

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Γενετική-επιγενετική συμμετοχή στην πρόωξη των καταγμάτων »**

**ΑΚΡΙΒΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ**

**ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΟΣ ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΗΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΕΖΟΥ, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Επιβλέπουσα**

**ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Μέλος**

**ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, Επικουρη Καθηγήτρια, Κυτταρικής Βιολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Μέλος**

**ΛΑΡΙΣΑ 2022**

## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	6
1.1. Η διαδικασία της οστικής πάρωσης.....	6
1.2. Τύποι και στάδια οστικής πάρωσης.....	6
1.3. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οστική πάρωση.....	7
1.4. Ψευδάρθρωση.....	8
1.4.1. Τύποι ψευδάρθρωσης και παράγοντες που σχετίζονται με ψευδάρθρωση.....	8
2. Ρόλος των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (BMPs) και των ανταγωνιστών τους στην οστική πάρωση.....	9
2.1. Η οικογένεια των BMP πρωτεϊνών, λειτουργία και δράση τους.....	9
2.2. Δράση των BMPs στα στάδια της οστικής πάρωσης.....	10
2.3. BMP ανταγωνιστές.....	10
2.4. Η πρωτεΐνη BMP-2 στα κατάγματα.....	11
2.5. rhBMP-6 και οστικά ελλείμματα.....	12
2.6. BMP-7 και κατάγματα.....	12
2.7. Η πρωτεΐνη Noggin στον οστικό μεταβολισμό.....	14
2.8. Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών Gremlin και Chordin – ανταγωνιστών των BMP - προκαλεί μείωση στην οστεογενετική ικανότητα των MSCs.....	14
3. SMAD6 και οστικός μεταβολισμός.....	15
4. Ο ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (HGF) στην οστική πάρωση.....	15
4.1. Η δομή του παράγοντα HGF.....	15
4.2. Χρήση του HGF σε οστικά ελλείμματα.....	16
5. Ο ρόλος των πεπτιδίων που σχετίζονται με το γονίδιο της καλσιτονίνης (calcitonin gene-related peptide (CGRP) στην οστική πάρωση.....	17
5.1. Η οστική πάρωση και αCGRP.....	18
6. Πολυμορφισμοί γονιδίων που σχετίζονται με την πάρωση των καταγμάτων/ψευδάρθρωση.....	21

6.1. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο BMP-4 .....	21
6.2. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο Noggin .....	21
6.3. Πολυμορφισμοί του γονιδίου SMAD6.....	22
6.4. Πολυμορφισμός στο γονίδιο CYR61 .....	22
6.5. Πολυμορφισμός στο γονίδιο της Nitric oxide synthase 2 (NOS2) και ψευδάρθρωση .....	23
7. Μικρά μη κωδικά RNA και οστική πόρωση .....	24
7.1. miRNA.....	24
7.2. miRNA και οστική πόρωση: in vitro μελέτες.....	24
7.3. miRNA και οστική πόρωση: in vivo μελέτες .....	25
7.4. miRNAs ως διαγνωστικοί δείκτες.....	29
7.5. miRNAs ως θεραπευτικά μόρια .....	30
7.5.1. Το miR-26a προάγει την οστική πόρωση μέσω της στόχευσης του SOSTDC1 .....	30
7.5.2 Το miR-381 ως ρυθμιστής της διαφοροποίησης μεσεγχυματικών κυττάρων (MSCs) προς οστεοβλάστες.....	31
7.6. Κυκλοφορούντα miRNAs και οστική πόρωση.....	33
8. Πιθανοί βιοδείκτες για οστική πόρωση .....	34
9. Θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	35
9.1. In vivo γονιδιακή θεραπεία .....	37
9.2. Ex vivo γονιδιακή θεραπεία .....	40
10. Συμπεράσματα.....	43
11.Βιβλιογραφία .....	44

## Περίληψη

Η πάρωση των καταγμάτων είναι ένα μείζων ζήτημα που απασχολεί ειδικούς σε παγκόσμιο επίπεδο, κυρίως λόγω των επιπλοκών που μπορούν να προκύψουν στην εξέλιξη της. Η καθυστερημένη πάρωση και η ψευδάρθρωση συμβαίνουν σε ένα ποσοστό 10-15% των καταγμάτων των μακρών οστών. Ο μηχανικός παράγοντας αποτελεί μια βασική αιτία για την ανάπτυξη της, ωστόσο τα δεδομένα πλέον δείχνουν ότι υπάρχει γενετική και επιγενετική συμμετοχή.

Βασικά γονίδια που συμμετέχουν στην οστική πάρωση είναι αυτά των μορφογενετικών οστικών πρωτεϊνών και (BMP) και των ανταγωνιστών τους. Πολυμορφισμοί στα γονίδια αυτά, σχετίζονται με την εμφάνιση ψευδάρθρωσης. Επίσης οι αλλαγές στα επιπέδα των BMP πρωτεϊνών μπορεί να επηρεάσουν τη σύνθεση νέου οστού. Πολυμορφισμοί που σχετίζονται με την ανάπτυξη ψευδάρθρωσης διαπιστώθηκαν και στα γονίδια *SMAD6*, *CYR61* και *NOS2*. Το νευροπεπτίδιο  $\alpha$ CGRP και ο αυξητικός παράγοντας HGF φαίνεται ότι ενισχύουν τη διαδικασία της πάρωσης.

Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της οστικής πάρωσης έχει και η επιγενετική και συγκεκριμένα τα μικρά μη κωδικά RNA (miRNAs). Τα miRNAs είναι μη κωδικά μόρια RNA που μπορούν να προάγουν αλλά και να αναστείλουν την διαδικασία της πάρωσης. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί διαγνωστικοί δείκτες για τη ψευδάρθρωση, ενώ έχουν και το πλεονέκτημα της ανίχνευσής τους στη κυκλοφορία.

Τα δεδομένα δείχνουν ότι τόσο οι BMP πρωτεΐνες όσο και τα miRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανά θεραπευτικά μόρια για την αντιμετώπιση των ψευδαρθρώσεων.

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι να συγκεντρώσει τη διαθέσιμη βιβλιογραφία και να παρουσιάσει το ρόλος των παραγόντων που συμβάλλουν στην οστική πάρωση, τα γονίδια που προδιαθέτουν στην εμφάνιση οστικής πάρωσης, καθώς επίσης και τα μικρά μη κωδικά RNA που θα μπορούσαν να αναδειχθούν σαν πιθανοί διαγνωστικοί δείκτες ή θεραπευτικοί στόχοι.

Η αναζήτηση των εργασιών πραγματοποιήθηκε στην βάση δεδομένων PubMed Medline, όπου και χρησιμοποιήθηκαν όλα τα διαθέσιμα σχετικά άρθρα.

Οι λέξεις – κλειδιά ήταν: nonunion, non-union, fracture healing, genetics, epigenetics μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό.

## **Abstract**

Fracture healing is a major issue for specialists globally, mainly because of the severe complications that can occur on its course. Delayed union and non-union occurs in 10-15% of the fractures of the long bones. The mechanical factor is considered one of the basic causes for non-union, but literature demonstrates that there is a genetic and epigenetic component.

Polymorphisms in bone morphogenetic proteins (*BMPs*), their antagonists and *SMAD6*, *CYR61* and *NOS2* genes have been associated with the development of non-union. In addition, it has been reported that changes in expression levels of BMP proteins, neuropeptide  $\alpha$ CGRP and growth factor HGF may affect bone healing.

Epigenetics and more specifically small non-coding RNAs (miRNAs) play a key role in fracture healing. miRNAs, are small non-coding RNAs that can promote or suspend fracture healing and are also investigated as potential diagnostic markers for non-union. miRNAs offer the advantage that and can also be found in circulation.

Literature supports that BMP proteins and miRNAs can be used as possible therapeutic targets for treating non-union.

The aim of the present Master thesis is to collect the existing literature and demonstrate the role of proteins, gene polymorphisms as well as miRNAs that affect bone healing and find molecules and identify potential a diagnostic markers or therapeutic targets.

For this reason, a search was conducted in the online database of Pubmed Medline using the key words -nonunion, non-union, fracture healing, genetics, epigenetics.

## **1. Εισαγωγή**

### **1.1. Η διαδικασία της οστικής πώρωσης**

Η οστική πώρωση είναι μια πολύπλοκη και καλά οργανωμένη φυσιολογική διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει διαδικασίες της οστικής ανάπτυξης του εμβρύου, σε συνδυασμό με διαδικασίες της φυσιολογικής απόκρισης του οργανισμού στην οξεία ιστική βλάβη.<sup>1</sup> Περικλείει πολλαπλά βιολογικά φαινόμενα και έχει διαμορφωθεί από το συνδυασμό οστεοκαθοδηγητικών (σχηματισμό ικριωμάτων), οστεοεπαγωγικών (κυτταρική απάντηση, η οποία ελέγχεται από πολλαπλά σηματοδοτικά μόρια) και οστεογενεσιακών (σχηματισμός νέου οστού) μηχανισμών.<sup>2</sup> Σε αντίθεση με τον σχηματισμό ίνωσης(ουλής), που συμβαίνει στην πλειοψηφία των άλλων ειδών ιστού που υπάρχουν στους ενήλικες, το οστόν έχει την ικανότητα να επιδιορθώνεται και να αναγεννάται, ανακτώντας έτσι τις προηγούμενες εμβιομηχανικές και βιοχημικές του ιδιότητες.<sup>3</sup> Κατά τη διαδικασία της οστικής πώρωσης, μια καλά ρυθμισμένη αλληλουχία σταδίων λαμβάνει χώρα στο περίοστεο, στο φλοιώδες οστόν, στο μυελό των οστών και στο μη διαφοροποιημένο ιστό που περιβάλλει το κάταγμα.<sup>4</sup>

### **1.2. Τύποι και στάδια οστικής πώρωσης**

Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι οστικής πώρωσης.<sup>5</sup> Η πρωτογενής (άμεση) οστική πώρωση ή πρωτογενής πώρος, η οποία πραγματοποιείται όταν υπάρχει ανατομική ανάταξη, σε συνθήκες σχεδόν απόλυτης μηχανικής σταθερότητας.<sup>6</sup> Η οστική πώρωση, σε αυτή την περίπτωση γίνεται με την αναγέννηση του Αμβέρσιου συστήματος και του πεταλιώδους οστού, με αποτέλεσμα να μην απαιτείται στη συνέχεια ανακατασκευή του οστού.<sup>7</sup> Στον αντίποδα η δευτερογενής (έμμεση) οστική ανάπτυξη ή δευτερογενής πώρος, που σχηματίζεται στη συντριπτική πλειοψηφία των κλινικών περιστατικών στηρίζεται στο σχηματισμό του ινοχόνδρινου πώρου.<sup>8</sup>

Η διαδικασία της οστικής πώρωσης, μπορεί να διαιρεθεί σε πέντε στάδια: στο στάδιο του σχηματισμού του αιματώματος, της φλεγμονής, του σχηματισμού του μαλακού πώρου (ινοχόνδρινου πώρου), του σκληρού πώρου(πεταλιώδες οστόν) και της ανακατασκευής.<sup>9</sup> Μετά από έναν οστικό τραυματισμό, η οστική συνέχεια του οστού και η αρχιτεκτονική του διαταράσσονται, καθώς επίσης και τα περιβαλλόμενα μαλακά μόρια. Η οστική παρεκτόπιση προκαλεί ρήξη στα αγγεία της περιοχής, αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός τοπικού αιματώματος και την ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης.<sup>10</sup> Το αιμάτωμα περιέχει κύτταρα τα οποία προέρχονται από την κυκλοφορία και το μυελό των οστών.<sup>6</sup> Το αιμάτωμα συγκεκριμένα, περιλαμβάνει φλεγμονώδη κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως είναι τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, επιπλέον αυτών των κυττάρων

περιλαμβάνει ινοβλάστες και μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα. Προσταγλανδίνες, κυτοκίνες και άλλες πρωτεΐνες που είναι άφθονες στο περιβάλλον, συνεισφέρουν στο σχηματισμό ενός σύνθετου μικροπεριβάλλοντος το οποίο έχει της κατάλληλες συνθήκες για την εξέλιξη της πώρωσης. Οι παράγοντες αυτοί, θεωρούνται υπεύθυνοι για την αύξηση της μετανάστευσης κυττάρων, της ενίσχυσης της οστεογένεσης, της σύνθεσης κολλαγόνου και της αγγειογένεσης.<sup>3</sup> Στη συνέχεια, το αιμάτωμα το οποίο έχει δημιουργηθεί στην εστία του κατάγματος σταδιακά αντικαθίσταται από ινώδη ιστό, αφού πρώτα έχουν απομακρυνθεί τα νεκρά ή και τα τραυματισμένα τμήματα του οστού. Αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε χονδροβλάστες, οστεοβλάστες, οστεοκύτταρα και οστεοκλάστες, οδηγώντας στην εναπόθεση κολλαγόνου και στο σχηματισμό ινώδους πόρου, διεργασία η οποία είναι φανερή στο εσωτερικό τμήμα του περιστέου. Ο σχηματισμός οστού, στη συνέχεια πραγματοποιείται είτε μέσω ενδομεμβανώδους είτε μέσω ενδοχόνδριας οστεοποίησης. Αρχικά πρωτογενές (ανώριμο) δικτυωτό οστόν σχηματίζεται, το οποίο χαρακτηρίζεται από τυχαία διάταξη ινών κολλαγόνου και το οποίο σταδιακά μετατρέπεται σε δευτερογενές (ώριμο) πεταλιώδες οστόν, όπου έχουμε πλέον παράταξη των ινών κολλαγόνου παράλληλα σε πέταλα. Η μετατροπή αυτή, είναι μια διαδικασία που απαιτεί χρόνο και επαναλαμβάνεται από μήνες έως και χρόνια και οδηγεί τελικά στην οστική ανακατασκευή του οστού, όπου τόσο η οστεοβλαστική όσο και η οστεοκλαστική δραστηριότητα είναι έντονη και η απορρόφηση του οστού ακολουθείται από παραγωγή νέου οστού.<sup>7</sup>

### **1.3. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οστική πώρωση**

Με σκοπό τη διερεύνηση της οστικής πώρωσης, μελέτες προσπαθούν να προσδιορίσουν τη λειτουργία διαφόρων πρωτεϊνών που εκκρίνονται κατά την διαδικασία αυτή, όπως είναι η αλκαλική φωσφατάση, η οστεονεκτίνη, η οστεοποντίνη, η οστεοκαλσίνη και η σιαλοπρωτεΐνη οστού. Η αλκαλική φωσφατάση είναι μια πολύ σημαντική πρωτεΐνη, η οποία παράγεται από τους οστεοβλάστες ως απόκριση στη οστεογενετική δραστηριότητα και αντιπροσωπεύει ένα δείκτη για τα πρώιμα στάδια της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης.<sup>11</sup> Η οστεονεκτίνη, η οστεοποντίνη και η οστεοκαλσίνη είναι μη κολλαγονικές πρωτεΐνες της μεσοκυττάριας ουσίας του οστού και βρίσκονται σε αφθονία στον οστίτη ιστό.<sup>12</sup> Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες θεωρείται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην οστική ανάπτυξη, στη πώρωση, καθώς και στη ψευδάρθρωση των καταγμάτων και μαζί με το μεταγραφικό παράγοντα Sp7(Osterix), αντιπροσωπεύουν δείκτες για τα αψότερα στάδια της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης.<sup>13</sup> Η οστική σιαλοπρω-

τείνη είναι μια εξωκυττάρια πρωτεΐνη της μεσοκυττάριας ουσίας η οποία παράγεται από τα οστεοβλαστικά κύτταρα και ρυθμίζει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση και οστεοποίηση.<sup>14</sup>

#### **1.4. Ψευδάρθρωση**

Η διαδικασία της πώρωσης, εξαρτάται από πολυάριθμους ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες, οι οποίοι βρίσκονται σε μια λεπτή ισορροπία, που εάν διαταραχθεί μπορεί να οδηγήσει σε επιπλοκές όπως είναι η καθυστερημένη πώρωση και η ψευδάρθρωση. Ο ορισμός της ψευδάρθρωσης ορίζεται ως η απουσία πώρωσης μέσα σε εννέα(9) μήνες μαζί με την απουσία της ακτινολογικής εξέλιξης του πώρου στην εστία του κατάγματος για τρεις (3) συνεχόμενους μήνες.<sup>15</sup> Μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής εκτιμάται ότι το 5-10% όλων των καταγμάτων επιπλέκονται είτε με καθυστέρηση στην πώρωση είτε με ψευδάρθρωση, έχοντας έτσι ένα τεράστιο οικονομικό αντίκτυπο στο σύστημα υγείας.<sup>16</sup> Η κνήμη και το μηριαίο είναι τα οστά τα οποία συχνότερα σχετίζονται με ψευδάρθρωση.<sup>17</sup>

##### **1.4.1. Τύποι ψευδάρθρωσης και παράγοντες που σχετίζονται με ψευδάρθρωση**

Η ψευδάρθρωση, σύμφωνα με ακτινολογικά και ιστολογικά κριτήρια μπορεί να χαρακτηριστεί είτε ως υπερτροφική, συνήθως ως αποτέλεσμα ανεπαρκούς σταθεροποίησης στην εστία του κατάγματος είτε ως ατροφική, όπου η σταθεροποίηση του κατάγματος είναι επαρκής αλλά υπάρχει τοπική δυσλειτουργία στη βιολογική δραστηριότητα.<sup>18</sup>

Η εξέλιξη ενός κατάγματος σε ψευδάρθρωση, είναι μια διαδικασία στην οποία εμπλέκονται πολυάριθμοι παράγοντες. Παράγοντες κινδύνου που έχουν συνδεθεί με διαταραχή στην οστική πώρωση, μπορούν να διαχωριστούν είτε σε παράγοντες που είναι εξαρτημένοι από τους ασθενείς όπως είναι η ηλικία, το φύλο, οι συνυπάρχουσες παθήσεις, το κάπνισμα και η φαρμακευτική αγωγή, είτε σε παρόγοντες ανεξάρτητες από τους ασθενείς, όπως είναι ο χαρακτήρας του κατάγματος, η παρουσία λοίμωξης και η χειρουργική τεχνική.<sup>19</sup>

Η ακριβής βιολογική διαδικασία που μπορεί να οδηγήσει σε ψευδάρθρωση παραμένει ασαφής και είναι γενικώς αποδεκτό ότι οποιαδήποτε παρέμβαση με σκοπό να αναστρέψει αυτή τη διαδικασία πρέπει να πραγματοποιηθεί στο κατάλληλο χρόνο και στόχο, ώστε να επαναφέρει τόσο τις βιολογικές όσο και τις μηχανικές ανεπάρκειες.<sup>20</sup>



## **2. Ρόλος των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (BMPs) και των ανταγωνιστών τους στην οστική πόρωση**

### **2.1. Η οικογένεια των BMP πρωτεϊνών, λειτουργία και δράση τους**

Οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMPs) είναι παράγοντες ανάπτυξης με πολλές λειτουργίες, που ανήκουν στην υπεροικογένεια των αυξητικών παραγόντων μετατροπής β (TGFB). Έχουν αναγνωριστεί περισσότερες από τριάντα(30) διαφορετικές BMPs με βάση τις δομικές τους ομοιότητες. Οι BMPs που διεγείρουν την παραγωγή οστού χωρίζονται σε αρκετές υποκατηγορίες με βάση την ομοιογένεια της ακολουθίας των αμινοτελικών τους άκρων: BMP2/BMP4, BMP5/BMP6/BMP7, BMP9/BMP10 και BMP12/BMP13/BMP14.<sup>21</sup> Οι BMPs παρέχουν μορφογενετικά σήματα για την ανάπτυξη του σκελετού και είναι υπεύθυνες για την πόρωση των καταγμάτων, ενεργοποιώντας ένα καταρράκτη κυτταρικών μονοπατιών που σχετίζεται με τη παραγωγή οστού και κατά την εμβρυϊκή ηλικία. Η διέγερση για το σχηματισμό νέου οστού, γίνεται μέσω της διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων σε ώριμους οστεοβλάστες και χονδροβλάστες. Η διαμεσολάβηση για τη διέγερση των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων γίνεται από πρόωρα κύτταρα που συναντώνται γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία και τους συνδετικούς ιστούς, για την διαδικασία αυτή δεν απαιτείται η παρουσία των οστεοκλαστών. Η βιολογική απάντηση στις BMP εξαρτάται από το τοπικό μικροπεριβάλλον και τον τύπο των κυττάρων που τις περιβάλλουν. Οι BMP είναι πιο αποτελεσματικές σε περιβάλλον με αφθονία πολυδύναμων βλαστοκυττάρων.<sup>22</sup>

Μετά από ενζυμική διάσπαση από Furin-like πρωτεάσες, οι pro-BMPs μετατρέπονται στην ενεργή μορφή τους, η οποία αποτελείται από δύο μονομερή, συνδεδεμένα με ένα δυσουλφιδικό δεσμό. Η τριμερής δομή της ώριμης μορφής είναι τυπική για τα μέλη της TGF οικογένειας και προσομοιάζει ένα αριστερό χέρι με ένα κεντρικό μόριο κυστεΐνης από το οποίο επεκτείνονται δύο δάκτυλα. Οι BMP εκφράζουν τη βιολογική δραστηριότητά τους μέσω της σύνδεσης τους σε υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, οι οποίοι αποτελούνται από τετραμερή σύμπλοκα. Τα τετραμερή σύμπλοκα αποτελούνται από δύο τύπου I και δύο τύπου II διαμεμβρανικούς υποδοχείς.<sup>23</sup> Οι BMPs συνδέονται στους τύπου I διαμεμβρανικούς υποδοχείς με μεγαλύτερη συγγένεια σε σύγκριση με τους τύπου II. Μετά τη σύνδεση των BMPs, η ενεργοποιημένη περιοχή της κινάσης του υποδοχέα τύπου II φωσφορυλιώνει την κυτταροπλασματική ουρά του τύπου I υποδοχέα και στη συνέχεια ο υποδοχέας τύπου I φωσφορυλιώνει τα Smads1/5/8. Τα φωσφορυλιωμένα Smads διαμορφώνουν στην συνέχεια ένα σύμπλοκο με Smad4 και μεταναστεύουν στο πυρήνα, όπου σε συνδυασμό με άλλους πυρηνικούς παράγοντες συνδέονται σε συγκεκριμένες θέ-

σεις του DNA, την περιογή των υποκινητών των BMP γονιδίων ρυθμίζοντας με αυτό το τρόπο τη μεταγραφή τους.<sup>24</sup>

## 2.2. Δράση των BMPs στα στάδια της οστικής πάρωσης

Οι BMP 2,4 και 7 αυξάνονται σε μεγάλο βαθμό κατά τη διάρκεια της ενδομεμβρανώδους οστεοποίησης γύρω από το τραυματισμένο περίοστεο. Στο στάδιο αυτό έχουμε και μεγάλη συγκέντρωση από μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSC), τα οποία μέσω των BMPs διαφοροποιούνται σε χονδροβλάστες και οστεοβλάστες, Η BMP2 εκκινεί το καταρράκτη της οστικής πάρωσης, με την έκφραση του mRNA του να φτάνει το μέγιστο σημείο 24 ώρες μετά τον τραυματισμό, επίσης ρυθμίζει την έκφραση άλλων BMPs.<sup>25</sup> Οι BMP 3,4,7 και 8 εκφράζονται στο οστεογενετικό στάδιο της οστικής πάρωσης, όταν η απορρόφηση του οστεοποιημένου αρθρικού χόνδρου και ο σχηματισμός νέου οστού είναι πιο έντονος. Οι BMP5 και BMP6 εκφράζονται από την ημέρα 3 μέχρι την ημέρα 21 κατά την πάρωση, γεγονός που υποδεικνύει ότι μεσολαβούν τόσο στην ενδομεμβρανώδη όσο και στην ενδοχόνδρια οστεοποίηση. Παρόλου που η BMP8 έχει υψηλό οστεογενετικό δυναμικό, οι BMP2, BMP6 και BMP9 είναι οι πιο ισχυροί επαγωγοί της διαφοροποίησης των MSCs σε οστεοβλάστες, ενώ οι υπόλοιπες BMPs κυρίως διεγείρουν την ωρίμανση των οστεοβλαστών. Οι οστεοκλάστες δεν παρουσιάζουν σημαντική έκφραση BMPs, με εξαίρεση την BMP3, η οποία γενικώς θεωρείται ότι είναι ανταγωνιστής στην δράση των BMP. Οι υποδοχείς BMPR-IA και BMPR-IB είναι παρόντες σε όλα τα κύτταρα που σχετίζονται με την οστική πάρωση και κυρίως στους ινοβλάστες, τους οστεοβλάστες, τους χονδροβλάστες και τους οστεοκλάστες, ενώ οι υποδοχείς BMPR-II είναι παρόντες σε μικρότερο βαθμό τόσο στους οστεοβλάστες και όσο και στον αρθρικό ιστό. Η BMPR14 παρουσίασε την ισχυρότερη παρουσία σε κατάγματα μακρών οστών με καθυστερημένη πάρωση, εξαιτίας της καθυστέρησης της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων.<sup>26</sup>

## 2.3. BMP ανταγωνιστές

Η ενδογενής δραστηριότητα των BMPs είναι στενά ελεγχόμενη και ρυθμιζόμενη αρνητικά, *in vivo*, από μια ομάδα εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων μορίων, που είναι γνωστά ως φυσικοί BMP ανταγωνιστές. Μερικοί ανταγωνιστές επάγονται από τα σήματα ενεργοποίησης των BMP, γεγονός που υποδεικνύει την παρουσία ενός κύκλου ανατροφοδότησης, μέσω του οποίου ασκείται η δραστηριότητα των BMPs.<sup>27</sup> Οι BMP ανταγωνιστές διαχωρίζονται σε τρεις διαφορετικούς διακριτούς τύπους:

- 1) ως ανταγωνιστές που δρουν στον εξωκυττάριο χώρο μέσω της άμεσης σύνδεσης με τους στόχους τους,
- 2) ως διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως ο BAMBI,
- 3) ως ενδοκυττάριοι αρνητικοί ρυθμιστές του σήματος των BMP, όπως είναι οι I-SMAD (Smad 6 και Smad 7).

