Utjecaj gena za BMP3 na trabekularne i kortikalne parametre dugih kostiju miša

Banovac, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:621605

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Banovac

Utjecaj gena za BMP3 na trabekularne i kortikalne parametre dugih kostiju miša

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za mineralizirana tkiva Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Lovorke Grgurević, u sklopu znanstvenog projekta „Novootkrivene cirkulirajuće izoforme BMP1 proteina kao biomarkeri i terapijski ciljevi za humane bolesti" (šifra projekta: UIP-09-2014-3509) čiji je voditelj izv. prof. dr. sc. Lovorka Grgurević i nagrađen je Rektorovom nagradom u akademskoj godini 2015./2016. te je korišten kao ekvivalent diplomskog rada u akademskoj godini 2016./2017.

POPIS KRATICA

ANOVA	analiza varijance
BMP3	koštani morfogenetski protein 3 (engl. *bone morphogenetic protein 3*)
BMP	koštani morfogenetski proteini (engl. *bone morphogenetic proteins*)
BV	koštani volumen (engl. *bone volume*)
BV/TV	omjer koštanog volumena i ukupnog volumena tkiva (engl. *bone volume/tissue volume*)
Co.Th	debljina kortikalne kosti (engl. *cortical thickness*)
CT	kompjuterizirana tomografija (engl. *computed tomography*)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat
EDTA	etilendiaminotetraoctena kiselina
EV	endostealni volumen (engl. *endosteal volume*)
HT	heterozigotni organizam
KO	organizam s izbačenim genom (engl. *knockout*)
MAPK	mitogenom aktivirana protein kinaza
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)
pK_a	konstanta disocijacije kiseline
ROI	područje interesa (engl. *region of interest*)
R-Smad	receptorom regulirani Smad
SDS	natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)
Tb.N	broj trabekula (engl. *trabecular number*)
Tb.Sp	razmak između trabekula (engl. *trabecular separation*)
Tb.Th	debljina trabekula (engl. *trabecular thickness*)
TGF-β	transformirajući čimbenik rasta β (engl. *transforming growth factor β*)
TV	ukupni volumen tkiva (engl. *tissue volume*)
WT	organizam s divljim genotipom (engl. *wild type*)

SADRŽAJ RADA

1. UVOD 1
1.1. Koštano tkivo 1
1.2. Koštani morfogenetski proteini 1
2. HIPOTEZA 3
3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA 3
3.1. Opći cilj rada 3
3.2. Specifični ciljevi rada 3
4. MATERIJALI I METODE 3
4.1. Eksperimentalni model 3
4.2. Genotipizacija miševa 4
4.2.1. Uzimanje uzoraka, izolacija DNA i mjerenje koncentracije DNA 4
4.2.2. Lančana reakcija polimerazom 5
4.2.3. Izdvajanje umnoženih sekvenci DNA 6
4.2.4. Određivanje genotipa životinja na temelju dobivenih rezultata 7
4.3. Analiza dugih kostiju 8
4.4. Statistička analiza 11
5. REZULTATI 13
5.1. Rezultati genotipizacije 13
5.2. Rezultati morfometrijske analize kostiju 14
5.2.1. Rezultati morfometrijske analize kortikalne kosti femura 14
5.2.2. Rezultati morfometrijske analize trabekularne kosti femura 15
5.2.3. Rezultati morfometrijske analize kortikalne kosti tibije 17
5.2.4. Rezultati morfometrijske analize trabekularne kosti tibije 18
5.2.5. Analiza povezanosti pojedinih morfometrijskih parametara 20
6. RASPRAVA 22
7. ZAKLJUČCI 24
8. ZAHVALE 24
9. POPIS LITERATURE 25
10. SAŽETAK 27
11. SUMMARY 28
12. ŽIVOTOPIS 29

1. UVOD

1.1. Koštano tkivo

Koštano tkivo specijalizirano je vezivno tkivo koje tvori skelet odraslog organizma. Glavna je uloga kosti potporna. Kost ima i važnu ulogu u zaštiti vitalnih organa, kretanju, hematopoezi, metabolizmu kalcija i fosfora te endokrinoj regulaciji. Koštano tkivo sastoji se od koštanog matriksa i tri vrste stanica: osteocita, osteoblasta i osteoklasta. Koštani matriks čine organska i anorganska tvar u približno jednakim omjerima. Od anorganskih tvari najzastupljeniji su kalcij i fosfor koji tvore kristale hidroksiapatita, dok organsku tvar čine kolagen tipa I (95%) i amorfna osnovna tvar (5%) sastavljena od proteoglikanskih agregata i specifičnih strukturnih glikoproteina (Andrades i sur.-2013.). Anorganski spojevi kosti daju čvrstoću, a organska tvar elastičnost. Proteoglikanski agregati, unatoč relativno malom udjelu u koštanom matriksu, imaju važnu ulogu u mehaničkim karakteristikama kosti (Bertassoni, Swain-2014.). Stanice koštanog tkiva imaju važnu ulogu u oblikovanju koštanog matriksa koji se stalno pregrađuje djelovanjem osteoblasta (sintetiziraju komponente koštanog matriksa) i osteoklasta (razgrađuju koštani matriks). Osteociti su stanice nastale od osteoblasta i imaju ulogu u održavanju koštanog matriksa.

Na presjeku dugih kosti makroskopski se razlikuju dva osnovna oblika kosti – kortikalna ili kompaktna kost te trabekularna ili spongiozna kost. Iako je osnovna histološka građa kortikalne i trabekularne kosti ista, razlika između njih postoji u stupnju poroznosti. Kortikalna kost je homogena, bez vidljivih šupljina izuzev *foramina nutricia* kroz koja u koštano tkivo ulaze krvne žile. Trabekularna kost sastoji se od gredica (trabekula) između kojih se nalaze šupljine.

Duge kosti imaju tri osnovna dijela: epifize, metafize i dijafizu. Epifize su krajnja proširenja dugih kosti izgrađena pretežito od trabekularne kosti i prekrivena samo tankim slojem kortikalne kosti. Metafize su prijelazna područja između epifiza i dijafize. Dijafiza je središnji dio duge kosti i građena je pretežito od kortikalne kosti, a s unutrašnje se strane nalazi vrlo malo trabekularne kosti (Junquiera, Carneiro-2005.).

1.2. Koštani morfogenetski proteini

Koštani morfogenetski proteini ili BMP-i (engl. *bone morphogenetic proteins*) skupina su čimbenika rasta i diferencijacije koji pripadaju TGF-β (engl. *transforming growth factor β*) nadobitelji proteina, a imaju značajnu ulogu u embriogenezi te stvaranju kosti, ali i drugih

tkiva i organa (Vukicevic, Sampath-2002.). Otkriveno je preko 20 različitih koštanih morfogenetskih proteina, uključujući i BMP3. Većina BMP-a ostvaruje učinak preko signalne kaskade koja uključuje receptore tipa I i II koji spadaju u transmembranske serin/treonin kinaze. Receptori tipa II imaju konstitutivnu aktivnost te fosforiliraju receptore tipa I koji dalje aktiviraju signalni put fosforilacijom R-Smad i MAPK (Chen i sur.-2004., Katagiri i sur.-2008.).

BMP3 je protein kojega kodira gen na 4. kromosomu u ljudi (Tabas i sur.-1991.), odnosno na 5. kromosomu u miševa (Dickinson i sur.-1990.). Mišji gen za BMP3 sastoji se od 3 egzonske regije koje kodiraju slijed glasničke RNA, a odvojene su intronskim regijama. BMP3 čini 65% ukupnog BMP-a u demineraliziranoj kosti (Wozney, Rosen-1993.), dok se sinteza BMP3 u odrasloj kosti odvija u osteoblastima i osteocitima (Kokabu i sur.-2012). Osim u kostima, BMP3 se sintetizira i u drugim tkivima tijekom intrauterinog razvoja, osobito u bronhalnom epitelu i sabirnim tubulima bubrega, ali i u crijevnoj sluznici (Vukičević i sur.-1994.). BMP3 je prvo bio izoliran iz kosti kao osteogenin koji inducira osteogenetsku diferencijaciju (Luyten i sur.-1992.). Nadalje, osteogenin sadrži male količine drugih BMP-a koji induciraju osteogenezu tako da je uloga BMP3 *in vivo* bila nejasna sve do razvitka eksperimentalnih modela u kojima je pokusnoj životinji izbačen gen za BMP3, čime je omogućeno proučavanje učinka BMP3, odnosno izostanka njegovog učinka u živom organizmu. Za rekombinantni BMP3 pokazano je da nema biološku aktivnost (Takao i sur.-1996.), što se objašnjava neadekvatnim posttranslacijskim modifikacijama u formiranju tercijarne strukture proteina u rekombinantnom sustavu. Utvrđeno je da miševi kojima je izbačen gen za BMP3 imaju više trabekularne kosti u odnosu na miševe s normalnim genotipom te da je BMP3 negativni regulator koštane gustoće (Daluiski i sur.-2001.). Jedan od opisanih mehanizama kako BMP3 ostvaruje navedeni učinak jest antagoniziranje učinka ostalih BMP-ova preko aktivinskog receptora tipa 2b, čime BMP3 dovodi do supresije diferencijacije osteoblasta (Kokabu i sur.-2012.).

2. HIPOTEZA

Miševi s izbačenim *Bmp3* genom imat će više vrijednosti koštanih parametara dugih kostiju od miševa divljeg tipa.

3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj rada

Opći je cilj rada pokazati učinak izbacivanja *Bmp3* gena u miševa na koštane morfometrijske parametre femura i tibije.

3.2. Specifični ciljevi rada

Specifični ciljevi rada su:

1. genotipizacijom napraviti probir miševa divljeg tipa od miševa s izbačenim *Bmp3* genom,
2. odrediti utjecaj izbacivanja *Bmp3* gena na kortikalnu kost femura i tibije,
3. odrediti utjecaj izbacivanja *Bmp3* gena na trabekularnu kost femura i tibije,
4. odrediti utjecaj spola na koštane parametre u miševa s izbačenim *Bmp3* genom.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Eksperimentalni model

Istraživanja u radu provedena su na miševima soja C57BL/6NTac, proizvedeni od strane tvrtke Regeneron Pharmaceuticals, pomoću VelociGene tehnologije (Kokabu i sur.-2012.). Uzgoj i razmnožavanje provedeni su u Laboratoriju za mineralizirana tkiva Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. VelociGene tehnologija omogućava da se miševima u prvi egzon *Bmp3* gena ubaci *LacZ* gen za β-galaktozidazu iz bakterije *E. coli* čime se izbacuje funkcija tog gena te se na taj način dobivaju *knockout* (KO) miševi. Kontrolnu skupinu čine miševi divljeg tipa soja C57BL/6NTac (WT, od engl. *wild type*). Ishodišne životinje su heterozigotne (HT) za *Bmp3* gen te imaju na jednom lokusu *Bmp3* gen, a na drugom *Bmp3* gen s ubačenim *LacZ* genom. Parenjem životinja su, prema Mendelovom nasljeđivanju, dobivene HT, WT i KO životinje. Genotip životinja određen je u procesu genotipizacije te su posebno izdvojeni WT i KO miševi. Nakon što je dobiven dovoljan broj WT i KO miševa, međusobno su parene samo

životinje istovrsnog genotipa te ih više nije bilo potrebno genotipizirati. Ukupno je za potrebe istraživanja korišteno 34 miša te su u radu analizirane kosti 16 miševa (8 muških i 8 ženskih) u dobi od 2 mjeseca te 18 miševa (8 muških i 10 ženskih) u dobi od 4 mjeseca.

