

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Vilim Molnar

UČINCI LIJEČENJA OSTEOARTRITISA KOLJENA APLIKACIJOM  
AUTOLOGNOG MIKROFRAGMENTIRANOG MASNOG TKIVA KOJE SADRŽI  
MEZENHIMNE MATIČNE STANICE U USPOREDBI S HIJALURONSKOM  
KISELINOM

Doktorska disertacija

Osijek, 2025.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Vilim Molnar

UČINCI LIJEČENJA OSTEOARTRITISA KOLJENA APLIKACIJOM  
AUTOLOGNOG MIKROFRAGMENTIRANOG MASNOG TKIVA KOJE SADRŽI  
MEZENHIMNE MATIČNE STANICE U USPOREDBI S HIJALURONSKOM  
KISELINOM

Doktorska disertacija

Osijek, 2025.

Mentor: prof. dr. sc. Dragan Primorac, dr. med.

Komentorica: prof. dr. sc. Martina Smolić, dr. med.

Rad ima 188 stranica.

Istraživanje u sklopu ove doktorske disertacije financirala je Europska komisija u projektu istraživanja razvoja i inovacija (IRI) pod nazivom „Klinička i molekularna fenotipizacija osteoartritisa: personalizirani pristup dijagnostici i liječenju“ (KK.01.2.1.02.0173).

Istraživanje je provedeno u Specijalnoj bolnici Sv. Katarina u suradnji sa sljedećim institucijama: Klinika za traumatologiju KBC Sestre milosrdnice, Zavod za opću i sportsku traumatologiju i ortopediju KB Merkur, laboratorij tvrtke Labena d.o.o.

## Zahvala

Svojem mentoru, prof. dr. sc. Draganu Primorcu upućujem iskrenu zahvalnost na stručnom vodstvu, podršci i povjerenju tijekom planiranja, provedbe i pisanja ove disertacije. Komentorici, prof. dr. sc. Martini Smolić, zahvaljujem na svojoj pomoći tijekom doktorskog studija i spremnosti da uvijek pronađe vrijeme za savjete koji su bili ključni u vođenju kroz studij i provedbu doktorske disertacije.

Zahvaljujem svim suradnicima koji su sudjelovali u provedbi ovog zahtjevnog projekta te doprinijeli njegovoj kvaliteti, od kliničkog rada, prikupljanja ispitanika i podataka do laboratorijskih analiza i obrade rezultata. Posebno zahvaljujem kolegama iz Specijalne bolnice Sv. Katarina, Klinike za traumatologiju KBC Sestre milosrdnice i Kliničke bolnice Merkur, kao i partnerima iz laboratorija tvrtke Labena d.o.o. i svima koji su svojom stručnošću, angažmanom i požrtvovnošću omogućili provođenje istraživanja.

Zahvaljujem svojim roditeljima na bezuvjetnoj podršci, strpljenju i ohrabrenju kroz sve faze života. Njihova vjera u mene, kao i financijska potpora tijekom doktorskog studija, omogućili su mi da bez zadržke slijedim svoj profesionalni put. Sve što sam postigao uvelike dugujem njima.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj supruzi Ivi. Hvala ti na neiscrpnom razumijevanju, strpljenju i podršci tijekom dugih mjeseci i godina istraživanja, obrade podataka, pisanja svih radova i same disertacije. Tvoja snaga, ljubav i vjera u mene bili su moja najveća motivacija. Bez tvoje podrške ovaj pothvat ne bi bio moguć, a svaki napredak bio bi manje vrijedan. Hvala ti što si uz mene u svim izazovima, ali i u svim radostima.

Ovu disertaciju posvećujem svojim sinovima, Anti i Jakovu. Neka vam ovaj rad bude podsjetnik da se trud, upornost i predanost uvijek isplate. Želim da u životu hrabro slijedite svoje ciljeve, čak i kada zahtijevaju puno vremena, želje i borbe. Sve što radim, radim zbog vas i za vas.