Οι εξωκυττάριοι BMP ανταγωνιστές είναι γλυκοπρωτεΐνες με χαρακτηριστικό μοτίβο κυστεϊνικών δεσμών και διαχωρίζονται περαιτέρω σε τρεις υποκατηγορίες: την οικογένεια Dan, την οικογένεια γαστριδίωσης και την οικογένεια chordin και noggin. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες δρουν σαν επικρατώντες αρνητικοί ψευδουποδοχείς που σχετίζονται με τους τύπου II BMP υποδοχείς αλλά έχουν έλλειψη ενός ενδοκυττάριου τμήματος κινάσης ικανό για τη μεταγωγή του σήματος. Οι I-SMAD δεσμεύονται με τον υποδοχέα Smad 1/5/8 και εμποδίζουν τη σύνδεση του με το Smad4.<sup>28</sup>

#### **2.4. Η πρωτεΐνη BMP-2 στα κατάγματα**

Το γονίδιο BMP-2 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 20p12, περιέχει 2 εξώνια με μια κωδική περιοχή από 1191 νουκλεοτίδια και παράγει τη BMP πρωτεΐνη αποτελούμενη από 396 αμινοξέα που επάγει το σχηματισμό οστού και χόνδρου. Έχει αποδειχθεί ότι η BMP-2 είναι κρίσιμο συστατικό για την φυσιολογική πόρωση. Η ολική απώλεια της πρωτεΐνης BMP-2 μπορεί να είναι θανατηφόρα, ωστόσο σε τρανς-γενετικά ποντίκια στα οποία το γονίδιο της BMP-2 απενεργοποιήθηκε πριν την σκελετική ανάπτυξη, αναπτύχθηκαν αυθόρμητα κατάγματα τα οποία δεν υποχώρησαν με το πέρασμα του χρόνου. Συγκεκριμένα φαίνεται ότι μπλοκάρονται μονοπάτια στα αρχικά στάδια της πόρωσης επί απουσίας της πρωτεΐνης BMP-2 και τα MSCs στην εστία του κατάγματος δεν διαφοροποιούνται με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ψευδάρθρωσης. Μελέτη που περιελάμβανε 420 ασθενείς έδειξε 44% μείωση στην πιθανότητα για ψευδάρθρωση, μείωση στη πιθανότητα για δεύτερη χειρουργική παρέμβαση, μείωση στις λοιμώξεις και μείωση στο χρονικό διάστημα στο οποίο επήλθε η πόρωση, σε ασθενείς που έλαβαν BMP-2(1.50 mg/ml) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.<sup>29</sup> Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε ποντίκια όπου μια υποδόρια έγχυση από BMP-2 επιτάχυνε την πόρωση των καταγμάτων. Επίσης η χρήση του rhBMP-2 μαζί με ενδομυελικό ήλο για την αντιμετώπιση καταγμάτων, μειώνει τη πιθανότητα για αποτυχία στη πόρωση του κατάγματος και τις παρεμβάσεις σε δεύτερο χρόνο.<sup>30</sup> Η rhBMP2, έπειτα από την έγκριση από τον FDA, χρησιμοποιήθηκε για την αντιμετώπιση ανοιχτών καταγμάτων κνήμης διάφορων τύπων σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Gustilo-Anderson, σε μια μεγάλη τυχαίοποιημένη κλινική δοκιμή που περιλάμβανε 450 ασθενείς. Έπειτα από ένα χρόνο παρακο-

λούθησης, η BMP -2 στην υψηλότερη δόση(1.5 mg/ml) ενίσχυσε την οστική πώρωση και μείωσε τον αριθμό των παρεμβάσεων σε σχέση με τους ασθενείς που αντιμετωπίστηκαν με το συνήθη τρόπο. Μεγάλο μειονέκτημα αυτής της μελέτης ήταν ότι οι χειρουργοί γνώριζαν ποιοι ασθενείς είχαν λάβει rhBMP2.<sup>29</sup> Ωστόσο η χρήση της BMP-2 μπορεί να συνοδεύεται και από κάποιες ανεπιθύμητες ενέργειες . Η τοπική φλεγμονή, η έκτοπη οστεοποίηση και η πρόωρη οστεόλυση είναι οι κύριες επιπλοκές της, ενώ μπορούν επίσης να προκληθούν επιπλοκές από το αναπνευστικό και το καρδιαγγειακό, εν τω βάθι φλεβοθρόμβωση, λοίμωξη του χειρουργικού τραύματος, μέχρι και ανάπτυξη όγκου.<sup>31</sup>

## **2.5. rhBMP-6 και οστικά ελλείμματα**

Μια πρωτότυπη rhBMP6 που περιέχει υποκατάστατο οστεοεπαγωγικού αυτόλογου οστικού μοσχεύματος (ABGS), με στόχο την επιτάχυνση της πώρωσης του οστού, δοκιμάστηκε πρόσφατα σε κλινικές δοκιμές. Αποτελείται από ένα βιολογικά συμβατό αυτόλογο φορέα ο οποίος προέρχεται από το περιφερικό αίμα του ασθενούς και από rhBMP6. Αυτός ο συνδυασμός παρακάμπτει τη χρήση φορέων βασισμένους σε ζώα, μειώνει σημαντικά τη φλεγμονώδη διαδικασία και καθιστά τον φορέα ευέλικτο και εύκολο στη χρήση με δυνατότητα να χορηγηθεί μέσω έγχυσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πρωτότυπη rhBMP6 γεφυρώνει με επιτυχία σημαντικά οστικά ελλείμματα σε μοντέλα ζώων και επιτρέπει την διατήρηση του rhBMP6 στο φορέα, μετά τη σύνδεση του με τα εξωκυττάρια μόρια και τους υποδοχείς της μεμβράνης. Η BMP 6 και 7 είναι ομόλογες με ποσοστό ομοιότητας 87% στην αμινοτελική ακολουθία, ωστόσο στη θέση 60 της ώριμης BMP, η BMP6 περιέχει λυσίνη αντί ασπαρτικού οξέως (BMP7) ή προλίνη(BMP2). Η λυσίνη επιτρέπει την αντιστρεπτή σύνδεση της BMP6 με τη Noggin, έτσι σε αντίθεση με τις BMP7 και 2, η BMP6 μπορεί να χωριστεί από τη Noggin και να αποφύγει την αναστολή από τη Noggin. Αυτό εξηγεί γιατί η BMP6 είναι πιο ισχυρή στην προαγωγή της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών *in vitro* και στην προαγωγή της οστικής πώρωσης *in vivo* σε σχέση με την BMP7.<sup>32</sup>

## **2.6. BMP-7 και κατάγματα**

Το γονίδιο BMP-7 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 20q13, έχει μια κωδική περιοχή από 1296 νουκλεοτίδια, περιλαμβάνει 7 εξώνια και κωδικοποιεί πρωτεΐνη (επίσης γνωστή και ως οστεογενετική πρωτεΐνη-1, OP-1) αποτελούμενη από 431 αμινοξέα, που επάγει επίσης το σχηματισμό οστού και χόνδρου. Η έκφραση του γονιδίου τBMP-7 είναι σημαντικά αυξημένη σε

πωρωθέντα κατάγματα και σημαντικά μειωμένη σε ψευδαρθώσεις σε διάφορες χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια της διαδικασίας τη πάρωσης.<sup>33</sup>

Ο ρόλος της πρωτεΐνης BMP-7 στον σκελετό προέρχεται από in vivo μελέτες όπου ποντίκια με ανεπάρκεια της πρωτεΐνης BMP-7 παρουσίαζαν σκελετικές διαταραχές κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. In vitro δεδομένα υποδηλώνουν ότι η BMP-7 κατέχει διαφορετικές χονδρογενετικές ιδιότητες και είναι πιο αποτελεσματική από την BMP-2 στην επαγωγή της χονδρογενετικής διαφοροποίησης των MSCs.

Η χρήση της πρωτεΐνης BMP-7 (δόση 3.5 mg μαζί με 1mg από κολλαγόνο τύπου I, με μέγιστη επιτρεπτή δόση τα 7mg) θεωρείται από ορισμένες κλινικές μελέτες σε ζώα ότι είναι ανώτερη από τα αυτόλογα οστικά μοσχεύματα για ασθενείς με γνωστούς παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη ψευδάρθρωσης. Ωστόσο υπάρχουν και μελέτες όπου τα αποτελέσματα της BMP-7 και των αυτόλογων οστικών μοσχευμάτων είναι παρόμοια.<sup>34</sup> Σε μελέτη που περιλάμβανε 122 ασθενείς με 124 κατάγματα στη κνήμη ατόμων που αντιμετωπίστηκαν με ενδομυελικό ήλο και τοπική χορήγηση rhBMP-7 στη μια ομάδα και ενδομυελικό ήλο και αυτόλογο οστικά μοσχεύματα στην άλλη ομάδα, δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές.<sup>35</sup> Μια μικρή τυχαίοποιημένη κλινική δοκιμή έδειξε πετυχημένα αποτελέσματα έπειτα από τη χορήγηση rhBMP7 μόνης της ή σε συνδυασμό με αυτομόσχευμα σε ψευδαρθώσεις του εγγύς πόλου του σκαφοειδούς οστού.<sup>36</sup> Δύο διαφορετικές μελέτες με τριάντα ασθενείς στο σύνολο έδειξαν πλήρη αποκατάσταση των ψευδαρθώσεων του βραχιονίου οστού έπειτα από τη χορήγηση rhBMP7 μαζί με αυτομόσχευμα.<sup>37</sup> Σε μια αναδρομική μελέτη, rhBMP2 και 7 απέτυχαν να δείξουν πλεονέκτημα στη θεραπεία της άσηπτης ψευδάρθρωσης στη κλείδα, ενώ η ριζική αφαίρεση του ιστού από την εστία της ψευδάρθρωσης αποδείχτηκε σημαντικό βήμα για την διαδικασία της πάρωσης.<sup>38</sup>

Από τη χρήση της BMP-7 στην Αγγλία φαίνεται ότι στο 60,5% των περιπτώσεων χρησιμοποιείται για ψευδαρθώσεις, είτε μόνη της (σε ποσοστό 23% των περιπτώσεων) είτε σε συνδυασμό με αυτόλογα οστικά μοσχεύματα (σε ποσοστό 74% των περιπτώσεων) και το ποσοστό όπου επιτυγχάνεται πάρωση κλινικά και ακτινολογικά είναι 82%. Ερωτηματικά προκύπτουν από το γεγονός ότι δεν αξιολογήθηκε το κατά πόσο ευθύνεται η BMP-7 αποκλειστικά για την πάρωση των καταγμάτων.<sup>39</sup> Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι υπάρχουν ακόμη ανεπαρκή δεδομένα για να επιβεβαιώσουν την ανωτερότητα της χρήσης της BMP-7 στους ανθρώπους, σε αντίθεση με τα ζώα όπου τα αποτελέσματα είναι πειστικά. Η χρήση της rhBMP7 όπως και της rhBMP2 παρουσίασε παρόμοιες σοβαρές παρενέργειες, με αποτέλεσμα η θεραπευτική τους χρήση να αναθεωρηθεί πρόσφατα.<sup>40</sup>

## 2.7. Η πρωτεΐνη Noggin στον οστικό μεταβολισμό

Η πρωτεΐνη Noggin παράγεται ως ένα μονοδιμερές από 64 kDa το οποίο σχηματίζει ένα σύμπλοκο με BMP διμερή και λειτουργεί ως ένας από τους κύριους ανταγωνιστές τους. Η πρωτεΐνη Noggin φαίνεται ότι έχει σημαντικές λειτουργίες τόσο στη πύρωση των καταγμάτων όσο και στον οστικό σχηματισμό. Προσδένεται στις BMP-2,4,6,7 με διαφορετική συγγένεια. Μελέτες έδειξαν ότι γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που υπερεκφράζουν τη πρωτεΐνη Noggin στους σκελετικούς ιστούς τους, πάσχουν από κατάγματα των μακρών οστών, ως αποτέλεσμα της διαταραχής στην οστεοβλαστική δραστηριότητα και του μειωμένου όγκου σπογγώδους οστού.<sup>41</sup>

Αναλύοντας την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου Noggin-BMP-7, διαπιστώθηκε ότι η Noggin καταλαμβάνει τα σημεία σύνδεσης της BMP-7 στους τύπου I και τύπου II BMP υποδοχείς και επομένως εμποδίζει τη περαιτέρω σύνδεσή της. Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στην προσπάθεια, για τη δημιουργία μεταλλαγμένων BMP με μειωμένη συγγένεια προς την Noggin, μέσω της αντικατάστασης των αμινοτελικών μορίων τους στις θέσεις που είναι σημαντικές για την πρόσδεση της Noggin στις BMP. Ωστόσο, οι θέσεις αυτές είναι κοινές τόσο για τους BMP υποδοχείς όσο και για τη Noggin και επομένως ο σχεδιασμός BMP με τροποποιημένα αμινοτελικά μόρια που θα συνδέονται εκλεκτικά μόνο με τους υποδοχείς και όχι με τη Noggin είναι μια απαιτητική διαδικασία και βρίσκεται ακόμη σε θεωρητικό επίπεδο.

Τρεις μεταλλάξεις (L46D, E48K, I218E) στη Noggin έχουν συσχετιστεί με σημαντικά μειωμένη συγγένεια προς την BMP-7 σε σχέση με την αγρίου τύπου Noggin. Τροποποιήσεις στα αμινοτελικά κατάλοιπα της BMP-7 που σχετίζονται με την σύνδεση των Noggin L46, E48 και I218 πιθανόν θα οδηγούν επίσης σε μειωμένη συγγένεια προς τη πρωτεΐνη Noggin και θα αποτελέσουν ένα μελλοντικό οδηγό για το σχεδιασμό BMPs με μειωμένη συγγένεια με τη Noggin.<sup>42</sup>

## 2.8. Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών Gremlin και Chordin – ανταγωνιστών των BMP - προκαλεί μείωση στην οστεογενετική ικανότητα των MSCs

Η Gremlin και η Chordin είναι ανταγωνιστές των BMP που έχουν συσχετιστεί με τη ρύθμιση της λειτουργίας των BMP για το σχηματισμό νέου οστού και την ομοιοστασή του. Η Gremlin είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που εκκρίνεται από τους οστεοβλάστες και ανταγωνίζεται τη δράση των BMP-2, 4 και 7. Διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία υπερεκφράζουν Gremlin παρουσιάζουν παρόμοιο φαινότυπο με Noggin διαγονιδιακά ποντίκια εξαιτίας της διαταραγμένης οστεοβλαστικής δραστηριότητας, με αποτέλεσμα να είναι πιο επιρρεπή σε κατάγματα.<sup>43</sup>

Η Chordin συμβάλλει επίσης στην αναστολή της οστεοεπαγωγικής δράσης των BMPs. Ο Wang και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν knockout στο γονίδιο της Chordin και διαπίστωσαν πως το συγκεκριμένο γονίδιο, είναι ο ιδανικότερος στόχος για την ενίσχυση της οστεογενετικής διαφοροποίησης των hBMSCs σε ασθενείς με ψευδάρθρωση. Αρχικά φάνηκε ότι το knock out στο γονίδιο της Chordin σε hBMSCs που απομονώθηκαν από ασθενείς με ψευδάρθρωση, προκάλεσε επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων OSX, OCN και Colla1 σε μεγαλύτερο βαθμό από το knock out στο γονίδιο της Gremlin. Τα hBMSCs με knock out στο γονίδιο της Chordin διατήρησαν την οστεογενετική τους ικανότητα στους ασθενείς με ψευδάρθρωση. Περαιτέρω ανάλυση αποκάλυψε ότι η επαγωγή της οστεογενετικής διαφοροποίησης συσχετίστηκε με τη μείωση στα επίπεδα της Chordin. Επιπλέον η υπερέκφραση της Chordin στα hBMSCs, προκάλεσε μείωση στην έκφραση του mRNA των OSX, OCN και Colla1 σε hBMSCs, αποδεικνύοντας ότι η υπερέκφραση της Chordin μειώνει την οστεογενετική ικανότητα των hBMSCs.<sup>44</sup>

### **3. SMAD6 και οστικός μεταβολισμός**

Το γονίδιο SMAD6, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 15q21-21, περιλαμβάνει 4 εξώνια με μια κωδική περιοχή από 1491 νουκλεοτίδια και παράγει πρωτεΐνη από 496 αμινοξέα που ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών SMAD. Η οικογένεια των πρωτεϊνών SMAD ρυθμίζει αρνητικά το σηματοδοτικό μονοπάτι των BMP. Το γονίδιο SMAD6 φαίνεται ότι κατέχει ένα ιδιαίτερο ρόλο στην σύνθεση οστού. Τρανς-γενετικά ποντίκια τα οποία υπερεκφράζουν το γονίδιο SMAD6 παρουσιάζουν νανισμό με οστεοπενία, διαταραχή στην οστική ανάπτυξη και ανάπτυξη οστού με λεπτό σπογγώδες οστόν. Το αποτέλεσμα αυτό προκαλείται από καθυστέρηση στην υπερτροφία των χονδροκυττάρων κατά τη διάρκεια της ενδοχόνδριας οστεοποίησης και ενός μειωμένου πληθυσμού χονδροκυττάρων που αποτελείται από ατροφικά χονδροκύτταρα.<sup>45,46</sup>

### **4. Ο ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (HGF) στην οστική πώρωση**

#### **4.1. Η δομή του παράγοντα HGF**

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα έχουν το δυναμικό να διαφοροποιηθούν σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένου των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών. Αυτά τα πολυδύναμα κύτταρα εκκρίνουν τον ηπατοκυτταρικό αυξητικό παράγοντα-Hepatocyte growth factor(HGF), ένα αυξητικό παράγοντα με ρυθμιστικές δράσεις στην ανάπτυξη, την επιβίωση,

την κινητικότητα, τη μετανάστευση και τη μιτογένεση των κυττάρων.<sup>47</sup> Ο HGF μεσολαβεί κυρίως στη ρύθμιση κυττάρων επιθηλιακής προέλευσης. Ο HGF συναντάται ως τέσσερα διαφορετικά αλληλόμορφα, αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος, τα οποία είναι ο NK1, NK2, NK3 και NK4, εκ των οποίων καθένα αλληλόμορφο έχει διαφορετική λειτουργία στο σηματοδοτικό μονοπάτι του HGF/cMET.<sup>48</sup> Ο HGF είναι ένας αυξητικός παράγοντας που ανιχνεύεται σε ποικιλία ιστών. Το γονίδιο του στον άνθρωπο έχει μήκος 70kb, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7q11.1-21, αποτελείται από 18 εξόνια και 17 ιντρόνια. Το πρόδρομο μόριο του HGF παράγεται ως μια βιολογικά μη λειτουργική μονή αλυσίδα που αποτελείται από 728 αμινοξέα και ονομάζεται, pro-HGF. Το πλήρως λειτουργικό μόριο του HGF (~90kDa) αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες: τη βαριά αλυσίδα(α: 69 kDa) και την ελαφριά αλυσίδα(β: 34kDa). Η βαριά αλυσίδα περιέχει το αμινοτελικό άκρο(η) και τέσσερα ελικοειδή τμήματα (k1,k2,k3,k4), τα οποία εξαιτίας εναλλακτικού ματίσματος του προϊόντος μετάφρασης του γονιδίου του HGF, μπορεί να οδηγήσει σε τέσσερα διαφορετικά αλληλόμορφα (NK1-NK4). Τα ελικοειδή τμήματα είναι πρωτεΐνες που σχηματίζουν αγκύλες, συνδεδεμένες με γέφυρες και σταθεροποιούνται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Στην ελαφριά αλυσίδα υπάρχει ένα ομόλογο τμήμα σερινικής πρωτεάσης.<sup>49</sup>

#### **4.2. Χρήση του HGF σε οστικά ελλείμματα**

Σε *in vivo* μελέτες έχει φανεί επίσης ότι η θεραπεία με HGF προάγει την οστεογένεση. Η τοπική χορήγηση HGF στο μικροπεριβάλλον ενός κατάγματος σε κουνέλια έδειξε ότι ενισχύει τη διαδικασία της πόρωσης του κατάγματος. Συγκεκριμένα σε μοντέλα κουνελιών όπου υπήρχε ένα οστικό έλλειμμα, φάνηκε ότι η χορήγηση HGF σε συνδυασμό με β-φωσφορικό τριασβέστιο (β-TCP) και κολλαγόνο είναι πιο αποτελεσματική για την κάλυψη των ελλειμμάτων από το συνδυασμό β-TCP με κολλαγόνο αλλά και από την ομάδα που δεν έλαβε καμία θεραπεία. Η β-TCP χρησιμοποιείται σαν οστικό υποκατάστατο σε οστικά ελλείμματα εξαιτίας της απορροφητικότητας και της βιοσυμβατότητας της, επιτρέποντας την ανάπτυξη οστού. Αυξημένη απορρόφηση του β-TCP υποδεικνύει μεγαλύτερη επιδιόρθωση του οστικού ελλείμματος. Μετά από οκτώ εβδομάδες, μόνο ένα μικρό ποσό νέου οστού ήταν ορατό στην ομάδα που δεν έλαβε θεραπεία, ενώ και στις άλλες δύο ομάδες παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση στη οστική πυκνότητα και τον οστικό όγκο. Επιπλέον η ομάδα που έλαβε θεραπεία με το συνδυασμό β-TCP, κολλαγόνο και HGF είχε ευρύτερη περιοχή με νέου οστού την 2η, τη 4η και την 6η εβδομάδα καθώς και μικρότερη περιοχή με β-TCP, υποδεικνύοντας ότι μεγαλύτερη ποσότητα β-TCP είχε απορροφηθεί και αντικατασταθεί από νεοσχηματισθέν οστό.<sup>50</sup>



Ωστόσο αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι ο HGF μπορεί να αναστείλλει την οστεογένεση. Μια δόση αρκετά υψηλότερη (100ng/ml) από τη φυσιολογική, αναστέλλει την οστεοποίηση που πραγματοποιείται μέσω BMP.<sup>51</sup> Επίσης ο Walker και οι συνεργάτες παρατήρησαν ένα δοσο-εξαρτώμενο αποτέλεσμα της θεραπείας με HGF, όπου υψηλότερες δόσεις HGF, προκαλούν μείωση στα επίπεδα cMET και στο σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK και PI3K.<sup>52</sup> Ο χρόνος της θεραπείας με HGF μπορεί επίσης να επηρεάσει τη δραστηριότητα των BMP. Όταν η θεραπεία με HGF πραγματοποιείται πριν τη χορήγηση BMP2, τότε η HGF δεν έχει δράση πάνω στη BMP.<sup>53</sup> Επίσης ο ρόλος της HGF στα hMSC μπορεί να εξαρτάται από το στάδιο στο οποίο βρίσκονται τα hMSC, όσο πιο ώριμα τα hMSC τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα, η HGF να προάγει την οστεογενετική διαφοροποίηση.<sup>54</sup> Συνεπώς, σε φυσιολογικά επίπεδα η HGF προάγει τη σύνθεση νέου οστού.

