

# MOLEKULARNA GENETIKA

novosti u dijagnostici i terapiji

urednici: Jadranka Sertić, Stjepan Gamulin, Filip Sedlić



MEDICINSKA  
NAKLADA

Jadranka Sertić, Stjepan Gamulin, Filip Sedlić (urednici)

MOLEKULARNA GENETIKA  
– novosti u dijagnostici i terapiji

MEDICINSKA NAKLADA, ZAGREB  
BIBLIOTEKA PRIRUČNICI

Jadranka Sertić, Stjepan Gamulin, Filip Sedlić (urednici)  
MOLEKULARNA GENETIKA – novosti u dijagnostici i terapiji

UREDNICI

Prof. dr. sc. Jadranka Sertić  
Akademik Stjepan Gamulin  
Doc. dr. sc. Filip Sedlić

RECENZENTI

Akademik Željko Kučan  
Akademik Nikola Ljubešić

CIP zapis je dostupan u računalnome katalogu Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu pod brojem 001009792  
ISBN 978-953-176-862-7

© Medicinska naklada, Zagreb, 2018.

Nijedan dio ove knjige ne smije se umnožavati niti reproducirati u bilo kojem obliku ili na bilo koji način, elektronički ili mehanički, uključujući fotokopiranje, osim za kratke citate, bez nakladnikova pismenog dopuštenja.

# PRIMJENA MIKROFRAGMENTIRANOG MASNOG TKIVA SA STROMALNOM VASKULARNOM FRAKCIJOM U LIJEČENJU OŠTEĆENJA ZGLOBNE HRSKAVICE: ISKUSTVA LIJEČNIKA SPECIJALNE BOLNICE SV. KATARINA

Eduard Rod, Mihovil Plečko, Ana Marija Slišković, Igor Borić, Damir Hudetz,  
Željko Jeleč, Andrea Skelin, Gordan Lauc, Irena Trbojević-Akmačić, Ozren Polašek,  
Trpimir Vrdoljak, Dragan Primorac

## SAŽETAK

Osteoarthritis (OA) jest degenerativna bolest zglobova u čijoj podlozi glavnu ulogu ima oštećenje zglobne hrskavice. Kao posljedica oštećenja hrskavice dolazi do preraspodjele opterećenja, karakterističnih promjena koje se očituju radiološki, a klasificiraju se posebnim bodovnim sustavima. Ova je bolest iznimno važna s obzirom na to da je jedan od vodećih uzroka invalidnosti u modernom svijetu. Liječenje OA dugo se vremena temeljilo isključivo na modulaciji bola i u najtežim slučajevima ugradnjom totalne endoproteze. Nove spoznaje idu u prilog velikom napretku na polju tkivnog inženjeringa i regenerativne medicine, a jedna od metoda koja je u središtu interesa jest i primjena matičnih stanica u liječenju OA. Riječ je o stanicama koje imaju sposobnost diferencijacije u specijalizirane stanice, a od posebnog su interesa mezenhimalne matične stanice (MSC) koje u određenim uvjetima *in vitro* mogu formirati koštano, hrskavično, masno ili mišićno tkivo. Zbog njihovih posebnih svojstava koja se očituju na mjestu ozljede (protuupalno, imunomodulacijsko itd.), ponajprije zbog lučenja niza bioaktivnih faktora, otac mezenhimalnih matičnih stanica Arnold Caplan predlaže promjenu njihova naziva u *medicinal signaling cells*. Vodeći se najsuvremenijim metodama dijagnostike i liječenja, u Specijalnoj bolnici „Sv. Katarina“ provedeno je kliničko istraživanje koje je uključivalo terapijski postupak primijenjen na 17 pacijenata s osteoartritisom koljena. Postupak je uključio lipoaspiraciju i fizikalnu manipulaciju masnog tkiva kojim se dobiva mikrofragmentirano masno tkivo koje sadržava stromalnu vaskularnu frakciju (SVF). Stromalna vaskularna frakcija obiluje brojnim stanicama, uključujući i MSC, pericite, endotelne progenitorske stanice, limfocite T, limfocite B, mastocite, makrofage i dr. Dobiven SVF, prema načelima *point of care*, odmah se aplicirao u zglobove s ciljem poticanja regenerativnih procesa u koštanom i hrskavičnom tkivu. Procjena stanja pacijenata radila se

u različitim intervalima: prije primjene terapije te tri, šest i dvanaest mjeseci nakon terapije. U procjenjivanju stanja rabila se vizualno-analogni ljestvica (VAS) bola u mirovanju i kretanju, mjerenje CRP-a u krvi, MRI metoda oslikavanja hrskavice kontrastnim sredstvom (dGEMRIC) koja je neizravno prikazala količinu glikozaminoglikana (GAG) u hrskavici i profil glikozilacije IgG protutijela iz krvi i sinovijalne tekućine kao vrlo osjetljiv biomarker akutnih i kroničnih upala. Rezultati dobiveni metodom dGEMRIC pokazuju da je ova terapijska metoda statistički znakovito povećala koncentracije GAG-a u više od pola provedenih mjerenja, dok je statistički značajan pad u koncentraciji GAG-a vidljiv u manje od 4 % mjerenja. U skladu s tim rezultati našeg istraživanja sugeriraju da primjena autolognog mikrofragmentiranog masnog tkiva sa stromalnom vaskularnom frakcijom kod pacijenata s OA povećava GAG u hijalinoj hrskavici, što prati smanjenje bola te poboljšanje pokretljivosti promatranih pacijenata. Na mjestima potpuno uništene hrskavice, prema očekivanju, nije bilo zabilježenih promjena vrijednosti glikozaminoglikana nakon primjene terapije. Iako se moguće djelovanje MSC-a tumači dvojako: prvo, putem diferencijacije MSC u hondrocite, a drugo putem parakrine sekrecije bioaktivnih čimbenika koje luče MSC i koji uzrokuju pojačan odgovor hondrocita, naše istraživanje govori u prilog drugom navedenom mehanizmu. Naime, tijekom istraživanja je zabilježen porast koncentracije GAG-a važnog za kvalitetu same hrskavice, i to na mjestima gdje su prije primjene bili prisutni hondrociti. Na mjestima gdje početno nisu bili prisutni hondrociti, nije se povećala razina GAG-a. Osim toga, tijekom istraživanja nisu pronađene statistički znakovite promjene udjela pojedinih N-glikana u analizi glikoma IgG-a u krvi i sinovijalnoj tekućini uzetih u različitim intervalima. Rezultati analiza glikoma IgG-a iz krvi govore da je do porasta razine GAG-a došlo zbog lokalne primijene terapije, bez sustavne promjene profila IgG glikoma. Također, analiza N-glikanskog profila IgG-a iz krvi i sinovijalne tekućine dokazala je da se primjenom ove terapije ne razvijaju lokalni i sustavni upalni odgovor.