4.2. Genotipizacija miševa

Genotipizacija je postupak određivanja genotipa životinje pomoću analize DNA. Postupak se sastoji od izolacije DNA iz tkiva, umnožavanja željenih sekvenci DNA, odnosno fragmenata željenih gena te izdvajanja i vizualizacije umnoženih sekvenci DNA.

4.2.1. Uzimanje uzoraka, izolacija DNA i mjerenje koncentracije DNA

Svakom mišu uzet je uzorak tkiva za izolaciju dovoljne količine DNA za daljnju genotipizaciju i analizu. Prije uzorkovanja rep miša je podvezan, a tkivo je uzeto s vrška repa miša (duljine oko 0,5 cm). Uzorak tkiva stavljen je u Eppendorf epruvetu sa sljedećim reagensima: 10 μL proteinaze K i 490 μL pufera za lizu (50 mM Tris HCl, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, pH 8,0).

Pufer za lizu sadrži deterdžent SDS (natrijev dodecil sulfat, engl. *sodium dodecyl sulfate*) koji razlaže membranske strukture u tkivu i omogućava izlazak DNA iz stanice te EDTA (etilendiaminotetraoctena kiselina) kao kelator metalnih iona koji inhibira metaloenzime čime štiti DNA od mogućih oštećenja. Također se u puferu za lizu nalazi i Tris (tris-hidroskimetilaminometan) čiji pK_a od 8,07 osigurava puferiranje u rasponu pH od 7,07 do 9,07. Time se osigurava pH otopine unutar fiziološkog raspona pH u kojemu se DNA ne će oštetiti. Puferu za lizu dodana je i proteinaza K – serinska proteaza širokog spektra koja razlaže tkivo kako bi se DNA mogla izolirati te inaktivira nukleaze koje bi mogle degradirati izoliranu DNA.

Uzorak tkiva u puferu za lizu inkubira se preko noći na 56°C. Nakon inkubacije DNA se izolira prema sljedećem protokolu:

1. uzorak se centrifugira 5 min na 14 000 okretaja/min,
2. za vrijeme centrifuge pripreme se čiste epruvete u koje se stavi 96%-tni etanol,
3. supernatant se otpipetira u pripremljene epruvete te se promiješa pomoću vortex miješalice čime se izdvoji DNA (bjelkasta tvar),
4. uzorak se ponovno centrifugira 5 min na 14 000 okretaja/min,
5. supernatant se odlije, a u talogu ostane DNA,
6. u epruvete se doda 1000 μL 70%-tnog etanola,

7. uzorak se ponovno promiješa pomoću vortex miješalice te potom centrifugira 5 min na 14 000 okretaja/min,
8. supernatant se ponovno odlije, a DNA ostane u talogu,
9. koraci 6., 7. i 8. ponove se dva puta kako bi se uklonile nečistoće,
10. uzorci se suše u otvorenim epruvetama na 37°C oko 30 min u hibridizacijskoj komori,
11. u epruvetu se stavi 150-200 μL 1x TE pufera (količina ovisno o veličini taloga),
12. uzorci se zagriju na 56°C u termobloku, dok se potpuno ne otopi DNA.

Nakon izolacije, koncentracija DNA u uzorku izmjerena je spektrofotometrijski pomoću uređaja Biophotometer (Eppendorf). Čistoća i kvaliteta izolirane DNA provjerena je iz omjera vrijednosti apsorbancije odčitane na 260 i 280 nm ($A_{260/280}$).

4.2.2. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom ili PCR (engl. *polymerase chain reaction*) metoda je umnožavanja željenih sekvenci DNA. Ovom metodom se iz jedne ishodišne DNA može dobiti mnogo kopija određene sekvence (obično fragmenta gena) bez umnožavanja čitave DNA. Smjesa za PCR sadrži slijedeće komponente: ishodišnu DNA (engl. *template DNA*), početnice „*forward*“ i „*reverse*“ (engl. *primers*), DNA polimerazu (npr. Taq polimeraza), deoksinukleotid trifosfate (dNTP) i pufersku otopinu. Smjesa se potom podvrgava ciklusima grijanja i hlađenja. Zagrijavanjem DNA na temperaturu od 98°C denaturira se molekula DNA pri čemu se prekidaju vodikove veze između dvaju lanaca čime nastaje jednolančana DNA koja se može umnožiti. DNA se potom hladi na 60°C kako bi se početnice vezale na točno određene sekvence DNA. Polimeraza se potom veže na kompleks početnice-DNA. Temperatura se podiže na 72°C te počinje proces elongacije pri kojem DNA polimeraza sintetizira lanac komplementaran ishodišnom lancu u smjeru 5' → 3' od mjesta vezanja početnice. U svakom ciklusu željena sekvenca DNA se udvostruči te je porast količine željene sekvence eksponencionalan sve do iscrpljenja reagensa u smjesi.

Nakon izolacije i mjerenja koncentracije DNA, umnožena je sekvenca za fragment gena koji želimo analizirati pomoću specifičnih početnica. Umnažanje sekvence za *Bmp3* i *LacZ* gene učinjeno je PCR-om. U tablici 1 prikazan je slijed početnica korištenih za genotipizaciju i veličina produkta koji nastaje nakon umnožavanja sekvence za fragmente gena PCR-om.

Tablica 1: Slijed početnica za genotipizaciju.

Gen	Smjer	Slijed	Veličina produkta (pb)
Bmp3	F	3'-GAAGTAGAGCGGTGCGACAGCA-5'	496
	R	3'-AAGGTCCCTACAGTGTACCGCCA-5'	
LacZ	F	3'-TTTCCATGTTGCCACTCGC-5'	264
	R	3'-ACCGCACGATAGAGATTCGG-5'	

Reakcija je provedena pomoću EmeraldAmp MAX PCR kompleta (Takara) u Thermal Cycler 2400 uređaju (Perkin Elmer). Reakcijski volumen, odnosno ukupni volumen uzorka u PCR tubi iznosio je 25 μL. Priprema uzoraka za PCR napravljena je prema uputama proizvođača:

1. u epruvetu za PCR stavi se 12.5 μL EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (2X Premix) te po 1 μL 10 μM otopine početnica (konačna koncentracija početnica: po 0,2 μM),
2. u epruvetu se zatim stavi izračunata količina izolirane DNA (< 500 ng DNA),
3. doda se sterilizirane destilirane vode do 25 μL.

Uzorci pripremljeni za PCR stavljaju se u blok koji je prethodno zagrijan na 98°C te se postavi 30 ciklusa zagrijavanja i hlađenja:

1. 10 s na 98°C,
2. 30 s na 60°C,
3. 60 s na 72°C.

4.2.3. Izdvajanje umnoženih sekvenci DNA

Genotip svake životinje određen je izdvajanjem sekvence DNA umnožene PCR-om elektroforezom na agaroznom gelu.

Princip rada elektroforeze na gelu jest različita pokretljivost čestica u električnom polju, s obzirom na njihovu masu koja je u slučaju DNA proporcionalna duljini DNA sekvence. Za vizualizaciju DNA u gel je dodan etidij bromid koji pokazuje svojstvo fluorescencije. Etidij bromid aromatski je spoj koji najjače apsorbira ultraljubičastu svjetlost (valne duljine 210 – 285 nm) pri čemu dolazi do prelaska molekule u ekscitirano stanje te se posljedično emitira višak energije u obliku fotona u području vidljive svjetlosti (valne duljine 605 nm). Budući da je etidij bromid istovremeno i interkalirajući spoj koji se umeće u

molekulu DNA, nakon obasjavanja ultraljubičastom svjetlošću vidi se položaj umnoženih sekvenci DNA na gelu u obliku vrpce (engl. *band*).

Za odvajanje umnoženih produkata PCR reakcije korišten je 1,5%-tni agarozni gel s 0,01%-tnim etidij bromidom (Sigma). Uzorci su u jažice gela naneseni u ukupnom volumenu od 8 µL. DNA je zbog fosfatnih skupina negativno nabijena, tako da putuje prema pozitivno nabijenoj anodi. Elektroforeza je provedena tijekom 15 minuta pod naponom od 100 V. Vizualizacija DNA produkta provedena je osvjetljavanjem gela u transiluminatoru (Appligene) pod ultra ljubičastim zračenjem valne duljine 300 nm. Kako bi se orijentacijski odredila duljina umnoženih fragmenata na gel je nanesen i 100 pb DNA standardni marker (Invitrogen).

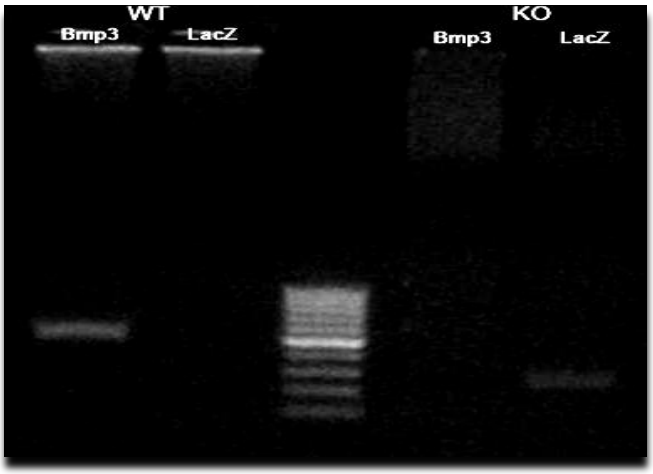
4.2.4. Određivanje genotipa životinja na temelju dobivenih rezultata

Genotip životinja određen je prema vizualizaciji DNA vrpci nakon elektroforeze na gelu. Kod KO životinja došlo je do umnožavanja DNA sekvence samo kod primjene *LacZ* početnica, a kod WT životinja samo kod primjene *Bmp3* početnica. Kod HT životinja DNA sekvence umnožene su u oba slučaja. Na gelu se vide samo vrpce kod uzorka u kojem je došlo do umnožavanja sekvence DNA. U tablici 2 prikazana je interpretacija genotipa na temelju prisutnosti (odnosno odsutnosti) vrpci na gelu.

Tablica 2: Određivanje genotipa životinje na temelju vrpci na gelu. Znak „+“ označava prisutnost, a znak „–“ odsutnost vrpce na gelu.

Genotip	***LacZ***	***Bmp3***
KO	+	–
WT	–	+
HT	+	+
ne može se odrediti	–	–

Na slici 1 prikazana je usporedna elektroforeza uzoraka jedne WT životinje i uzoraka jedne KO životinje. Iz slike se uočava da WT životinja ima vidljivu vrpcu na gelu kod uzorka s *Bmp3* početnicama, a da nema vidljive vrpce kod uzorka s *LacZ* početnicama. Obrnuto vrijedi za KO životinju koja ima vidljivu vrpcu na gelu kod uzorka s *LacZ* početnicama, a nema vidljive vrpce kod uzorka s *Bmp3* početnicama.



Slika 1: Gel nakon elektroforeze uzoraka WT i KO životinje.

4.3. Analiza dugih kostiju

Za analizu dugih kostiju korišteni su miševi oba spola, starosti 2 i 4 mjeseca. Miševi su žrtvovani injiciranjem ketamina (1 mL/kg) intraperitonealno i embutramida (1 mL/kg) intrapulmonalno. Nakon žrtvovanja miševa prikupljeni su femur i tibija lijeve noge. Uklonjeni su koža i okolno mišićno tkivo te su kosti fiksirane 24 h u 4%-tnom formalinu. Nakon toga kosti su prebačene u 70%-tni etanol do analize. Uzorci kostiju snimljeni su SkyScan 1076 mikro CT uređajem.