## **5. Ο ρόλος των πεπτιδίων που σχετίζονται με το γονίδιο της καλσιτονίνης (calcitonin gene-related peptide (CGRP) στην οστική πώρωση**

Τα πεπτίδια που σχετίζονται με το γονίδιο της καλσιτονίνης, CGRP, είναι νευροπεπτίδια που παράγονται από νευρώνες του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος. Τα τελευταία χρόνια έχουν μελετηθεί εκτενώς στα οστά λόγω των πλειοτροπικών επιπτώσεών τους στα οστικά κύτταρα και την πιθανότητα να αποτελέσουν φαρμακευτικούς στόχους. Οι δράσεις τους μεσολαβούνται μέσω μίας οικογένειας υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνη G τύπου II, CGRPR. Μελέτες έχουν δείξει ότι λειτουργικοί υποδοχείς των CGRP εκφράζονται σε οστικά κύτταρα και ειδικότερα σε οστεοκλάστες και οστεοβλάστες. Τα πεπτίδια CGRP απαντώνται σε δύο ισομορφές, αCGRP και βCGRP, οι οποίες είναι νευροδιαβιβαστές που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό οστών και στην επούλωση καταγμάτων, ενώ επίσης έχει αναφερθεί ότι ενέχονται στην οστική πώρωση. Ωστόσο, η πιο μελετημένη μορφή είναι το πεπτίδιο αCGRP, διότι τα δεδομένα σχετικά με το ρόλο του πεπτιδίου βCGRP στην οστική πώρωση είναι ασαφή καθώς πειραματικά μοντέλα ζώων με έλλειψη του πεπτιδίου βCGRP παρουσιάζουν μόνο ήπια και παροδική μείωση στη σύνθεση νέου οστού.<sup>55</sup>

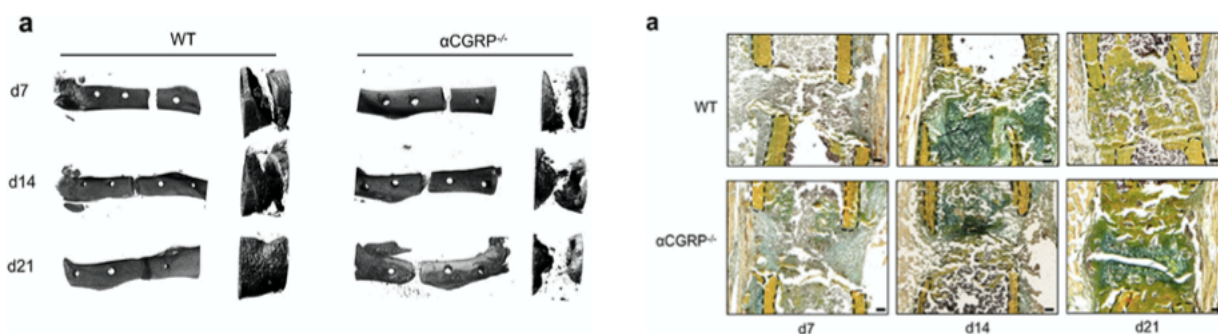
Αναφορικά με το πεπτιδίο αCGRP, τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι αυξάνει στην οστική μάζα σε πειραματικό μοντέλο ποντικού<sup>56</sup>, ενώ επίσης έχει αναφερθεί ότι ενισχύει το ρυθμό πολλαπλασιασμού των οστεοβλαστών.<sup>57</sup> Επιπλέον, *in vitro* μελέτες υποστηρίζουν ότι το πεπτιδίο αCGRP επάγει τη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των οστεοβλαστών, καθώς αυξημένα επίπεδα του πεπτιδίου έχουν συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα οστικού σχηματισμού, μία επίδραση η οποία μεσολαβείται από αλληλεπιδράσεις του αCGRP με το Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι.<sup>58,59,60</sup> Ο ρόλος του αCGRP πεπτιδίου στο σχηματισμό και ανακατασκευή του οστού ενισχύεται περαιτέρω από δεδομένα που υποστηρίζουν ότι εμφυτεύματα μαγνησίου σε μοντέλο ποντικού επάγουν την οστική αναγέννηση μέσω του υποδοχέα του CGRP, προκαλώντας οστεογενετική διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων του περιostίου,<sup>61</sup> ενώ ποντίκια στα οποία απουσιάζει το αCGRP παρουσιάζουν οστεοπενία εξαιτίας του μειωμένου ρυθμού οστικού σχηματισμού.<sup>62</sup>

Όπως προαναφέρθηκε, τα πεπτιδία που σχετίζονται με το γονίδιο της καλσιτονίνης συμβάλλουν και στην επούλωση των οστών μετά από κατάγματα. Ειδικότερα, μελέτη του Li J και συν. έδειξε ότι εστίες καταγμάτων σε ποντίκια παρουσιάζουν αυξημένη σύνθεση νέων νευρικών ινών που περιέχουν CGRP,<sup>63</sup> ενώ σε κλινικό επίπεδο, αυξημένα επίπεδα του CGRP έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με κατάγματα των μακρών οστών.<sup>64</sup>

### 5.1. Η οστική πώρωση και αCGRP

Η συμβολή του πεπτιδίου αCGRP στην οστική πώρωση επιβεβαιώνεται και από δεδομένα που αναφέρουν ότι η απουσία του πεπτιδίου σχετίζεται με διαταραχές της οστικής πώρωσης. Ειδικότερα, σε πειραματικό μοντέλο ποντικού στο οποίο είχε πραγματοποιηθεί οστεοτομία και εξωτερική σταθεροποίηση παρατηρήθηκε μειωμένη αναγεννητική ικανότητα και καθυστερημένη οστική πώρωση σε ποντίκια στα οποία είχε γίνει knock-out του αCGRP συγκριτικά με τα ποντίκια άγριου τύπου (wild-type, WT). Ιστομορφομετρική ανάλυση με μCT υπέδειξε ότι παρόλο της μικρής αλλά σημαντικής αύξησης στο λόγο όγκος οστού/όγκος ιστού (BV/TV) που ανιχνεύθηκε την 7<sup>η</sup> ημέρα μετά το τραυματισμό, τα αCGRP ανεπαρκή ποντίκια παρουσίασαν διαταραχές στο σχηματισμό πόρου την 14<sup>η</sup> και την 21<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα. Αυτό ήταν φανερό από τη μείωση του ολικού όγκου του οστικού πόρου (BV) και του ιστικού όγκου (TV), το οποίο συνδέθηκε με μειωμένο λόγο BV/TV την 21<sup>η</sup> ημέρα. Αυτά τα αποτελέσματα συνδέθηκαν με τα ευρήματα από ιστολογικές αναλύσεις σε μη-αποασβεστοποιημένο πόρο, οι οποίες έδειξαν διαταραχή στην οστική αναγέννηση στα αCGRP

ανεπαρκή ποντίκια σε σχέση με την ομάδα ελέγχου την 14<sup>η</sup> και την 21<sup>η</sup> ημέρα μετά τον

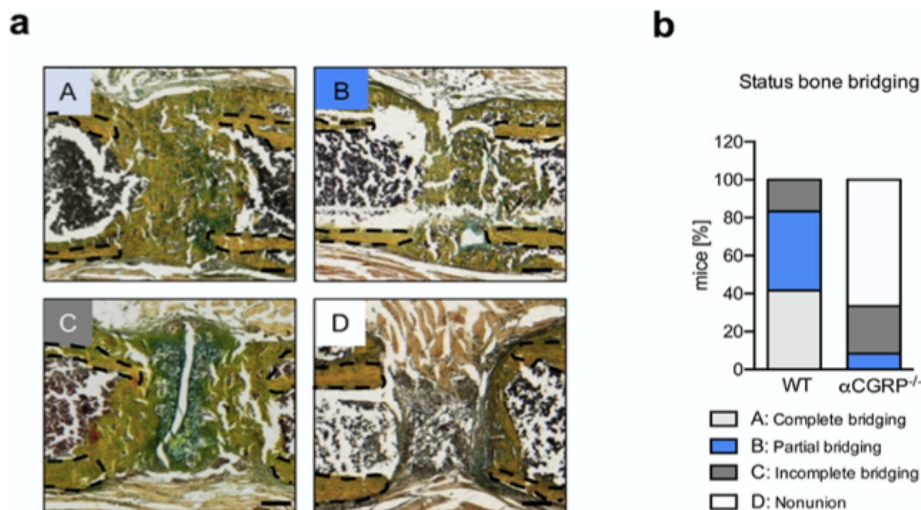


τραυματισμό (Εικόνα 1).

**Εικόνα 1. Διαταραγμένος σχηματισμός οστικού πώρου σε αCGRP ανεπαρκή ποντίκια.** Τομές από οστικό πώρο μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση Movat Pentachrome σε τομές από WT και αCGRP-ανεπαρκή ποντίκια την 7<sup>η</sup>, 14<sup>η</sup> και 21<sup>η</sup> ημέρα μετά τον τραυματισμό. Οι μαύρες διακοπόμενες γραμμές υποδεικνύουν φλοιούς οστών με κάταγμα μέσω στο σχηματιζόμενο πώρο, ενώ το κίτρινο χρώμα αντιπροσωπεύει το ασβεστοποιημένο οστό, το πράσινο χρώμα είναι ο χόνδρος και το κόκκινο ο μυς.<sup>65</sup>

Αναλυτικότερα, η ιστομορφομετρική ποσοτικοποίηση αποκάλυψε μειωμένη ποσότητα από ασβεστοποιημένο οστούν και χαμηλότερο ποσοστό από ασβεστοποιημένο οστό στην συνολική επιφάνεια του νεοσχηματισμένου πώρου στα ποντίκια με έλλειψη του πεπτιδίου αCGRP. Στην περίπτωση του αρθρικού χόνδρου, παρατηρήθηκε μια τάση για μικρότερη περιοχή με χόνδρο και σημαντικά μειωμένη περιοχή χόνδρου ανά συνολική επιφάνεια στην εστία του κατάγματος στα αCGRP ανεπαρκή ποντίκια την 14<sup>η</sup> ημέρα μετά την επέμβαση. Ωστόσο παρατηρήθηκε και μια τάση για αύξηση σε αυτούς τους παράγοντες την 21<sup>η</sup> ημέρα, προτείνοντας έτσι την παρουσία διαταραγμένης σύνθεσης υαλοειδούς πώρου στα αCGRP ανεπαρκή ποντίκια.<sup>65</sup>

Όσο αφορά την αξιολόγηση του ρυθμού ψευδάρθωσης, ημι-ποσοτική μέθοδος βαθμολόγησης του οστικού γεφυρώματος την 21<sup>η</sup> ημέρα μετά το κάταγμα έδειξε ότι τα άγριου τύπου ποντίκια παρουσίασαν πλήρη (41.66%) ή μερική (41.66%) γεφύρωση των καταγματικών ακρών και ένα μικρό ποσοστό 16.66% παρουσίασε καθυστερημένη ψευδάρθρωση. Σε αντίθεση η οστική πώρωση στα αCGRP ανεπαρκή ποντίκια χαρακτηρίστηκε από ένα μεγάλο αριθμό καθυστερημένων ψευδαρθρώσεων (25%) και ψευδαρθρώσεων (66.6%), με μόνο ένα μικρό ποσοστό των ποντικίων να πετυχαίνει μερική γεφύρωση (8.3%) και κανένα να μην πετυχαίνει πλήρη πώρωση (Εικόνα 2). Συνολικά αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι ο σχηματισμός πώρου είναι σοβαρά διαταραγμένος στα αCGRP ανεπαρκή ποντίκια και ως αποτέλεσμα έχουν ένα υψηλό ποσοστό ψευδαρθρώσεων.<sup>65</sup>



**Εικόνα 2: Υψηλό ποσοστό από ψευδάρθρωση σε αCGRP ανεπαρκή ποντίκια** (a) Παραδείγματα εικόνων από οστικό πόρο μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση Movat Pentachrome σε τομές ιστού την 21<sup>η</sup> ημέρα μετά το κάταγμα. A = πλήρη πόρωση (γεφύρωση του πόρου και στους τέσσερις φλοιούς), B = μερική γεφύρωση (γεφύρωση σε 2 από τους 3 φλοιούς), C = ανεπαρκής γεφύρωση (παρουσία πόρου, αλλά χωρίς παρουσία γεφύρωσης), D = ψευδάρθρωση (στρογγυλεμένοι φλοιοί, ελάχιστη παρουσία πόρου). Μαύρες διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν οστικούς φλοιούς μέσω στο σχηματισμένο (b) Ημι-ποσοτική αξιολόγηση του οστικού πόρου σε WT και αCGRP-ανεπαρκή ποντίκια.<sup>65</sup>

Προκειμένου να διερευνηθούν περαιτέρω το ρόλο του πεπτιδίου αCGRP, οι ερευνητές μελέτησαν και την επίδρασή του στον οστικό πόρο σε κυτταρικό επίπεδο. Ιστολογική ανάλυση έδειξε ότι ποντίκια με έλλειψη του πεπτιδίου αCGRP παρουσίαζαν σημαντική μείωση του πληθυσμού των οστεοβλαστών θετικά στην οστεοκαλσίνη την 21<sup>η</sup> ημέρα μετεγχειρητικά γεγονός υποδεικνύει δυσλειτουργικό σχηματισμό του νέου οστού κατά τη διάρκεια της πόρωσης στα αCGRP ανεπαρκή ποντίκια. Σημαντική μείωση παρατηρήθηκε και στον συνολικό αριθμό των οστεοκλαστών στην εστία του κατάγματος την 14<sup>η</sup> και 21<sup>η</sup> ημέρα προτείνοντας έτσι μια ανεπαρκή οργάνωση του πόρου στα αCGRP ανεπαρκή ποντίκια. Το παραπάνω ενισχύθηκε και από μελέτες στις οποίες χορήγηση ανασυνδυασμένων μορίων αCGRP σε μεσεγχυματικά κύτταρα τα οποία στη συνέχεια υπόκεινται σε οστεογενετική διαφοροποίηση είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης γονιδίων-δεικτών των οστεοβλαστών όπως το Runx2, το Colla1, και η Alpl. Τα προαναφερθέντα γονίδια ενέχονται σε διαδικασίες που αφορούν στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, το σχηματισμό της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και την ασβεστοποίησή της. Επιπλέον, σάρωση του γονιδιώματος υπέδειξε 170 γονίδια που παρουσίαζαν διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ των WT και αCGRP-ανεπαρκή ποντικών. Ειδικότερα, η ανάλυση έδειξε ότι γονίδια που επηρεάζουν την ομοιόσταση και την αναγέννηση του οστού και αποτελούν ρυθμι-

στές του σχηματισμού οστού (Αντιπυρογοναδίνη, Ιντερλευκίνη 1β), της οστικής ανακατασκευής (CCL7, MMP13, MRC-1) και γονίδια του σηματοδοτικού μονοπατιού PPAR $\gamma$  παρουσιάζαν σημαντικά μειωμένη έκφραση στα ποντίκια με έλλειψη του πεπτιδίου  $\alpha$ CGRP συγκριτικά με τα ποντίκια άγριου τύπου. Συνολικά όλα τα προαναφερθέντα ευρήματα υποδεικνύουν ότι το  $\alpha$ CGRP ενεργοποιεί μια πολύπλοκη απάντηση στους πρόδρομους οστεοβλάστες στην εστία του πώρου, η οποία είναι απαραίτητη για την σωστή και επαρκή οστική πάρωση.<sup>65</sup>

## **6. Πολυμορφισμοί γονιδίων που σχετίζονται με την πάρωση των καταγμάτων/ψευδάρθρωση**

### **6.1. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο BMP-4**

Το γονίδιο της BMP-4 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14q22-23. Η BMP-4 εκρίνεται ως μια pre-pro-πρωτεΐνη, η οποία επεξεργάζεται και διαμορφώνεται σε ομοδιμερή και ετεροδιμερή. Η μετάδοση του σήματός της γίνεται μέσω της σύνδεσής της σε ένα ετεροδιμερή διαμεμβρανικό υποδοχέα με δραστηριότητα κινάσης σερίνης-θρεονίνης. Η BMP-4 διεγείρει το σχηματισμό οστού μέσω της διαφοροποίησης των MSCs και εμπλέκεται κυρίως στην ανάπτυξη του οστού και του χόνδρου. Η ανεπάρκεια του γονιδίου της BMP-4 μπορεί να προκαλέσει σκελετικές και νευρολογικές διαταραχές. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο C>T πολυμορφισμός(rs17563) στο γονίδιο της BMP4 σχετίζεται με οστεοποίηση του οπίσθιου επιμήκους συνδέσμου, με μελάνωμα αλλά και με ψευδάρθρωση καταγμάτων. Ο πολυμορφισμός C>T (rs17563) του γονιδίου της BMP4, βρίσκεται στη μεταγραφόμενη περιοχή του γονιδίου, στο εξόνιο 5 και συσχετίστηκε σημαντικά με ψευδάρθρωση των μακρών οστών. Αυτός ο πολυμορφισμός κωδικοποιεί ένα μη-συνώνυμο αμινοξύ. Ασθενείς με τον απλότυπο GTAA φαίνεται ότι είναι τρεις φορές πιο επιρρεπείς για την ανάπτυξη ψευδάρθρωσης, εξαιτίας της υπερέκφρασης του mRNA του BMP4, το οποίο διαταράσσει την ομοιόσταση του οστού.<sup>66</sup> Τα δεδομένα αυτά συμβαδίζουν και με την παρατήρηση ότι τα mRNA επίπεδα της BMP-4 αλλά και της πρωτεΐνης της είναι αυξημένα σε εστίες ψευδάρθρωσης

### **6.2. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο Noggin**

Το γονίδιο Noggin (NOG) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17q21-q22, έχει μόνο ένα εξόνιο αποτελούμενο από 699 νουκλεοτίδια και κωδικοποιεί πρωτεΐνη αποτελούμενη από 232 αμινοξέα. Η έκφραση του γονιδίου της Noggin μπορεί να ενισχυθεί, από την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού των BMP, αποδεικνύοντας ότι υπάρχει ένας ισχυρός μηχανισμός ανάστροφης ανατροφοδότησης που ελέγχει την δραστηριότητα των BMP.<sup>67</sup>

Αρκετές μορφές σκελετικής δυσπλασίας έχουν συσχετιστεί με ετερόζυγες μεταλλάξεις στο γονίδιο της *poggin*. Οι μεταλλάξεις φαίνεται ότι τροποποιούν την ικανότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης NOG με τις BMPs και τους GDFs (Growth Differentiation Factors - αυξητικούς παράγοντες διαφοροποίησης).<sup>68</sup> Μελέτη έδειξε ότι ο πολυμορφισμός A>G (rs1372857) στο γονίδιο NOG σχετίζεται με αυξημένη ψευδάρθρωση καταγμάτων. Συγκεκριμένα στην ομάδα της ψευδάρθρωσης, το 25.8% των ασθενών ήταν φορείς του G/G γονότυπου και το 25,8% ήταν φορείς του γονότυπου A/A, ενώ στην ομάδα της φυσιολογικής πάρωσης το 8.5% ήταν φορείς του G/G γονότυπου και το 40.4% ήταν φορείς του A/A γονότυπου. Ασθενείς με τον γονότυπο G/G φαίνεται ότι είναι τέσσερις φορές πιο επιρρεπείς στην ανάπτυξη ψευδάρθρωσης σε σχέση με τον A/A γονότυπο.<sup>46</sup> Η αναστολή της έκφρασης του γονιδίου της *Noggin* μέσω RNAi είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της οστεογένεσης τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.<sup>69</sup>

### 6.3. Πολυμορφισμοί του γονιδίου SMAD6

Πολυμορφισμοί του γονιδίου SMAD6 έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο για οστεοπόρωση και με αυξημένη πιθανότητα για ψευδάρθρωση. Συγκεκριμένα, μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε γυναίκες στην Ιαπωνία συσχέτισε τον πολυμορφισμό A>C (rs755451) του ιντρονίου 3 στο γονίδιο SMAD6 με μειωμένη οστική πυκνότητα και με αυξημένο κίνδυνο για οστεοπόρωση σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.<sup>45</sup> Ο Dimitriou και οι συνεργάτες πραγματοποίησαν μελέτη, η οποία έδειξε ότι ο πολυμορφισμός C>T (rs2053423) στο γονίδιο SMAD6 σχετίζεται με αυξημένη ψευδάρθρωση καταγμάτων. Στην ομάδα της ψευδάρθρωσης το 58.1% των ασθενών ήταν φορείς του T/T γονότυπου και το 1.6% ήταν φορείς του γονότυπου C/C, ενώ στην ομάδα της φυσιολογικής πάρωσης το 46.8% ήταν φορείς του T/T και το 10.7% του C/C γονότυπου. Ασθενείς με τον γονότυπο T/T φαίνεται ότι είναι οχτώ με δέκα φορές πιο επιρρεπείς στην ανάπτυξη ψευδάρθρωσης σε σχέση με τον C/C γονότυπο.<sup>46</sup>

### 6.4. Πολυμορφισμός στο γονίδιο CYR61

Το γονίδιο CYR61 (cysteine rich protein 61) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1p22. Είναι ένα σημαντικό γονίδιο, η πρωτεΐνη του οποίου συμμετέχει σε ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών διαδικασιών. Το γονίδιο CYR61 είναι κύριο γονίδιο όσον αφορά το μηχανισμό της αγγειογένεσης και είναι προαπαιτούμενο για τη διαδικασία της πάρωσης. Έχει παρατηρηθεί ότι διαταραχές στη διαδικασία της αγγειογένεσης στην εστία του κατάγματος, διαταράσσουν και την οστική πάρωση. Ο Ali και οι συνεργάτες του<sup>70</sup> διερεύνησαν τη επίδραση του (T → G) πολυμορφισμού (rs3753793) στο γονίδιο CYR61 και την επίδραση που έχει στην mRNA έκφραση του γονιδίου σε περιπτώσεις ψευδάρθρωσης στο οστό της κνήμης. Στη μελέτη

συμμετείχαν άτομα ηλικίας από 18 μέχρι 45 ετών. Συνολικά η μελέτη περιλάμβανε 250 κατάγματα στο οστό της κνήμης, που εξελέχθησαν με την ανάπτυξη ψευδάρθρωσης. Η ομάδα ελέγχου περιλάμβανε 250 άτομα με υγιή οστά. Η ανάλυση του (T → G) πολυμορφισμού (rs3753793) στο γονίδιο CYR61 έγινε αρχικά μέσω PCR και στη συνέχεια μέσω RFLP. Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε πέψη από το ένζυμο KspA I για την ανίχνευση του πολυμορφισμού (T → G) .