**Ključne riječi:** mezenhimalne matične stanice, osteoarthritis koljena, masno tkivo, regenerativna medicina, dGEMRIC, glikozaminoglikani, hrskavica

## ABSTRACT

*Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease characterized by articular cartilage deterioration. As a consequence of weight-bearing redistribution specific transformations of cartilage occur, which are usually diagnosed and classified by radiography. This disease is hugely important as it is one of the leading causes of disability in the modern world. For a long time treatment of OA was mainly based on pain management, with total endoprosthesis implantation in the more severe cases. New methods are being developed as tissue engineering and*

*regenerative medicine advance. One of these methods is based on the usage of stem cells. Stem cells have the ability to differentiate into specialized cells. Mesenchymal stem cells (MSCs) are a type of stem cells that recently attracted a lot of attention because, in certain conditions in vitro, they have the ability to differentiate into bone, cartilage, adipose or muscle tissue. Due to their special effects that are manifested on the location of injury (anti-inflammatory, immunomodulatory etc.), mostly because of their potential to secrete bioactive factors, „the father of MSCs“ Arnold Caplan suggests changing their name into „medicinal signaling cells“. Using state-of-the-art methods of diagnostics and treatment, a clinical study was conducted in Specialty hospital St. Catherine. The study included 17 patients diagnosed with knee osteoarthritis. They were submitted to a procedure that consisted of aspiration of adipose tissue and its physical manipulation in order to extract micro-fragmented adipose tissue with stromal vascular fraction (SVF). Stromal vascular fraction contains cells like MSCs, pericytes, endothelial progenitor cells, lymphocytes T and B, mastocytes, macrophages et al. Extracted SVF was then, following the „point of care“ principles, applied immediately into patient's joint/s with the goal to stimulate regenerative processes of bone and cartilage tissue. All patients underwent four assessments, one before the application of the therapy, after 3, 6 and 12 months after the therapy. Each assessment included a visual-analogue scale (VAS) of pain while patients are resting and moving, measurement of CRP levels in blood, an MRI method of cartilage imaging with a specific contrast agent (dGEMRIC) which indicates levels of glycosaminoglycans in the cartilage. In addition, IgG antibody glycosylation profiling from both blood samples and synovial fluid samples was done, which is a very sensitive biomarker of acute and chronic inflammation. Results obtained by dGEMRIC method show that the used therapeutical procedure led to a statistically significant rise of levels of GAGs in more than half of the measurements, while a statistically significant drop of levels was measured in less than 4% of measurements. Hence, results of our study suggest that application of autologous microfragmented adipose tissue with stromal vascular fraction in patients with OA lead to rise of GAG levels in hyaline cartilage consequently leading to reduction of pain and improvement of movement abilities in observed patients. In the cases of total cartilage deterioration no change after the therapy was recorded. There are two possible mechanisms of MSCs that help explain treatment of OA. The first one assumes that stem cells differentiate into chondrocytes, while the second one suggests that MSCs stimulate chondrocytes by paracrine secretion of bioactive factors. Our study provides evidence in favor of the second mechanism, as there was a rise of concentration of GAGs molecules which are important for the quality of cartilage, indeed if chondrocytes were present before application of the therapy. In the locations where there was no cartilage before the application of the therapy there was no rise of GAG levels. There were no statistically significant changes in the abundance of individual IgG N-glycans from blood IgG samples and synovial fluid IgG samples taken in different time points. This shows that the recorded rise of GAG levels was directly connected to the locally applied therapy, without the systemic change of the*

*IgG glycosylation profile. Also, the analysis of blood IgG and synovial fluid IgG N-glycosylation showed that there was no local or systemic inflammation response to the applied therapy.*

**Keywords:** *mesenchymal stem cells; knee osteoarthritis; adipose tissue; regenerative medicine; dGEMRIC; glycosaminoglycans; cartilage*

## UVOD

Osteoarthritis je bolest koja će, prema predviđanjima Ujedinjenih naroda, do 2050. godine zahvatiti više od 20 % ukupne svjetske populacije starije od 60 godina. S obzirom na globalnu pojavu starenja stanovništva očekuje se da će ova bolest biti jedan od vodećih uzroka morbiditeta stanovništva. Samim time ona se nameće kao iznimno važna za društvo u budućnosti. Osteoarthritis koljena veliko je opterećenje zdravstvenom sustavu glede cijene liječenja i dana koje bolesnici izostaju sa svojih radnih mjesta. Posebno važno je naglasiti da nema mnogo znanstvenih dokaza koji govore u prilog uspješnosti trenutačno dostupnih terapijskih postupaka (1), uz iznimku ugradnje totalne endoproteze koljena. Znanje o patofiziologiji same bolesti još uvijek je nezadovoljavajuće, stoga istraživanja bioloških procesa vezanih uz osteoarthritis te novih metoda liječenja dobivaju na važnosti.

## OSNOVE HRSKAVIČNOG TKIVA (ANATOMIJA, HISTOLOGIJA, FIZIOLOGIJA)

Zglobna je hrskavica tkivo koje ima jedinstvenu ulogu u pružanju mehaničke potpore zglobu. Odolijevanjem mehaničkim opterećenjima i smanjivanjem trenja između dvaju susjednih zglobnih površina omogućuje kretanje zglobova. Histološka mikroporozna arhitektura, biokemijski sastav matriksa i usmjerenost kolagenih vlakana omogućuju elastično oblikovanje i preuzimanje pritiska. Te viskoelastične značajke imaju amortizacijski učinak. Zglobna hrskavica nema krvne niti limfne žile kao ni živce, a prehranjuje se većim dijelom (dvije trećine) difuzijom hranjivih tvari iz sinovijalne tekućine unutar zglobne šupljine i putem kapilara u okolnome vezivnom tkivu (perihondriju) (2). Histološki, hrskavica se sastoji od hondrocita smještenih u šupljinama međustanične tvari koje se nazivaju lakune i obilne međustanične tvari (izvanstanični matriks). Na hondrocite otpada samo 5 % tkiva, dok ostalih 95 % hrskavičnog tkiva čini izvanstanični matriks odgovoran za biomehanička svojstva (3).

Hondrociti sintetiziraju i izlučuju sastavnice izvanstaničnog matriksa. Najvažnije komponente izvanstaničnog matriksa su kolagen, voda, hijaluronska kiselina, proteoglikani te mali udio kalcijevih soli i ostalih glikoproteina. Čvrstoća hrskavice ovisi o elektrostatskim vezama između kolagenih vlakana i postraničnih lanaca glikozaminoglikana te o vezanju vode za negativno nabijene postranične glikozaminoglikanske lance. Glikozaminoglikani (GAG, stariji naziv kiseli mukopolisaharidi) jesu ravni polipeptidni lanci sastavljeni od disaharidnih jedinica koje se sastoje od uronske kiseline i heksozamina. Heksozamin može biti glukozamin ili galaktozamin, a uronska kiselina može biti glukuronska ili iduronska kiselina. S izuzetkom hijaluronske kiseline, ravni glikozaminoglikanski lanci kovalentno su vezani za središnji proteinski lanac s kojim tvore molekulu proteoglikana. To je trodimenzionalna tvorba koja se može usporediti s četkicom za pranje epruveta, na kojoj bi žica u sredini bila središnja bjelancevina, a dlake su glikozaminoglikani. U hrskavici se molekule proteoglikana vežu za lanac hijaluronske kiseline pa tvore još veće molekule, proteoglikanske agregate. U proteoglikanima prevladava ugljikohidratni dio molekule i čini 80 – 90 % mase makromolekule. Zbog tih svojstava proteoglikani mogu vezati na sebe velik broj kationa (najčešće natrija) pomoću elektrostatskih (ionskih) veza, što ih čini izrazito hidratiziranim molekulama sa slojem vezane vode oko sebe. U tom stanju ispunjavaju mnogo veći prostor nego u nehidratiziranom.