Mikro CT uređaj koristi stožasti izvor rendgenskog zračenja. Rendgenske zrake koje izlaze iz izvora rendgenskog zračenja dolaze do tkiva gdje s njim stupaju u interakciju. Na temelju intenziteta registriranog zračenja izračunavaju se apsorpcijski koeficijenti tkiva kroz koje su prošle rendgenske zrake te se svakom apsorpcijskom koeficijentu pridružuje nijansa sive boje što omogućuje rekonstrukciju slike te kasniju vizualizaciju i analizu.

Prilikom snimanja uzorci femura i tibije bili su učvršćeni u nosaču na platformi mikro CT uređaja te su snimljeni koristeći rezoluciju od 9 μm, što je odgovaralo naponu od 50 kV i jakosti struje od 200 μA. Otvrdnjavanje rendgenskih zraka smanjeno je upotrebom aluminijskog filtra debljine 0,5 mm. Rotacijski pomak izvora zračenja prilikom snimanja je iznosio 0,5° u području od 198° za svaki uzorak. Uprosječenje slike postavljeno je na vrijednost 2 kako bi se smanjio šum . Rekonstrukcija dobivenih podataka izvršena je pomoću NRecon (SkyScan) programa.

Tkiva snimljena mikro CT-om analizirana su morfometrijski pomoću računalnog programa CTAn (Skyscan). Za morfometrijsku analizu korišteni su transverzalni presjeci kostiju. Osnovni je princip analize da se kost prikaže kao skup voksela bijela boje, dok

pozadina ostaje crna. Taj postupak naziva se binarizacija, a postiže se pomoću histogramske ljestvice. Prag histogramske ljestvice određuje se tako da bijeli vokseli najbolje moguće odgovaraju stvarnoj koštanoj masi. Nakon binarizacije računalo analizira bijele voksele prema zadanim parametrima, a budući da svaki voksel odgovara određenom volumenu stvarne kosti, dobiveni podatci mogu se kvantificirati.

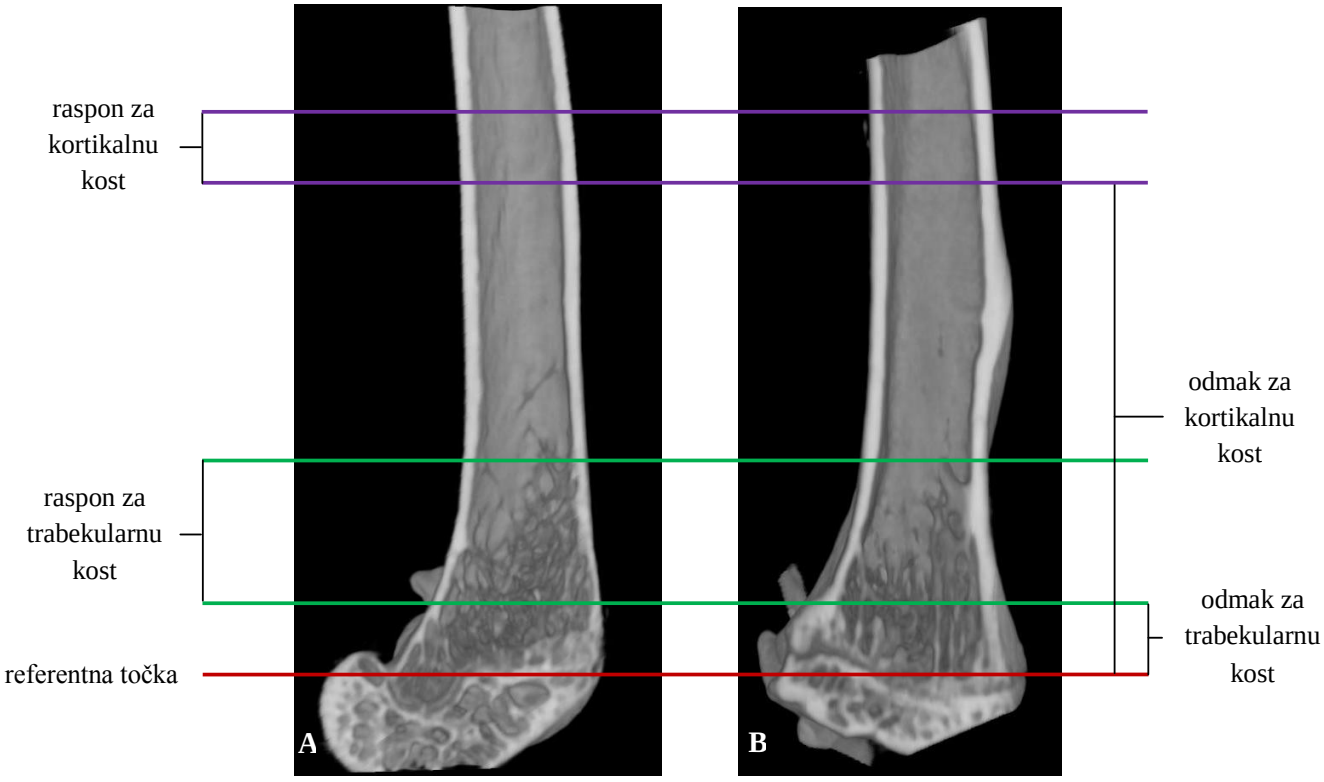
U programu DataViewer prikažu se snimljene kosti u tri presjeka (koronalni, sagitalni i transverzalni) te se slika rotacijom dovede u položaj u kojem je pojedina kost najbolje prikazana u transverzalnoj ravnini. Transverzalni presjeci spreme se u obliku seta podataka (engl. *dataset*) posebno za femur i posebno za tibiju.

Nakon što su za femur i tibiju spremljeni transverzalni presjeci, kod svake su kosti u programu CTAn odabrani presjeci za analizu kortikalne i trabekularne kosti. Kao referentnu točku u odabiru presjeka najpogodnije je odabrati transvezalni presjek na kojemu se tek počinju spajati epifizne ploče rasta. S obzirom da se analizira dio kosti oko spoja u zglobu koljena, navedeni presjek nalazi se u distalnom dijelu femura i u proksimalnom dijelu tibije. Budući da se oko ploča rasta nalazi prvenstveno primarna spongioza, za adekvatnu analizu kortikalne i trabekularne kosti definiran je odmak (engl. *offset*), tj. broj presjeka od referentne točke prema proksimalno (kod femura), odnosno distalno (kod tibije), koji se ne će uzimati za analizu. Potom je definiran raspon, tj. koliko presjeka nakon odmaka se izabire za analizu. Za analizu kortikalne kosti uzet je veći odmak kako bi se uzeli presjeci na kojima nema trabekularne kosti i time olakšala kasnija analiza. U tablici 3 navedene su vrijednosti odmaka i raspona korištene u ovoj analizi.

Tablica 3: Vrijednosti odmaka i raspona u izdvajanju transverzalnih presjeka za analizu.

		Odmak	**Raspon**
femur	kortikalna kost	350	50
	trabekularna kost	50	100
tibija	kortikalna kost	350	50
	trabekularna kost	50	100

Na slici 2 prikazani su na mikro CT snimkama dijelovi femura i tibije izdvojeni za morfometrijsku analizu.



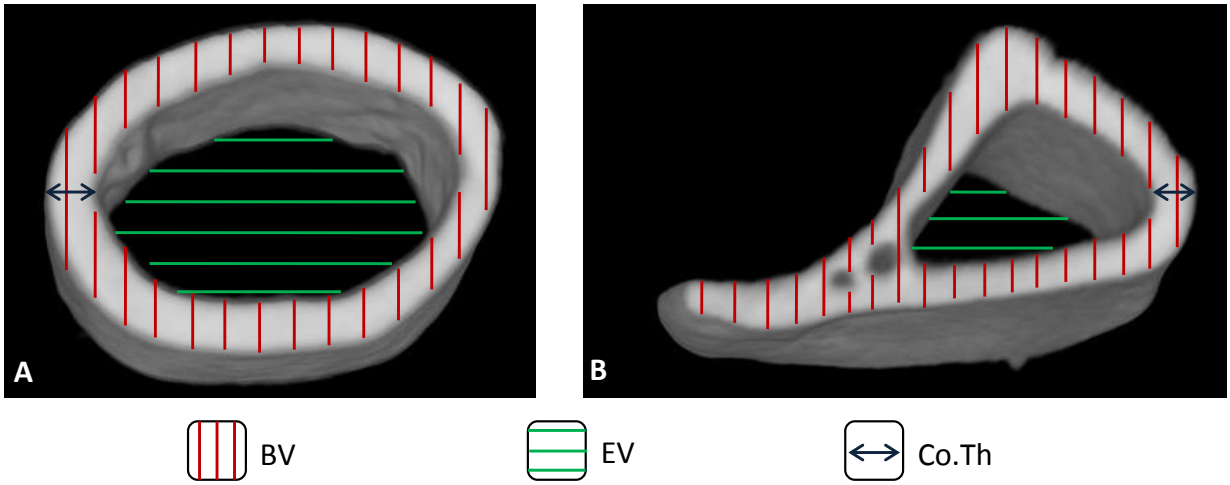
Slika 2: Prikaz dijelova femura (A) i tibije (B) uzetih za morfometrijsku analizu na mikro CT snimkama na sagitalnom presjeku.

Nakon što su definirani odmak i raspon presjeka za analizu, na presjeku se označi područje interesa (engl. *region of interest* – ROI) koje se ocrta oko kosti na presjeku, pazeći da se pritom obuhvati čitava cirkumferencija kosti. Tako definirani ROI se spremi, zasebno za kortikalnu i za trabekularnu kost femura i tibije.

Morfometrijska analiza kosti napravljena je također u programu CTAn. Binarizacija podataka napravljena je postavljanjem praga histogramske ljestvice (engl. *General tresholding*) na 60 do 255. Zaostale bijele točke manje od 3 voksela uklonjene su pomoću funkcije *Despecle*. Kod analize kortikalne kosti ograničeno je vanjsko područje interesa na periostalni dio kosti pomoću funkcije *ROI shrink wrap*. Kod analize trabekularne kosti upotrebljena je ista funkcija, ali za ograničenje vanjskog područja interesa na trabekularnu kost.

Nakon što su zadani parametri za analizu, pomoću programa Batch Manager napravljena je analiza koštanih parametara u 3 dimenzije (engl. *3D bone analysis*) u svih snimljenih uzoraka. Kod kortikalne kosti analizirani su sljedeći parametri: omjer koštanog volumena i ukupnog volumena tkiva (BV/TV, od engl. *bone volume/tissue volume*), debljina kortikalne kosti (Co.Th, od engl. *cortical thickness*) i endostealni volumen (EV, od engl.

endosteal volume). EV se dobije računski tako da se od TV oduzme BV. Kod trabekularne kosti analizirani su sljedeći parametri: omjer koštanog volumena i ukupnog volumena tkiva (BV/TV), debljina trabekula (Tb.Th, od engl. *trabecular thickness*), razmak između trabekula (Tb.Sp, od engl. *trabecular separation*) i broj trabekula (Tb.N, od engl. *trabecular number*). Na slici 3 prikazane su 3D rekonstrukcije transverzalnih presjeka kortikalne kosti femura i tibije s označenim morfometrijskim parametrima.



Slika 3: 3D rekonstrukcije transverzalnih presjeka kortikalne kosti femura (A) i tibije (B) s označenim morfometrijskim parametrima: BV, EV i Co.Th.