## SADRŽAJ

Popis kratica.....	IV
Popis tablica.....	VIII
Popis slika.....	XI
1. UVOD .....	1
1.1. Epidemiologija i klinički značaj osteoartritisa koljena.....	1
1.2. Patofiziologija i koncept osteoartritisa kao bolesti cijelog zgloba .....	2
1.3. Fenotipizacija osteoartritisa koljena .....	8
1.4. Terapijski pristupi i ograničenja konvencionalnog liječenja.....	9
1.4.1. Autologno mikrofragmentirano masno tkivo.....	10
1.4.2. Hijaluronska kiselina .....	14
1.4.3. Nedostatak standardizacije ortobioloških terapija .....	16
1.5. Biomarkeri u dijagnostici i praćenju osteoartritisa koljena.....	19
1.6. Slikovne metode i njihova uloga u evaluaciji terapije osteoartritisa koljena .....	23
1.7. Znanstvena opravdanost i jedinstvenost istraživanja.....	25
2. HIPOTEZA.....	27
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	28
4. MATERIJAL I METODE .....	29
4.1. Ustroj studije .....	29
4.2. Ispitanici.....	30
4.2.1. Odabir upalnog fenotipa osteoartritisa koljena.....	31
4.2.2. Kriteriji uključenja i isključenja iz istraživanja .....	32
4.2.3. Postupak selekcije ispitanika.....	34
4.3. Metode.....	36
4.3.1. Randomizacija i maskiranje.....	36
4.3.2. Intervencije.....	37
4.3.3. Klinički ishodi .....	39

4.3.4.	Radiološke metode .....	41
4.3.5.	Biokemijske metode .....	43
4.3.6.	Objektivizacija mikrofragmentiranog masnog tkiva .....	44
4.4.	Sigurnost i zaštita ispitanika i istraživanja .....	45
4.4.1.	Korištenje protuupalnih lijekova tijekom istraživanja .....	45
4.4.2.	Praćenje nuspojava i sigurnosni nadzor .....	46
4.4.3.	Prikupljanje i upravljanje podacima .....	46
4.4.4.	Zaštita osobnih podataka i etička načela .....	47
4.5.	Statističke metode.....	47
5.	REZULTATI .....	50
5.1.	Karakteristike ispitanika .....	50
5.2.	Klinički ishodi (PROMs) .....	52
5.2.1.	KOOS .....	52
5.2.2.	WOMAC.....	55
5.2.3.	VAS.....	61
5.2.4.	Analiza odgovora na terapiju ( <i>responderi</i> ).....	63
5.3.	Slikovni ishodi na temelju rezultata magnetske rezonancije .....	65
5.3.1.	dGEMRIC.....	65
5.3.2.	MOAKS.....	72
5.4.	Korelacija kliničkih i radioloških ishoda.....	73
5.5.	Biokemijski ishodi.....	75
5.5.1.	Analiza citokina i kemokina u krvnoj plazmi.....	75
5.5.2.	Analiza citokina i kemokina u sinovijalnoj tekućini .....	87
5.5.3.	Analiza koncentracija fenilalanina u krvnoj plazmi .....	99
5.6.	Analiza mikrofragmentiranog masnog tkiva.....	100
5.6.1.	Analiza citokina i kemokina u mikrofragmentiranom masnom tkivu .....	100
5.6.2.	Analiza mikrofragmentiranog masnog tkiva metodom protočne citometrije..	104