Kao posljedica različitih potreba postoje tri vrste hrskavičnog tkiva koje imaju i različit sastav međustanične tvari. Razlikujemo hijalinu, elastičnu i vezivnu hrskavicu. Najrasprostranjenija i najbolje proučena vrsta hrskavice jest hijalina hrskavica koja se nalazi na zglobnim površinama pokretnih zglobova, u stijenci većih dišnih puteva (nos, grkljan, traheja, bronhi) i na ventralnim krajevima rebara. Hijalina hrskavica sadržava, uz molekule kolagena tipa 2, proteoglikane od kojih su najvažniji hondroitin-4-sulfat, hondroitin-6-sulfat i keratin-sulfat. Proteoglikani nekovalentno vezani za duge molekule hijaluronske kiseline stvaraju proteoglikanske agregate koji su povezani s kolagenom. Osim molekula kolagena i proteoglikana važan je sastojak i glikoprotein hondronektin koji posreduje u prijanjanju hondrocita za međustaničnu tvar. Funkcija hondrocita ovisi o hormonskoj ravnoteži. Hormon rasta, tiroksin i testosteron ubrzavaju sintezu GAG-a, a usporavaju je kortizon, hidrokortizon i estradiol. Rast hrskavice u najvećoj mjeri ovisi o somatotropinu koji posredno djeluje na hrskavične stanice putem somatomedina C sintetiziranog u jetri i na taj način izravno stimulira



stanice hrskavice na rast. Hrskavica se regenerira iz perihondrija koji oblaže hijalinu hrskavicu svugdje osim u zglobovima (4). Osim sintetskih procesa posredovanih putem hondrocita, u izvanstaničnom matriksu zbivaju se i degradacijski procesi djelovanjem proteolitičkih enzima. U fiziološkim su uvjetima ti procesi u ravnoteži, a kada zakaže uloga hondrocita u održavanju homeostaze između sintetskih i degradacijskih procesa, razvija se osteoartritis (5).

## OSTEOARTRITIS

Osteoartritis (OA) ili osteoartroza jest degenerativna bolest zglobova i jedan od vodećih uzroka invalidnosti u modernom svijetu, čije liječenje pričinja velik trošak na globalnoj razini. Prema nedavnoj nizozemskoj epidemiološkoj studiji osteoartritis koljena ima incidenciju 3,4 na 1000 stanovnika i prevalenciju 22 na 1000 stanovnika (6). Etiologija je višezročna te mnogi čimbenici pridonose nastanku bolesti. Rizični čimbenici važni za razvoj osteoartritisa uključuju: pretilost, prethodnu traumu, genetiku, pretjeranu sportsku aktivnost. Dob, oblik koštane abnormalnosti i zglobno preopterećenje imaju sinergistički utjecaj u nastanku OA (7). Starenje se oduvijek smatralo važnim etiološkim čimbenikom u nastanku OA, ali mehanizmi kojima ono dovodi do OA još nisu u potpunosti razjašnjeni (8). Povećanjem dobi proporcionalno se povećava razina proupalnih citokina kao što su IL-1, IL-6, IL-18, TNF i CRP, što aktivira proupalne puteve koji pridonose kroničnom propadanju zglobne hrskavice. Povećane razine masnih kiselina, hiperglikemija i oksidacijski stres pridonose nastanku sustavne upale. Često djeluju u kombinaciji i pod slikom metaboličkog sindroma, koji je također češći u starijih. Starenjem se smanjuje osjetljivost i odgovor hondrocita na čimbenike rasta kao što su IGF1 i OP-1, smanjuje se aktivnost antioksidacijskih enzima poput katalaza i superoksid-dimutaza koje su odgovorne za smanjenje superoksidnih radikala nastalih u respiratornom lancu. U ranoj fazi OA, hondrociti formiraju proliferacijske klastere. Time se pokušava popraviti hrskavično oštećenje, ali istraživanja su pokazala da to ne pridonosi oporavku. Dok su rane faze povezane s proliferacijom stanica, u kasnim stadijima dolazi do gubitka stanica, a apoptoza se u zglobnoj hrskavici učestalije događa u starijih osoba. Tijekom različitih faza OA kost podliježe procesima remodeliranja. Tako u ranoj fazi subhondralna kost postaje tanja zbog pojačanog djelovanja osteoklasta, dok u kasnim fazama, u korelaciji sa stupnjem oštećenja hrskavice, kost

postaje skleroznija, iako hipomineralizirana. Još jedno dodatno obilježje OA jesu osteofiti, koštani izdanci koji protrudiraju s medijalnih i lateralnih krajeva kosti. Oni nastaju kao posljedica hondrogene i osteogene diferencijacije matičnih stanica perihondrija. Kao i subhondralna kost, njihov se nastanak vezuje uz preraspodjelu opterećenja na oštećenoj hrskavici (9). Prema Peyronu i Altmanu, u nastanku OA važna su dva mehanizma. U većine je početni mehanizam nastanka ozljeda normalne zglobne hrskavice fizičkim silama koje mogu biti rezultat ili jednostruke makrotraume ili ponavljajućih mikrotrauma (10). U manjem broju slučajeva defektno hrskavično tkivo nema sposobnost podnošenja normalnih zglobnih opterećenja, bilo zbog defekta u građi kolagena tipa 2 bilo zbog odlaganja štetnog pigmenta (11).

Prema istraživanju Aignera i Scmitza (12) oštećenje hrskavičnog tkiva i gubitak biomehaničke funkcije nastaje većim dijelom zbog oštećenja i gubitka izvanstaničnog matriksa, u prvom redu dolazi do degradacije mreže kolagenih vlakana i umetnutih proteoglikanskih agregata. Enzimi ključni za povećanu razgradnju matriksa pripadaju u red metaloproteinaza (13), a od ostalih čimbenika koji pridonose nastanku OA važno je izdvojiti upalne citokine (14 – 16), dušikov oksid (17), leptine (18), angiogenezu (19) i T-stanice (20). Najnovije spoznaje u patogenezi OA objašnjavaju mehanizam hrskavičnog oštećenja kao posljedicu stvaranja viška subhondralne kosti koja rasteže hrskavicu i ubrzava njezino propadanje. Također, Zheng i suradnici upozorili su na aktivaciju čimbenika TGF- $\beta$ 1 u subhondralnoj kosti, čija izraženost u osteoblastima inducira osteoartritis, a inhibicija aktivnosti TGF- $\beta$  usporava proces degeneracije zglobne hrskavice što može biti novi terapijski pristup u liječenju osteoartritisa (21). Dodatnu važnost subhondralne kosti u patogenezi OA i potrebu za daljnjim istraživanjem njezine uloge u nastanku hrskavičnog oštećenja naglasili su u svom radu Uygur i suradnici (22). Mnogi znanstveni radovi povezuju oštećenja koštane srži i trenje subhondralne kosti s razvojem i pogoršanjem hrskavičnog gubitka (23 – 26).

OA utječe na zglobnu hrskavicu, kost i zglobnu ovojniciu što ima za posljedicu nastanak osteofita, subhondralnu sklerozu i zadebljanje zglobne ovojnice.

2003. godine ICRS (*International Cartilage Repair Society*) objavio je klasifikaciju oštećenja hijaline hrskavice koja se trenutačno rabi kao međunarodni standard (27). Prema toj klasifikacijskoj ljestvici (preuzetoj s [www.cartilage.org]): Stupanj 0: Normalna hrskavica

- stupanj 1: skoro normalna (blago zasijecanje i/ili površinske fisure i pukotine)
- stupanj 2: abnormalna (lezije koje zahvaćaju manje od 50 % hrskavične debljine)
- stupanj 3: teško oštećena – hrskavični defekti više od 50 % debljine hrskavice koji se pružaju do kalcificiranog sloja, do subhondralne kosti, ali ju ne prelaze; u ovom stupnju nastaju odignuća hrskavice
- stupanj 4: teško oštećena (defekti se pružaju kroz subhondralnu kost).

Kada govorimo o dijagnostici OA u kliničkoj praksi, radiološka je dijagnostika i dalje zlatni standard. Ipak, njezin je domet ograničen zbog toga jer radiografski nije moguće detektirati rane degenerativne promjene. U klasifikaciji stupnja OA koljenog zgloba kao zlatni standard rabi se Kellgren-Lawrenceova ljestvica.