4.4. Statistička analiza

Rezultati morfometrijske analize prikazani su kao aritmetička sredina ± standardna devijacija, pri čemu je aritmetička sredina mjera centralne tendencije podataka, a standardna devijacija mjera varijabilnosti.

Za testiranje razlike između više nezavisnih uzoraka (skupina miševa) po pojedinom morfometrijskom parametru korištena je jednosmjerna analiza varijance (jednosmjerna ANOVA) uz razinu značajnosti $\alpha = 0{,}05$. Za svaku učinjenu jednosmjernu ANOVU prikazana je i snaga testa koja predstavlja vjerojatnost odbacivanja neistinite nul-hipoteze. Statistički test smatra se dobrim ako je snaga testa barem 80% (Ivanković i sur.-1989.). U slučaju kada je jednosmjerna ANOVA pokazala statistički značajnu razliku (slučajna varijabla $F > F_{\text{granično}}$, odnosno $p < 0{,}05$), napravljen je *post hoc* test po Tukeyju kojim je analizirano koje se točno skupine miševa međusobno statistički značajno razlikuju ($p < 0{,}05$) za pojedini morfometrijski parametar. U interpretaciji rezultata, razlika za pojedini morfometrijski parametar između WT i KO miševa smatrana je značajnom ako je razlika statistički značajna

kod obje dobne skupine miševa (dakle za miševe stare 2 mjeseca i za miševe stare 4 mjeseca) i ukoliko je razlika u obje dobne skupine konzistentno u prilog istom genotipu.

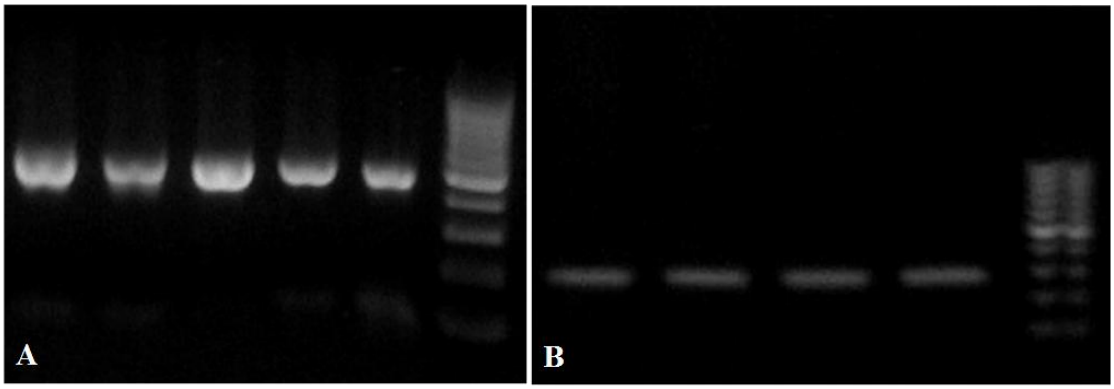
Za otkrivanje povezanosti (korelacije) između pojedinih morfometrijskih parametara izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije r, a povezanost je smatrana statistički značajnom za $p < 0,05$. Vrlo jakom korelacijom smatra se $|r| > 0,9$, jakom $0,7 < |r| \leq 0,9$, srednje jakom $0,5 < |r| \leq 0,7$, slabom $0,3 < |r| \leq 0,5$ i zanemarivom $|r| \leq 0,3$ (Mukaka-2012.). Udio varijabilnosti jednog morfometrijskog parametra objašnjen linearnom povezanošću s drugim morfometrijskim parametrom prikazan je koeficijentom determinacije r^2, odnosno kvadratom Pearsonova koeficijenta korelacije.

5. REZULTATI

5.1. Rezultati genotipizacije

Ukupno je genotipizirano 150 miševa, od toga je bilo 34 KO, 33 WT i 73 HT, te su ustanovljeni Mendelovi zakoni nasljeđivanja prilikom križanja miševa.

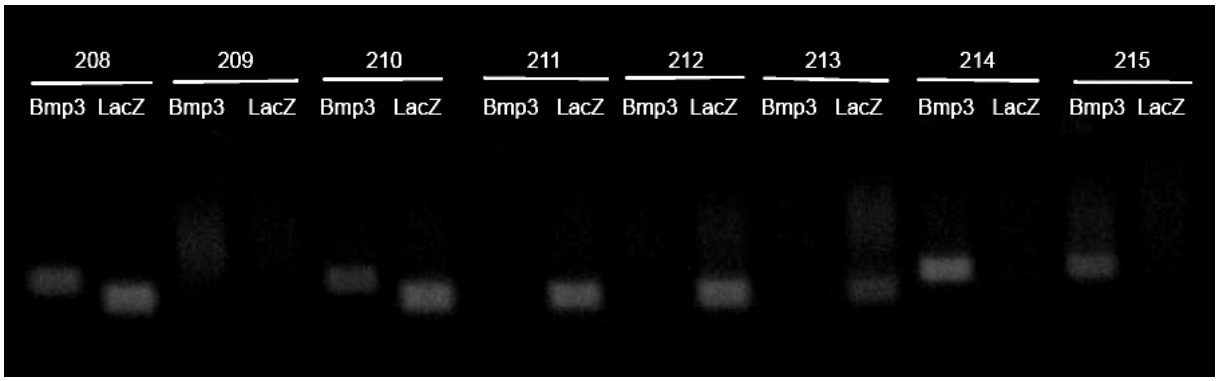
Na slici 4-A prikazani su produkti umnažanja *Bmp3* gena, a na slici 4-B produkti umnažanja *LacZ* gena. U desnom dijelu gela nalazi se marker (engl. *ladder*) s razdvojenim fragmentima DNA koji se razlikuju po 100 pb u veličini, a služi da se orijentacijski odredi veličina fragmenata DNA iz uzorka.



Slika 4: Gelovi nakon elektroforeze

A) uzorci WT životinja B) uzorci KO životinja.

Na slici 5 prikazana je genotipizacija 8 miševa označenih brojevima od 208 do 215, kao primjer interpretacije rezultata genotipizacije za sve miševe. Iz slike se vidi da uzorci 208 i 210 odgovaraju HT miševima, uzorci 209, 214 i 215 WT miševima, a uzorci 211, 212 i 213 KO miševima.



Slika 5: Gelovi nakon elektroforeze uzoraka 208 – 215.

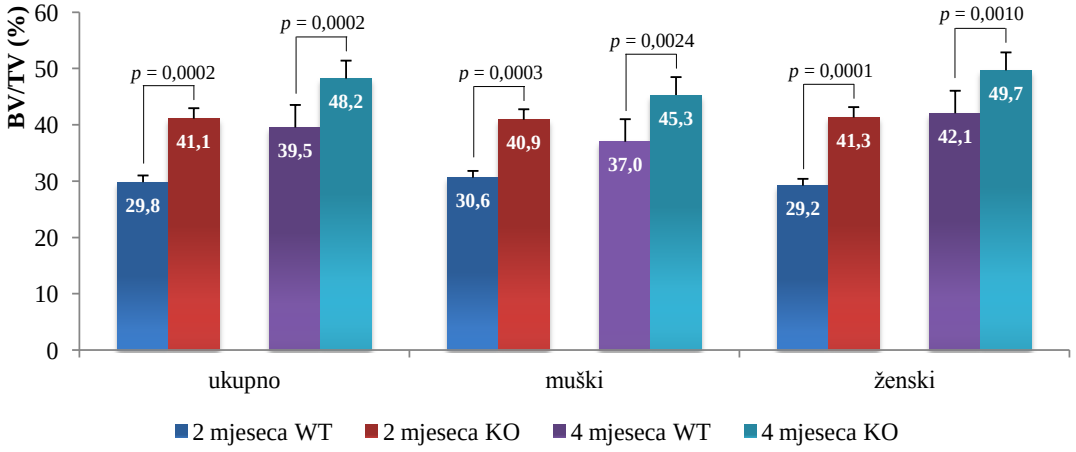
Za daljnju morfometrijsku analizu kostiju izdvojena su 34 miša, 17 WT i 17 KO.

5.2. Rezultati morfometrijske analize kostiju

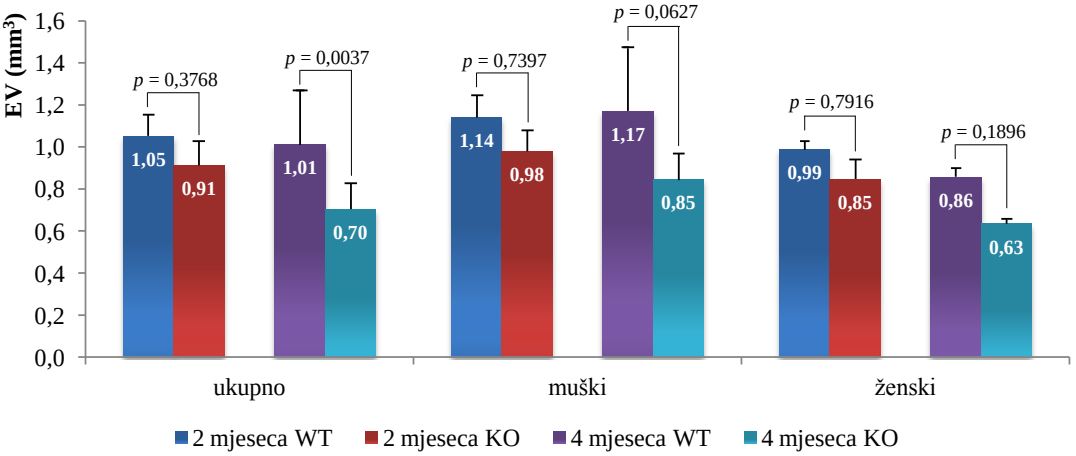
Rezultati morfometrijske analize kostiju prikazani su posebno za kortikalnu kost femura, trabekularnu kost femura, kortikalnu kost tibije i trabekularnu kost tibije. Za svaki morfometrijski parametar prikazane su usporedbe između WT i KO miševa po dobi i spolu.

5.2.1. Rezultati morfometrijske analize kortikalne kosti femura

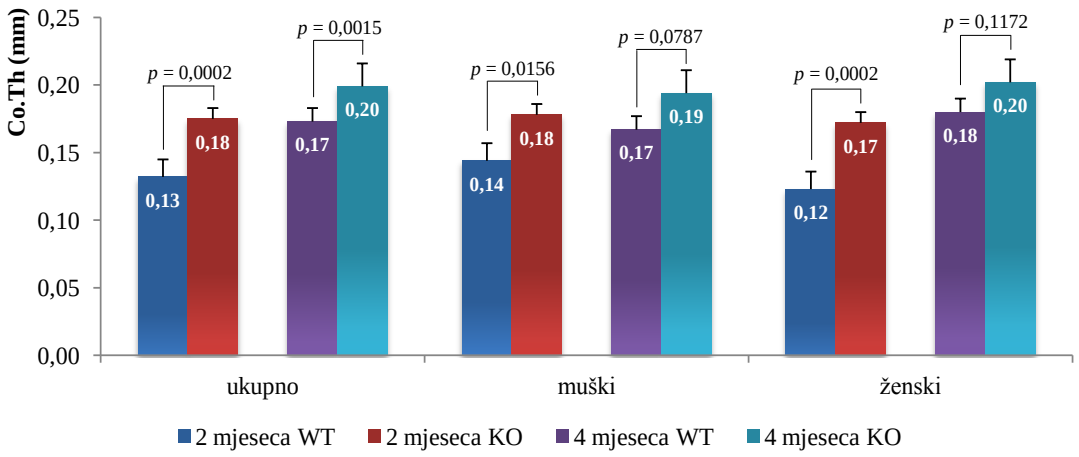
Izmjereni omjer BV/TV veći je kod KO miševa u obje dobne skupine i za oba spola te su razlike statistički značajne za sve skupine miševa (Slika 6). Endostealni volumen (EV) pokazao je trend smanjenja kod KO miševa u obje dobne skupine i za oba spola, ali je statistički značajna razlika dobivena samo u miševa starosti 4 mjeseca uzimajući u obzir oba spola (Slika 7). Debljina kortikalne kosti (Co.Th) veća je kod KO miševa u obje dobne skupine i za oba spola te je razlika statistički značajna za obje dobne skupine, osim pojedinačno za muške i ženske miševe 4 mjeseca starosti (Slika 8).