Βρέθηκε ότι ο ετερόζυγος γονότυπος TG ήταν στατιστικά σημαντικά πιο συχνός στην ομάδα των ατόμων με την ψευδάρθρωση, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ ο ομόζυγος γονότυπος GG ήταν πιο συχνός στην ομάδα της ψευδάρθρωσης, χωρίς ωστόσο να είναι σημαντική η διαφορά. Η συχνότητα του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου G στο γονίδιο CYR61 (T → G) είναι στατιστικά σημαντική στις περιπτώσεις με ψευδάρθρωση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, υποδηλώνοντας συνολικά ότι τόσο ο ετερόζυγος γονότυπος TG όσο και το αλληλόμορφο G σχετίζονται με την εμφάνιση ψευδάρθρωσης. Επίσης φάνηκε ότι ο TT γονότυπος σχετίστηκε με στατιστικά υψηλότερα επίπεδα mRNA του CYR61 στο αίμα σε σχέση με το GT/GG γονότυπο.<sup>70</sup>

### **6.5. Πολυμορφισμός στο γονίδιο της Nitric oxide synthase 2 (NOS2) και ψευδάρθρωση**

Το γονίδιο NOS2 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17q11.2 και κωδικοποιεί το ένζυμο της συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου, το οποίο συνθέτει νιτρικό οξύ στο ανθρώπινο σώμα. Το νιτρικό οξύ είναι μια αντιδραστική ελεύθερη ρίζα, η οποία δρα ως μεσολαβητής σε διάφορες αντιμικροβιακές και αντινεοπλασματικές διαδικασίες, καθώς επίσης και στη διαδικασία μεταγωγής των νευρικών ώσεων. Μελέτη σε ποντίκια έδειξε, αυξημένη έκφραση του γονιδίου NOS2 στα αρχικά στάδια της διαδικασίας της πώρωσης στους οστεοβλάστες και τους χονδροβλάστες. Αυτή η αύξηση έφτασε στο μέγιστο σημείο της, την τέταρτη ημέρα μετά το κάταγμα, αλλά η έκφραση του NOS2 δεν μπορούσε να ανιχνευτεί τέσσερις εβδομάδες μετά το κάταγμα. Τα ευρήματα αυτά φανερώνουν ότι πιθανώς η NOS2 εμπλέκεται σε μεγάλο βαθμό στην διαδικασία της πώρωσης.<sup>71</sup>

Άλλη μελέτη προσπάθησε να εξετάσει τη πιθανότητα σύνδεσης μεταξύ SNPs στο γονίδιο NOS2 και ανάπτυξη ψευδάρθρωσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν σύνδεση του C>T πολυμορφισμού(rs2297514) στο γονίδιο NOS2 με την ανάπτυξη ψευδάρθρωσης. Ωστόσο η σημαντικότητα του πολυμορφισμού rs2297514 στην ανάπτυξη ψευδάρθρωσης δεν μπορούσε να επιβεβαιωθεί πλήρως, λόγω ανεπάρκειας στη στατιστική ισχύ.<sup>72</sup> Πρόσφατα δεδομένα ωστόσο, απέδειξαν ότι η παρουσία του SNP rs2297514 στο γονίδιο NOS2 σχετίζεται σημαντικά με τη

ψευδάρθρωση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το T αλληλόμορφο του rs2297514 πολυμορφισμού αυξάνει κατά 38% το κίνδυνο για ψευδάρθρωση κατά τη διαδικασία της πάρωσης σε σχέση με το C αλληλόμορφο. Ωστόσο, η στατιστικά σημαντική συσχέτιση αφορούσε μόνο την ανατομική περιοχή της διάφυσης της κνήμης, ενώ φάνηκε ότι υπάρχει και πιθανή συσχέτιση με τα οστά των κάτω άκρων. Το αποτέλεσμα της δράσης του συγκεκριμένου πολυμορφισμού στη διαδικασία της πάρωσης φαίνεται ότι επηρεάζεται από παράγοντες που αφορούν τη θέση του κατάγματος.<sup>73</sup>

## 7. Μικρά μη κωδικά RNA και οστική πόρωση

### 7.1. miRNA

Τα μικρά μη κωδικά RNA (miRNAs) έχουν μήκος 19-25 νουκλεοτίδια και αναστέλλουν την έκφραση των γονιδίων στόχων τους, είτε επάγοντας την αποδόμηση του αγγελιοφόρου mRNA(mRNA) είτε μέσω της αναστολής της μετάφρασης του mRNA σε μετα-μεταγραφικό στάδιο. Η τέλεια συμπληρωματικότητα μεταξύ του miRNA και του mRNA στόχου οδηγεί σε διάσπαση του mRNA στόχου, ενώ η ατελής συμπληρωματικότητα οδηγεί σε αναστολή της μετάφρασης. Και στις δυο περιπτώσεις το τελικό αποτέλεσμα είναι η μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης που αντιστοιχεί στο γονίδιο -στόχος.<sup>74</sup> Στο οστό τα miRNAs έχουν αναγνωρισθεί ως κύριοι παράγοντες για τον έλεγχο της σύνθεσης οστού, της οστικής ανακατασκευής και ομοιόστασης. Η έκφραση των miRNAs τροποποιείται μετά από ένα κάταγμα. Επιπλέον διάφορα miRNAs φαίνεται να επηρεάζουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, είτε μέσω της αναστολής είτε μέσω της διέγερσης της διαφοροποίησης.<sup>75</sup>

### 7.2. miRNA και οστική πόρωση: *in vitro* μελέτες

Τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα προέρχονται από *in vitro* μελέτες οι οποίες έδειξαν ότι τα miR-17-5p, miR-106a, miR-204 και miR-206 καταστέλλουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση και προάγουν την λιπώδη διαφοροποίηση.<sup>76</sup> Αυξημένη έκφραση των miR-195 και miR-497 σε MSC και MC3T3 (προ-οστεοβλαστικές) κυτταρικές σειρές έχουν συσχετιστεί με μειωμένη αλκαλική φωσφατάση(ALP) και με μειωμένη έκφραση του Runx2, υποδεικνύοντας τον αντι-οστεογενετικό ρόλο που έχουν στην διαφοροποίηση. Τόσο το miR-195 όσο και το miR-497 μειώνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση στα ανθρώπινα MSCs.<sup>77</sup> Αρκετά άλλα miRNAs αναστέλλουν τον Runx2, συμπεριλαμβανομένου του miR-204, miR-133 και του miR-433.<sup>78</sup> Το MiR-126 φαίνεται να λειτουργεί ως ένας αρνητικός ρυθμιστής του mRNA του PDGFR- $\alpha$ (platelet-derived growth factor  $\alpha$ ) και επίσης αναστέλλει τη

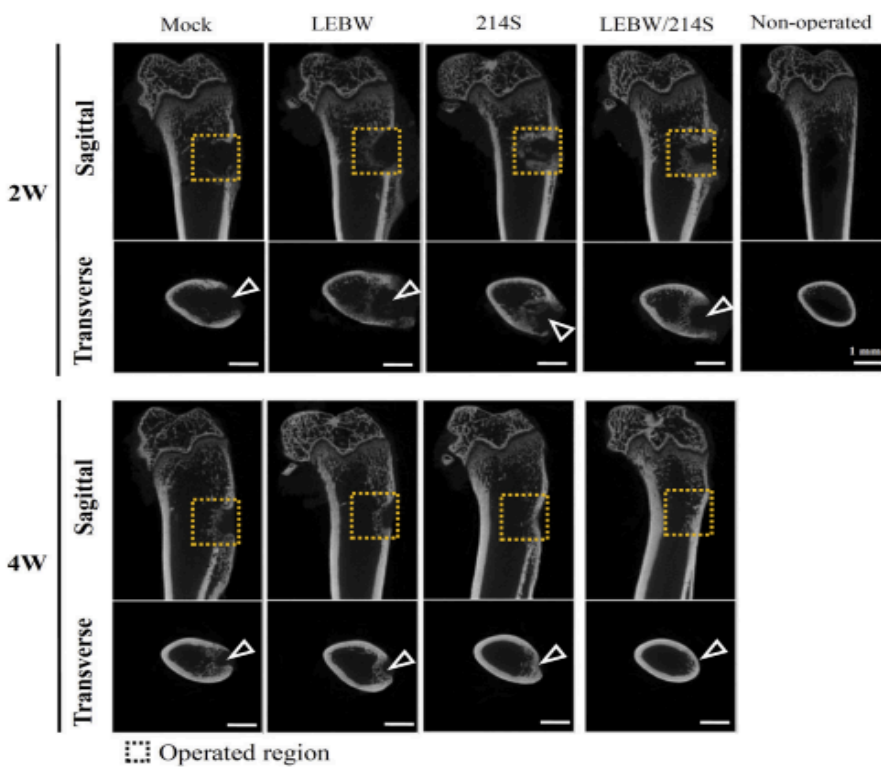


μετανάστευση των ανθρωπίνων οστεοβλαστών.<sup>79</sup> Τα miR-27a και miR-489 ρυθμίζουν αρνητικά την οστεοβλαστική διαφοροποίηση μέσω της αποσιώπησης του γονιδίου TNAP (tissue non-specific alkaline phosphatase).<sup>80</sup> Μερικά miRNAs προάγουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση από τα MSCs. Αυτά περιλαμβάνουν το miR-21 (αυξάνει την έκφραση της οστεοποντίνης και της αλκαλικής φωσφατάσης), το miR-29a, το miR-216a (ρυθμίζει το μονοπάτι PI3K/AKT που επάγεται από το c-Cbl), το miR-335-5p (αναστέλλει τον αναστολέα Dkk1 του μονοπατιού Wnt), το miR-637 και το miR-2861 (προάγει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση που επάγεται από τη BMP2, μέσω της καταστολής της έκφρασης της απακετυλάσης της ιστόνης 5).<sup>81,82,83,84,85,86</sup> Το miR-142-5p εμφανίζει σημαντικά αυξημένη έκφραση κατά τη διάρκεια της οστικής πώρωσης και συσχετίζεται με ενεργό οστεοβλαστογένεση μέσω στόχευσης του γονιδίου που κωδικοποιεί την Wwp1 (WW-domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1).<sup>87</sup>

### 7.3. miRNA και οστική πώρωση: *in vivo* μελέτες

Όσον αφορά τα αποτελέσματα που έχουμε από *in vivo* κλινικές δοκιμές, φάνηκε ότι τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-214 σχετίζονται με μειωμένο βαθμό σύνθεσης νέου οστού. Η ανάλυση έγινε με τη χρήση real time PCR και αφορούσε κατάγματα του μηριαίου οστού σε ηλικιωμένους ασθενείς. Επιπλέον φάνηκε ότι και σε ποντίκια το miR-214 έχει ανασταλτικό ρόλο στον οστικό σχηματισμό. Η ανάλυση *in vitro* για το miR-214 φανέρωσε ότι αναστέλλει την οστεοβλαστική ικανότητα, μέσω της στόχευσης του γονιδίου ATF4. Το γονίδιο ATF4 είναι ένα γονίδιο που κωδικοποιεί έναν από τους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες που απαιτούνται για την οστεοβλαστική λειτουργία.<sup>88</sup>

Μελέτη προσπάθησε να γεφυρώσει οστικά ελλείμματα που δημιουργήθηκαν στη μετάφυση του μηριαίου οστού σε ποντίκια. Οι ερευνητές χορήγησαν MSCs με αναστολή της έκφρασης του miR-214 είτε μόνα τους, είτε σε συνδυασμό με MSCs που εκφράζουν BMP2. Το αποτέλεσμα της χορήγησης αξιολογήθηκε στις δύο και στις τέσσερις εβδομάδες μέσω μCT. Η χορήγηση MSCs με αναστολή της έκφρασης του miR-214, προκάλεσε βελτιωμένη πώρωση στα οστικά ελλείμματα σε σχέση με την εμφύτευση MSCs που εκφράζουν BMP2. Σε συνέχεια αυτού του αποτελέσματος, η συνδυαστική εμφύτευση MSCs με αναστολή της έκφρασης του miR-214 και MSCs με έκφραση του BMP2 είχε συνεργικό αποτέλεσμα στην οστική πώρωση (εικόνα 3).<sup>89</sup>



**Εικόνα 3. Οστική πόρωση στις 2 και 4 εβδομάδες μετά τη χορήγηση.**

(Mock=ομάδα με δημιουργία οστικού ελλείμματος χωρίς τη χορήγηση θεραπείας/ LEBW= ομάδα όπου έγινε έγχυση MSCs με έκφραση του BMP2 / 214S= ομάδα όπου έγινε έγχυση MSCs με αναστολή της έκφρασης του miR-214 / LEBW-214S= ομάδα όπου έγινε συνδυαστική έγχυση MSCs με έκφραση του BMP2 και MSCs με αναστολή της έκφρασης του miR-214 / Non-operated= φυσιολογικό μηριαίο.<sup>89</sup>

Η τοπική έγχυση MSCs εμπλουτισμένων με miR-21 οδήγησε σε υψηλότερη οστική πυκνότητα και μηχανική δύναμη σε κλειστά κατάγματα του μηριαίου οστού σε μοντέλα ποντικών.<sup>86</sup>

Περιορισμένα είναι τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με το ρόλο των miRNAs στην οστεοκλαστική λειτουργία. Σε μελέτη που διεξήχθη σε ποντίκια φάνηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης των miR-9 και miR-181a στο αρθρικό υγρό ήταν μειωμένα πέντε ημέρες μετά από κάταγμα του κνημιαίου πλατώ. Προγράμματα βιοπληροφορικής ανάλυσης έδειξαν ότι τα παραπάνω miRNAs προσδένονται στην 3' αμετάφραση περιοχή του γονιδίου Cbl και καταστέλλουν την έκφρασή του. Το γονίδιο Cbl κωδικοποιεί μία E3 λιγάση ουβικουτίνης η οποία είναι σημαντική για τη σύνθεση του οστού και για τη ρύθμιση της ομοιόστασης, ενώ φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε κυτταρικές διεργασίες των οστεοκλαστών καθώς αυξάνει την αποδόμηση της πρωτεΐνης Bim και ενισχύει την επιβίωση και η ενεργοποίησή τους. Ο ρόλος των miR-9 και miR-181a στην ομοιόσταση των οστεοκλαστών ενισχύθηκε παραπάνω από πειράματα όπου αναστολή των προαναφερθέντων miRNAs οδήγησε σε μειωμένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων Bim και Cbl, μαζί με αυξημένη επιβίωση των κυττάρων *in vitro*, ενώ επίσης αυξημένη συγκέντρωση Cbl και μειωμένη Bim στο αρθρικό υγρό συσχετίστηκε με τα μειωμένα επίπεδα miR-9 και miR-181a. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι microRNAs ενέχονται στη ρύθμιση της διάρκειας ζωής και στην ενεργότητα των οστεοκλαστών.<sup>90</sup> Παρόλα αυτά, πε-

ραιτέρω μελέτες απαιτούνται για να αποσαφηνιστεί ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο ρυθμίζουν βασικές λειτουργίες των οστεοκλαστών. Επιπλέον, μελέτη των Hadjiargyrou M και συν. ανέδειξε έναν σημαντικό αριθμό miRNAs που παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση σε άθικτο οστό συγκριτικά με οστό μετά από κάταγμα σε διάφορες χρονικές στιγμές. Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που επιχείρησε να χαρτογραφήσει πλήρως την έκφραση των miRNAs στα αρχικά στάδια της οστικής πώρωσης προτείνοντας ότι αυτά τα μόρια μπορεί να έχουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της πώρωσης.<sup>91</sup> Επίσης, ο ρόλος των microRNAs αναδείχθηκε και από μελέτη των Waki T και συν. οι οποίοι σύγκριναν τα επίπεδα έκφρασης miRNAs σε πωρωθέντα και μη-πωρωθέντα κατάγματα σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά το κάταγμα. Οι συγγραφείς αναγνώρισαν πέντε miRNAs (miR-140-3p, miR-140-5p, miR-181a-5p, miR-181d-5p, miR-451a), τα οποία παρουσίαζαν σημαντικά αυξημένη έκφραση σε πωρωθέντα κατάγματα.<sup>92</sup> (Πίνακας 1).

**Πίνακας 1:** microRNAs με διαφοροποιημένα επίπεδα έκφρασης μεταξύ πωρωθέντων και μη-πωρωθέντων καταγμάτων.

miRNA	Function in bone physiology	Expression in association with fracture
MiR-9	Repress Cbl	Decreased
MiR-17-5p	Suppress osteoblast differentiation, promote adipocyte differentiation	
MiR-21	Increases expression of osteopontin and ALP	Increased
MiR-27a	Inhibit TNAP	
MiR-29a	Regulates the c-Cbl-mediated PI3K/AKT pathway	
MiR-106a	Suppress osteoblast differentiation, promote adipocyte differentiation	
MiR-140-3p		Increased
MiR-140-5p		Increased
MiR-142-5p	Osteoblastogenesis via WWP1	Increased
MiR-181a	Repress Cbl	Decreased
miR-181a-5p		Increased
MiR-181d-5p		Increased
MiR-187	Unknown	Decreased
MiR-195	Inhibits ALP, Runx2, cell proliferation and angiogenesis	
MiR-204	Inhibits Runx2, suppresses osteoblast differentiation, promotes adipocyte differentiation	
MiR-214	Inhibits osteoblast activity through targeting of ATF4	Decreased
MiR-216a	Regulates the c-Cbl-mediated PI3K/AKT pathway	
MiR-206	Suppress osteoblast differentiation, promote adipocyte differentiation	
MiR-320a		Increased
MiR-335-5p	Inhibits Dkk1	
MiR-451a		Increased
MiR-483-		Increased
MiR-518f	Skeletal homeostasis including regulation of insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP1) and several factors relating to the Wnt pathway (Dkk1, WISP1 and CTNBP1)	Increased
miR-637	Increases BMP2-induced osteoblast differentiation	
MiR-133	Inhibit Runx2	
MiR-433	Inhibit Runx2	
MiR-126	Inhibits PDGFR- $\alpha$ and migration of human osteoblasts	
MiR-489	Inhibit TNAP	
MiR-497	Inhibits ALP, Runx2, cell proliferation and angiogenesis	Decreased

Παρόλα αυτά, περιορισμένα είναι τα δεδομένα που να συσχετίζουν τη συμβολή των microRNAs στην ανάπτυξη ψευδάρθρωσης μετά από κάταγμα. Μελέτη των Waki *T και συν.* ανέλυσε το πρότυπο έκφρασης των miRNAs σε μοντέλα ποντικών όπου έγινε σύγκριση της οστικής πάρωσης σε κατάγματα της διάφυσης του μηριαίου και ατροφικών ψευδαρθρώσεων που δημιουργήθηκαν με καυτηριασμό. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης ανέδειξαν πέντε miRNAs (miR-31a-3p, miR-31a-5p, miR-146a-5p, miR-146b-5p, miR-223-3p) τα οποία παρουσίαζαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης στον νεο-δημιουργηθέν ιστό στην εστία του κατάγματος στην ομάδα με τις ψευδαρθρώσεις σε σχέση με την ομάδα της οστικής πάρωσης. Ενδιαφέρον ήταν το γεγονός ότι η έκφραση των miRNAs παρουσίαζε διακυμάνσεις στις διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά το κάταγμα και ειδικότερα τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν την 14<sup>η</sup> ημέρα μετά το κάταγμα, ενώ μετά παρατηρήθηκε μείωση αυτών.<sup>93</sup> Παρόλου που οι ακριβείς μηχανισμοί και η σημασία του διαφορετικού προτύπου έκφρασης των miRNA δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως, τα περισσότερα από αυτά τα miRNAs (με εξαίρεση το miR-31a-3p) είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση της φλεγμονώδους διαδικασίας, καθώς στα γονίδια-στόχους συμπεριλαμβάνονται γονίδια που ενέχονται σε φλεγμονώδη μονοπάτια.<sup>94</sup> Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με βάσεις δεδομένων, φαίνεται ότι το miR-31a-3p στοχεύει τα γονίδια του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGF3, fibroblast growth factor 3), το SATB2 (SATB homeobox 2), το Osterix, το Runx2, το γονίδιο BMPR2 και τη NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK), ενώ στα γονίδια-στόχους του miR-146a-5p και το miR-146b-5p συμπεριλαμβάνονται μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού Toll-like receptors όπως το TRAF6 (target tumour necrosis factor receptor-associated factor 6) και IPAK1(interleukin-1 receptor-associated kinase ). Δεδομένου ότι τα παραπάνω γονίδια-στόχοι είναι γνωστό ότι παίζουν ρόλο στη φλεγμονώδη διαδικασία, διεργασίες που ενέχονται στην οστική πάρωση, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η αυξημένη έκφραση των miRNAs μπορεί να αναστείλει τη διαδικασία της οστικής πάρωσης.<sup>95,96,97,98,99,100,101</sup> Η διαφοροποιημένη έκφραση των microRNAs συσχετίστηκε και με σημαντικά καθυστερημένη πάρωση σε κατάγματα της διάφυσης του μηριαίου σε ηλικιωμένα θηλυκά ποντίκια συγκριτικά με υγιή θηλυκά ποντίκια, ενώ επίσης τα ηλικιωμένα ποντίκια παρουσίασαν και μικρότερη ποσότητα οστεοποιημένου πόρου και μικρότερη οστική γέφυρα. Επίσης αναλύθηκαν συνολικά 1079 miRNAs με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών και αναγνωρίστηκαν 53 διαφορετικά εκφραζόμενα miRNAs στην εστία του κατάγματος. Μέσω της ανάλυσης των αποτελεσμάτων για τα miRNA που συμβάλλουν στη διαταραγμένη οστική πάρωση, το miR-494 παρουσίασε τη μεγαλύτερη

συσχέτιση με την οστική πώρωση, ενώ *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι το miR-494 αναστέλλει την αγγειογένεση, τη χονδρογένεση και την οστεογένεση.<sup>102</sup>

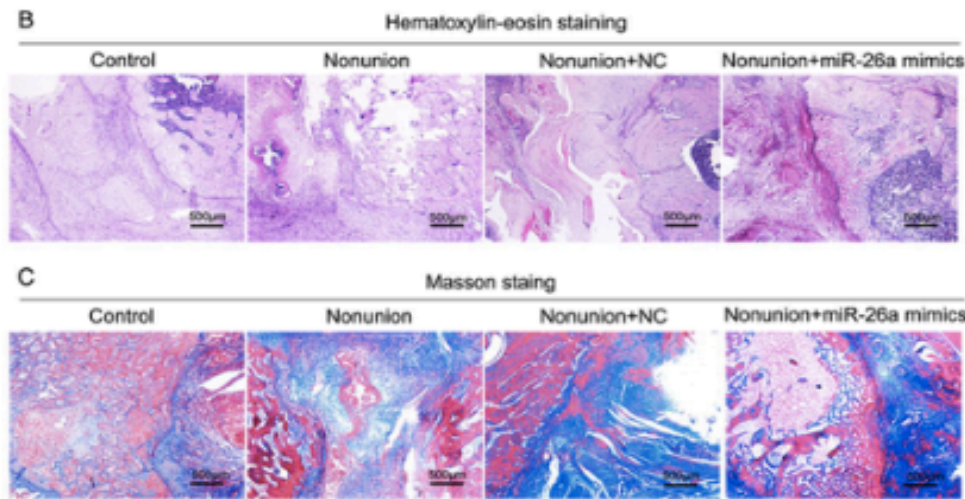
#### 7.4. miRNAs ως διαγνωστικοί δείκτες