Prema toj klasifikaciji oštećenja zglobne hrskavice prikazana su stupnjevima, i to: stupanj 0 – nema radiografski prisutnih znakova OA; stupanj 1 – nesigurni znakovi suženja zglobne pukotine i mogući osteofiti; stupanj 2 – jasno se pokazuju osteofiti i moguće suženje zglobne pukotine na AP snimkama; stupanj 3 – multipli osteofiti, definitivno suženje zglobne pukotine, skleroza, moguća deformacija kosti; stupanj 4 – veliki osteofiti, upadljivo suženje zglobne pukotine, teška skleroza i koštana deformacija (28).

Težina ranog OA može se određivati MR snimkama prema ICRS ljestvici temeljenoj na modificiranom Outerbridge-sustavu koji klasificira hrskavične lezije u pet stupnjeva, ovisno o veličini i dubini lezije kao i o izgledu okolne subhondralne kosti. Stupanj 0 – normalna hrskavica; stupanj 1 – razlike u intenzitetu signala u odnosu na okolnu normalnu hrskavicu; stupanj 2 – hrskavični defekti s fisurama na površini koje ne sežu do subhondralne kosti i nisu veće od 1,5 cm u promjeru; stupanj 3 – fisure hrskavice do razine subhondralne kosti s veličinom zahvaćenog područja većim od 1,5 cm; stupanj 4 – izložena subhondralna kost.

## MATIČNE STANICE

Pojam *matična stanica* prvi se put spominje 1868. godine kako bi opisao oplodenu jajnu stanicu koja postaje organizam (29). Bilo je potrebno gotovo sto godina kako bi matične stanice pronašle svoju kliničku upotrebu, što se dogodilo 1957. kada je E. Donnall Thomas, liječnik koji je radio u Seattleu, pokušao prvu ljudsku

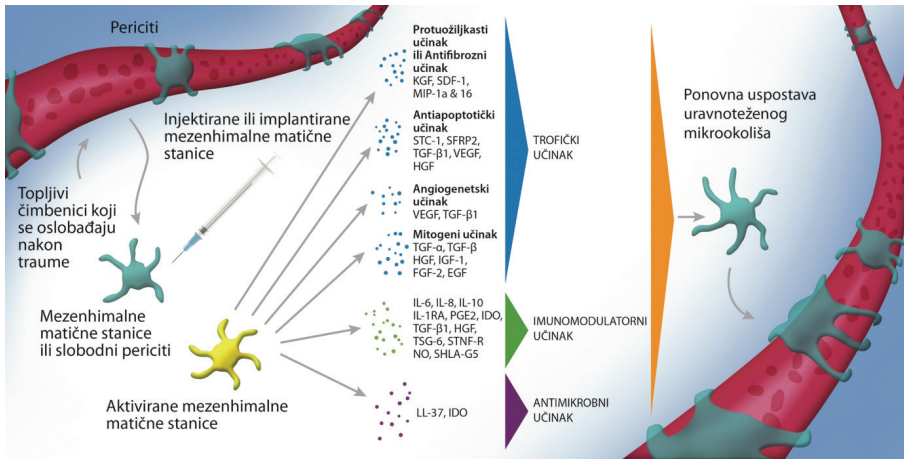
transplantaciju koštane srži, za koju je kasnije nagrađen Nobelovom nagradom (30). Otada znanje o matičnim stanicama i njihovu potencijalu eksponencijalno se povećavalo te se danas one smatraju jednom od terapijskih metoda koje najviše obećavaju u liječenju brojnih stanja. Kada govorimo o toj metodi, najčešće je opisujemo kao regenerativnu medicinu. Matične se stanice definiraju kao nediferencirane stanice sposobne za samoobnovu mitozom i za diferencijaciju u specijalizirane stanice (31).

Postoje tri veće skupine matičnih stanica: embrionalne matične stanice, odrasle matične stanice (adultne) i inducirane pluripotentne matične stanice. Embriionalne matične stanice (EMS) dobivaju se iz embrija, uzgojenih iz *in vitro* oplodene jajne stanice donirane isključivo za istraživačke potrebe, uz informirani pristanak donora. Stanice se ekstrahiraju iz blastociste, preimplantacijskog stadija razvoja embrija i dalje se kultiviraju u laboratorijskim uvjetima. Ove su stanice pluripotentne i mogu se usmjeriti u diferencijaciju u brojne specijalizirane stanice prema različitim protokolima ustanovljenima tijekom godina temeljitog istraživanja (32, 33). No, još uvijek postoje brojne medicinske i etičke prepreke u radu s EMS-om. Osim toga, važno je podsjetiti se neželjenog svojstva EMS-a u stvaranju teratoma. Odrasle matične stanice, također poznate i kao somatske matične stanice, nalazimo u različitim organima u tijelu s funkcijom da zamijene odumrle stanice nekog organa, odnosno regeneriraju ozlijeđeno tkivo. Njihova primjena u istraživanjima i terapiji nije kontroverzna kao uporaba embrionalnih matičnih stanica jer njihova proizvodnja ne zahtijeva uništavanje embrija. S druge strane, odrasle matične stanice nemaju isti potencijal diferencijacije u raznovrsne specijalizirane stanice kao što to imaju embrionalne matične stanice i često su ograničene na mogućnost diferencijacije u određene stanice neke stanične loze. Dobar primjer za odrasle matične stanice jesu stanice koštane srži koje se već mnogo godina koriste kao opcija u liječenju leukemija (34). Inducirane pluripotentne matične stanice dobivaju se iz diferenciranih stanica koje prolaze složene postupke reprogramiranja i *dovode se natrag* u stanje nalik na ono u fazi embrija, tj. pluripotentno stanje (35). Ove se stanice rabe za izradu modela određenih bolesti, istraživanje učinaka lijekova i u regenerativnoj medicini za brojna stanja, npr. Parkinsonovu bolest (36). Kao koncept predstavljene su unatrag desetak godina, uz još uvijek brojne neriješene zapreke kao što su nemogućnost reprogramiranja stanica bez genetičke modifikacije, mogućnost formacije tumora *in vivo* i sl. (37).

## MEZENHIMALNE MATIČNE STANICE

Mezenhimalne matične stanice (MSC) jesu populacija multipotentnih stanica koje nalazimo u gotovo svim tkivima, uz potencijal diferencijacije u osteoblaste, hondroblaste, mioblaste, stromalne stanice, fibroblaste i adipocite. One pripadaju u skupinu odraslih matičnih stanica koje imaju funkciju održavati i popravljati tkivo u kojemu se nalaze (38). Također, njihova mogućnost da djeluju protuupalno i imunomodulacijski na određenom mjestu daje im još važniju ulogu u regenerativnoj medicini. S obzirom na to u kakvoj se mikrookolini nalaze, te stanice registriraju svoje okruženje te luče bioaktivne čimbenike i signale u varijabilnim koncentracijama s ciljem vraćanja homeostatskih uvjeta koji bi omogućili normalnu lokaliziranu ili sustavnu regeneraciju tkiva (39). Stanice za koje se smatra da imaju najvažniju ulogu u ovom fiziološkom procesu jesu periciti. Oni se otpuštaju s krvnih žila čija je cjelovitost narušena te imaju i imunomodulacijski i regenerativnu ulogu (40). Oni se obično nalaze u *vaskularnim nišama matičnih stanica* koje se najčešće nalaze u adventiciji krvnih žila, gdje se mogu pronaći i endotelne progenitorske stanice, progenitorske stanice glatkih mišića, periadventicijski adipociti itd. (41). Njihova je uloga razvoj, stabilizacija, maturacija i remodelacija krvnih žila, održavanje krvnoga tlaka, proliferacija endotelnih stanica, kontraktilnost vaskularnih glatkih mišića, cijeljenje ozljeda i dr. (42). Također, periciti imaju važnu ulogu kao medijator u vaskularnoj biologiji i angiogenezi kod razvoja tumora. Daljnja istraživanja biologije pericita mogla bi dovesti do otkrića novih ciljeva u onkološkoj terapiji (43). Adipocitne progenitorske matične stanice imaju sličan terapijski potencijal i uz to nekoliko prednosti, kao što je činjenica da se one ekstrahiraju iz masnoga tkiva, tkiva koje se u modernome dobu često pronalazi u višku i općenito se smatra nepoželjnim u većim količinama. Prednost je i u tome što se do velike količine ovoga tkiva može doći minimalnoinvazivnim procedurama (44). Masno tkivo ima i velik broj malih krvnih žila koje sadržavaju pericite. Ekstrakcijom masnoga tkiva tako se može dobiti velika količina MSC-a a da se ne naruši funkcioniranje nekog od vitalno važnih tkiva.