Slika 6: Omjer BV/TV kortikalne kosti femura u WT i KO muških i ženskih miševa; (snaga jednosmjerne ANOVE: > 99,9%).



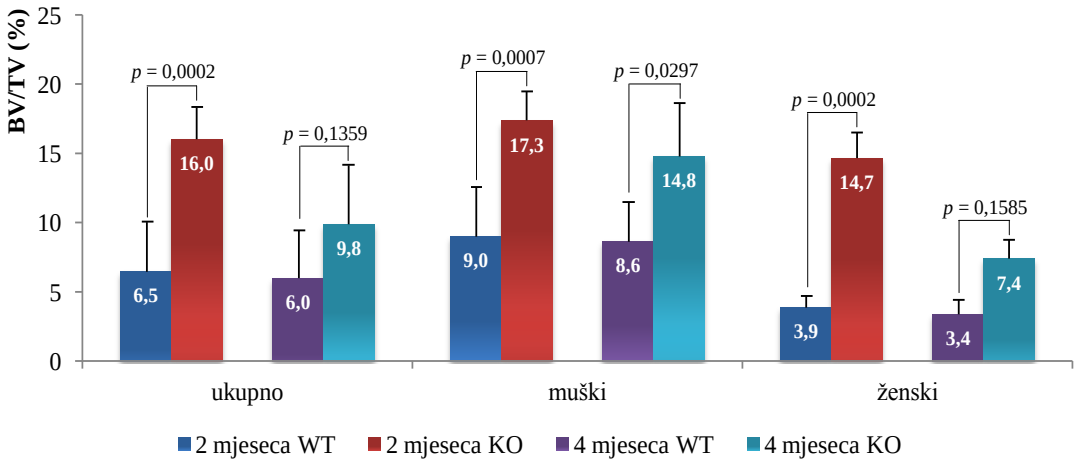
Slika 7: EV kortikalne kosti femura u WT i KO muških i ženskih miševa; (snaga jednosmjerne ANOVE: 96,9%).



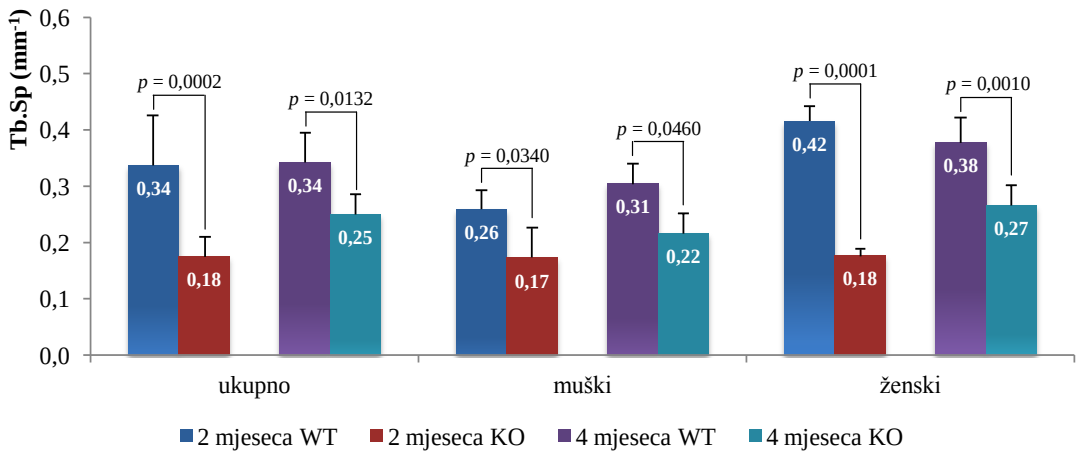
Slika 8: Co.Th kortikalne kosti femura u WT i KO muških i ženskih miševa; (snaga jednosmjerne ANOVE: > 99,9%).

5.2.2. Rezultati morfometrijske analize trabekularne kosti femura

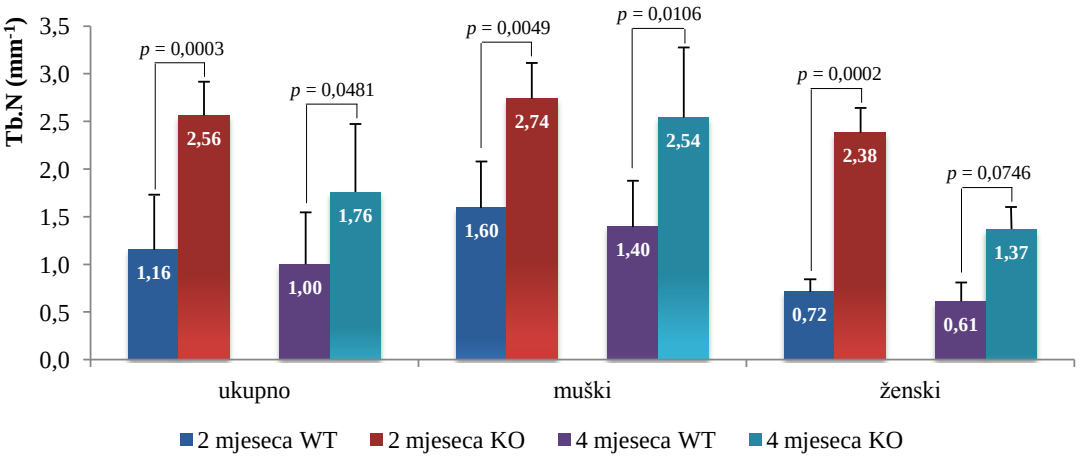
Omjer BV/TV trabekularne kosti femura veći je kod KO miševa u obje dobne skupine i za oba spola te je razlika statistički značajna za miševe starosti 2 mjeseca, kao i kod muških miševa starosti 4 mjeseca, dok samo u ženki i uzimajući u obzir oba spola miševa starih 4 mjeseca nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na WT miševe (slika 9). Razmak između trabekula (Tb.Sp) manji je kod KO miševa u obje dobne skupine i za oba spola te je razlika statistički značajna za obje dobne skupine i za oba spola (slika 10). Broj trabekula (Tb.N) je pak veći kod KO miševa u obje dobne skupine i za oba spola, a razlika je statistički značajna za sve skupine miševa osim za ženke starosti 4 mjeseca (slika 11). Debljina trabekula (Tb.Th) veća je kod KO miševa starosti 2 mjeseca i razlika je statistički značajna, a manja kod KO miševa starosti 4 mjeseca te razlika nije statistički značajna (slika 12).



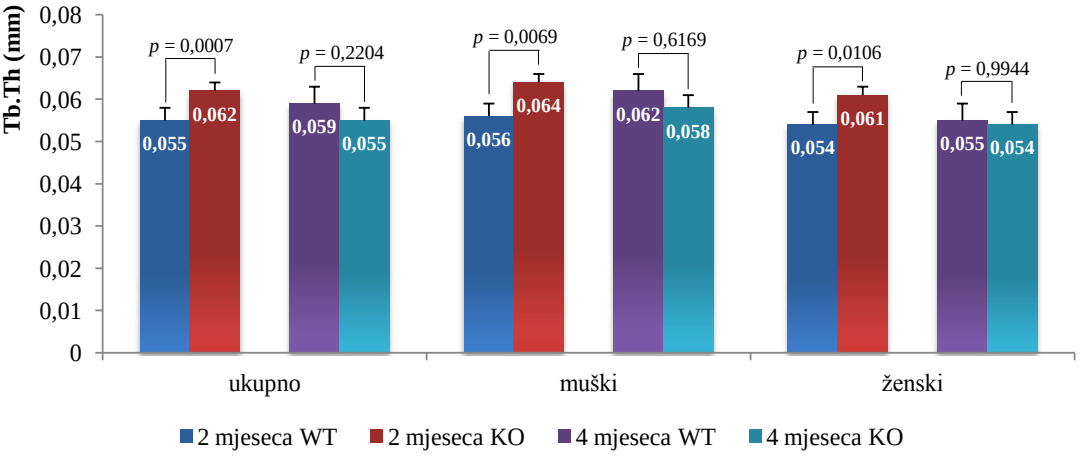
Slika 9: Omjer BV/TV trabekularne kosti femura u WT i KO muških i ženskih miševa; (snaga jednosmjerne ANOVE: > 99,9%).



Slika 10: Tb.Sp trabekularne kosti femura u WT i KO muških i ženskih miševa; (snaga jednosmjerne ANOVE: > 99,9%).



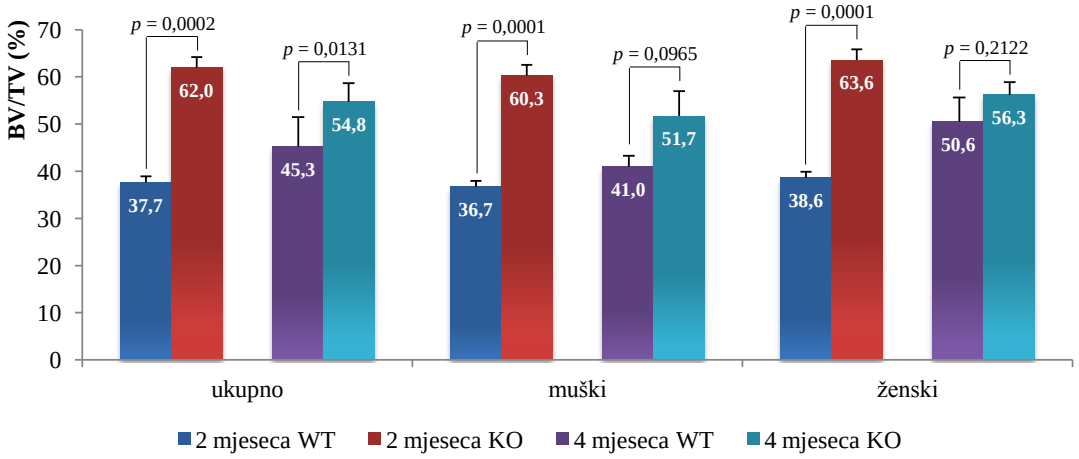
Slika 11: Tb.N tabekularne kosti femura u WT i KO muških i ženskih miševa; (snaga jednosmjerne ANOVE: > 99,9%).