5.6.3.	Utjecaj staničnog sastava mikrofragmentiranog masnog tkiva na kliničke ishode	105
5.6.4.	Utjecaj staničnog sastava mikrofragmentiranog masnog tkiva na radiološke ishode	107
6.	RASPRAVA .....	109
6.1.	Opći pregled i glavna zapažanja .....	109
6.2.	Klinički ishodi .....	111
6.3.	Slikovni ishodi .....	116
6.3.1.	dGEMRIC.....	117
6.3.2.	MOAKS .....	119
6.4.	Korelacija kliničkih i radioloških ishoda.....	121
6.5.	Biokemijski ishodi.....	123
6.5.1.	Analiza citokina i kemokina u krvnoj plazmi.....	124
6.5.2.	Analiza citokina i kemokina u sinovijalnoj tekućini .....	129
6.5.3.	Analiza koncentracija fenilalanina u krvnoj plazmi .....	131
6.6.	Analiza mikrofragmentiranog masnog tkiva.....	132
6.6.1.	Biokemijska analiza mikrofragmentiranog masnog tkiva.....	132
6.6.2.	Stanična analiza mikrofragmentiranog masnog tkiva.....	135
6.7.	Snage istraživanja.....	137
6.8.	Ograničenja istraživanja.....	139
6.9.	Znanstveni doprinos i implikacije za buduća istraživanja.....	142
7.	ZAKLJUČAK .....	145
8.	SAŽETAK.....	147
9.	SUMMARY.....	149
10.	LITERATURA .....	151
11.	ŽIVOTOPIS .....	174
12.	PRILOZI .....	190

## Popis kratica

AAOS	Američka akademija ortopedskih kirurga (engl. <i>American Academy of Orthopaedic Surgeons</i> )
ACR/AF	engl. <i>American College of Rheumatology / Arthritis Foundation</i>
ADAMTS	engl. <i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
ADL	Funkcioniranje u svakodnevnim aktivnostima (engl. <i>Activities of Daily Living</i> )
ADO	adenozin
BMI	Indeks tjelesne mase (engl. <i>Body Mass Index</i> )
BML	Lezija koštane srži (engl. <i>Bone Marrow Lesion</i> )
CCL	C-C kemokin ligand
CESD-R	Upitnik centra za epidemiološke studije depresije (engl. <i>Center for Epidemiologic Studies Depression Scale – Revised</i> )
CONSORT	Konsolidirani standardi za izvještavanje randomiziranih kliničkih studija (engl. <i>Consolidated Standards of Reporting Trials</i> )
COX-2	Ciklooksigenaza 2
CXCL	C-X-C kemokin ligand
dGEMRIC	Gadolinijem osnaženo oslikavanje hrskavice magnetskom rezonancom (engl. <i>delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of cartilage</i> )
ELISA	engl. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESCEO	engl. <i>European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases</i>
FGF	Faktor rasta fibroblasta (engl. <i>fibroblast growth factor</i> )
GAG	Glikozaminoglikani
GCP	Dobra klinička praksa (engl. <i>Good Clinical Practice</i> )
GDPR	Opća uredba o zaštiti podataka (engl. <i>General Data Protection Regulation</i> )
Gd-DTPA	Gadolinij-dietilentriamin pentaocetna kiselina (engl. <i>gadolinium diethylenetriamine pentaacetic acid</i> )
HA	Hijaluronska kiselina (engl. <i>Hyaluronic Acid</i> )

HBD	Humani $\beta$ -defenzini
HGF	Faktor rasta hepatocita (engl. <i>Hepatocyte growth factor</i> )
HLA-G	Antigen humanih leukocita G (engl. <i>Human leukocyte antigen G</i> )
HPLC	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High-performance liquid chromatography</i> )
HO-1	Hem-oksigenaza-1
ICAM-1	Međustanična adhezijska molekula 1 (engl. <i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i> )
IDO	Indoleamin 2,3-dioksigenaza
IGF	Faktor rasta inzulina (engl. <i>Insulin-like growth factor</i> )
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleukin
KL	Kellgren-Lawrence klasifikacija osteoartritisa
KOOS	Upitnik o osteoartritisu i ozljedama koljena (engl. <i>Knee injury and osteoarthritis outcome score</i> )
KS	Kortikosteoridi
LCN2	Lipokalin 2
LLOQ	Najniža granica kvantifikacije (engl. <i>Lower limit of quantification</i> )
LOD	engl. <i>Limit of detection</i>
MCID	Minimalna klinički značajna razlika (engl. <i>Minimal clinically important difference</i> )
MCP	Monocitni kemotaktički protein (engl. <i>Monocyte chemoattractant protein</i> )
MFAT	Mikrofragmentirano masno tkivo (engl. <i>Microfragmented adipose tissue</i> )
MIP	Makrofagni upalni protein (engl. <i>Macrophage inflammatory protein</i> )
MMP	Matriksne metaloproteinaze
MOAKS	MRI klasifikacija osteoartritisa koljena (engl. <i>MRI Osteoarthritis Knee Score</i> )
MRI	Magnetska rezonancija (engl. <i>Magnetic Resonance Imaging</i> )
MSC	Mezenhimne matične stanice
NSAID	Nesteroidni protuupalni lijekovi

