. K. Vaishnav, T. Grodzicky, T. A. Fleisher and M. J. Lenardo (2001). "The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis." Blood **98**(1): 194-200.
- Su, P., R. Li, S. Liu, Y. Zhou, X. Wang, N. Patil, C. S. Mow, J. C. Mason, D. Huang and Y. Wang (2008). "Age at onset-dependent presentations of premature hip osteoarthritis, avascular necrosis of the femoral head, or Legg-Calve-Perthes disease in a single family, consequent upon a p.Gly1170Ser mutation of COL2A1." Arthritis and rheumatism **58**(6): 1701-1706.
- Suda, T., T. Takahashi, P. Golstein and S. Nagata (1993). "Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family." Cell **75**(6): 1169-1178.
- Szepesi, K., E. Posa, J. Harsfalvi, E. Ajzner, G. Szucs, L. Gaspar, Z. Csernatony and M. Udvardy (2004). "The most severe forms of Perthes' disease associated with the homozygous Factor V Leiden mutation." J Bone Joint Surg Br **86**(3): 426-429.
- Szodoray, P., S. Jellestad, B. Nakken, J. G. Brun and R. Jonsson (2003). "Programmed cell death in rheumatoid arthritis peripheral blood T-cell subpopulations determined by laser scanning cytometry." Lab Invest **83**(12): 1839-1848.
- Terry, C. F., V. Loukaci and F. R. Green (2000). "Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation." J Biol Chem **275**(24): 18138-18144.
- Teuffel, O., M. C. Ethier, J. Beyene and L. Sung (2010). "Association between tumor necrosis factor-alpha promoter -308 A/G polymorphism and susceptibility to sepsis and sepsis mortality: a systematic review and meta-analysis." Crit Care Med **38**(1): 276-282.
- Thomadaki, H. and A. Scorilas (2006). "BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer." Crit Rev Clin Lab Sci **43**(1): 1-67.
- Tilg, H., C. van Montfrans, A. van den Ende, A. Kaser, S. J. van Deventer, S. Schreiber, M. Gregor, O. Ludwiczek, P. Rutgeerts, C. Gasche, J. C. Koningsberger, L. Abreu, I. Kuhn, M. Cohard, A. LeBeaut, P. Grint and G. Weiss (2002). "Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon gamma." Gut **50**(2): 191-195.

- Turnpenney, L., C. M. Spalluto, R. M. Perrett, M. O'Shea, K. P. Hanley, I. T. Cameron, D. I. Wilson and N. A. Hanley (2006). "Evaluating human embryonic germ cells: concord and conflict as pluripotent stem cells." Stem Cells **24**(2): 212-220.
- Vasku, J. A., A. Vasku, M. Goldbergova and V. Vasku (2004). "Heterozygote AG variant of -596 A/G IL-6 gene polymorphism is a marker for cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)." Clin Immunol **113**(3): 256-260.
- Vater, C., P. Kasten and M. Stiehler (2011). "Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells." Acta Biomater **7**(2): 463-477.
- Vegter, J. (1987). "The influence of joint posture on intra-articular pressure. A study of transient synovitis and Perthes' disease." J Bone Joint Surg Br **69**(1): 71-74.
- Vidal, M. A., S. O. Robinson, M. J. Lopez, D. B. Paulsen, O. Borkhsenius, J. R. Johnson, R. M. Moore and J. M. Gimble (2008). "Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow." Vet Surg **37**(8): 713-724.
- Villena, S. N., R. O. Pinheiro, C. S. Pinheiro, M. P. Nunes, C. M. Takiya, G. A. DosReis, J. O. Previato, L. Mendonca-Previato and C. G. Freire-de-Lima (2008). "Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand." Cell Microbiol **10**(6): 1274-1285.
- Voetsch, B. and J. Loscalzo (2004). "Genetic determinants of arterial thrombosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(2): 216-229.
- von Aulock, S., N. W. Schroder, K. Gueinzus, S. Traub, S. Hoffmann, K. Graf, S. Dimmeler, T. Hartung, R. R. Schumann and C. Hermann (2003). "Heterozygous toll-like receptor 4 polymorphism does not influence lipopolysaccharide-induced cytokine release in human whole blood." J Infect Dis **188**(6): 938-943.
- Vosmaer, A., R. R. Pereira, J. S. Koenderman, F. R. Rosendaal and S. C. Cannegieter (2010). "Coagulation abnormalities in Legg-Calve-Perthes disease." J Bone Joint Surg Am **92**(1): 121-128.
- Vukasinovic, Z., C. Vucetic, D. Spasovski and Z. Zivkovic (2008). "[Legg-Calve-Perthes disease--diagnostics and contemporary treatment]." Srp Arh Celok Lek **136**(7-8): 430-434.