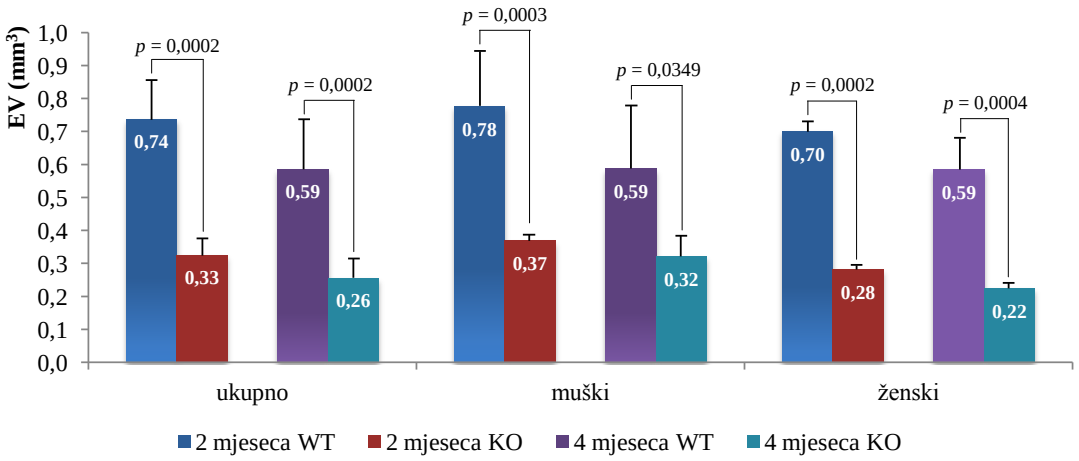
Slika 12: Tb.Th trabekularne kosti femura u WT i KO muških i ženskih miševa; (snaga jednosmjerne ANOVE: 98,8%).

5.2.3. Rezultati morfometrijske analize kortikalne kosti tibije

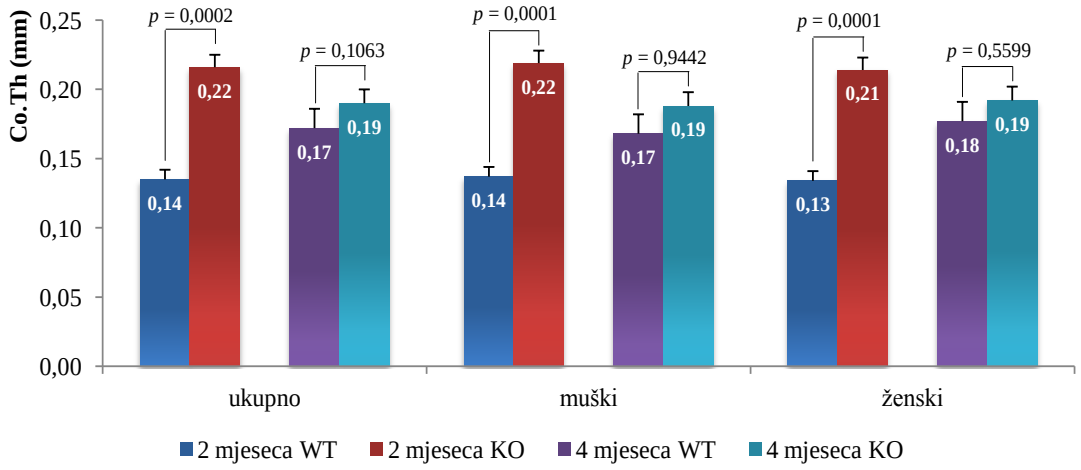
Omjer BV/TV kortikalne kosti tibije veći je kod KO miševa te je razlika statistički značajna za obje dobne skupine, ali ne i pojedinačno za muške i ženske miševe starosti 4 mjeseca (slika 13). Endostealni volumen manji je kod KO miševa, a razlika je statistički značajna za obje dobne skupine i oba spola (slika 14). Debljina kortikalne kosti veća je kod KO miševa, ali je razlika statistički značajna samo za miševe starosti 2 mjeseca, dok za miševe starosti 4 mjeseca nije statistički značajna (slika 15).



Slika 13: Omjer BV/TV kortikalne kosti tibije u WT i KO muških i ženskih miševa; (snaga jednosmjerne ANOVE: > 99,9%).



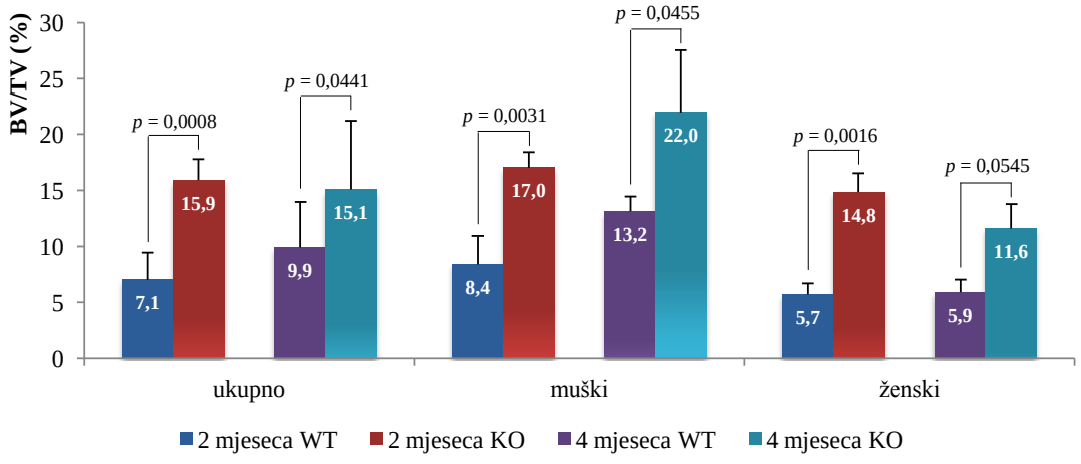
Slika 14: EV kortikalne kosti tibije u WT i KO muških i ženskih miševa; (snaga jednosmjerne ANOVE: > 99,9%).



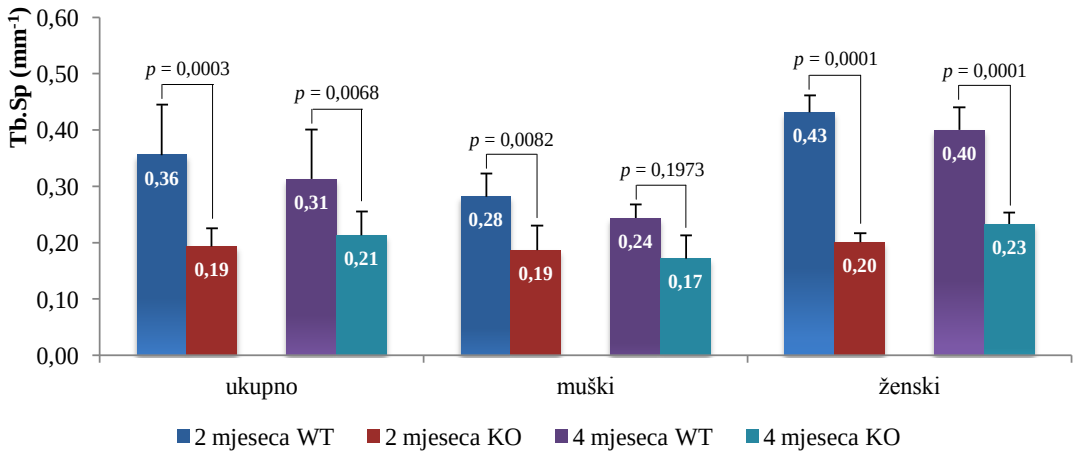
Slika 15: Co.Th kortikalne kosti tibije u WT i KO muških i ženskih miševa; (snaga jednosmjerne ANOVE: > 99,9%).

5.2.4. Rezultati morfometrijske analize trabekularne kosti tibije

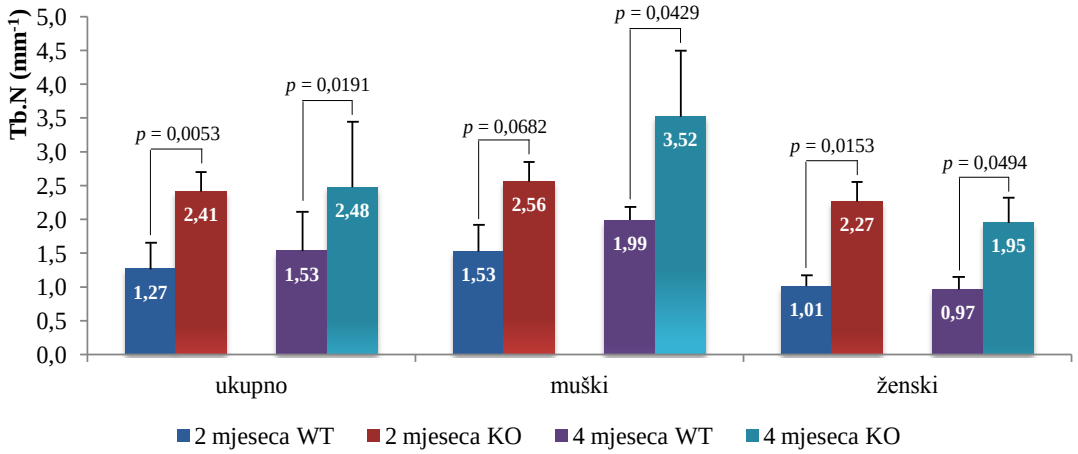
Omjer BV/TV trabekularne kosti tibije veći je kod KO miševa te je razlika statistički značajna za sve skupine miševa osim za ženke starosti 4 mjeseca (slika 16). Razmak između trabekula manji je kod KO miševa, a razlika je statistički značajna za sve skupine miševa osim za muške miševe starosti 4 mjeseca (slika 17). Broj trabekula veći je kod KO miševa te je razlika statistički značajna za sve skupine miševa osim za muške miševe starosti 2 mjeseca (slika 18). Debljina trabekula veća je kod KO miševa starosti 2 mjeseca i razlika je statistički značajna, a manja kod KO miševa starosti 4 mjeseca te razlika nije statistički značajna (slika 19).



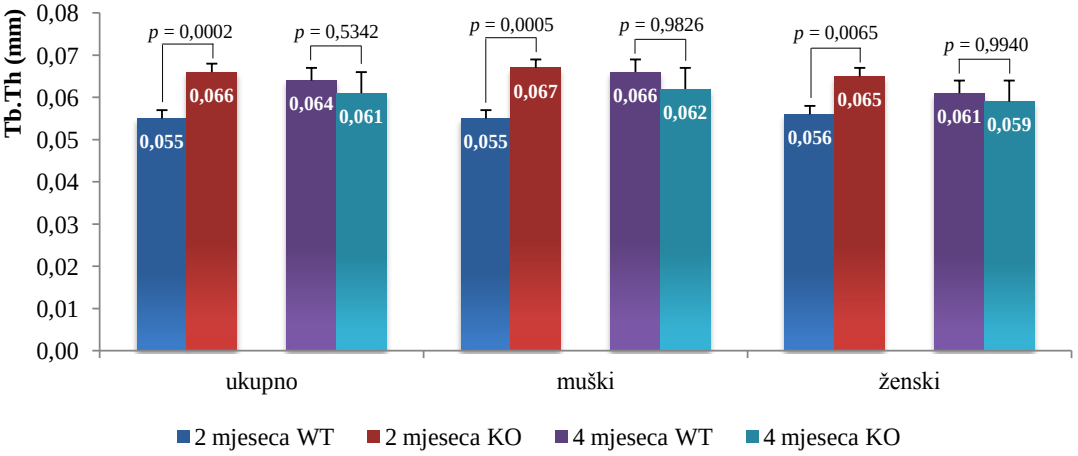
Slika 16: Omjer BV/TV trabekularne kosti tibije u WT i KO muških i ženskih miševa; (snaga jednosmjerne ANOVE: 99,2%).



Slika 17: Tb.Sp trabekularne kosti tibije u WT i KO muških i ženskih miševa; (snaga jednosmjerne ANOVE: > 99,9%).