Mezenhimalne matične stanice trenutačno se istražuju u više od 480 kliničkih istraživanja za širok raspon indikacija. Osnovna ideja istraživanja jest aplicirati matične stanice u područje zahvaćeno patološkim procesom s ciljem da matične stanice budu medijator reparacijskom i regenerativnom odgovoru organa



**Slika 1. Trofički, imunomodulacijski i antimikrobni učinak mezenhimalnih matičnih stanica.** Periciti stimulirani topljivim faktorima rasta i kemokinima postaju aktivirane mezenhimalne matične stanice (MSC) koje na promjenu mikrookoliša reagiraju izlučivanjem trofičkih (mitogenih, angiogenetskih, antiapoptotičkih i antifibroznih faktora) te faktora s imunomodulacijskim i antimikrobnim učinkom. Nakon ponovne uspostave uravnoteženog mikrookoliša, MSC-i se vraćaju u prvotno stanje i postaju periciti koji potom prijanjaju uz krvne žile. Murphy BM, Moncivais K and Caplan IA. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & Molecular Medicine* (2013) 45, e54; doi: 10.1038/emm.2013.94 (uz dopuštenje prof. Arnold i Caplana)

pojedince (40). Mezenhimalne matične stanice mogu se primijeniti iz alogenog i autolognog izvora. Dok s alogenim stanicama još postoje komplikacije, ponajviše zbog imunskog odgovora organizma na stanice stranog podrijetla, autologne stanice nemaju tu komplikaciju te su kao takve odlična platforma za buduća istraživanja ove vrste terapije (39). Jedno od ovakvih kliničkih istraživanja provodi se i u Republici Hrvatskoj, pod vodstvom Specijalne bolnice „Sveta Katarina“ i laboratorija Genos, naslova *Osteoarthritis stem cell therapy*. (<https://doi.org/10.1186/ISRCTN13337022>).

## LIPOGEMS®

Prateći razvoj terapije matičnim stanicama, regenerativna ortopedija također ubrzano napreduje. Pod pojmom regenerativna ortopedija opisujemo interdisciplinarnu granu medicine kojoj je osnovni cilj usporiti ili potpuno zaustaviti degeneraciju lokomotornog sustava te potaknuti njegovu regeneraciju koristeći se modernim spoznajama iz molekularne i stanične biologije, kliničke medicine i

tkivnog inženjstva. Osnovni je koncept koordinirati tri ključna čimbenika kako bi se postigla homeostaza: stanice, mikrookolinu (biološki signali) te biološki nosač (45). Lipogems je metoda koja lipoaspiracijom i fizikalnom manipulacijom masnim tkivom dobiva derivate koje nazivamo stromalnom vaskularnom frakcijom (SVF). Dobivena stromalna vaskularna frakcija sadržava adipocite, preadipocite, MSC, pericite, endotelne progenitorske stanice, limfocite T, limfocite B, mastocite, makrofage i dr. (46, 47). Ova se stromalna vaskularna frakcija u istom operacijskom aktu, bez dodatne manipulacije, aplicira u zglobove kako bi potaknula regeneraciju tkiva. Lipogems je tehnologija koja se rabi potpuno zatvorenim sustavom koji osigurava uzimanje, razrjeđivanje, preradu i ponovnu primjenu lipoaspirata, a zahvat počinje aplikacijom adrenalina i lidokaina u potkožno masno tkivo trbušne stijenke, s ciljem vazokonstrukcije malih krvnih žila i osiguranja lokalne anestezije. Idući je korak aspiracija masnog tkiva i prerada pomoću slabe mehaničke sile kroz nekoliko filtara. Konačni Lipogems proizvod sadržava mikrofragmentirane derivate masnog tkiva i očuvanu vaskularnu stromalnu frakciju s pericitima i ostalim MSC-om. Važno je istaknuti da tijekom ove procedure nema klasične kultivacije stanica, već samo aplikacija autoloških stanica na mjesto patološkog procesa (48).

### **DELAYED GADOLINIUM Gd-ENHANCED MAGNETIC RESONANCE IMAGING OF CARTILAGE (DGEMRIC)**

*Delayed gadolinium Gd-enhanced magnetic resonance imaging of cartilage* (dGEMRIC) jest molekularna tehnika oslikavanja koja služi za proučavanje sadržaja glikozaminoglikana u zglobnoj hrskavici pacijenata s primarnim OA (49, 50), a može se rabiti i u druge svrhe, npr. kod pacijenata s ozljedom križnih ligamenata (51, 52). Tijekom ovog protokola i nakon intravenske primjene anionskog kontrastnog sredstva temeljenog na gadoliniju (Gd-DTPA), kreirane su T1-mape hijaline hrskavice. Kako hrskavični matriks obiluje GAG molekulama s negativno nabijenim karboksilnim i sulfatnim skupinama, to za posljedicu ima odbijanje negativno nabijenih iona kontrastnog sredstva. U skladu s tim koncentracije gadolinija više su u hrskavičnim regijama u kojima nedostaje GAG te je hrskavično T1-vrijeme relaksacije (T1Gd) smanjeno (49).

*dGEMRIC index* (prosjek T1Gd u području interesa) povezan je s koncentracijom GAG-a i vremenom između aplikacije gadolinija i oslikavanja (53 – 55). Kao re-



zultat toga, zdrava hrskavica koja obiluje GAG-om imat će niske koncentracije kontrasta Gd-DTPA, dok za oštećenu hrskavicu vrijedi obrnuto, tj. u područjima gdje manjka GAG-a, koncentracije kontrastnog sredstva bit će visoke. T1-vremena relaksacije obrnuto su proporcionalna koncentracijama Gd-DTPA, što omogućuje kvantitativno mjerenje očuvanosti hrskavičnog integriteta (49, 51).

U provedenom istraživanju status zglobne hrskavice analiziran je na sedam različitih zglobnih faseta: medijalni i lateralni femoralni kondili, trohleja femura, medijalni i lateralni kondili tibije i obje patelarne fasete. Debljina zglobne hrskavice mjerena je na istom mjestu netom prije intraartikularne aplikacije mikrofragmentiranog masnog tkiva i na svakom od kasnijih MRI evaluacija.

## GLIKOZILACIJA IMUNOGLOBULINA G

Razvojem moderne medicine standardne dijagnostičke metode u velikom broju bolesti pokazuju se nedostatnima. Potreba za što ranijom intervencijom uvjetuje što raniju detekciju bolesti i samim se time otvara potreba za novim, osjetljivijim metodama. Strukturalne promjene u glikozilaciji proteina događaju se pod utjecajem raznih bolesti (56). Analiza profila glikozilacije imunoglobulina G (IgG), odnosno IgG glikoma, pokazala se vrlo osjetljivim biomarkerom za evaluaciju akutne i kronične upale (57) i kao takva dobar je izbor za analizu sustavnog učinka primijenjene terapije (58).