Η συμβολή των microRNAs σε παθήσεις έχει αναδείξει και το ρόλο τους ως διαγνωστικοί δείκτες. Σε περιπτώσεις καταγμάτων, πρόσφατη μελέτη ανέδειξε 20 miRNAs τα οποία παρουσίαζαν διαφοροποιημένα επίπεδα έκφρασης στο οστό ασθενών με σηπτική ψευδάρθρωση της κνήμης συγκριτικά με ασθενείς με πωρωθέντα κατάγματα της κνήμης. Ειδικότερα, 14 microRNAs είχαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε οστικά δείγματα ασθενών με σηπτική αρθρίτιδα, ενώ τα miR-649, miR-29b-3p, miR-498, miR-365a-5p, miR-328-5p, miR-345-3p παρουσίαζαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης. Δεδομένου ότι τα παραπάνω miRNAs συμμετέχουν στη ρύθμιση γονιδίων που ενέχονται σε διεργασίες λοίμωξης αλλά και συχνότητας ψευδαρθρώσεων, προτάθηκε ότι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για τη διάγνωση των σηπτικών ψευδαρθρώσεων. Επιπλέον, ο ρόλος τους ως διαγνωστικοί δείκτες ενισχύεται και από δεδομένα που υποστηρίζουν ότι ενέχονται σε διεργασίες οστεογενετικής διαφοροποίησης και ανοσολογικής απάντησης. Ειδικότερα, το miR-29b-3p θεωρείται καλός διαγνωστικός βιοδείκτης για ασθενείς με ιδιοπαθή οστεοπόρωση, ενώ τα miR-498 και miR-345-3p ρυθμίζουν την οστεογενετική διαφοροποίηση σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα από οστό ποντικού. Επιπλέον, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απάντηση, καθώς έχει βρεθεί ότι εκφράζονται σε CD4<sup>+</sup>T κύτταρα στο αρθρικό υγρό και στο αίμα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και στο ρινικό επιθήλιο ασθενών με αλλεργική ρινίτιδα. Το miR-365a-5p μπορεί να στοχεύσει την HDAC4 η οποία μπορεί να προσδεθεί στο RUNX2, αναστέλλοντας τη λειτουργία του. Επιπλέον, στα γονίδια-στόχους των προαναφερθέντων microRNAs συγκαταλέγονται γονίδια με σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της σηπτικής ψευδάρθρωσης όπως τα MLANA (melan-A), FERMT2 (fermitin family homolog 2), SUN1 (Sad1/UNC-84 domain-containing 1), COL5A3 (collagen type V alpha 3 chain), και το ELOVL4 (elongation of very long chain fatty acids 4). Ο μηχανισμός βάσης του οποίου συμμετέχουν αυτά τα miRNAs και τα γονίδια στόχος τους στην σηπτική ψευδάρθρωση των καταγμάτων κνήμης απαιτεί περαιτέρω μελέτη. Τα ευρήματα αυτά εγείρουν κάποια ερωτήματα σχετικά με το ρόλο αυτών των miRNA σε εστίες σηπτικής ψευδάρθρωσης και επισημαίνουν την ανάγκη για προσδιορισμό των βιολογικών λειτουργιών αυτών των miRNAs.<sup>103</sup>

## 7.5. miRNAs ως θεραπευτικά μόρια

### 7.5.1. Το miR-26a προάγει την οστική πώρωση μέσω της στόχευσης του SOSTDC1

Το microRNA-26a (miR-26a) συμμετέχει στον οστικό μεταβολισμό και μάλιστα προάγει την οστεογενετική διαφοροποίηση σωματικών βλαστοκυττάρων. Στα γονίδια-στόχους του miR-26a συμπεριλαμβάνεται το γονίδιο SOSTDC1 (Sclerostin domain-containing 1) το οποίο ανήκει στην οικογένεια sclerostin και λειτουργεί ως BMP ανταγωνιστής. Το SOSTDC1 συμμετέχει στον οστικό μεταβολισμό, εκφράζεται στο περίοστεο και φαίνεται ότι σε ποντίκια στα οποία υπάρχει έλλειψη του SOSTDC1 παρουσιάζουν αυξημένο οστικό όγκο και ενισχυμένο οστικό σχηματισμό. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι το SOSTDC1 ίσως είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της οστικής πώρωσης. Η φυσιολογική λειτουργία του SOSTDC1 είναι ως ένας αναστολέας του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/ $\beta$ -catenin και ασκεί τη λειτουργία του μέσω της ρύθμισης αυτού του μονοπατιού. Μελέτη διερεύνησε τη σχέση μεταξύ του SOSTDC1 και του miR-26a και το ρόλο τους στην οστική πώρωση σε μοντέλα ποντικίου όπου πραγματοποιήθηκαν οστεοτομίες στη διάφυση του μηριαίου ποντικίων, οι οποίες στη συνέχεια θεραπεύτηκαν με τη τοποθέτηση ενός ενδομυελικού kirchner. Οι ερευνητές προκειμένου να διερευνήσουν το ρόλο του miR-26a στη ψευδάρθρωση, πραγματοποίησαν εγχύσεις με miR-26a στον οστικό πόρο σε ποντίκια στα οποία είχε γίνει αφαίρεση του περιostίου (ομάδα ψευδάρθρωσης). Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα ζώα παρουσίασαν εικόνα πόρου την 4<sup>η</sup> και την 8<sup>η</sup> εβδομάδα μετεγχειρητικά αλλά δεν παρατηρήθηκε οστική πώρωση 8 εβδομάδες μετά το χειρουργείο, υποδεικνύοντας ότι υπήρχε ψευδάρθρωση. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα της έκφρασης του miR-26a στον ορό και στους ιστούς των ποντικίων την 8<sup>η</sup> εβδομάδα μετά το χειρουργείο ήταν σημαντικά μειωμένα στα ποντίκια με τη ψευδάρθρωση, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου SOSTDC1 ήταν αυξημένα σε ποντίκια της ομάδας με ψευδάρθρωση σε σύγκριση με την ομάδα ποντικίων με φυσιολογική πώρωση υποδεικνύοντας υποδεικνύοντας κακή οστική πώρωση στην περίπτωση της ψευδάρθρωσης. Ο ρόλος του miR-26a στην διαδικασία της πώρωσης επιβεβαιώθηκε και με ανοσοϊστοχημικές χρώσεις όπου μετά από χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης και χρώση με Masson επιβεβαιώθηκε ο σχηματισμός πόρου 4 εβδομάδες μετά την έγχυση με miR-26a και απουσία καταγματικής γραμμής επιβεβαιώνοντας ότι το miR-26a ενισχύει τη διαδικασία της πώρωσης, τη δημιουργία νέου χόνδρου και τη νεοαγγείωση (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4.** Ανοσοϊστοχημική χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης και Masson σε ποντίκια πριν και μετά την έγχυση με miR-26a.<sup>104</sup>

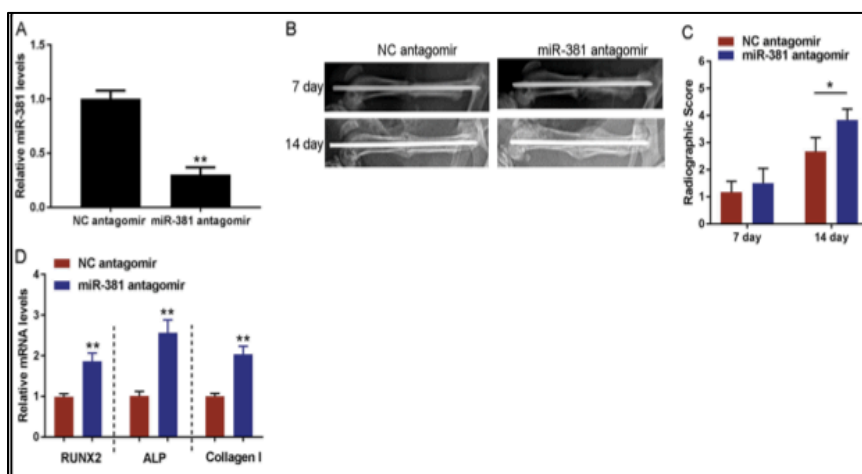
Η επίδραση του miR-26a στη ψευδάρθρωση ενισχύθηκε και από τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης γονιδίων του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/ $\beta$ -catenin, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον οστικό μεταβολισμό. Ειδικότερα παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του μονοπατιού μετά τις εγχύσεις με miR-26a υποδηλώνοντας ότι το miR-26a προάγει την οστική πάρωση πιθανώς μέσω της μείωσης της έκφρασης του SOSTDC1 και ενεργοποιώντας το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ $\beta$ -catenin.<sup>104</sup>

### 7.5.2 Το miR-381 ως ρυθμιστής της διαφοροποίησης μεσεγχυματικών κυττάρων (MSCs) προς οστεοβλάστες

Παρόμοια μελέτη προσπάθησε να προσδιορίσει την σχέση διαφορετικά εκφραζόμενων miRNAs σε ιστούς με ατροφική ψευδάρθρωση με το μονοπάτι Wnt. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt μπορεί να προάγει την οστεογενετική διαφοροποίηση των οστικών μεσεγχυματικών κυττάρων μέσω της αναστολής του PPAR $\gamma$ . Σε ατροφικές ψευδαρθρώσεις, παράγοντες συσχετιζόμενοι με το μονοπάτι Wnt, όπως οι πρωτεΐνες WNT5A και FZD3 και η έκφραση του Runx2, της ALP, και του κολλαγόνου τύπου I είναι σημαντικά μειωμένα, ενώ η έκφραση του PPAR $\gamma$  είναι αυξημένη. Αρχικά έγινε ανάλυση με τη χρήση μικροσυστοιχιών και προσδιορίστηκαν 557 miRNAs με διαφορετική έκφραση σε εστίες ατροφικής ψευδάρθρωσης, με τα αποτελέσματα να υποστηρίζουν ότι 124 miRNAs παρουσίαζαν αυξημένα επίπεδα έκφραση. Με τη χρήση της βάσης δεδομένων DIANA-microT-CDS, οι συγγραφείς παρατήρησαν ότι γονίδια-στόχοι 93 miRNAs συμμετέχουν στη σηματοδότηση Wnt. Από αυτά τα miRNAs, τα miR-520d, miR-27b, miR-381, miR-4694, και miR-1323 παρουσίασαν σημαντικά αυξημένα, με το miR-381 να έχει την μεγαλύτερη αύξηση. Οι ερευνητές επικεντρώθηκαν στο miR-381, μετά από οστεογενετική διαφοροποίηση των MSCs, τα MSCs επιμολύνθηκαν με τον αναστολέα του miR ή το ίδιο το miR-381 και διερεύνησαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων PPAR $\gamma$ , Runx2, ALP και κολλαγόνου τύπου I. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αναστολή του miR-381 μείωσε σημαντικά την πρωτεΐνη



PPAR $\gamma$ , ενώ αύξησε τις πρωτεΐνες Runx2, ALP και κολλαγόνο τύπου I, με την έκφραση της ALP να είναι σημαντικά ενισχυμένη. Αντιθέτως η υπερέκφραση του miR-381 προκάλεσε αντίθετα αποτελέσματα στις ανωτέρω πρωτεΐνες. Επιπλέον όπως φάνηκε από τη χρώση Alizarin red και ALP, η αναλογία του ασβεστοποιημένου οστού ήταν αυξημένη μετά την αναστολή του miR-381, ενώ μειώθηκε με την υπερέκφραση του. Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι η υπερέκφραση του miR-381 μπορεί να αναστείλλει την οστεογενετική διαφοροποίηση στα ανθρώπινα BMSCs. Επίσης παρατηρήθηκε ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων WNT5A και FZD3 ήταν σημαντικά μειωμένα όταν έγινε υπερέκφραση του miR-381 και αυξήθηκαν με την αναστολή του miR-381. Η επίδραση του miR-381 στη ρύθμιση των παραπάνω γονιδίων επιβεβαιώθηκε και με πειράματα λουσιφεράσης όπου επιβεβαιώθηκε ότι το miR-381 μπορεί να δεσμευτεί στο 3' αμετάφραστη περιοχή των γονιδίων WNT5A και του FZD3, με αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης τους και την περαιτέρω διαταραχή της οστεογενετικής διαφοροποίησης των BMSC. Όλα τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν και με *in vivo* μελέτη όπου σε μοντέλο ποντικού που είχε πραγματοποιηθεί οστεοτομία στη διάφυση του μηριαίου, πραγματοποιήθηκαν εγχύσεις με τον αναστολέα του miR-381 και παρατηρήθηκε παρουσία σκληρού πόρου στην εστία του κατάγματος μετά τις εγχύσεις με αναστολέα του miR-381, ενώ επίσης η εστία του κατάγματος εξαφανίστηκε. Παρομοίως, η ακτινογραφική βαθμολόγηση της απεικόνισης του οστικού σχηματισμού ήταν υψηλότερη μετά τις εγχύσεις με αναστολέα του miR-381, ενώ αυξημένα ήταν και τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων Runx2, ALP και κολλαγόνου τύπου I επιβεβαιώνοντας την αντι-οστεογενετική λειτουργία του miR-381 *in vivo* (Εικόνα 5).<sup>105</sup>



**Εικόνα 5: miR-381 και οστικός πόρος σε μοντέλο ποντικού.** Α) Η έκφραση του miR-381 στον οστικό πόρο μετά από 14 ημέρες από την έγχυση του αναστολέα miR-381. (Β) Ακτινογραφικό έλεγχο του οστού μετά από έγχυση του αναστολέα miR-381. (Γ) Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων RUNX2, ALP και κολλαγόνου τύπου I στην εστία του πόρου την 14<sup>η</sup> ημέρα από την έγχυση του αναστολέα miR-381.<sup>105</sup>



## 7.6. Κυκλοφορούντα miRNAs και οστική πώρωση

Τα κυκλοφορούντα miRNAs έχουν αναγνωριστεί σε διάφορα σωματικά υγρά, ενώ πληθώρα μελετών υποστηρίζει τη χρήση τους ως βιοδείκτες. Ανιχνεύονται σε κυστίδια που εντοπίζονται σε βιολογικά υγρά και έχει διατυπωθεί η άποψη ότι τα επίπεδα έκφρασής τους στην κυκλοφορία συνάδουν με αλλαγές στην έκφρασή τους στον ιστό ή κύτταρα από τα οποία εκκρίνονται. Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασής τους ενδείκνυται καθώς η απομόνωσή τους γίνεται μη επεμβατικά από δείγματα βιοψίας με αποτέλεσμα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την οστική δραστηριότητα. Στη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία, υπάρχει περιορισμένος αριθμός μελετών που έχει επικεντρωθεί στον προσδιορισμό κυκλοφορούντων miRNAs σε ασθενείς με κατάγματα. Μια από αυτές τις μελέτες, ανέλυσε τα επίπεδα miRNAs στον ορό σε γυναίκες με οστεοπορωτικά κατάγματα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, τα επίπεδα των miR-21-5p, miR-122-5p και miR-125b-5p ήταν σημαντικά μειωμένα στον ορό γυναικών με οστεοπορωτικά κατάγματα.<sup>106</sup> Ειδικότερα, τα επίπεδα του miR-21-5p στον ορό συσχετίστηκαν με τα επίπεδα του CTX (carboxy terminal collagen crosslinks), ενός δείκτη για την οστική απορρόφηση. Σε μια μελέτη, πέντε miRNAs (miR-21, miR-23a, miR-24, miR-100, miR-125b), ήταν αυξημένα τόσο στον ορό όσο και σε οστικά δείγματα από ασθενείς με οστεοπορωτικά κατάγματα σε σύγκριση με ασθενείς με μη οστεοπορωτικά κατάγματα.<sup>107</sup> Επιπλέον, μελέτη έδειξε ότι τα επίπεδα των miR-10a-5p, miR-10b-5p και miR-22-3p ήταν αυξημένα, ενώ τα επίπεδα των miR-133b, miR-328-3p και let-7g-5p ήταν μειωμένα σε γυναίκες ασθενείς με οστεοπορωτικά κατάγματα του αυχένα του μηριαίου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου που περιελάμβανε γυναίκες όμοιας ηλικίας χωρίς κατάγματα.<sup>108</sup> Σε άλλη μελέτη, τα επίπεδα στο πλάσμα του miR-92a ήταν σημαντικά μειωμένα την ημέρα 1, 7, και 14 μετά το κάταγμα αλλά είχαν επανέλθει στο φυσιολογικό την ημέρα 21 μετά το τραυματισμό ή το χειρουργείο. Επίσης φάνηκε ότι η αναστολή του miR-92a μέσω της χορήγησης είτε τοπικά είτε συστηματικά επιτάχυνε την οστική πώρωση σε μοντέλα ποντικών με κάταγμα του μηριαίου οστού.<sup>109</sup> Η αναστολή του miR-92a δεν επηρεάζει την οστεοβλαστική ή χονδροκυτταρική διαφοροποίηση, αλλά συσχετίστηκε με ενίσχυση της αγγειογένεσης στον οστικό πόρο και στους παρακείμενους ιστούς. Επίσης άλλη μια μελέτη, προσδιόρισε τα επίπεδα έκφρασης 187 miRNAs στον ορό, έπειτα από σύγκριση μεταξύ 39 ασθενών με χαμηλής ενέργειας κάταγμα και μιας ομάδας ελέγχου με υγιή άτομα. Από αυτή τη μελέτη, οχτώ miRNAs (miR-152-3p, miR-30e-5p, miR-140-5p, miR-324-3p, miR-19b-3p, miR-335-5p, miR-19a-3p, miR-550a-3p) συσχετίστηκαν ως πιθανοί δείκτες για την οστική διεργασία και έδειξαν εξαιρετική ικανότητα διάκρισης των ασθενών με κάταγμα από την ομάδα ελέγχου.<sup>110</sup> Όλα αυτά

τα δεδομένα συνηγορούν σε μια πιθανή σύνδεση μεταξύ κάποιων miRNAs και της οστικής πώρωσης, ωστόσο κανένα miRNA επί του παρόντος δεν χρησιμοποιείται ως δείκτης για το προσδιορισμό μιας ψευδάρθρωσης.

## 8. Πιθανοί βιοδείκτες για οστική πώρωση

Η δυνατότητα της έγκαιρης αναγνώρισης των ασθενών με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ψευδάρθρωσης θα επιτρέψει την έγκαιρη, κατάλληλη και στοχευμένη παρεμβατική θεραπεία που θα οδηγήσει σε ένα πετυχημένο αποτέλεσμα.<sup>111</sup> Μια τέτοια προσέγγιση δεν θα ευνοήσει μόνο τους ασθενείς, αλλά και το σύστημα υγείας και κυρίως το κόστος που σχετίζεται με μακρόχρονες νοσηλείες εξαιτίας επιπλοκών από τις ψευδαρθρώσεις. Ωστόσο, για να είναι πετυχημένη με τέτοια στρατηγική οι κατάλληλοι βιοδείκτες θα πρέπει να είναι διαθέσιμοι ώστε να προβλεφθεί έγκαιρα η αναμενόμενη διαταραχή στην πώρωση των καταγμάτων. Ένας βιοδείκτης θα πρέπει να διαθέτει κάποιες σημαντικές ιδιότητες για να μπορεί να είναι χρήσιμος όπως είναι η ικανότητα της πρόβλεψης της ψευδάρθρωσης, η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα και να είναι εύκολα διαθέσιμος.<sup>112</sup> Οι βιοδείκτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαχωρίζονται σε γονιδιακά προδιαθεσικούς παράγοντες και βιοδείκτες που κυκλοφορούν ελεύθεροι στον ορό.

Η διαδικασία της πώρωσης απαιτεί άμεσα το συντονισμό αρκετών κυτταρικών τύπων μαζί με μονοπάτια τα οποία δρουν τόσο τοπικά όσο και συστηματικά. Αυτά τα μονοπάτια περιλαμβάνουν φλεγμονώδη μόρια, πρωτεΐνες, ένζυμα και οστεοεπαγωγικούς αυξητικούς παράγοντες. Έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα αυτών των μορίων αυξάνονται μετά το κάταγμα και πιθανώς να επηρεάζονται από παράγοντες όπως το χειρουργείο, η φαρμακευτική αγωγή και η χορήγηση υγρών και αίματος. Επομένως εάν υφίσταται μια ανεπαρκής απάντηση που οδηγεί στο σχηματισμό ψευδάρθρωσης, τότε αυτά τα μόρια εν δυνάμει θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για τη διαδικασία της πώρωσης. Πάνω σε αυτή την αρχή διάφορα μόρια θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν. Ο καθορισμός των επιπέδων της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) κατά τη διάρκεια της πώρωσης έδειξε μια σύνδεση μεταξύ της αύξησης της αλκαλικής φωσφατάσης και της πώρωσης.<sup>113</sup> Σε περιπτώσεις πιθανούς σηπτικής ψευδάρθρωσης, ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της οστεοκαλσίνης ορού, της αλκαλικής φωσφατάσης και της δεοξυπυριδινολίνης επέδειξε ακρίβεια της τάξης του 96%.<sup>114</sup> Επιπλέον, μελέτες υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα των MMP9 και MMP13 στα ούρα πιθανώς να έχουν ένα ρόλο ως μεταβολικοί δείκτες για την παρακολούθηση της εξέλιξης της πώρωσης, καθώς φάνηκε ότι συνάδουν με την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων σε ιστούς με πόρο.<sup>115</sup> Απεναντίας το καρβοξυτελικό προπεπτίδιο του

προκαλλαγόνου τύπου I (PICP), η σκελετική αλκαλική φωσφατάση (sALP) και το αμινοτελικό προπεπτίδιο του προκαλλαγόνου τύπου III (PIIINP) δε συσχετίστηκαν με την οστική πώρωση.<sup>116</sup> Παρομοίως συσχέτιση δε παρατηρήθηκε και με τα επίπεδα των TGF- $\beta$ , PDGF, FGFb και BMP 2/4 καθώς δεν παρατήθηκαν διαφορές στα επίπεδά τους μεταξύ ιστών με ψευδάρθρωση και ιστών με φυσιολογική πώρωση.<sup>117</sup> Δύο επιπλέον μόρια τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες είναι τα γονίδια TRACP 5b και CTX δεδομένου ότι τα επίπεδά τους βρέθηκαν μειωμένα σε ασθενείς με ψευδάρθρωση.<sup>118</sup> Επίσης, ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργείο για ορθοπαιδικές παθήσεις παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα 2 (FGF2), ωστόσο αυτά τα επίπεδα φαίνεται ότι ήταν σημαντικά μειωμένα στους ασθενείς που παρουσίασαν μετεγχειρητικά ψευδάρθρωση.<sup>119</sup> Ο TGF - $\beta$ 1 είναι ένας παράγοντας ο οποίος έχει αποτελέσει αντικείμενο μελετών ως ένας πιθανός βιοδείκτης της ψευδάρθρωσης από πολλούς ερευνητές. Ωστόσο υπάρχουν δεδομένα αντιφατικά μεταξύ τους ως προς τα επίπεδα αυτού του παράγοντα τις πρώτες εβδομάδες σε ασθενείς με ψευδάρθρωση.<sup>120</sup>

## 9. Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να θεωρηθεί μια πολλά υποσχόμενη κλινική λύση για παθήσεις που θεραπεύονται με rhBMPs, ωστόσο μεταξύ περισσότερων από 1300 κλινικές δοκιμές μόνο το 8,2% περιλαμβάνουν τη μεταφορά αυξητικών παραγόντων και οι περισσότερες από αυτές στόχευαν το καρδιαγγειακό σύστημα. Με τη χρήση γονιδιακής θεραπείας μέσω αδενοϊών, οι BMP-6 και 9, βρέθηκε ότι είναι πιθανώς, οι πιο πιθανοί επαγωγοί της οστεογενετικής διαφοροποίησης μεταξύ 14 διαφορετικών BMP γονιδίων και ακολουθούνται στενά από την BMP-2.<sup>121</sup>

Η γονιδιακή θεραπεία συχνά χωρίζεται σε δύο κατηγορίες είτε την *in vivo*, στην οποία το γονίδιο μεταφέρεται απευθείας στα κύτταρα-δέκτες της περιοχής ενδιαφέροντος, είτε την *ex vivo*, στην οποία τα γονίδια ενδιαφέροντος εισέρχονται *in vitro* στο πληθυσμό κυττάρων-στόχων όπως βλαστοκύτταρα ή ινοβλάστες και στην συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρονται στην επιθυμητή θέση *in vivo*. Στη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία, υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός μελετών σχετικά με την εφαρμογή της *in vivo* (Πίνακας 2) και της *ex vivo* (Πίνακας 3) γονιδιακής θεραπείας για την πώρωση των καταγμάτων. Ωστόσο, μικρός αριθμός μελετών συγκρίνουν την *in vivo* και τη γονιδιακή θεραπεία που μεσολαβείται από κύτταρα για την οστική πώρωση.