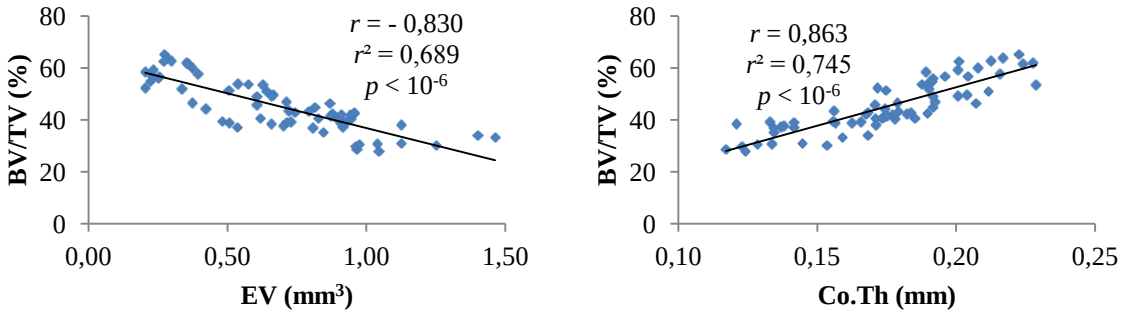
Slika 18: Tb.N trabekularne kosti tibije u WT i KO muških i ženskih miševa; (snaga jednosmjerne ANOVE: 97,9%).



Slika 19: Tb.Th trabekularne kosti tibije u WT i KO muških i ženskih miševa; (snaga jednosmjerne ANOVE: > 99,9%).

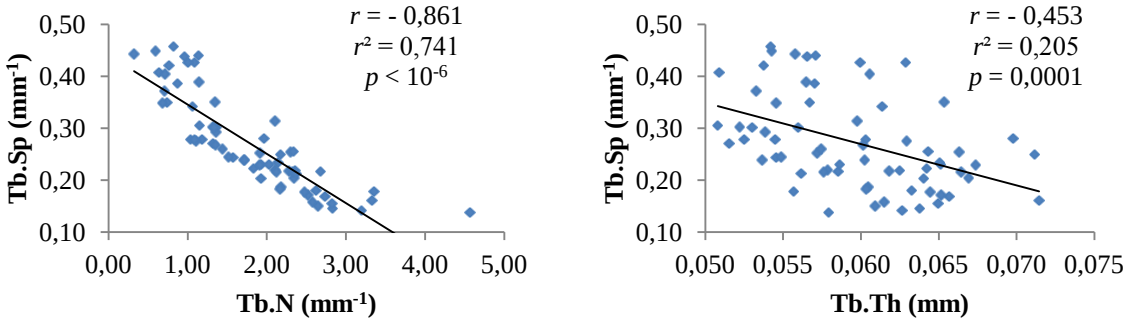
5.2.5. Analiza povezanosti pojedinih morfometrijskih parametara

Na slici 20 prikazana je povezanost između BV/TV za kortikalnu kost i kortikalnih morfometrijskih parametara (EV i Co.Th). Iz prikazanih dijagrama raspršenja vidljivo je da između BV/TV i EV postoji jaka negativna korelacija (r = -0,830), a da između BV/TV i Co.Th postoji jaka pozitivna korelacija (r = 0,863). Korelacije su u oba slučaja statistički značajne ($p < 10^{-6}$). Pritom povezanost s EV objašnjava 68,9% varijabilnosti BV/TV (r^2 = 0,689), dok povezanost s Co.Th objašnjava 74,5% varijabilnosti BV/TV (r^2 = 0,745).



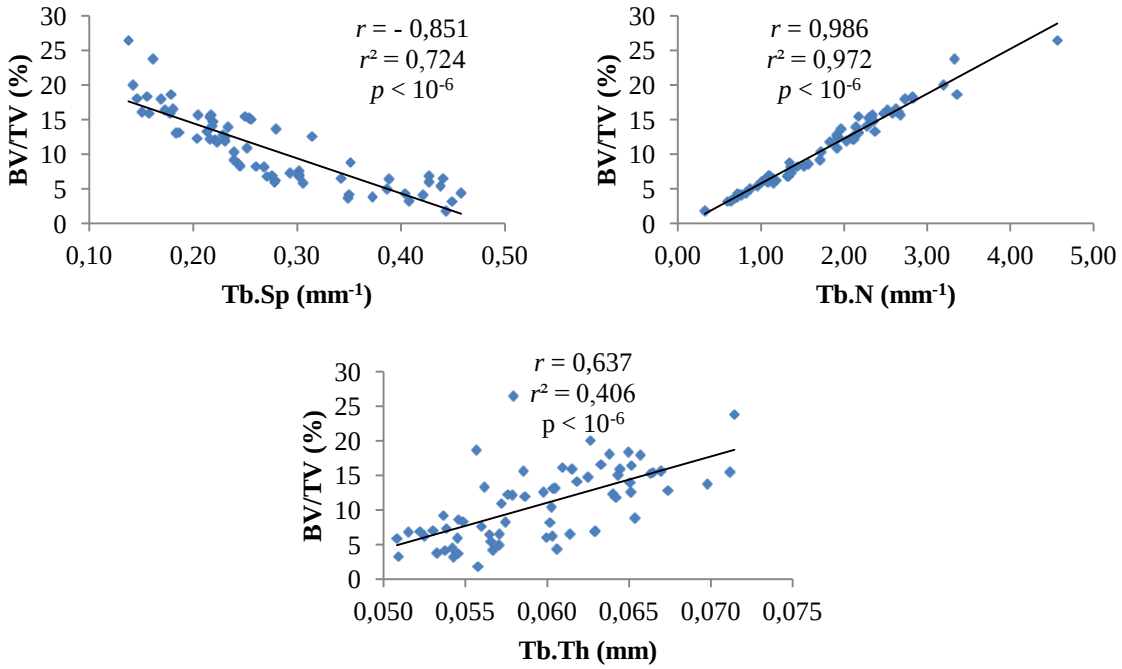
Slika 20: Povezanost između BV/TV za kortikalnu kost i EV te Co.Th.

Na slici 21 prikazana je povezanost između Tb.Sp i trabekularnih morfometrijskih parametara (Tb.N i Tb.Th). Iz prikazanih dijagrama raspršenja vidljivo je da između Tb.Sp i Tb.N postoji jaka negativna korelacija (r = -0,861), dok između Tb.Sp i Tb.Th postoji slaba negativna korelacija (r = -0,453). Korelacije su u oba slučaja statistički značajne ($p < 10^{-6}$ za korelaciju Tb.Sp i Tb.N, p = 0,0001 za korelaciju Tb.Sp i Tb.Th). Pritom povezanost s Tb.N objašnjava 74,1% varijabilnosti Tb.Sp (r^2 = 0,741), dok povezanost s Tb.Th objašnjava 20,5% varijabilnosti Tb.Sp (r^2 = 0,205).



Slika 21: Povezanost između Tb.Sp i Tb.N te Tb.Th.

Na slici 22 prikazana je povezanost između BV/TV za trabekularnu kost i trabekularnih morfometrijskih parametara (Tb.Sp, Tb.N i Tb.Th). Iz prikazanih dijagrama raspršenja vidljivo je da između BV/TV i Tb.Sp postoji jaka negativna korelacija (r = -0,851), dok između BV/TV i Tb.N postoji vrlo jaka pozitivna korelacija (r = 0,986). Između BV/TV i Tb.Th postoji srednje jaka pozitivna korelacija (r = 0,637). Korelacije su u sva tri slučaja statistički značajne ($p < 10^{-6}$). Pritom povezanost s Tb.Sp objašnjava 72,4% varijabilnosti BV/TV (r^2 = 0,724), povezanost s Tb.N objašnjava 97,2% varijabilnosti BV/TV (r^2 = 0,972), a povezanost s Tb.Th objašnjava 40,6% varijabilnosti BV/TV (r^2 = 0,406).



Slika 22: Povezanost između BV/TV za trabekularnu kost i Tb.Sp, Tb.N te Tb.Th.

6. RASPRAVA

Rezultati morfometrijske analize potvrdili su hipotezu da miševi s izbačenim *Bmp3* genom imaju veći volumen koštanog tkiva od WT miševa. Parametar koštanog volumena (BV) doveden je u odnos s ukupnim tkivnim volumenom kosti (TV) te pokazuje normalizirani volumen kosti (BV/TV). Budući da je riječ o omjeru, tj. relativnom udjelu, BV/TV omogućava usporedbu količine kosti kod različitih miševa, bez obzira na apsolutne volumene koštanog tkiva. Naime, apsolutni volumen koštanog tkiva, odnosno BV, značajno ovisi o veličini jedinke koja pak ovisi o brojnim parametrima, kako genetskim, tako i okolišnim te ne bi bio adekvatan parametar za usporedbu količine kosti kod različitih miševa. Također, usporedba BV/TV napravljena je između životinja različitog genotipa, ali iste dobi, kako bi se isključio utjecaj dobi na povećanje koštanog volumena. Unutar životinja iste dobi napravljena je i dodatna usporedba unutar životinja istog spola kako bi se eliminirale eventualne razlike među spolovima.

Kod miševa obje dobne skupine zabilježen je porast normaliziranog volumena kostiju kod KO miševa koji se pokazao statistički značajnim za sve analizirane dijelove kostiju osim za trabekularnu kost femura kod miševa starosti 4 mjeseca. Ovakav rezultat je očekivan, budući da bi se izbacivanje gena trebalo očitovati na jedinki neovisno o dobi jedinke. Rezultati nisu pokazali razlike u utjecaju izbacivanja *Bmp3* gena na normalizirani volumen kostiju između muških i ženskih miševa – tendencija porasta BV/TV kod KO miševa opažena je u oba spola na svim analiziranim dijelovima kostiju što proizlazi iz činjenice da se *Bmp3* gen nalazi na autosomu. U ovom je radu prvi puta pokazan utjecaj izbacivanja *Bmp3* gena na volumen kostiju na miševima različitih dobnih skupina te usporedba volumena kostiju između KO i WT miševa po spolu.

Analiza kortikalne kosti pokazala je da KO miševi imaju manji endostealni volumen (EV), što odgovara manjoj šupljini medularnog kanala, a veću debljinu kortikalne kosti (Co.Th) te da su te razlike uglavnom statistički značajne, osim EV kortikalne kosti femura kod miševa starih 2 mjeseca i Co.Th tibije kod miševa starih 4 mjeseca. S obzirom na navedeno, može se zaključiti da je veći koštani volumen kortikalne kosti posljedica smanjenja endostealnog volumena, odnosno smanjene endostealne resorpcije. Pri tome je apsolutna vrijednost koeficijenta korelacije između BV/TV i EV (r = -0,830) bliska koeficijentu korelacije između BV/TV i Co.Th (r = 0,863), što ukazuje na podjednaku važnost utjecaja

obaju parametara na normalizirani volumen kortikalne kosti. U ovom je radu prvi puta opisan utjecaj izbacivanja *Bmp3* gena na kortikalnu kost femura i tibije u miševa.