## REZULTATI

Klinička studija provedena u Specijalnoj bolnici „Sveta Katarina“ uključivala je 17 pacijenata uz kirurški zahvat izveden na 32 koljena (59 – 61). Istraživanje je uključivalo 12 muških i 5 ženskih pacijenata. Svi su pacijenti imali slične karakteristike glede visine, mase, indeksa tjelesne mase, dobi (srednje dobi  $69 \pm 12$ ) i radiološkog Kellgren-Lawrenceova stupnjevanja osteoartritisa (stupanj 3 ili 4). Intraartikularna aplikacija autolognog mikrofragmentiranog masnog tkiva ni u jednog pacijenta nije dovela do razvoja nuspojava (infekcije, hondrocitne toksičnosti i sl.). Svim je pacijentima stanje evaluirano netom prije primjene terapije ( $M_0$ ), nakon 3 mjeseca ( $M_3$ ), 6 mjeseci ( $M_6$ ) i 12 mjeseci ( $M_{12}$ ).

Evaluacijom koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP) u krvi u vremenima  $M_0$ ,  $M_6$  i  $M_{12}$  dobiveni su rezultati koji upućuju na padajući trend CRP-a od primjene



terapije do kontrole nakon 6 mjeseci, te nakon toga rast vrijednosti do početnih razina 12 mjeseci nakon terapije. Unatoč prisutnoj dinamici vrijednosti CRP-a, rezultati nisu statistički znakoviti. S druge strane, evaluacija vizualno-analogne ljestvice za bol pokazala je statistički znakovite rezultate uz tendenciju pada osjećaja bola i u mirovanju i u kretanju tijekom svih 12 mjeseci.

IgG protutijela izolirana su zasebno iz krvi i iz sinovijalne tekućine pacijenata. Analiza profila N-glikozilacije obaju uzoraka IgG-a rađena je netom prije primjene terapije, nakon 6 mjeseci te nakon 12 mjeseci. Evaluacijom rezultata te usporedbom početnih vrijednosti i vrijednosti prilikom kontrole nakon 6 mjeseci, odnosno početnih vrijednosti i vrijednosti prilikom kontrole nakon 12 mjeseci nisu pronađene statistički znakovite promjene u sastavu IgG glikoma.

Rezultati našeg istraživanja sugeriraju da primjena autolognog mikrofragmentiranog masnog tkiva sa stromalnom vaskularnom frakcijom kod pacijenata s OA povećava GAG u hijalinoj hrskavici, što prati smanjenje bola te poboljšanje pokretljivosti promatranih pacijenata.

## RASPRAVA

Kliničko istraživanje provedeno u Specijalnoj bolnici „Sveta Katarina“ (59 – 61) pokazalo je da primjena mikrofragmentiranog masnog tkiva u zglob koljena pacijenata nije povezana s nuspojavama, uključujući i hondrocitnu toksičnost. Ovi se rezultati slažu s dosad provedenim sličnim istraživanjima (62, 63). No, novost u pristupu jest primjena stromalne vaskularne frakcije umjesto izoliranih i uzgojenih stanica. Stromalna vaskularna frakcija opisuje se kao tkivo u kojemu su sve stanice u svojem prirodnom okruženju, bez dodatne biokemijske manipulacije stanica.

Bolesnici koji su sudjelovali u studiji imali su OA koljena III. i IV. stupnja što odgovara stanjima od potpuno uredno konfigurirane hrskavice u određenim dijelovima do potpuno uništene hrskavice s izloženom subhondralnom kosti u drugim dijelovima zglobne plohe. To je omogućilo praćenje učinka terapije na različite stadije bolesti i time pružilo uvid u mogućnosti djelovanja terapije. Početno, u bolesnika je utvrđeno znatno poboljšanje VAS ljestvice 12 mjeseci nakon terapije, bez statistički znakovitih promjena u koncentraciji CRP-a. Nadalje, literatura opisuje dva moguća načina djelovanja MSC-a u liječenju OA

(64, 65). Prvi se način opisuje kao diferencijacija MSC-a u hondrocite. Iako postoje istraživanja koja su dokazala mogućnost diferencijacije matičnih stanica u hondrocite te njihovu produkciju izvanstaničnog matriksa (66, 67), studija nije pokazala da se u područjima potpuno uništene hrskavice uz izloženu subhondralnu kost formirao novi sloj hrskavice nakon 12 mjeseci primjene terapije. Drugi način djelovanja MSC-a u liječenju OA jest parakrina sekrecija bioaktivnih čimbenika. Studija je pokazala da primjena autologne transplantacije mikrofragmentiranog masnog tkiva dovodi do pojačanog odgovora hondrocita i povećane sinteze proteoglikana. Iznimno je važno održati čim veći broj MSC-a i pericita na životu prije primjene u zglob, što se osiguralo tako da su navedene stanice nakon izdvajanja zadržane u svom prirodnom okruženju bez zamrzavanja. To se pokazalo ključnim za dobivanje očekivanog terapijskog odgovora. Jedan od mogućih mehanizama djelovanja jest da MSC i periciti koji se nalaze unutar koljena počinju dobivati informacije iz (za njih) nove mikrosredine te započnu lučenje bioaktivnih čimbenika koji djeluju imunomodulacijski, sprečavaju stvaranje ožiljkastog tkiva i smrt (apoptozu) stanica, potiču stvaranje novih krvnih žila i imaju trofički (regenerativni) učinak (68). Glavni učinak ove terapije izmjeren je metodom dGEMRIC u područjima gdje je prije primjene postojalo rezidualno hrskavično tkivo.

Starenjem i progresijom osteoartitisa dolazi do degradacije hrskavičnih stanica i ekstracelularnog matriksa, ponajviše proteoglikana. Zglobna hrskavica koljena nalazi se pod utjecajem citokina koji potiču katabolične reakcije, odgovorni su za produkciju proteinaza i za smanjenu produkciju agrekana. Smanjena količina GAG-a povezana je sa smanjenim količinama agrekana i slabijom hidracijom zglobne hrskavice, posljedično i sa smanjenom mogućnošću hrskavice da izdrži mehaničko opterećenje (69). Rezultati dobiveni dGEMRIC MRI metodom pokazuju da ova terapijska metoda znatno povećava koncentraciju GAG-a u više od pola provedenih mjerenja, uz klinički znatan pad GAG-a u samo 3,93 % provedenih mjerenja. To je u suprotnosti s očekivanim padom koncentracije GAG-a zbog uobičajene progresije bolesti tijekom vremena (9). Ovi rezultati upućuju na pozitivan terapijski učinak primjene mikrofragmentiranog masnog tkiva.

Općenito, sastav IgG glikoma odgovoran je za razinu upalnog odgovora u kroničnoj upali i na taj način pridonosi uništavanju tkiva (70). Kako bi se procijenili sustavni učinci primijenjene terapije, istraživanje je uključilo analizu IgG gliko-

ma prije primjene terapije, 6 i 12 mjeseci nakon primjene terapije. Usporedba dobivenih rezultata nije pokazala statistički znakovitu promjenu u sastavu IgG glikoma, koja bi se mogla povezati s učinkom terapije. Ključno značenje ovih mjerenja dokaz je da je porast razine proteoglikana specifično vezan kao posljedica za lokalnu primjenu mikrofragmentiranog masnog tkiva. Također, kako je IgG glikom vrlo osjetljiv biomarker upalnih procesa, isključen je i lokalni (sinovijalna tekućina) i sustavni (krvna plazma) upalni proces nakon primjene ove terapijske metode.