In vivo gene therapy for bone regeneration.

Vector and gene	Target site	Main results
Adenoviral <i>BMP-7</i>	Ectopic site (subcutaneous and intramuscular) in a mouse model	Induced bone formation 4 weeks following implantation
Adenoviral <i>BMP-2</i>	Ectopic site (intramuscular) in a mouse model	Bone was formed 2 weeks following gene delivery in immunodeficient mice and 3 weeks following gene delivery in immunocompetent mice
Adenoviral <i>BMP-9</i>	Injection into thigh muscles of athymic rats or Sprague-Dawley rats	Bone volume obtained in athymic rats was 3 times higher than that noted in immunocompetent animals
Adenoviral <i>BMP-2</i>	Rabbit femur segmental defect model	After 7 weeks, robust bone formation was noted in the defect sites and some defects were bridged by new bone
Adenoviral <i>BMP-2</i>	Femur segmental defect regeneration in a rat model	50% of defects were bridged with mature bone that did not contain cartilage islands 8 weeks after gene delivery
Adenoviral <i>BMP-2</i>	Femur segmental defect regeneration in a rat model	When the adBMP-2 injection was delayed until 10 days after defect formation, 86% of defects were bridged with bone, compared with no defects when gene delivery occurred during defect formation and 50% of defects when the adenovector was injected 1 day later
Adenoviral <i>BMP-2</i>	High dose of adBMP-2 injected 5 days after defect formation in a rat femur segmental defect model	100% bridging of defects 8 weeks following gene delivery
Adenoviral <i>BMP-2</i> or <i>BMP-6</i>	Osteochondral defects in a femoral condyle in a pony model	Bone formation failed to provide long-term healing
Adenoviral <i>BMP-2</i>	Tibia bone defects in an osteoporotic sheep model	Induced faster defect healing, higher callus stiffness during the initial stages of the healing process
AAV <i>rhBMP-2</i> under TetON regulation	Ectopic site (intramuscular) and critically sized calvarial defects in a mouse model	Mice that were given Dox demonstrated bone formation in both in vivo models compared to none in mice prevented from receiving Dox
rAAV-caAlk2	Mouse femoral allograft model	Complete bridging of bone around a cortical allograft was possible
scAAV2.5-BMP2	Mouse femoral allograft model	scAAV2.5-BMP2 allografts formed a new cortical shell that was indistinguishable from that formed by live autografts
Retroviral fused <i>BMP-2/4</i>	Femoral fracture in a rat model	Healing was achieved in a similar rate to untreated controls and was followed by production of massive amounts of ectopic bone that eventually remodeled
Retroviral <i>COX-2</i>	Femoral fracture in a rat model	Faster healing (3 vs. 5 weeks in the control group) and avoided ectopic bone formation
naked DNA, <i>BMP-2</i>	Repeated injections (1-8 times) into the skeletal muscle of mice at a divided dose	Bone formation was more frequent when more injections were used
GAM, <i>BMP-4</i>	Femoral osteotomy model in rats	Bridging of the gap observed after 9 weeks, while healing was achieved after 18 weeks
GAM, <i>BMP-4</i> and <i>PTH1-34</i>	Canine tibia osteotomy model	Bridging was observed at 4 weeks and healing at 12 weeks
GAM, <i>PTH1-34</i>		Connection found between bone formation and both the dose of plasmid DNA delivered and defect size
Sonoporation, <i>BMP-9</i>	Ectopic (intramuscular) bone formation in a mouse model	Gene activity was limited for several weeks and no tissue damage was found
Electroporation, <i>BMP-9</i>	Nonunion radial defect regeneration in a mouse model	Complete healing of the bone defect 5 weeks following gene delivery
Liposome-mediated <i>BMP-2</i>	Peri-implant bone defects in a porcine calvaria model	New bone formation was enhanced compared with control groups

Πίνακας 2. In vivo γονιδιακή θεραπεία<sup>122</sup>

Ex vivo gene therapy for bone regeneration.

Vector and gene	Cells	Target site	Main results
Adenoviral <i>BMP-2</i>	Autologous bone marrow cells	Femur segmental defect in syngeneic rats	Superior bone properties to those treated BMP-2 protein alone
Adenoviral <i>BMP-2</i>	Human bone marrow MSCs	Subcutaneously implantation and radius bone segmental defect in nude mice	Bone formation in ectopic sites, and radius bone regeneration. Similar results were obtained with hMSCs isolated from a patient suffering from osteoporosis
Adenoviral <i>BMP-2</i>	Rabbit bone marrow MSCs	Subcutaneously implantation in nude mice	Robust ectopic bone formation after 4 weeks
Adenoviral <i>BMP-2</i>	Human bone marrow vs. adipose tissue-derived MSCs	Athymic rat spinal fusion	No difference in bone formation was noted
Adenoviral <i>BMP-2</i>	Human bone marrow MSCs	Mandible bone defect regeneration in NOD/SCID mice	Complete defect regeneration achieved
Adenoviral <i>BMP-2</i>	Porcine bone marrow MSCs	Large-scale skull defect in a porcine model	Defects were completely repaired after 6 months. The bone formed was significantly thicker and stiffer.
Adenoviral/retroviral/cationic lipid, human <i>BMP-2</i>	Rat bone marrow MSCs	Ectopic (subcutaneous) bone formation or orthotopic critical-size defect in a rat cranium	adBMP-2 MSCs showed statistically significant increase in bone formation relative to the other vectors
Lentiviral <i>BMP-4</i>	Rat bone marrow MSCs	Segmental defect in rat calvaria	Complete defect healing
Retroviral <i>osterix</i>	Mouse bone marrow MSCs	Calvaria bone defects in a mouse model	MSCs induced 85% healing
Lentiviral <i>BMP-2</i>	Rat bone marrow buffy-coat cells	"Same-day" implantation in a rat femoral defect	Radiographic evidence of bone healing and higher bone volume
Plasmid DNA, <i>BMP-4</i> and <i>VEGF</i>	Human bone marrow MSCs	Implanted subcutaneously in NOD/SCID mice	Significant increase in the quantity of bone formed
Plasmid DNA, <i>BMP-2</i>	Rat bone marrow MSCs	Culture in a perfusion bioreactor and then implanted subcutaneously in a rat model	Homogeneous bone formation was histologically observed
Liposome-mediated and adenoviral, <i>BMP-2</i>	Rat bone marrow MSCs	Healing of critical size defects in the rat mandible.	Defects were healed at 6 weeks after gene transfer when liposomes were used, and within 4 weeks when adBMP-2 was used
Liposome mediated, <i>bFGF</i>	Rabbit periosteum MSCs	Critical-size segmental bone defect in the rabbit radius	Elevation in bone formation and capillary regeneration
Liposome mediated, <i>BMP-7</i>	Rat bone marrow MSCs	Mandible distraction osteogenesis site in rat model	Higher bone formation and earlier mineralization in the distracted callus
Liposome mediated, <i>osterix</i>	Rabbit bone marrow MSCs	Rabbit model of mandibular lengthening	Higher bone mineral density, thickness of new trabeculae, and volume of the newly formed bone in the distraction zones
Nucleofection, <i>BMP-2</i> or <i>BMP-9</i>	Human bone marrow MSCs	Implantation to ectopic (intramuscular) sites in NOD/SCID mice	Bone formation was induced 4 weeks after cell implantation
Nucleofection, <i>BMP-6</i>	Porcine adipose tissue-derived MSCs.	Posterior spinal fusion in a immunodeficient mouse model	Large bone mass was formed adjacent to the lumbar area.
Nucleofection, <i>BMP-6</i>	Porcine adipose tissue-derived MSCs	Repair of vertebral bone defects in a rat model	The rate of bone formation was two times faster than that in the no cells treated group
Nucleofection, <i>BMP2/Rumc2</i>	Human adipose MSCs	Dorsal subcutaneous implantation to BALB/c-nu mice	Superior bone formation compared with cells nucleofected with <i>BMP-2</i> alone

Πίνακας 3. Ex vivo γονιδιακή θεραπεία<sup>122</sup>

Παρόλο που τα αποτελέσματα των μελετών έδειξαν ότι η ικανότητα για σχηματισμό οστού ήταν παρόμοια και με τις δύο στρατηγικές, φαίνεται ότι υπάρχουν και σημαντικές διαφορές στην εφαρμογή των δύο προσεγγίσεων. Ειδικότερα, μελέτη των Zachos T και συν. έδειξε ότι η χρήση του επιμολυσμένων κυττάρων επέτρεψε καλύτερο έλεγχο της οστικής σύνθεσης.<sup>123</sup> Επιπλέον η *ex vivo* γονιδιακή θεραπεία επιτρέπει καλύτερο έλεγχο στην αναγνώριση των κυττάρων υποδοχής σε αντίθεση με την *in vivo* γονιδιακή θεραπεία στην οποία είναι δύσκολο να στοχεύσεις το γονίδιο σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό κυττάρων. Σε άλλη μελέτη φάνηκε ότι με τη γονιδιακή θεραπεία είναι πιθανό να στοχεύσουμε ένα πληθυσμό από προγονικά κύτταρα-δέκτες με τη εμφύτευση ενός βιοαπορροφήσιμου ικριώματος.<sup>124</sup> Άλλη προσέγγιση περιλαμβάνει την έγχυση βλαστοκυττάρων την ίδια μέρα της απομόνωσης τους και την εμφύτευσή τους χωρίς να διαμεσολαβήσει η φάση της καλλιέργειας.<sup>125</sup> Οι περισσότερες ορθοπαιδικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν την *ex vivo* γονιδιακή θεραπεία εξαιτίας των επιπλέον πλεονεκτημάτων που προσφέρουν τα κυτταρικά δομικά στοιχεία, τα οποία επιτρέπουν γρήγορη και προβλέψιμη οστική πάρωση. Συνήθως χρησιμοποιούνται τα μεσεγχοματικά βλαστοκύτταρα λόγω του οστεογενετικού τους δυναμικού και της ικανότητας να λειτουργούν και ως αυτοκρινή και ως παρακρινή στοιχεία μέσω της διαφοροποίησης των εμφυτευμένων κυττάρων και της επιστράτευσης κυττάρων του ξενιστή.<sup>126</sup>

### 9.1. *In vivo* γονιδιακή θεραπεία

Έκτοπος σχηματισμός οστού έχει επιτευχθεί με ποικίλους αδενοϊούς που κωδικοποιούν διάφορα γονίδια των BMPs και παρουσιάζουν μια δυναμική για της χρήσης τους ως φορείς για *in vivo* μεταφορά με στόχο την οστική πάρωση. Αδενοϊκά σωματίδια που κωδικοποιούν το γονίδιο της BMP-7 (adBMP-7) συνδυάστηκαν με φορέα βόιου κολλαγόνου και εμφυτεύτηκαν σε μια έκτοπη θέση σε μοντέλο ποντικού επάγοντας ενισχυμένη οστική πάρωση.<sup>127</sup> Ωστόσο, η απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος στην παρουσία αυτών των φορέων επιβράδυνε το σχηματισμό οστού σε μοντέλα ποντικών που χορηγήθηκε adBMP-2 ή adBMP-9 με τον οστικό όγκο να είναι υψηλότερος σε αθυμικά ποντίκια συγκριτικά με ανοσοεπαρκή ζώα. Μετά την οστεογενετική δράση της γονιδιακής θεραπείας με BMPs που επάγεται από αδενοφορείς σε μια έκτοπη θέση, προσπάθειες έγιναν για να χρησιμοποιηθεί αυτή η στρατηγική ώστε να δημιουργηθεί οστόν σε μια περιοχή οστικού ελλείμματος. Οι προσπάθειες αυτές περιελάμβαναν τη χρήση ενός αδενοϊού που κωδικοποιούσε το γονίδιο της BMP-6 και χρησιμοποιήθηκε για την οστική πάρωση σε κουνέλια με οστεοτομία ωλένης<sup>128</sup> και το γονίδιο

της BMP-2 που εμφυτεύτηκε στο μηρό ποντικών με τμηματικά ελλείμματα,<sup>129</sup> όπου και παρατηρήθηκε ισχυρό οστόν ενώ κάποια από αυτά γεφυρώθηκαν με νέες οστικές γέφυρες.<sup>130</sup> <sup>131</sup> Μία εις βάθος εικόνα σχετικά με τη γονιδιακή θεραπεία και το σχηματισμό οστού έδωσε μελέτη των Betz και συν. οι οποίοι μελέτησαν τη δράση του χρονικού διαστήματος που γίνεται η γονιδιακή θεραπεία μετά τη δημιουργία ενός οστικού ελλείμματος. Δεδομένου ότι η διαδικασία της πάρωσης είναι μια καλά ορχηστρωμένη διαδικασία στην οποία τα κύτταρα και διαλυτοί παράγοντες εμφανίζονται και δρουν με καθορισμένους χρόνους, αναμένεται ότι και η γονιδιακή θεραπεία πρέπει να ταυτίζεται με το χρονικό διάστημα στο οποίο τα κύτταρα-στόχοι βρίσκονται στην εστία του ελλείμματος. Μελέτες έχουν δείξει ότι καθυστερημένη χορήγηση adBMP-2 έως και 10 ημέρες μετά τη δημιουργία του ελλείμματος, τα περισσότερα ελλείμματα καθυστερούν στη γεφύρωση τους με οστό επισημαίνοντας το πόσο σημαντικό είναι το χρονικό διάστημα στο οποίο θα χορηγηθεί η γονιδιακή θεραπεία.<sup>132</sup> Επιπλέον, δεδομένα υποστηρίζουν ότι εξίσου με το χρονικό διάστημα, σημαντική είναι και η δόση του φορέα που θα χρησιμοποιηθεί. Πιο συγκεκριμένα, μελέτη έδειξε ότι υψηλή δόση από adBMP-2, χορηγούμενη 5 ημέρες μετά τη δημιουργία του ελλείμματος είχε ως αποτέλεσμα 100% γεφύρωση των οστικών ελλειμμάτων 8 εβδομάδες μετά τη γονιδιακή θεραπεία, ενώ αντιθέτως μη επιθυμητά αποτελέσματα πάρωσης παρατηρήθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκαν χαμηλότερες δόσεις του φορέα. Ωστόσο, όταν αδενοφορείς χρησιμοποιήθηκαν σε μεγάλα μοντέλα ζώων, τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. Ειδικότερα, έγχυση από αδενοφορείς που κωδικοποιούν είτε BMP-2 είτε BMP-6 μέσα σε οστεοχόνδρινα ελλείμματα που δημιουργήθηκαν σε φέρουσα βάρους περιοχή του μηριαίου κονδύλου σε μοντέλα πόνου, είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό οστού αλλά απέτυχε να παρέχει πάρωση για μεγάλο χρονικό διάστημα.<sup>133</sup> Αντιθέτως, σε οστεοπορωτικό μοντέλο προβάτου παρατηρήθηκε γρήγορη οστική πάρωση, η οποία χαρακτηριζόταν και από υψηλότερη σκληρότητα στον πόρο στα αρχικά στάδια της διαδικασίας της πάρωσης συγκριτικά με τα ζώα στα οποία δε χορηγήθηκε θεραπεία.<sup>134</sup>

Μια ακόμη μη κυτταρική *in vivo* γονιδιακή θεραπεία για την αναγέννηση οστίτη ιστού περιελάμβανε τη χρήση αδενο-συσχετιζόμενων ιών (rAAV) επικαλυμμένων με αλλομοσχεύμα.<sup>135</sup> Οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν είχαν ως στόχο να επάγουν την έκφραση οστεογενετικών γονιδίων τα οποία συμβάλλουν στο σχηματισμό ενός νέου μανδύα οστού καθόλο το μήκος του αλλομοσχεύματος χωρίς να το επαναπορροφούν με σκοπό να παρέχουν μέγιστο δυναμικό πάρωσης.<sup>136</sup> Αυτά τα αλλομοσχεύματα επικαλυμμένα με rAAV πέτυχαν αύξηση τρεις φορές στον οστικό όγκο σε σχέση με τα αυτομοσχεύματα ως αποτέλεσμα την μειωμένης οστικής απορρόφησης. Αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν εμβιομηχανική υπεροχή τόσο

σε σχέση με τα αλλομοσχεύματα όσο και με τα αυτομοσχεύματα και επιπλέον στροφική ακεραιότητα ισάξια με το υγιές μηριαίο.

Επιπλέον, ερευνητές χρησιμοποίησαν ως φορείς κάποιον ρετροϊό ή λεντοϊό για την εισαγωγή υβριδικού γονιδίου BMP2/4 σε εστία κατάγματος σε μοντέλο ποντικίου όπου δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην πόρωση μεταξύ των ομάδων μελέτης που έλαβαν ή όχι το φορέα.<sup>137</sup> Σε μια προσπάθεια να επιταχύνουν την οστική πόρωση και να αποφύγουν τον έκτοπο οστικό σχηματισμό που παρατηρήθηκε όταν μεταφέρθηκε το BMP-2/4, ο Rundle και συν. χρησιμοποίησαν τον ίδιο φορέα για την μεταφορά του γονιδίου της κυκλοοξυγενάσης (COX-2). Οι συγγραφείς παρατήρησαν ότι η υπερέκφραση του COX-2 σε μια εστία κατάγματος είχε ως αποτέλεσμα ταχύτερη πόρωση (3 εβδομάδες σε σύγκριση με τις 5 εβδομάδες της ομάδας ελέγχου) και απέφυγαν τον σχηματισμό έκτοπου οστού. Ωστόσο δεν πραγματοποιήθηκε μακροχρόνια ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων και ένωσης του διαγονιδίου με το DNA του δέκτη.<sup>137</sup>

Επιπλέον, υποσχόμενες προσεγγίσεις για τη γονιδιακή θεραπεία των ψευδαρθρώσεων αποτελεί και η χρήση μη-ϊικών φορεών και συγκεκριμένα η χρήση υποστρωμάτων που ενεργοποιούνται από γονίδια (GAMs) τα οποία ενισχύουν την δομική σταθερότητα του νέου οστού μέσω της εμφύτευσης ενός ικρίωματος στην εστία του οστικού ελλείμματος. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει ένα βιοαπορροφήσιμο υπόστρωμα ή ικρίωμα που περιέχει πλασμιδιακό DNA από ένα θεραπευτικό γονίδιο. Σε ζωικό μοντέλο όπου χρησιμοποιήθηκε το παραπάνω υπόστρωμα για τη μεταφορά του γονιδίου BMP-4 σε συνδυασμό ή χωρίς με ένα τμήμα από το γονίδιο που κωδικοποιεί την παραθορμόνη, PTH1-34 παρατηρήθηκαν οστικές γέφυρες μετά από μερικές εβδομάδες, αλλά μόνο σε ζώα στα οποία χρησιμοποιήθηκε η BMP-4, ενώ επίσης παρατηρήθηκε ταχύτερη γεφύρωση της οστεοτομίας όταν χρησιμοποιήθηκαν συνδυαστικά και τα δύο γονίδια.<sup>138</sup> Η μεταφορά του γονιδίου PTH1-34 μέσω GAM έχει δοκιμαστεί και σε μοντέλο κυνός με οστεοτομία κνήμης και βρέθηκε ότι επάγει εκτεταμένη παραγωγή οστού. Δραστηριότητα του γονιδίου υπήρχε μέχρι και 6 εβδομάδες μετά την εμφύτευση των GAM και οστικός σχηματισμός παρατηρήθηκε μέχρι τον έκτο μήνα. Η μελέτη αυτή αποκάλυψε και μια σύνδεση μεταξύ του οστικού σχηματισμού και της δόσης του πλασμιδιακού DNA που μεταφέρθηκε στην εστία του ελλείμματος.<sup>139</sup>

Στα πλαίσια της γονιδιακής θεραπείας για την πόρωση των καταγμάτων, έχουν διερευνηθεί και προσεγγίσεις που περιλαμβάνουν είτε τη χρήση ήχου (κυτταρική υπερήχηση) είτε τη χρήση ηλεκτρικού πεδίου (ηλεκτροδιάρτηση) για την τροποποίηση της κυτταρικής

μεμβράνης προκειμένου να εισαχθεί το επιθυμητό γονίδιο. Ωστόσο, οι προσεγγίσεις αυτές φάνηκαν λιγότερο αποτελεσματικές όσο αφορά την οστική αναγέννηση.<sup>140</sup>

## 9.2. *Ex vivo* γονιδιακή θεραπεία

Η επιλογή ενός ιϊκού φορέα για *ex vivo* γονιδιακή θεραπεία βασίζεται στην ικανότητα του φορέα να εισάγεται στο ξενιστή, την επιλογή του ζωϊκού μοντέλου και την ασφάλεια. Η πλειοψηφία των μελετών έχει χρησιμοποιήσει τους αδenoφορείς, ενώ επίσης ένα από τα κύρια κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς γονιδίων και θεραπευτικοί παράγοντες ήταν τα MSCs. Μια από τις πρώτες μελέτες με τη χρήση των MSCs για αυτό το σκοπό δημοσιεύθηκε το 1999. Μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από τον οστικό μυελό ποντικίου επιμολύνθηκαν με adBMP-2 και χρησιμοποιήθηκαν για να θεραπεύσουν ένα τμηματικό έλλειμμα στο μηριαίο σε συγγενικά ποντίκια. Σχεδόν όλα τα ελλείμματα που θεραπεύτηκαν με τα κύτταρα που παρήγαν BMP-2 ιάθηκαν μετά από 2 μήνες.<sup>141</sup> Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε μεταγενέστερη μελέτη όταν ανθρώπινα MSCs επιμολυσμένα με adBMP-2 χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό να ενισχύσουν την οστική πάρωση σε οστικά ελλείμματα στη κερκίδα σε μοντέλο ποντικίου. Ενδιαφέρον παρουσίαζε το γεγονός ότι αυτά τα κύτταρα είχαν τα ίδια αποτελέσματα με βλαστοκύτταρα που απομονώθηκαν από οστεοπορωτικό οστό, ένα εύρημα που υποδηλώνει ότι τα βλαστοκύτταρα διατηρούν οστεογενετικές ιδιότητες. Αυτές οι αρχικές μελέτες έδειξαν το δυναμικό της χρήσης των ενήλικων βλαστοκυττάρων ως φορείς γονιδιακής θεραπείας για την αποτελεσματική σύνθεση οστού.