Kod analize trabekularne kosti femura vidljivo je da KO miševi imaju oko dva puta veći BV/TV u odnosu na WT miševe, što je u skladu s rezultatima dosadašnjih istraživanja (Daluiski i sur.-2001.). Za trabekularnu kost tibije, trend je vrlo sličan onom za trabekularnu kost femura što se može objasniti činjenicom da je riječ o segmentima kosti koji se nalaze relativno blizu jedni drugima (distalni femur i proksimalna tibija). Povećanje BV/TV u KO miševa posljedica je povećanja broja trabekula (Tb.N) i smanjenjem razmaka između trabekula (Tb.Sp), tj. povećanjem gustoće trabekula. Naime, za ta su dva parametra dobivene statistički značajne razlike između KO i WT miševa u obje dobne skupine miševa na svim analiziranim dijelovima kostiju. Za razliku od toga, Tb.Th (debljina trabekula) pokazuje statistički značajnu razliku samo u miševa 2 mjeseca starosti, s time da je u miševa starih 2 mjeseca Tb.Th veći kod KO miševa, a u miševa starih 4 mjeseca veći kod WT miševa. Dakle, debljina trabekula očito nije parametar odgovoran za značajno povećanje koštanog volumena u KO miševa. Ovo dodatno potkrjepljuje i činjenica da su apsolutne vrijednosti koeficijenata korelacije između BV/TV i Tb.N (r = 0,986) te BV/TV i Tb.Sp (r = -0,851) veće od koeficijenta korelacije između BV/TV i Tb.Th (r = 0,637), što ukazuje na to da debljina trabekula od ova tri parametra općenito najmanje utječe na normalizirani koštani volumen. Iz navedenog se također vidi da broj trabekula ima najveći utjecaj na normalizirani koštani volumen te da se BV/TV može vrlo točno predvidjeti iz parametra Tb.N (Tb.N opisuje čak 97,2% varijabilnosti BV/TV). Manji razmak među trabekulama u KO miševa također je prvenstveno posljedica povećanja broja trabekula, a ne povećanje njihove debljine što potvrđuje veća apsolutna vrijednost koeficijenta korelacije između Tb.Sp i Tb.N (r = -0,861) nego između Tb.Sp i Tb.Th (r = -0,453). Do sada u literaturi nije bio opisan utjecaj izbacivanja *Bmp3* gena na trabekularnu kost tibije, niti je opisan utjecaj na pojedine trabekularne parametre.

Iz svega navedenog vidljivo je da produkt *Bmp3* gena u miševa ima značajnu ulogu u regulaciji koštanog tkiva dugih kostiju te da je njegova uloga prvenstveno inhibicijska po čemu se razlikuje od ostalih koštanih morfogentskih proteina za koje je pokazano da djeluju osteoindukcijski (Bahamonde, Lyons-2001.). U ovom je radu pokazano i da izbacivanje *Bmp3* gena dovodi do povećanja normaliziranog koštanog volumena trabekularne kosti tibije te kortikalne kost femura i tibije čime je dodatno potvrđena uloga BMP3 kao negativnog regulatora koštane mase.

7. ZAKLJUČCI

1. Izbacivanje *Bmp3* gena dovodi do porasta volumena trabekularne i kortikalne kosti distalnog femura i proksimalne tibije u miševa, čime je pokazano da je uloga produkta *Bmp3* gena u kostima inhibitorna.
2. Povećani koštani volumen u KO miševa vidljiv je kod miševa obje promatrane dobne skupine (2 mjeseca i 4 mjeseca).
3. Povećani koštani volumen u KO miševa javlja se kod miševa oba spola.
4. Porast volumena i debljine kortikalne kosti kod KO miševa posljedica je smanjenja endostealne resorpcije.
5. Porast volumena trabekularne kosti kod KO miševa posljedica je povećanja broja trabekula i smanjenja razmaka između njih.

8. ZAHVALE

Zahvaljujem se akademiku Slobodanu Vukičeviću koji je prepoznao moju sklonost za znanstveno-istraživački rad i usmjerio me na ovaj projekt.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Lovorki Grgurević koja mi je savjetima i detaljnim pregledom rada pomogla poboljšati kvalitetu teksta i prikaza rezultata.

Zahvaljujem se i dr. sc. Igoru Erjavecu koji me je naučio praktično izvesti sve metode korištene u ovom radu i koji me je uputio kako provoditi znanstveno istraživanje i pisati znanstveno-istraživački rad.

9. POPIS LITERATURE

1. Andrades JA, Ledesma LN, Torres LC, Amaya APC, Guillén DL, Almagro MLM, Moreno JAM. Bone Engineering: A Matter of Cells, Growth Factors and Biomaterials Regenerative Medicine and Tissue Engineering, chapter 25, ed. Andrades JA, 2013.

2. Bahamonde ME, Lyons KM (2001). BMP3: To be or not to be a BMP, The Journal of Bone & Joint Surgery: 83-A(1), Supplement 1.

3. Bertassoni LE, Swain MV (2014). The contribution of proteoglycans to the mechanical behavior of mineralized tissues. J Mech Behav Biomed Mater: 38:91-104.

4. Chen D, Zhao M, Mundy GR (2004). Bone morphogenetic proteins. Growth Factors: 22(4):233-241.

5. Daluiski A, Engstrand T, Bahamonde ME, Gamer LW, Agius E, Stevenson SL, Cox K, Rosen V, Lyons KM (2001). Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. Nat Genet: 27(1):84-8.

6. Dickinson ME, Kobrin MS, Silan CM, Kingsley DM, Justice MJ, Miller DA, Ceci JD, Lock LF, Lee A, Buchberg AM, Siracusa LD, Lyons KM, Derynck R, Hogan BLM, Copeland NG, Jenkins NA (1990). Chromosomal localization of seven members of the murine TGF-beta superfamily suggests close linkage to several morphogenetic mutant loci. Genomics: 6(3):505-520.

7. Ivanković D, i sur. Osnove statističke analize za medicinare. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1989.

8. Junquiera LC, Carneiro J. Osnove histologije: udžbenik i atlas. Školska knjiga, Zagreb, 2005.

9. Katagiri T, Suda T, Miyazono K. The bone morphogenetic proteins. Cold Spring Harbor Press, New York, 2008.

10. Kokabu S, Gamer L, Cox K, Lowery J, Tsuji K, Raz R, Economides A, Katagiri T, Rosen V (2012). BMP3 Suppresses osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells via interaction with Acvr2b. Mol Endocrinol: 26(1):87-94.

11. Luyten FP, Yanagishita M, Vukicevic S, Hammonds RG & Reddi AH (1992). Natural bovine osteogenin and recombinant human bone morphogenetic protein-2B are equipotent in the maintenance of proteoglycans in bovine articular cartilage explant cultures. J Biol Chem: 267(6):3691-3695.

12. Mukaka MM (2012). A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. Malawi Med J: 24(3):69-71.

13. Tabas JA, Zasloff M, Wasmuth JJ, Emanuel BS, Altherr MR, McPherson JD, Wozney JM, Kaplan FS (1991). Bone morphogenetic protein: chromosomal localization of human genes for BMP1, BMP2A, and BMP3. Genomics: 9(2):283-289.

14. Takao M, Hino J, Takeshita N, Konno Y, Nishizawa T, Matsuo H, Kangawa K (1996). Identification of rat bone morphogenetic protein-3b (BMP3b), a new member of BMP-3. Biochem Biophys Res Commun: 219:656-662.

15. Vukicevic S, Helder MN, Luyten FP (1994). Developing human lung and kidney are major sites for synthesis of bone morphogenetic protein-3 (osteogenin), J Histochem Cytochem: 42(7):869-875.

16. Vukičević S, Sampath K. Bone Morphogenetic Proteins : From Laboratory to Clinical Practice. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2002.

17. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic proteins. In: Physiology and Pharmacology of Bone, eds. Mundy GR, Martin TJ. Springer-Verlag, Berlin, 1993.

10. SAŽETAK

Ivan Banovac

UTJECAJ GENA ZA BMP3 NA TRABEKULARNE I KORTIKALNE PARAMETRE DUGIH KOSTIJU MIŠA

BMP3 najučestaliji je BMP izoliran iz demineralizirane kosti i djeluje *in vivo* kao antagonist ostalih osteoinduktivnih BMP-ova. Istraživanje je provedeno na miševima s izbačenim genom za BMP3 oba spola, 2 i 4 mjeseca starosti. Miševi su genotipizirani i podijeljeni u skupine prema genotipu (WT i KO), dobi i spolu. Kosti miševa snimljene su *ex vivo* pomoću SkyScan 1076 mikro CT uređaja te je napravljena morfometrijska analiza trabekularnih i kortikalnih parametara distalnog femura i proksimalne tibije. Morfometrijskom analizom utvrđeno je da KO miševi imaju veći volumen kostiju (BV/TV) od WT miševa. Povećani BV/TV ustanovljen je u miševa obje dobne skupine i oba spola. Analizom je također utvrđeno da je povećanje koštanog volumena kortikalne kosti i debljine kortikalne kosti (Co.Th) kod KO životinja posljedica smanjenjene endostealne resorpcije pokazano jakom korelacijom endostealnog volumena (EV) s BV/TV. Povećanje koštanog volumena trabekularne kosti kod KO životinja posljedica je povećanja broja trabekula (Tb.N) i smanjenja razmaka između trabekula (Tb.Sp.) pokazano jakom korelacijom s BV/TV. Nije utvrđena značajna razlika u debljini trabekula (Tb.Th.) između KO i WT životinja što je potvrđeno slabom korelacijom s BV/TV.

Ključne riječi: BMP3, trabekularna kost, kortikalna kost, mikro CT, morfometrijska analiza

11. SUMMARY

Ivan Banovac

THE INFLUENCE OF THE BMP3 GENE ON TRABECULAR AND CORTICAL BONE PARAMETERS OF LONG BONES IN MICE

BMP3 is the most abundant BMP in demineralised bone and antagonises other osteoinductive BMPs *in vivo*. The research was carried out on BMP3 knock-out mice of both sexes aged 2 and 4 months. After genotyping, the mice were divided into groups according to genotype (WT and KO), age and sex. The bones of the mice were recorded *ex vivo* using a SkyScan 1076 micro CT device and a subsequent morphometric analysis of trabecular and cortical parameters of the distal femur and proximal tibia was carried out. The morphometric analysis established that KO mice have higher bone volume (BV/TV) than WT mice. An increase in BV/TV was found in all groups of mice. The analysis also found that the increases in bone volume of cortical bone and cortical thickness (Co.Th) in KO mice were due to reduced endosteal resorption shown by a strong correlation between endosteal volume (EV) and BV/TV. The increase in bone volume of trabecular bone in KO mice was due to increased trabecular number (Tb.N) and decreased trabecular separation (Tb.Sp) shown by a strong correlation with BV/TV. No significant difference in trabecular thickness (Tb.Th) was found between KO and WT mice, confirmed by a weak correlation with BV/TV.

Key words: BMP3, trabecular bone, cortical bone, micro CT, morphometric analysis

12. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 13.12.1992. godine u Zagrebu. U Zagrebu sam završio osnovnu školu i V. gimnaziju, s prosjekom ocjena 5,00 u svim godinama školovanja te sam sudjelovao na deset državnih natjecanja iz više školskih predmeta. Bio sam državni prvak iz kemije i latinskog jezika.

Položio sam razinu C2 iz engleskog i njemačkog jezika te B2 iz francuskog i ruskog jezika.

Bio sam prvi na rang listi Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje sam i upisao integrirani studij medicine 2011. godine. Sada sam student 6. godine Medicinskog fakulteta, s ostvarenim prosjekom ocjena 5,00. Dobio sam Dekanovu nagradu za uspjeh na prvoj godini studija. Od druge godine studija demonstrator sam na katedri za anatomiju za medicinare, a zadnje tri godine i za stomatologe.

Petogodišnja suradnja u Laboratoriju za mineralizirana tkiva ispunila je moje istraživačke afinitete.