- Wada, N., H. Maeda, Y. Yoshimine and A. Akamine (2004). "Lipopolysaccharide stimulates expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappa B ligand in periodontal ligament fibroblasts through the induction of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha." *Bone* **35**(3): 629-635.
- Wagers, A. J. and I. L. Weissman (2004). "Plasticity of adult stem cells." *Cell* **116**(5): 639-648.
- Walsh, M. C., N. Kim, Y. Kadono, J. Rho, S. Y. Lee, J. Lorenzo and Y. Choi (2006). "Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism." *Annu Rev Immunol* **24**: 33-63.
- Walsh, N. C., S. Reinwald, C. A. Manning, K. W. Condon, K. Iwata, D. B. Burr and E. M. Gravalles (2009). "Osteoblast function is compromised at sites of focal bone erosion in inflammatory arthritis." *J Bone Miner Res* **24**(9): 1572-1585.
- Watanabe-Fukunaga, R., C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and S. Nagata (1992). "Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis." *Nature* **356**(6367): 314-317.
- Wei, Y., X. Sun, W. Wang and Y. Hu (2007). "Adipose-derived stem cells and chondrogenesis." *Cytotherapy* **9**(8): 712-716.
- Wilson, A. G., F. S. di Giovine, A. I. Blakemore and G. W. Duff (1992). "Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product." *Hum Mol Genet* **1**(5): 353.
- Wilson, A. G., J. A. Symons, T. L. McDowell, H. O. McDevitt and G. W. Duff (1997). "Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7): 3195-3199.
- Wong, P. K., I. K. Campbell, P. J. Egan, M. Ernst and I. P. Wicks (2003). "The role of the interleukin-6 family of cytokines in inflammatory arthritis and bone turnover." *Arthritis Rheum* **48**(5): 1177-1189.
- Woratanarat, P., C. Thaveeratitharm, T. Woratanarat, C. Angsanuntsukh, J. Attia and A. Thakkinstian (2014). "Meta-analysis of hypercoagulability genetic polymorphisms in Perthes disease." *J Orthop Res* **32**(1): 1-7.
- Wu, X., M. A. McKenna, X. Feng, T. R. Nagy and J. M. McDonald (2003). "Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro." *Endocrinology* **144**(12): 5545-5555.