Είναι γνωστό ότι τα MSCs απομονώνονται κυρίως από το μυελό των οστών ή από λιπώδη ιστό. Μελέτες διερεύνησαν το ενδεχόμενο η προέλευση των μεσεγχυματικών κυττάρων να επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Οι ερευνητές δεν παρατήρησαν διαφορές στο σχηματισμό οστού μεταξύ των MSCs προερχόμενων από ανθρώπινο οστικό μυελό και από λιπώδη ιστό όταν έγινε σε αυτά ένθεση adBMP-2 και στη συνέχεια εμφυτεύθηκαν σε αθυμικά ποντίκια με σκοπό την σπονδυλοδεσία. Παρόμοιες μελέτες έγιναν και σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια όπου η χρήση MSCs μυελού των οστών με adBMP-2 είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη οστική πάρωση. Τα παραπάνω αποτελέσματα συνηγορούν στη χρήση των MSCs για εφαρμογές *ex vivo* γονιδιακής θεραπείας για την πάρωση των καταγμάτων. Τα επεξεργασμένα μηχανικά κύτταρα επίσης έχουν αποδειχθεί χρήσιμα σε μεγάλα ζωικά μοντέλα.

Σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί ο καλύτερος φορέας *ex vivo* γονιδιακής θεραπείας, έγινε σύγκριση μιας *ex vivo* γονιδιακής τροποποίησης σε MSCs ποντικίου από αδenoϊικούς, ρετροϊκούς φορείς και φορείς κατιονικών λιπιδίων που κωδικοποιούσαν το ανθρώπινο γονίδιο



BMP-2, με σχηματισμό οστού ως ο τελικό αποτέλεσμα. Ο σχηματισμός οστού στην εστία του ελλείμματος παρατηρήθηκε σε όλες της περιπτώσεις, αλλά τα MSCs με αδενοφορείς παρουσίασαν μια στατιστικώς σημαντική αύξηση στο σχηματισμό οστού συγκριτικά με τους άλλους φορείς. Παρόλου που φαίνεται ότι οι αδενοφορείς ήταν οι πιο αποτελεσματικοί, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι μια τέτοια σύγκριση δεν είναι ξεκάθαρη. Παράγοντες όπως η συγκέντρωση του φορέα, ο μηχανισμός της γονιδιακής θεραπείας, ο χρόνος έκθεσης και ακόμα και οι φορείς που χρησιμοποιούνται μπορούν να επηρεάσουν την αποδοτικότητα στο οστικό σχηματισμό.<sup>142</sup>

Οι ρετροϊκοί και λεντοϊκοί φορείς χρησιμοποιήθηκαν επίσης για *ex vivo* οστική γονιδιακή θεραπεία όπου και παρατηρήθηκε πλήρης επούλωση όταν BMP-4 μεταφέρθηκε από λεντοϊκούς φορείς σε MSCs ποντικών τα οποία εμφυτεύθηκαν σε τμηματική ελλείμματα σε κρανίο ποντικών. Πρωτογενή MSCs δεν κατάφεραν να επάγουν οστική πάρωση και σχημάτισαν μικρότερη οστική πυκνότητα.<sup>143</sup> Σε άλλη μελέτη ρετροϊκοί φορείς μετέφεραν το γονίδιο *osterix*, το οποίο δρα ως μεταγραφικός παράγοντας σε οστεοβλάστες, σε MSCs από το μυελό των οστών ποντικών. Τα MSCs που υπερέκφραζαν το γονίδιο *osterix* πέτυχαν πλήρη οστική πάρωση σε κρανιακά οστικά ελλείμματα σε ποντίκια.<sup>144</sup>

Μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση με στόχο να παρακάμψει το χρονοβόρο και ακριβό χρόνο καλλιέργειας στην *ex vivo* γονιδιακή θεραπεία, είναι η *ex vivo* γονιδιακή θεραπεία της ίδιας μέρας. Αυτή αποτελείται από κύτταρα του επιχριστικού στρώματος που απομονώθηκαν από το μυελό των οστών ποντικών, στα οποία έγινε μεταγωγή μέσω λεντοϊών BMP-2 και στη συνέχεια εμφυτεύθηκαν σε ένα έλλειμμα του μηριαίου οστού σε ποντίκια την ίδια ημέρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν παρόμοια ποσοστά επούλωσης με την προσέγγιση όπου χρησιμοποιούνται κύτταρα καλλιέργειας υποδηλώνοντας αυτή η στρατηγική μπορεί να βελτιώσει το κόστος στην κλινική χρήση και να ελαχιστοποιήσει το κίνδυνο διαφοροποίησης των MSC κατά τη διάρκεια παρατεταμένων χρόνων καλλιέργειας.<sup>125</sup>

Μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση για γονιδιακή θεραπεία που συνδυάζει την *in vivo* και την *ex vivo* γονιδιακή θεραπεία με τη χρήση γυμνού DNA προτάθηκε από το Huang et al.. Ικρίωματα φορτωμένα με πλασμιδιακό DNA που κωδικοποιούν τα γονίδια του BMP-4 και VEGF εμφυτεύθηκαν στο υποδόριο από ανοσοκατασταλαμένα NOD/SCID ποντίκια μαζί με MSCs από ανθρώπινο μυελό των οστών. Η συνδυασμένη μεταφορά τριών παραγόντων, πλασμιδιακού DNA για BMP-4, πλασμιδιακού DNA για VEGF και των MSCs, είχε ως αποτέλεσμα σημαντική αύξηση στην ποσότητα του νεο-σχηματισμένου οστού σε σύγκριση με κάθε ένα παράγοντα μόνο του ή σε συνδυασμούς δύο παραγόντων.<sup>145</sup> Γονιδιακή θεραπεία

επαγόμενη από λιποσώματα σε καλλιεργημένα κύτταρα χρησιμοποιείται ευρέως για να αύξηση την αποτελεσματικότητα της μη-ϊικής γονιδιακής θεραπείας. Μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε συνέκρινε την επαγόμενη από λιποσώματα και από αδενοϊούς μεταφορά του γονιδίου της BMP-2 σε MSCs ποντικών και τη περαιτέρω χρήση αυτών των κυττάρων στη θεραπεία ελλειμμάτων σε γνάθο ποντικού. Η χρήση των λιποσωμάτων δεν ήταν τόσο αποτελεσματική όσο η adBMP-2 στη γρήγορη πώρωση των ελλειμμάτων. Παρά την χαμηλή αποτελεσματικότητα αυτής της μεθόδου, η υψηλότερη ασφάλεια της χρήσης των λιποσωμάτων ενισχύουν την κλινική εφαρμογή αυτής της μεθόδου. Η ίδια τεχνική εφαρμόστηκε και σε πειραματικό μοντέλο κουνελιού όπου η μεταφορά του γονιδίου του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών, IGF, μέσω της εμφύτευσης MSCs σε εστιακό οστικό έλλειμμα 15 χιλιοστών σε κερκίδα κουνελιού, είχε ως αποτέλεσμα ενισχυμένες οστεογενετικές ιδιότητες των κυττάρων μαζί με αυξημένη σύνθεση οστού και αγγειακή αναγέννηση.<sup>146</sup> Όταν MSCs ποντικών που επιμολύνθηκαν με το γονίδιο της BMP-7, εμφυτεύθηκαν σε ένα σημείο διατακτικής οστεογένεσης σε ένα μοντέλο ποντικού, προκάλεσε υψηλότερο οστικό σχηματισμό και γρηγορότερη οστεοποίηση του πόρου σε σχέση με τα πρωτόγονα MSCs.<sup>147</sup> Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε μελέτη επιμήκυνσης της κάτω γνάθου σε μοντέλο κουνελιού. Μέσω της χρήσης λιποσωμάτων, MSCs κουνελιών επιμολύνθηκαν με πλασμιδιακό DNA που κωδικοποιούσε το γονίδιο του osterix και τα κύτταρα αυτά στη συνέχεια εμφυτεύθηκαν στο σημείο της διάτασης. Οστικός σχηματισμός παρατηρήθηκε τόσο με τα πρωτογενή κύτταρα όσο και με τα επιμολυσμένα MSCs. Ωστόσο τα επιμολυσμένα κύτταρα παρήγαγαν μεγαλύτερη οστική πυκνότητα, παχύτερες νέες δοκίδες και μεγαλύτερους όγκους από νεο-σχηματισθέν οστών στα σημεία διάτασης. Δεδομένου αυτών των μελετών, η γονιδιακή θεραπεία που επάγεται από λιποσώματα μπορεί να προάγει την οστική πώρωση αλλά με μια χαμηλή αποτελεσματικότητα.<sup>148</sup>

Ενθαρρυντικά ήταν και τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της μεθόδου της ηλεκτροδιάτρησης όπου σε περιπτώσεις εισαγωγής του γονιδίου BMP-2, BMP-6 ή BMP-9 μέσω τις εμφύτευσης MSCs σε έκτοπες θέσεις σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια οδήγησε σε οστικό σχηματισμό και μεγάλο οστικό όγκο.<sup>149, 150</sup> Επιπλέον, φαίνεται ότι η εισαγωγή περισσότερων από έναν οστεογενετικών παραγόντων αυξάνει το εύρος του οστικού σχηματισμού. Το παραπάνω υποστηρίζεται από μελέτη όπου η χρήση MSCs προερχόμενων από λιπώδη ιστό, στα οποία έγινε ένθεση των παραγόντων BMP2/Runx2, και ακολούθως έγχυση των κυττάρων σε ραχιαίο υποδόριο χώρο BALB/c-nu ποντικών, είχε ως αποτέλεσμα υψηλότερο οστικό σχηματισμό συγκριτικά με αυτόν που επιτεύχθηκε με τη μεταφορά μόνο του BMP-2.<sup>151</sup> Όλα τα

παραπάνω αναδεικνύουν τις μη-ϊικές μεθόδους σε εν δυνάμει εργαλεία για την *ex vivo* γονιδιακή θεραπεία της οστικής πάρωσης.

## 10. Συμπεράσματα

Η διαδικασία της οστικής πάρωσης είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που συμμετέχουν πολυάριθμα μόρια και πρωτεΐνες. Κάθε χρόνο καινούργιες μελέτες προσφέρουν νέα γνώση και μας βοηθούν να κατανοήσουμε σε μεγαλύτερο βαθμό τις επιμέρους διαδικασίες. Από τις πρώτες προσπάθειες που πραγματοποιήθηκαν για να ενισχύσουν αυτή τη διαδικασία συμμετείχαν οι BMPs. Τα αποτελέσματα φανερώνουν ότι οι BMPs είναι σημαντικά μόρια για την εξέλιξη της πάρωσης και μπορούν να βοηθήσουν στη μείωση των ψευδαρθρώσεων. Ωστόσο φαίνεται πλέον ότι το ενδιαφέρον έχει στραφεί και στους ανταγωνιστές τους αφού η υπερέκφρασή τους σε εστίες καταγμάτων εμποδίζει τη φυσιολογική πάρωση. Μάλιστα βρέθηκαν συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί στα γονίδια των ανταγωνιστών των BMPs που αυξάνουν τη πιθανότητα για ψευδάρθρωση. Ο αυξητικός παράγοντας HGF φαίνεται ότι ενισχύει τη πάρωση των καταγμάτων, αυξάνοντας τόσο την οστική πυκνότητα όσο και τον οστικό όγκο και αποτελεί ένα πιθανό θεραπευτικό μόριο για την ενίσχυση της οστικής πάρωσης. Το πεπτίδιο αCGRP ανιχνεύεται αυξημένο σε κατάγματα των μακρών οστών και αυξάνει την οστική μάζα ενισχύοντας το ρυθμό πολλαπλασιασμού των οστεοβλαστών. Η δράση αυτή είναι απαραίτητη για την σωστή και επαρκή οστική πάρωση και αναδεικνύει το αCGRP ως ένα πεπτίδιο για χρήση σε μελλοντικές μελέτες στην οστική πάρωση. Επιπλέον πολυμορφισμοί που αυξάνουν τη πιθανότητα για ψευδάρθρωση αφορούν τα γονίδια SMAD6, CYR61, NOS2. Περαιτέρω έρευνα σε αυτά τα γονίδια θα μπορούσε να ενισχύσει το ρόλο που διαδραματίζουν στην οστική πάρωση.

Παρότι τα miRNAs ανακαλύφθηκαν αρχικά το 1993, η δράση που διαδραματίζουν στις βιολογικές διαδικασίες δεν έχει εκτιμηθεί μέχρι πρόσφατα. Τα miRNAs αποδείχτηκαν ότι είναι πολύ σημαντικά μόρια στη ρύθμιση της πάρωσης των καταγμάτων. Από τα *in vitro* δεδομένα φάνηκε ότι μπορούν να προάγουν και να αναστείλουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Οι συνεχείς δημοσιεύσεις που αφορούν αυτά τα μόρια για την οστική πάρωση δίνει την εντύπωση ότι αποτελούν μια σημαντική προσέγγιση για την ενίσχυσή της και είναι θέμα χρόνου μέχρι τη χρήση του πρώτου miRNA ως θεραπευτικό μόριο σε ασθενή. Ένα ακόμη σημαντικό ρόλο που μπορούν να επιτελέσουν τα miRNAs είναι ως διαγνωστικοί δείκτες. Οι μελέτες ανέδειξαν διάφορα miRNAs, είτε στον οστικό πόρο είτε στη κυκλοφορία, τα οποία έπειτα από ένα κατάγμα παρουσιάζουν τροποποίηση των επιπέδων τους. Τα δεδομένα συνηγορούν σε μια

πιθανή σύνδεση μεταξύ κάποιων miRNAs και της οστικής πάρωσης, ωστόσο κανένα miRNA επί του παρόντος δεν χρησιμοποιείται ως δείκτης για το προσδιορισμό μιας ψευδάρθρωσης.

Όσον αφορά τις προσπάθειες για γονιδιακή θεραπεία, αυτές επικεντρώνονται *in vivo* στα γονίδια των BMP, της COX2 και της PTH1-34, ενώ *ex vivo* επίσης στα γονίδια των BMP και του osterix. Τα αποτελέσματα από τις μέχρι τώρα μελέτες είναι ενθαρρυντικά και αναδεικνύουν το δυναμικό της χρήσης της γονιδιακής θεραπείας για την αποτελεσματική σύνθεση οστού σε περιπτώσεις καταγμάτων.

## 11.Βιβλιογραφία

1. Komatsu DE, Warden SJ. The control of fracture healing and its therapeutic targeting: improving upon nature. *J Cell Biochem.* 2010; 109: 302–11.
2. Giannoudis PV, Panteli M, Calori GM. Bone healing: the diamond concept. In: Bentley G, editor. *European Instructional Lectures.* Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. pp. 3–16.
3. Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, et al. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010; 16: 427–34.
4. Sarahrudi K, Thomas A, Mousavi M, et al. Elevated transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) levels in human fracture healing. *Injury.* 2011; 42: 833–7.
5. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury.* 2005; 36: 1392–404.
6. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury.* 2011; 42: 551–5.
7. Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma.* 2005; 19: S4–6
8. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury.* 2007 Sep;38 Suppl 4:S3-6.
9. Fajardo M, Liu CJ, Ilalov K, et al. Matrix metalloproteinases that associate with and cleave bone morphogenetic protein-2 *in vitro* are elevated in hypertrophic fracture non-union tissue. *J Orthop Trauma.* 2010; 24: 557–63.
10. Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discovery Today.* 2003; 8: 980–9.
11. Koga T, Lee SY, Niikura T, et al. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on bone morphogenetic protein 7-induced osteogenic differentiation of human nonunion tissue-derived cells *in vitro.* *J Ultrasound Med.* 2013; 32: 915–22.

12. Lawton DM, Andrew JG, Marsh DR, et al. Expression of the gene encoding the matrix gla protein by mature osteoblasts in human fracture non-unions. *Molecular pathology*. 1999; 52: 92–6.
13. Lombardi G, Perego S, Luzi L, et al. A four season molecule: osteocalcin. Updates in its physiological roles. *Endocrine*. 2015; 48: 394–404.
14. Monfoulet L, Malaval L, Aubin JE, et al. Bone sialoprotein, but not osteopontin, deficiency impairs the mineralization of regenerating bone during cortical defect healing. *Bone*. 2010; 46: 447–52.
15. Bishop JA, Palanca AA, Bellino MJ, et al. Assessment of compromised fracture healing. *J Am Acad Orthop Surg*. 2012; 20: 273–82.
16. Kanakaris NK, Giannoudis PV. The health economics of the treatment of long bone non-unions. *Injury*. 2007; 38: S77–84.
17. Sarmiento A, Sharpe FE, Ebramzadeh E, et al. Factors influencing the outcome of closed tibial fractures treated with functional bracing. *Clin Orthop Relat Res*. 1995; 315: 8–24.
18. Iwakura T, Miwa M, Sakai Y, et al. Human hypertrophic nonunion tissue contains mesenchymal progenitor cells with multilineage capacity in vitro. *J Orthop Res*. 2009; 27: 208–15.
19. Pneumaticos SG, Panteli M, Triantafyllopoulos GK, et al. Management and outcome of diaphyseal aseptic non-unions of the lower limb: a systematic review. *Surgeon*. 2014; 12 (3): 166–75.
20. Kwong FN, Hoyland JA, Freemont AJ, et al. Altered relative expression of BMPs and BMP inhibitors in cartilaginous areas of human fractures progressing towards nonunion. *J Orthop Res*. 2009; 27: 752–7.
21. Vukicevic S, Sampath TK *Bone morphogenetic proteins: from local to systemic therapeutics*. Basel-Boston-Berlin: Birkhauser Verlag AG 2008
22. Vukicevic S, Sampath TK (ed) *Bone morphogenetic proteins: systems biology regulators*, 1st edn Springer International Publishing AG, Switzerland, 2017
23. Allendorph GP, Vale WW, Choe S. Structure of the ternary signaling complex of a TGF-beta superfamily member. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:7643–8.
24. ten Dijke P. Bone morphogenetic protein signal transduction in bone. *Curr Med Res Opin* 2006;22(Suppl. 1):S7–11.
25. Edgar CM, Chakravarthy V, Barnes G, Kakar S, Gerstenfeld LC, Einhorn TA Autogenous regulation of a network of bone morphogenetic proteins (BMPs) mediates the osteogenic

differen- tiation in murine marrow stromal cells. *Bone* 2007; 40:1389–1398.

26. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am.* 2003 Aug;85(8):1544-52.

27. Yanagita M. BMP modulators regulate the function of BMP during body patterning and disease progression. *Biofactors* 2009;35:113–9.

28. Gaggero E, Canalis E. Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord* 2006;7:51–65.

29. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R et al Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84-A:2123–2134

30. Wei S et al. Recombinant human BMP-2 for the treatment of open tib- ial fractures. *Orthopedics* 2012; 35: e847–e854.

31. Kim MJ et al. BMP-2 promotes oral squamous carcinoma cell invasion by inducing CCL5 release. *PLoS ONE* 2014; 9: e108170.

32. Vukicevic S, Grgurevic L, Pecina M Clinical need for bone morphogenetic proteins. *Int Orthop* 2017;41:2415–2416

33. Fajardo M, Liu CJ, Egol K. Levels of expression for BMP-7 and several BMP antagonists may play an integral role in a fracture nonunion: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res.* 2009 Dec;467(12):3071-8.

34. Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg.* 2007 Aug;77(8):626-31.

35. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2001; 83-A (Suppl. 1): S151–8.

36. Bilic R, Simic P, Jelic M, Stern-Padovan R, Dodig D, van Meerdervoort HP et al Osteogenic protein-1 (BMP-7) accelerates healing of scaphoid non-union with proximal pole sclerosis. *Int Orthop* 2006;30:128–134.

37. Giannoudis, P.V., Kanakaris, N.K., Dimitriou, R. et al. The Synergistic Effect of Autograft and BMP-7 in the Treatment of Atrophic Nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 2009 467, 3239

38. von Rüden C, Morgenstern M, Friederichs J, Augat P, Hackl S, Woltmann A, Bühren V, Hierholzer C Comparative study suggests that human bone morphogenetic proteins have no influence on the outcome of operative treatment of aseptic clavicle non-unions. *Int Orthop* 2016;40:2339–2345.
39. Giannoudis PV, Tzioupis C. Clinical applications of BMP-7: the UK perspective. *Injury* 2005; 36 (Suppl. 3): S47–S50.
40. Fu R, Selph S, McDonagh M, Peterson K, Tiwari A, Chou R et al Effectiveness and harms of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spine fusion: a systematic review and meta- analysis. *Ann Intern Med* 2016;158:890–902.
41. Devlin RD, Du Z, Pereira RC, Kimble RB, Economides AN, Jorgetti V, Canalis E. Skeletal overexpression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation. *Endocrinology*. 2003 May;144(5):1972-8. doi: 10.1210/en.2002-220918. PMID: 12697704.
42. Groppe J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Kwiatkowski W, et al. Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* 2002;420:636–42.
43. Gazzero E, Pereira RC, Jorgetti V, Olson S, Economides AN, Canalis E. Skeletal overexpression of gremlin impairs bone formation and causes osteopenia. *Endocrinology* 2005;146:655–65.
44. Wang C, Xiao F, Gan Y, Yuan W, Zhai Z, Jin T, Chen X, Zhang X. Improving Bone Regeneration Using Chordin siRNA Delivered by pH-Responsive and Non-Toxic Polyspermine Imidazole-4,5-Imine. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(1):133-147.
45. Urano T, Shiraki M, Usui T, Sasaki N, Ouchi Y, Inoue S: Bone mass effects of a Smad6 gene polymorphism in Japanese postmenopausal women. *J Bone Miner Metab*. 2009, 27 (5): 562-566. 10.1007/s00774-009-0068-4.
46. Dimitriou R, Carr IM, West RM, Markham AF, Giannoudis PV. Genetic predisposition to fracture non-union: a case control study of a preliminary single nucleotide polymorphisms analysis of the BMP pathway. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011 Feb 10;12:44.
47. Ross J, Gherardi E, Mallorqui-Fernandez N, Bocci M, Sobkowicz A, Rees M, et al. Protein engineered variants of hepatocyte growth factor/scatter factor promote proliferation of primary human hepatocytes and in rodent liver. *Gastroenterology* 2012 Apr;142(4):897-906.
48. Nakamura T, Sakai K, Matsumoto K. Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *J Gastroenterol Hepatol* 2011 Jan;26 Suppl 1:188-202.