NO	Dušikov oksid
OA	Osteoartritis
OARSI	engl. <i>Osteoarthritis Research Society International</i>
OOR	Izvan mjernog raspona (engl. <i>Out of range</i> )
OR	Omjer izgleda (engl. <i>Odds ratio</i> )
PGE2 / PGE-2	Prostaglandin E2
PKR	Protein kinaza R
PPV	Pozitivna prediktivna vrijednost
PRP	Plazma obogaćena trombocitima (engl. <i>Platelet-rich plasma</i> )
PROMs	Mjere ishoda prema kliničkim upitnicima (engl. <i>Patient-reported outcome measures</i> )
PV	Protrombinsko vrijeme
RANTES (CCL5)	Kemokin induciran aktivacijom T-stanica (engl. <i>Regulated on Activation, Normal T-Cell Expressed and Secreted</i> )
ROI	Regija od interesa
RTG	Rendgenska snimka
SD	Standardna devijacija
SDF-1	Stromalni čimbenik deriviran iz stanica 1 (engl. <i>Stromal cell-derived factor-1</i> )
SF	Sinovijalna tekućina (engl. <i>Synovial fluid</i> )
SFRP2	engl. <i>secreted frizzled-related protein-2</i>
STC1	Staniokalcin-1
SVF	Stromalna vaskularna frakcija
SYSADOA	Simptomatski sporodjelujući lijekovi u osteoartritisu (engl. <i>Symptomatic slow-acting drugs in osteoarthritis</i> )
TGF-β	Transformirajući čimbenik rasta beta (engl. <i>Transforming Growth Factor-beta</i> )
TIMP	Inhibitori tkivnih metaloproteinaza (engl. <i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i> )
TNF-α	Tumor nekrotizirajući faktor alfa
TSG-6	engl. <i>Tumor necrosis factor-stimulated gene-6</i>

VAS	Vizualno analogna skala
VCAM-1	Vaskularna adhezijska molekula 1 (engl. <i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i> )
VEGF	Vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
WOMAC	Upitnik o osteoartritisu Sveučilišta Western Ontario i mcmaster (engl. <i>Western Ontario and mcmaster Universities Osteoarthritis Index</i> )
YLD	Godine života s onesposobljenošću (engl. <i>Years lived with disability</i> )