Dosad je publicirano više prikaza slučajeva i studija za različite indikacije koje pokazuju poboljšanje nakon primjene MSC-a. Većinom se rezultati svode na subjektivno stanje bolesnika nakon primijenjene terapije. Nedavno provedeno istraživanje u Specijalnoj bolnici „Sveta Katarina“ napravilo je korak naprijed, uključilo najnovije metode dijagnostike osteoartritisu te, uz već prije dokazano subjektivno poboljšanje kod većine pacijenata, objektivno dokazalo koji je rezultat primjene mikrofragmentiranog masnog tkiva u osteoartritisom zahvaćeno koljeno. Uočen porast GAG-a izravno je povezan s kvalitetom hijaline hrskavice, što rezultira i nizom klinički mjerljivih parametara u pacijenata (redukcija bola i povećanje opsega pokreta). Ograničen prostor predviđen za ovaj članak ne dopušta nam prikazati prijedlog dijagnostičkog algoritma koji razvijamo sa svrhom selekcije pacijenata koji ispunjavaju osnovne preduvjete za aplikaciju mikrofragmentiranog masnog tkiva i koji u konačnici može predvidjeti pozitivan ishod liječenja. Uz detaljan klinički pregled, on uključuje i pregled magnetnom rezonancijom, utvrđivanje poremećaja osovine koristeći se panoramskim snimanjem donjih ekstremiteta te utvrđivanje *Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score* (KOOS), mjerenje *The Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Indeks* (WOMAC) i bola koristeći se Vizualno-analognu skalom (VAS) itd. Poseban naglasak stavljamo i na poslijeoperacijsku rehabilitaciju kojoj je cilj rasterećenje zgloba koljena i jačanje muskulature stražnje lože natkoljenice. Istodobno, prema rezultatima randomiziranih dvostruko slijepih kontroliranih multicentričnih ispitivanja, poput onog objavljenog u američkom *National Institutes of Health* (NCT00604539), pacijentima nakon zahvata preporučujemo uzimanje 800 mg hondroitin-sulfata dnevno (71).

Uz sve navedeno, u budućim istraživanjima planiramo utvrditi udio MSC-a u SVF-u, prije svega putem identifikacije za njih specifičnih površinskih biljega

(CD 70, CD 93, CD 105). S druge strane, bilo bi za očekivati i da se još učinkovitiji terapijski učinak navedenog postupka postigne eliminacijom stanica iz SVF-a s površinskim biljezima CD 34 i CD 45 (hematopoetska i leukocitna loza), koje zasigurno tijekom aplikacije u oštećeno tkivo mogu potencirati neželjene učinke poput upale.

## LITERATURA

1. Hunter DJ, Schofield D, Callander E. The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 2014; 10:437-41.
2. Fanghänel J. PF, Anderhuber F, Nitsch R. Waldeyerova anatomija čovjeka. Golden marketing - Tehnička knjiga, Zagreb. 2009.
3. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British medical bulletin* 2008; 87:77-95.
4. Junqueira LC CJ. Osnove histologije. Školska knjiga Zagreb. 2005.
5. Heijink A, Gomoll AH, Madry H, Drobnič M, Filardo G, Espregueira-Mendes J i sur. Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 2012; 20:423-35.
6. Boshuizen HC, Poos MJ, Van den Akker M, van Boven K, Korevaar JC, de Waal MW i sur. Estimating incidence and prevalence rates of chronic diseases using disease modeling. *Population Health Metrics* 2017; 15:13.
7. Roman-Blas JA, Herrero-Beaumont G. Targeting subchondral bone in osteoporotic osteoarthritis. *Arthritis research & therapy* 2014; 16:494.
8. Lotz M, Loeser RF. Effects of aging on articular cartilage homeostasis. *Bone* 2012; 51:241-8.
9. Rahmati M, Nalesso G, Mobasheri A, Mozafari M. Aging and osteoarthritis: Central role of the extracellular matrix. *Ageing research reviews* 2017; 40:20-30.
10. Kurz B, Lemke AK, Fay J, Pufe T, Grodzinsky AJ, Schünke M. Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger* 2005; 187:473-85.
11. Peyron JG AR. Osteoarthritis: Diagnosis and Management. In: Moskowitz RW HD, Goldberg VC, Mankin HJ, ed. *The Epidemiology of Osteoarthritis*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia 1992. p. 15.
12. Aigner T, Schmitz N. Pathogenesis and pathology of osteoarthritis. *Rheumatology* 2011; 5:1741-59.
13. Burrage P, Brinckerhoff C. Molecular targets in osteoarthritis: metalloproteinases and their inhibitors. *Current drug targets* 2007; 8:293-303.
14. van de Loo FA, Joosten LA, van Lent PL, Arntz OJ, van den Berg WB. Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism* 1995; 38:164-72.
15. Fan Z, Bau B, Yang H, Aigner T. IL-1 $\beta$  induction of IL-6 and LIF in normal articular human chondrocytes involves the ERK, p38 and NF $\kappa$ B signaling pathways. *Cytokine* 2004; 28:17-24.

16. Stannus O, Jones G, Cicuttini F, Parameswaran V, Quinn S, Burgess J i sur. Circulating levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults. *Osteoarthritis and cartilage* 2010; 18:1441-7.
17. Clancy R. Nitric oxide alters chondrocyte function by disrupting cytoskeletal signaling complexes. *Osteoarthritis and Cartilage* 1999; 7:399-400.
18. Dumond H, Presle N, Terlain B, Mainard D, Loeuille D, Netter P i sur. Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2003; 48:3118-29.
19. Bonnet C, Walsh D. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology* 2005; 44:7-16.
20. Sakkas LI, Platsoucas CD. The role of T cells in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 2007; 56:409-24.
21. Zhen G, Wen C, Jia X, Li Y, Crane JL, Mears SC i sur. Inhibition of TGF- $\beta$  signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis. *Nature medicine* 2013; 19:704-12.
22. Uygun E, Kilic B, Demiroglu M, Ozkan K, Cift HT. Subchondral bone and its role in osteoarthritis. *Open J Orthopaed* 2015; 5:355-60.
23. Davies-Tuck ML, Wluka AE, Forbes A, Wang Y, English DR, Giles GG i sur. Development of bone marrow lesions is associated with adverse effects on knee cartilage while resolution is associated with improvement - a potential target for prevention of knee osteoarthritis: a longitudinal study. *Arthritis research & therapy* 2010; 12:R10.
24. Felson DT, McLaughlin S, Goggins J, LaValley MP, Gale ME, Totterman S i sur. Bone marrow edema and its relation to progression of knee osteoarthritis. *Annals of internal medicine* 2003; 139:330-6.
25. Hunter DJ, Zhang Y, Niu J, Goggins J, Amin S, LaValley MP i sur. Increase in bone marrow lesions associated with cartilage loss: a longitudinal magnetic resonance imaging study of knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2006; 54:1529-35.
26. Wluka AE, Hanna F, Davies-Tuck M, Wang Y, Bell RJ, Davis SR i sur. Bone marrow lesions predict increase in knee cartilage defects and loss of cartilage volume in middle-aged women without knee pain over 2 years. *Annals of the rheumatic diseases* 2009;68:850-5.
27. Brittberg M, Winalski CS. Evaluation of cartilage injuries and repair. *JBJS* 2003; 85:58-69.
28. Kellgren J, Lawrence J. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Annals of the rheumatic diseases* 1957; 16:494.
29. Natürliche Schöpfungsgeschichte von Dr. Ernst Haeckel, Professor in Jena. Berlin bei Georg Reimer. 1868 S. 568. *Archiv der Pharmazie* 1869; 189:282-3.
30. Henig I, Zuckerman T. Hematopoietic stem cell transplantation-50 years of evolution and future perspectives. *Rambam Maimonides medical journal* 2014; 5:e0028.
31. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997; 88:287-98.
32. Lam AQ, Freedman BS, Bonventre JV. Directed differentiation of pluripotent stem cells to kidney cells. *Seminars in nephrology* 2014; 34:445-61.
33. Chen X, Zeng F. Directed hepatic differentiation from embryonic stem cells. *Protein & cell* 2011; 2:180-8.