- Yamada, R., T. Tanaka, M. Unoki, T. Nagai, T. Sawada, Y. Ohnishi, T. Tsunoda, M. Yukioka, A. Maeda, K. Suzuki, H. Tateishi, T. Ochi, Y. Nakamura and K. Yamamoto (2001). "Association between a Single-Nucleotide Polymorphism in the Promoter of the Human Interleukin-3 Gene and Rheumatoid Arthritis in Japanese Patients, and Maximum-Likelihood Estimation of Combinatorial Effect That Two Genetic Loci Have on Susceptibility to the Disease." Am J Hum Genet **68**: 674-685.
- Yang, S. H., M. J. Park, I. H. Yoon, S. Y. Kim, S. H. Hong, J. Y. Shin, H. Y. Nam, Y. H. Kim, B. Kim and C. G. Park (2009). "Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10." Exp Mol Med **41**(5): 315-324.
- Yin, H., R. L. Kanasty, A. A. Eltoukhy, A. J. Vegas, J. R. Dorkin and D. G. Anderson (2014). "Non-viral vectors for gene-based therapy." Nat Rev Genet **15**(8): 541-555.
- Yogesha, S., S. Khapli and M. Wani (2005). "Interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inhibits tumor necrosis factor (TNF)- α -induced osteoclast differentiation by downregulation of expression of TNF receptors 1 and 2." J Biol Chem **280**: 11759-11769.
- Yoo, K. H., I. K. Jang, M. W. Lee, H. E. Kim, M. S. Yang, Y. Eom, J. E. Lee, Y. J. Kim, S. K. Yang, H. L. Jung, K. W. Sung, C. W. Kim and H. H. Koo (2009). "Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues." Cell Immunol **259**(2): 150-156.
- Yu, G., Z. E. Floyd, X. Wu, Y. D. Halvorsen and J. M. Gimble (2011). "Isolation of human adipose-derived stem cells from lipoaspirates." Methods Mol Biol **702**: 17-27.
- Zhang, Y., D. Khan, J. Delling and E. Tobiasch (2012). "Mechanisms underlying the osteo- and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells." ScientificWorldJournal **2012**: 793823.
- Zhang, Y., J. Zhang, C. Tian, Y. Xiao, C. He, X. Li, A. Bogati, J. Huang and H. Fan (2006). "The -308 G/A polymorphism in TNF- α gene is associated with asthma risk: an update by meta-analysis." J Clin Immunol **31**(2): 174-185.
- Zhu, Z. H., Y. S. Gao, B. F. Zeng and C. Q. Zhang (2011). "The effect of dexamethasone and hypoxic stress on MC3T3-E1 cells." Front Biosci (Landmark Ed) **16**: 2747-2755.

Zuk, P. A. (2008). "Tissue engineering craniofacial defects with adult stem cells? Are we ready yet?" Pediatr Res **63**(5): 478-486.

Zuk, P. A., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz and M. H. Hedrick (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." Tissue Eng **7**(2): 211-228.

BIOGRAFIJA

Sanja Srzentić je rođena 25.04.1984. godine u Beogradu, Srbija.

Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, upisala je školske 2003/2004. godine, a diplomirala je 2010. godine sa prosečnom ocenom 9.34 i diplomskim radom pod nazivom „Određivanje učestalosti polimorfizma *CD14* gena kod obolelih od autoimunske bolesti *Oralni Lichen Planus*“.

Tokom 2009/2010 godine je bila na tromesečnom studijskom boravku na Institutu za molekularnu biotehnologiju Tehnološkog univerziteta u Gracu, Austrija.

Doktorske studije je upisala školske 2010/2011. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota.

Od januara 2011. je zaposlena u Laboratoriji za molekularnu hematologiju (koja je 2013. godine promenila naziv u - Laboratorija za molekularnu biomedicinu), Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu.

Učesnik je na nacionalnom projektu “Retke bolesti: molekularna patofiziologija, dijagnostički i terapijski modaliteti i socijalni, etički i pravni aspekti“ (MNTRS, broj III 41004, 2011-2015) kao i na evropskim projektima za popularizaciju nauke FP7 Researchers' Night 2012. i 2013. godine i H2020-MSCA-NIGHT 2014. i 2015. godine.

Sanja Srzentić je tokom 2014. godine bila na obuci u Holandiji, na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Utrehtu, na Odeljenju za ortopediju, gde je učila različite tehnike rada na primarnim ćelijskim kulturama.

Do sada je objavila 5 radova u časopisima međunarodnog značaja i imala 17 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Сања Срзентић

број уписа M3005/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Молекуларни маркери поремећаја коагулације, инфламације, апоптозе, формирања и ремоделовања коштаног ткива код Лег-Калве-Пертесове болести

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

Потпис докторанда

У Београду 8.05.2015.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Сања Срзентић

Број уписа M3005/2010

Студијски програм Молекуларна биологија, модул молекуларна биологија
еукариота

Наслов рада Молекуларни маркери поремећаја коагулације, инфламације,
апоптозе, формирања и ремоделовања коштаног ткива код Лег-Калве-
Пертесове болести

Ментор др Гордана Никчевић, др Соња Павловић

Потписани Сања Срзентић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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.

У Београду, 8.05.2015.

Потпис докторанда



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Молекуларни маркери поремећаја коагулације, инфламације, апоптозе, формирања и ремоделовања коштаног ткива код Лег-Калве-Пертесове болести

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 8.05.2015.



1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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 прераде. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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 прераде. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.