49. Athauda G CF, Ito T, Giubellino A, Rabe D, Raffensperger K, Lee Y, Bottaro DP. HGF (hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* 2010;14(10):1008-25
50. Goshima K, Nakase J, Xu Q, Matsumoto K, Tsuchiya H. Repair of segmental bone defects in rabbit tibia promoted by a complex of beta-tricalcium phosphate and hepatocyte growth factor. *J Orthop Sci* 2012 Sep;17(5):639-48
51. Standal T, Abildgaard N, Fagerli UM, Stordal B, Hjertner O, Borset M, et al. HGF inhibits BMP-induced osteoblastogenesis: possible implications for the bone disease of multiple myeloma. *Blood* 2007 Apr 1;109(7):3024-30
52. Walker N, Kahamba T, Woudberg N, Goetsch K, Niesler C. Dose-dependent modulation of myogenesis by HGF: implications for c-Met expression and downstream signalling pathways. *Growth factors* 2015;33(3):229-41.
53. Shibasaki S, Kitano S, Karasaki M, Tsunemi S, Sano H, Iwasaki T. Blocking c-Met signaling enhances bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation. *FEBS open bio* 2015;5:341-7.
54. Kawasaki T, Niki Y, Miyamoto T, Horiuchi K, Matsumoto M, Aizawa M, et al. The effect of timing in the administration of hepatocyte growth factor to modulate BMP-2-induced osteoblast differentiation. *Biomaterials* 2010 Feb;31(6):1191-8.
55. Naot D., Musson D.S., Cornish J. The activity of peptides of the calcitonin family in bone. *Physiol Rev.* 2019;99(1):781–805
56. Ballica R, Valentijn K, Khachatryan A, Guerder S, Kapadia S, et al. Targeted expression of calcitonin gene related peptide to osteoblasts increases bone density in mice. *J Bone Miner Res.* 1999;14:1067–1074
57. Villa I, Dal Fiume C, Maestroni A, Rubinacci A, Ravasi F, et al. Human osteoblast-like cell proliferation induced by calcitonin-related peptides involves PKC activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284:E627–633
58. Wang L., Shi X., Zhao R., Halloran B.P., Clark D.J., Jacobs C.R. Calcitonin-gene-related peptide stimulates stromal cell osteogenic differentiation and inhibits RANKL induced NF-kappaB activation, osteoclastogenesis and bone resorption. *Bone.* 2010;46(5):1369–1379.
59. Tian G., Zhang G., Tan Y.H. Calcitonin gene-related peptide stimulates BMP-2 expression and the differentiation of human osteoblast-like cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34(11):1467–1474.



60. Zhou R., Yuan Z., Liu J. Calcitonin gene-related peptide promotes the expression of osteoblastic genes and activates the WNT signal transduction pathway in bone marrow stromal stem cells. *Mol Med Rep.* 2016;13(6):4689–4696.
61. Zhang Y., Xu J., Ruan Y.C., Yu M.K., O'Laughlin M., Wise H. Implant-derived magnesium induces local neuronal production of CGRP to improve bone-fracture healing in rats. *Nat Med.* 2016;22(10):1160–1169
62. Schinke T., Liese S., Priemel M., Haberland M., Schilling A.F., Catala-Lehnen P. Decreased bone formation and osteopenia in mice lacking alpha-calcitonin gene-related peptide. *J Bone Miner Res.* 2004;19(12):2049–2056
63. Li J., Kreicbergs A., Bergström J., Stark A., Ahmed M. Site-specific CGRP innervation coincides with bone formation during fracture healing and modeling: a study in rat angulated tibia. *J Orthop Res.* 2007;25(9):1204–1212.
64. Onuoha G.N. Circulating sensory peptide levels within 24h of human bone fracture. *Peptides.* 2001;22(7):1107–1110.
65. Appelt J, Baranowsky A, Jahn D, Yorgan T, Köhli P, Otto E, Farahani SK, Graef F, Fuchs M, Herrera A, Amling M, Schinke T, Frosch KH, Duda GN, Tsitsilonis S, Keller J. The neuropeptide calcitonin gene-related peptide alpha is essential for bone healing. *EBioMedicine.* 2020 Sep;59:102970.
66. Guimarães JM, Guimarães IC, Duarte ME, Vieira T, Vianna VF, Fernandes MB, Vieira AR, Casado PL. Polymorphisms in BMP4 and FGFR1 genes are associated with fracture non-union. *J Orthop Res.* 2013 Dec;31(12):1971-9.
67. Groppe J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Kwiatkowski W, et al. Structural basis of BMP signaling inhibition by Noggin, a novel twelve-membered cysteine knot protein. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85A(Suppl. 3):52–8.
68. Dixon, M., Armstrong, P., Stevens, D. et al. Identical mutations in NOG can cause either tarsal/carpal coalition syndrome or proximal symphalangism. *Genet Med* 2001 3, 349–353
69. Wan DC, Pomerantz JH, Brunet LJ, Kim JB, Chou YF, Wu BM, et al. Noggin suppression enhances in vitro osteogenesis and accelerates in vivo bone formation. *J Biol Chem* 2007;282:26450–9.
70. Ali S, Hussain SR, Singh A, Kumar V, Walliullah S, Rizvi N, Yadav M, Ahmad MK, Mahdi AA. Study of Cysteine-Rich Protein 61 Genetic Polymorphism in Predisposition to Fracture Nonunion: A Case Control. *Genet Res Int.* 2015;2015:754872.

71. Zhu W, Diwan AD, Lin JH, Murrell GAC. Nitric oxide synthase isoforms during fracture healing. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2001; 16(3):535–40. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.3.535> PubMed PMID: WOS:000167157700013. PMID: 11277271
72. Sathyendra V, Donahue HJ, Vrana KE, Berg A, Fryzel D, Gandhi J, et al. Single Nucleotide Polymorphisms in Osteogenic Genes in Atrophic Delayed Fracture-Healing: A Preliminary Investigation. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2014; 96(15):1242–8. <https://doi.org/10.2106/JBJS.M.00453> PMID: 25100770.
73. Huang W, Zhang K, Zhu Y, Wang Z, Li Z, Zhang J. Genetic polymorphisms of NOS2 and predisposition to fracture non-union: A case control study based on Han Chinese population. *PLoS One*. 2018 Mar 8;13(3)
74. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S Many roads to maturity: micro-RNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 2009 11(3):228–234.
75. Watson L, Elliman SJ, Coleman CM From isolation to implantation: a concise review of mesenchymal stem cell therapy in bone fracture repair. *Stem Cell Res Ther* 2014 5(2):51.
76. Li H, Li T, Wang S, Wei J, Fan J, Li J et al miR-17-5p and miR-106a are involved in the balance between osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res* 2013 10(3):313–324.
77. Almeida MI, Silva AM, Vasconcelos DM, Almeida CR, Caires H, Pinto MT et al miR-195 in human primary mesenchymal stromal/stem cells regulates proliferation, osteogenesis and paracrine effect on angiogenesis. *Oncotarget*. 2015
78. Kim EJ, Kang IH, Lee JW, Jang WG, Koh JT MiR-433 mediates ERGgamma-suppressed osteoblast differentiation via direct targeting to Runx2 mRNA in C3H10T1/2 cells. *Life Sci* 2013 92(10):562–568.
79. Schmidt Y, Simunovic F, Strassburg S, Pfeifer D, Stark GB, Finkenzeller G miR-126 regulates platelet-derived growth factor receptor-alpha expression and migration of primary human osteoblasts. *Biol Chem* 2015 396(1):61–70.
80. Schoolmeesters A, Eklund T, Leake D, Vermeulen A, Smith Q, Force Aldred S et al Functional profiling reveals critical role for miRNA in differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS ONE* 2009 4(5):e5605
81. Li H, Xie H, Liu W, Hu R, Huang B, Tan Y Fetal Anovel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. *J Clin Invest* 2009 119(12):3666–3677.

82. Zhang J, Tu Q, Bonewald LF, He X, Stein G, Lian J et al Effects of miR-335-5p in modulating osteogenic differentiation by specifically downregulating Wnt antagonist DKK1. *J Bone Miner Res* 2011 26(8):1953–1963.
83. Kapinas K, Delany AM MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. *Arthritis Res Ther* 2011 13(3):220.
84. Zhang JF, Fu WM, He ML, Wang H, Wang WM, Yu SC et al MiR-637 maintains the balance between adipocytes and osteoblasts by directly targeting Osterix. *Mol Biol Cell* 2011 22(21):3955–3961.
85. Li H, Li T, Fan J, Fan L, Wang S, Weng X et al miR-216a rescues dexamethasone suppression of osteogenesis, promotes osteoblast differentiation and enhances bone formation, by regulating c-Cbl-mediated PI3K/AKT pathway. *Cell Death Differ* 2015 22(12):1935–1945.
86. Sun Y, Xu L, Huang S, Hou Y, Liu Y, Chan KM et al mir- 21 overexpressing mesenchymal stem cells accelerate fracture healing in a rat closed femur fracture model. *Biomed Res Int* 2015:412327.
87. Tu M, Tang J, He H, Cheng P, Chen C MiR-142-5p promotes bone repair by maintaining osteoblast activity. *J Bone Miner Metab.* 2016
88. Wang X, Guo B, Li Q, Peng J, Yang Z, Wang A et al miR- 214 targets ATF4 to inhibit bone formation. *Nat Med* 2013 ;19(1):93–100
89. Li KC, Chang YH, Yeh CL, Hu YC Healing of osteoporotic bone defects by baculovirus-engineered bone marrow- derived MSCs expressing MicroRNA sponges. *Biomaterials* 2016 ;74:155–166
90. Wang S, Tang C, Zhang Q, Chen W Reduced miR-9 and miR-181a expression down-regulates Bim concentration and promote osteoclasts survival. *Int J Clin Exp Pathol* 2014 ;7(5):2209–2218
91. Hadjiargyrou M, Zhi J, Komatsu DE Identification of the microRNA transcriptome during the early phases of mammalian fracture repair. *Bone* 2016 ;87:78–88.
92. Waki T, Lee SY, Niikura T, Iwakura T, Dogaki Y, Okumachi E et al Profiling microRNA expression during fracture healing. *BMC Musculoskelet Disord* 2016 ;17:83
93. Waki T, Lee SY, Niikura T, Iwakura T, Dogaki Y, Okumachi E et al Profiling microRNA expression in fracture non- unions: Potential role of microRNAs in nonunion formation studied in a rat model. *Bone Joint J* 2015 ;97-B(8):1144–115

94. Xiao W, Bao ZX, Zhang CY, Zhang XY, Shi LJ, Zhou ZT et al Upregulation of miR-31\* is negatively associated with recurrent/newly formed oral leukoplakia. *PLoS ONE* 2012 ;7(6):e38648.
95. Baglio SR, Devescovi V, Granchi D, Baldini N (2013) Micro- RNA expression profiling of human bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation reveals Osterix regulation by miR-31. *Gene* 2013 ;527(1):321–331
96. Xie Q, Wang Z, Bi X, Zhou H, Wang Y, Gu P et al Effects of miR-31 on the osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014 ;446(1):98–104.
97. Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsumi A et al Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF-kappaB pathway in adult T cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell* 2012 ;21(1):121–135.
98. Gao J, Yang T, Han J, Yan K, Qiu X, Zhou Y et al. MicroRNA expression during osteogenic differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow. *J Cell Biochem* 2011; 112(7):1844–1856
99. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D NF- kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ;103(33):12481–12486.
100. Chen Q, Wang H, Liu Y, Song Y, Lai L, Han Q et al. Inducible microRNA-223 down-regulation promotes TLR-triggered IL-6 and IL-1beta production in macrophages by targeting STAT3. *PLoS ONE* 2012 ;7(8):e42971
101. Haneklaus M, Gerlic M, O'Neill LA, Masters SL miR- 223: infection, inflammation and cancer. *J Intern Med* 2013; 274(3):215–226
102. He B, Zhang ZK, Liu J, He YX, Tang T, Li J et al Bioinformatics and microarray analysis of miRNAs in aged female mice model implied new molecular mechanisms for impaired fracture healing. *Int J Mol Sci* 2016
103. Dai Y, Huang L, Zhang H, Hong G, He Y, Hu J, Liu Y. Differentially expressed microRNAs as diagnostic biomarkers for infected tibial non-union. *Injury*. 2021 Jan;52(1):11-18.
104. Sun L, Li Z, Xue H, Ma T, Ren C, Li M, Lu Y, Sun H, Zhang K. MiR-26a promotes fracture healing of nonunion rats possibly by targeting SOSTDC1 and further activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Mol Cell Biochem*. 2019 Oct;460(1-2):165-173.

- 105 Long, H., Zhu, Y., Lin, Z. et al. miR-381 modulates human bone mesenchymal stromal cells (BMSCs) osteogenesis via suppressing Wnt signaling pathway during atrophic nonunion development. *Cell Death Dis* 2019 10, 470
106. Panach L, Mifsut D, Tarin JJ, Cano A, Garcia-Perez MA Serum circulating microRNAs as biomarkers of osteoporotic fracture. *Calcif Tissue Int* 2015; 97(5):495–505
107. Seeliger C, Karpinski K, Haug AT, Vester H, Schmitt A, Bauer JS, van Griensven M. Five freely circulating miRNAs and bone tissue miRNAs are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res.* 2014 Aug;29(8):1718-28
108. Weilner S, Skalicky S, Salzer B, Keider V, Wagner M, Hildner F et al Differentially circulating miRNAs after recent osteoporotic fractures can influence osteogenic differentiation. *Bone* 2015;79:43–51
109. Murata K, Ito H, Yoshitomi H, Yamamoto K, Fukuda A, Yoshikawa J et al Inhibition of miR-92a enhances fracture healing via promoting angiogenesis in a model of stabilized fracture in young mice. *J Bone Miner Res* 2014 ;29(2):316–326
110. Kocijan R, Muschitz C, Geiger E, Skalicky S, Baierl A, Dormann R et al Circulating microRNA signatures in patients with idiopathic and postmenopausal osteoporosis and fragility fractures. *J Clin Endocrinol Metab* 2016 ;101(11):4125–4134.
111. Axelrad TW, Einhorn TA. Use of clinical assessment tools in the evaluation of fracture healing. *Injury* 2011;42:301–5158.
112. Riley RD, Sauerbrei W, Altman DG. Prognostic markers in cancer: the evolution of evidence from single studies to meta-analysis, and beyond. *Br J Cancer* 2009;100::1219–29.
113. Komnenou A, Karayannopoulou M, Polizopoulou ZS, Constantinidis TC, Dessiris A. Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of long bone fractures in dogs. *Vet Clin Pathol* 2005;34:35–8.
114. Southwood LL, Frisbie DD, Kawcak CE, McIlwraith CW. Evaluation of serum biochemical markers of bone metabolism for early diagnosis of nonunion and infected nonunion fractures in rabbits. *Am J Vet Res* 2003;64:727–35.
115. Wigner NA, Kulkarni N, Yakavonis M, Young M, Tinsley B, Meeks B, et al. Urine matrix metalloproteinases (MMPs) as biomarkers for the progression of fracture healing. *Injury* 2012;43:274–8.
116. Klein P, Bail HJ, Schell H, Michel R, Amthauer H, Bragulla H, et al. Are bone turnover markers capable of predicting callus consolidation during bone-healing? *Calcif Tissue Int* 2004;75:40–9.

117. Brownlow HC, Reed A, Simpson AH. Growth factor expression during the development of atrophic non-union. *Injury* 2001;32:519–24.
118. Moghaddam A, Muller U, Roth HJ, Wentzensen A, Grützner PA, Zimmermann G. TRACP 5b and CTX as osteological markers of delayed fracture healing. *Injury* 2011;42:758-64.
119. Granchi D, Devescovi V, Pratelli L, Verri E, Magnani M, Donzelli O, et al. Serum levels of fibroblast growth factor 2 in children with orthopedic diseases: potential role in predicting bone healing. *J Orthop Res* 2013;31:249–56.
120. Sarahrudi K, Thomas A, Mousavi M, Kaiser G, Kottstorfer J, Kecht M, et al. Elevated transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) levels in human fracture healing. *Injury* 2011;42:833–7.
121. G.M. Calori, D. Donati, C. Di Bella, L. Tagliabue, Bone morphogenetic proteins and tissue engineering: future directions, *Injury* 2009;40 (Suppl. 3) S67–S76
122. Kimelman Bleich N, Kallai I, Lieberman JR, Schwarz EM, Pelled G, Gazit D. Gene therapy approaches to regenerating bone. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(12):1320-1330
123. Zachos T., A. Diggs, S. Weisbrode, J. Bartlett, A. Bertone, Mesenchymal stem cell-mediated gene delivery of bone morphogenetic protein-2 in an articular fracture model, *Mol. Ther.* 2007;15 1543–1550.
124. Kimelman-Bleich N, G. Pelled, Y. Zilberman, I. Kallai, O. Mizrahi, W. Tawackoli, Z. Gazit, D. Gazit, Targeted gene-and-host progenitor cell therapy for nonunion bone fracture repair, *Mol. Ther.* 2011;19 53–59.
125. M.S. Virk, O. Sugiyama, S.H. Park, S.S. Gambhir, D.J. Adams, H. Drissi, J.R. Lieberman, “Same day” ex-vivo regional gene therapy: a novel strategy to enhance bone repair, *Mol. Ther.* 2011;19 (2011) 960–968.
126. Gazit D, Turgeman G, Kelley P, Wang E, Jalenak M, Zilberman Y, Moutsatsos I. Engineered pluripotent mesenchymal cells integrate and differentiate in regenerating bone: a novel cell-mediated gene therapy. *J Gene Med.* 1999 Mar-Apr;1(2):121-33
127. R.T. Franceschi, D. Wang, P.H. Krebsbach, R.B. Rutherford, Gene therapy for bone formation: in vitro and in vivo osteogenic activity of an adenovirus expressing BMP7, *J. Cell. Biochem.* 200;78 476–486.
128. L. Bertone, D.D. Pittman, M.L. Bouxsein, J. Li, B. Clancy, H.J. Seeherman, Adenoviral-mediated transfer of human BMP-6 gene accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model, *J. Orthop. Res.* 2004;22 1261–1270.

129. V.M. Betz, O.B. Betz, V. Glatt, L.C. Gerstenfeld, T.A. Einhorn, M.L. Boussein, M.S. Vrahas, C.H. Evans, Healing of segmental bone defects by direct percutaneous gene delivery: effect of vector dose, *Hum. Gene Ther.* 2007;18 907–915.

130. A.W. Baltzer, C. Lattermann, J.D. Whalen, P. Wooley, K. Weiss, M. Grimm, S.C. Ghivizzani, P.D. Robbins, C.H. Evans, Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene, *Gene Ther.* 7 2000;7 734–739.

131. O.B. Betz, V.M. Betz, A. Nazarian, C.G. Pilapil, M.S. Vrahas, M.L. Boussein, L.C. Gerstenfeld, T.A. Einhorn, C.H. Evans, Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects, *J. Bone Joint Surg. Am.* 2006;88 355–365.

132. O.B. Betz, V.M. Betz, A. Nazarian, M. Egermann, L.C. Gerstenfeld, T.A. Einhorn, M.S. Vrahas, M.L. Boussein, C.H. Evans, Delayed administration of adenoviral BMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects, *Gene Ther.* 2007;14 1039–1044.

133. M.I. Menendez, D.J. Clark, M. Carlton, D.C. Flanigan, G. Jia, S. Sammet, S.E. Weisbrode, M.V. Knopp, A.L. Bertone, Direct delayed human adenoviral BMP-2 or BMP-6 gene therapy for bone and cartilage regeneration in a pony osteochondral model, *Osteoarthr. Cartil.* 2011;19 1066–1075.

134. M. Egermann, A.W. Baltzer, S. Adamaszek, C. Evans, P. Robbins, E. Schneider, C.A. Lill, Direct adenoviral transfer of bone morphogenetic protein-2 cDNA enhances fracture healing in osteoporotic sheep, *Hum. Gene Ther.* 2006;17 507–517.

135. H.A. Awad, X. Zhang, D.G. Reynolds, R.E. Guldborg, R.J. O'Keefe, E.M. Schwarz, Recent advances in gene delivery for structural bone allografts, *Tissue Eng.* 2007;13 1973–1985.

136. C. Yazici, M. Takahata, D.G. Reynolds, C. Xie, R.J. Samulski, J. Samulski, E.J. Beecham, A.A. Gertzman, M. Spilker, X. Zhang, R.J. O'Keefe, H.A. Awad, E.M. Schwarz, Self-complementary AAV2.5-BMP2-coated femoral allografts mediated superior bone healing versus live autografts in mice with equivalent biomechanics to unfractured femur, *Mol. Ther.* 2011;19 1416–1425.

137. C.H. Rundle, D.D. Strong, S.T. Chen, T.A. Linkhart, M.H. Sheng, J.E. Wergedal, K.H. Lau, D.J. Baylink, Retroviral-based gene therapy with cyclooxygenase-2 promotes the

union of bony callus tissues and accelerates fracture healing in the rat, *J. Gene Med.* 2008;10 229–241.

138. G. Both, I. Alexander, S. Fletcher, T.J. Nicolson, J.E. Rasko, S.D. Wilton, G. Symonds, Gene therapy: therapeutic applications and relevance to pathology, *Pathology* 2011;43 642–656.

139. J. Bonadio, E. Smiley, P. Patil, S. Goldstein, Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration, *Nat. Med.* 1999;5 753–759

140. Sheyn D., N. Kimelman-Bleich, G. Pelled, Y. Zilberman, D. Gazit, Z. Gazit, Ultrasound-based nonviral gene delivery induces bone formation in vivo, *Gene Ther.* 2008;15 257–266.

141. J.R. Lieberman, A. Daluiski, S. Stevenson, L. Wu, P. McAllister, Y.P. Lee, J.M. Kabo, G.A. Finerman, A.J. Berk, O.N. Witte, The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats, *J. Bone Joint Surg. Am.* 1999;81 905–917.

142. J.S. Blum, M.A. Barry, A.G. Mikos, J.A. Jansen, In vivo evaluation of gene therapy vectors in ex vivo-derived marrow stromal cells for bone regeneration in a rat critical-size calvarial defect model, *Hum. Gene Ther.* 2003;14 1689–1701.

143. R. Gysin, J.E. Wergedal, M.H. Sheng, Y. Kasukawa, N. Miyakoshi, S.T. Chen, H. Peng, K.H. Lau, S. Mohan, D.J. Baylink, Ex vivo gene therapy with stromal cells transduced with a retroviral vector containing the BMP4 gene completely heals critical size calvarial defect in rats, *Gene Ther.* 2002;9 991–999.

144. Q. Tu, P. Valverde, S. Li, J. Zhang, P. Yang, J. Chen, Osterix overexpression in mesenchymal stem cells stimulates healing of critical-sized defects in murine calvarial bone, *Tissue Eng.* 2007;13 2431–2440.

145. Y.C. Huang, D. Kaigler, K.G. Rice, P.H. Krebsbach, D.J. Mooney, Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration, *J. Bone Miner. Res.* 2005;20 848–857.

146. X. Guo, Q. Zheng, I. Kulbatski, Q. Yuan, S. Yang, Z. Shao, H. Wang, B. Xiao, Z. Pan, S. Tang, Bone regeneration with active angiogenesis by basic fibroblast growth factor gene transfected mesenchymal stem cells seeded on porous beta-TCP ceramic scaffolds, *Biomed. Mater.* 2006;1 93–99.

147. J. Hu, M.C. Qi, S.J. Zou, J.H. Li, E. Luo, Callus formation enhanced by BMP-7 ex vivo gene therapy during distraction osteogenesis in rats, *J. Orthop. Res.* 2007;25 241–251.



148. Q.G. Lai, K.F. Yuan, X. Xu, D.R. Li, G.J. Li, F.L. Wei, Z.J. Yang, S.L. Luo, X.P. Tang, S. Li, Transcription factor osterix modified bone marrow mesenchymal stem cells enhance callus formation during distraction osteogenesis, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2011;111 412–419.

149. H. Aslan, Y. Zilberman, V. Arbeli, D. Sheyn, Y. Matan, M. Liebergall, J.Z. Li, G.A. Helm, D. Gazit, Z. Gazit, Nucleofection-based ex vivo nonviral gene delivery to human stem cells as a platform for tissue regeneration, *Tissue Eng.* 2006;12 877–889.

150. D. Sheyn, G. Pelled, Y. Zilberman, F. Talasazan, J.M. Frank, D. Gazit, Z. Gazit, Non-virally engineered porcine adipose tissue-derived stem cells: use in posterior spinal fusion, *Stem Cells* 2008;26 1056–1064.

151. S.J. Lee, S.W. Kang, H.J. Do, I. Han, D.A. Shin, J.H. Kim, S.H. Lee, Enhancement of bone regeneration by gene delivery of BMP2/Runx2 bicistronic vector into adipose-derived stromal cells, *Biomaterials* 2010;31 5652–5659.