34. Ashfaq K, Yahaya I, Hyde C, Andronis L, Barton P, Bayliss S i sur. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of stem cell transplantation in the management of acute leukaemia: a systematic review. *Health technology assessment (Winchester, England)* 2010; 14:1-141.
35. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126:663-76.
36. Diecke S, Jung SM, Lee J, Ju JH. Recent technological updates and clinical applications of induced pluripotent stem cells. *The Korean journal of internal medicine* 2014; 29:547-57.
37. Madonna R. Human-induced pluripotent stem cells: in quest of clinical applications. *Molecular biotechnology* 2012; 52:193-203.
38. Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L, Shi YF. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta pharmacologica Sinica* 2013; 34:747-54.
39. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med* 2013; 45:e54.
40. Caplan AI, Hariri R. Body Management: Mesenchymal Stem Cells Control the Internal Regenerator. *Stem cells translational medicine* 2015; 4:695-701.
41. Bobryshev YV, Orekhov AN, Chistiakov DA. Vascular stem/progenitor cells: current status of the problem. *Cell and tissue research* 2015; 362:1-7.
42. Gokcinar-Yagci B, Uckan-Cetinkaya D, Celebi-Saltik B. Pericytes: Properties, Functions and Applications in Tissue Engineering. *Stem cell reviews* 2015; 11:549-59.
43. Chang L, Nguyen V, Nguyen A, Scott MA, James AW. Pericytes in sarcomas of bone. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 2015; 32:202.
44. Nordberg RC, Lobo EG. Our Fat Future: Translating Adipose Stem Cell Therapy. *Stem cells translational medicine* 2015; 4:974-9.
45. Houra KP, Darko; Hudetz, Damir; Radić, Andrej; Rod, Eduard; Borić, Igor; Prpić Vučković, Renata; Skok, Ira; Granec, Darija; Mikula, Ivan; Skelin, Andrea; Lauc, Gordan; Škaro, Vedrana; Primorac, Dragan. Personalizirana medicina u modernoj radiologiji, neurologiji, neurokirurgiji, ortopediji, anesteziologiji, fizikalnoj medicini i rehabilitaciji te pedijatriji: Model Specijalne bolnice Sv. Katarina. *Paediatrica Croatica Supplement* 2016; 60:1-17.
46. Riordan NH, Ichim TE, Min WP, Wang H, Solano F, Lara F i sur. Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *Journal of translational medicine* 2009; 7:29.
47. Schipper HS, Prakken B, Kalkhoven E, Boes M. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2012; 23:407-15.
48. Tremolada C, Beltrami G, Magri A, Bianchi F, Ventura C, Di Vito C i sur. Adipose mesenchymal stem cells and „regenerative adipose tissue graft“ (Lipogems®) for musculoskeletal regeneration. *Eur J Musculoskeletal Dis* 2014; 3:57-67.
49. Schreiner MM, Mlynarik V, Zbýň Š, Szomolanyi P, Apprich S, Windhager R i sur. New Technology in Imaging Cartilage of the Ankle. *Cartilage* 2017; 8:31-41.
50. Eagle S, Potter HG, Koff MF. Morphologic and quantitative magnetic resonance imaging of knee articular cartilage for the assessment of post-traumatic osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research* 2017; 35:412-23.
51. Tiderius CJ, Olsson LE, Nyquist F, Dahlberg L. Cartilage glycosaminoglycan loss in the acute phase after an anterior cruciate ligament injury: Delayed gadolinium-enhanced magnetic

- resonance imaging of cartilage and synovial fluid analysis. *Arthritis & Rheumatology* 2005; 52:120-7.
52. Young AA, Stanwell P, Williams A, Rohrsheim JA, Parker DA, Giuffre B i sur. Glycosaminoglycan content of knee cartilage following posterior cruciate ligament rupture demonstrated by delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of cartilage (dGEMRIC). *JBJS Case Connector* 2005; 2763-7.
  53. Williams A, Gillis A, McKenzie C, Po B, Sharma L, Micheli L i sur. Glycosaminoglycan distribution in cartilage as determined by delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage (dGEMRIC): potential clinical applications. *American Journal of Roentgenology* 2004; 182:167-72.
  54. Burstein D, Velyvis J, Scott KT, Stock KW, Kim YJ, Jaramillo D i sur. Protocol issues for delayed Gd (DTPA) 2-enhanced MRI (dGEMRIC) for clinical evaluation of articular cartilage. *Magnetic Resonance in Medicine* 2001; 45:36-41.
  55. Tiderius CJ, Olsson LE, Leander P, Ekberg O, Dahlberg L. Delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage (dGEMRIC) in early knee osteoarthritis. *Magnetic resonance in medicine* 2003; 49:488-92.
  56. Klein A. Human total serum N-glycome. *Advances in clinical chemistry* 2008; 46:51-85.
  57. Lauc G, Pezer M, Rudan I, Campbell H. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 2016; 1860:1574-82.
  58. Drake PM, Cho W, Li B, Prakobphol A, Johansen E, Anderson NL i sur. Sweetening the pot: adding glycosylation to the biomarker discovery equation. *Clinical chemistry* 2010; 56:223-36.
  59. Hudetz D, Borić I, Rod E, Jeleč Ž, Radić A, Vrdoljak T i sur. The Effect of Intra-articular Injection of Autologous Microfragmented Fat Tissue on Proteoglycan Synthesis in Patients with Knee Osteoarthritis. *Genes* 2017; 8:270.
  60. Hudetz D BI, Rod E, Jeleč Ž, Radić A, Vrdoljak T, Sklein A, Lauc G, Trbojević Akmačić I, Plečko M, Polašek O, Primorac D A year follow-up study of AdMSC therapy in patients with knee osteoarthritis. 10th ISABS Conference of Forensic and Anthropological Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, Dubrovnik, Book of abstracts page 203. 2017.
  61. Hudetz D, Vrdoljak T, Borić I, Primorac D. One year clinical experience with Lipogems in treating musculoskeletal disorders-Hip, knee and Achilles tendon. *Lipogems day: Regenerative medicine in orthopedics*, Warsaw, Poland. 2017.
  62. Jo CH, Lee YG, Shin WH, Kim H, Chai JW, Jeong EC i sur. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem cells* 2014; 32:1254-66.
  63. Pers Y-M, Rackwitz L, Ferreira R, Pullig O, Delfour C, Barry F i sur. Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem cells translational medicine* 2016; 5:847-56.
  64. Barry F, Murphy M. Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nature Reviews Rheumatology* 2013; 9:584-94.
  65. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of cellular biochemistry* 2006; 98:1076-84.
  66. Mokbel AN, El Tookhy OS, Shamaa AA, Rashed LA, Sabry D, El Sayed AM. Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model. *BMC musculoskeletal disorders* 2011; 12:259.

67. Sato K, Moy O, Peimer C, Nakamura T, Howard C, Ko S i sur. An experimental study on costal osteochondral graft. *Osteoarthritis and Cartilage* 2012; 20:172-83.
68. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell stem cell* 2011; 9:11-5.
69. Roughley PJ, Mort JS. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. *Journal of experimental orthopaedics* 2014; 1:8.
70. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E i sur. Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000; 908:244-54.
71. Wildi ML, Raynauld JP, Martel-Pelletier J, Beaulieu, A, Bessette L, Morin F, Abram F, Dorais M, Pelletier JP. Chondroitin sulphate reduces both cartilage volume loss and bone marrow lesions in knee osteoarthritis patients starting as early as 6 months after initiation of therapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled pilot study using MRI. *Ann Rheum Dis* 2011; 70:982-989.