## Popis tablica

Tablica 1.4.1. Preporuke stručnih smjernica za najčešće korištene intraartikularne terapijske opcije u liječenju osteoartrisa koljena.....	17
Tablica 1.5.1. Funkcije citokina i kemokina uključenih u panel biomarkera za analizu .....	22
Tablica 4.2.2.1. Kriteriji uključenja i isključenja iz kliničkog istraživanja .....	33
Tablica 5.1.1. Osnovne demografske značajke na početku praćenja .....	50
Tablica 5.2.1.1. Deskriptivna statistika za svaku KOOS podskalu prije intervencije (0M), nakon 1 mjeseca (1M) i nakon 6 mjeseci (6M) od intraartikularne aplikacije mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) ili hijaluronske kiseline (HA).....	53
Tablica 5.2.1.2. Deskriptivna statistika za promjene KOOS podskala nakon 6 mjeseci od intraartikularne aplikacije mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) ili hijaluronske kiseline (HA).....	55
Tablica 5.2.2.1. Deskriptivna statistika za svaku WOMAC prije intervencije (0M), nakon 1 mjeseca (1M) i nakon 6 mjeseci (6M) od intraartikularne aplikacije mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) ili hijaluronske kiseline (HA).....	59
Tablica 5.2.2.2. Deskriptivna statistika promjena u WOMAC podskalama od početnog mjerenja do 6 mjeseci nakon intraartikularne aplikacije mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) ili hijaluronske kiseline (HA) .....	60
Tablica 5.2.3.1. Deskriptivna statistika razine boli prema vizualno analognoj skali (VAS) u mirovanju i kretanju prije intervencije (0M), nakon 1 mjeseca (1M) i nakon 6 mjeseci (6M) od intraartikularne aplikacije mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) ili hijaluronske kiseline (HA).....	62
Tablica 5.2.3.2. Deskriptivna statistika promjena u boli prema vizualno analognoj skali (VAS) za bol u mirovanju i kretanju od početnog mjerenja do 6 mjeseci nakon intraartikularne aplikacije mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) ili hijaluronske kiseline (HA).....	63

Tablica 5.2.4.1. Analiza statusa odgovora na terapiju ( <i>responder</i> analiza) za rezultate kliničkih upitnika temeljena na unaprijed definiranim pragovima minimalne klinički značajne razlike (MCID).....	65
Tablica 5.3.1.1. Deskriptivna statistika dGEMRIC indeksa za 7 regija interesa (ROI) hrskavice koljena prije (0M) i šest mjeseci nakon (6M) aplikacije mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) ili hijaluronske kiseline (HA) s prikazom unutargrupnih i međugrupnih usporedbi .....	67
Tablica 5.4.1. Kontingencijska tablica statusa dGEMRIC i KOOS Bol <i>respondera</i> (ispitanika koji su odgovorili na terapiju).....	75
Tablica 5.5.1.1. Detektabilnost i dostupnost podataka za analizu citokina i kemokina u plazmi u skupini liječenoj aplikacijom mikrofragmentiranog masnog tkiva .....	76
Tablica 5.5.1.2. Detektabilnost i dostupnost podataka za analizu citokina i kemokina u plazmi u skupini liječenoj aplikacijom hijaluronske kiseline .....	77
Tablica 5.5.1.3. Koncentracije citokina i kemokina u krvnoj plazmi prije liječenja (T0) te jedan (T1) i šest (T6) mjeseci nakon liječenja mikrofragmentiranim masnim tkivom s prikazom unutargrupne statistike .....	80
Tablica 5.5.1.4. Koncentracije citokina i kemokina u krvnoj plazmi prije liječenja (T0) te jedan (T1) i šest (T6) mjeseci nakon liječenja hijaluronskom kiselinom s prikazom unutargrupne statistike .....	82
Tablica 5.5.1.5. Međugrupne usporedbe promjena koncentracija citokina i kemokina u krvnoj plazmi između skupina liječenih mikrofragmentiranim masnim tkivom (MFAT) i hijaluronskom kiselinom (HA).....	85
Tablica 5.5.2.1. Detektabilnost i dostupnost podataka za analizu citokina i kemokina u sinovijalnoj tekućini u skupini liječenoj mikrofragmentiranim masnim tkivom .....	88
Tablica 5.5.2.2. Detektabilnost i dostupnost podataka za analizu citokina i kemokina u sinovijalnoj tekućini u skupini liječenoj aplikacijom hijaluronske kiseline .....	89

Tablica 5.5.2.3. Koncentracije citokina i kemokina u sinovijalnoj tekućini prije liječenja (T0) te jedan (T1) mjesec nakon liječenja mikrofragmentiranim masnim tkivom s prikazom unutargrupne statistike .....	92
Tablica 5.5.2.4. Promjene koncentracija citokina i kemokina u sinovijalnoj tekućini u skupini liječenoj hijaluronskom kiselinom (HA) između početnog mjerenja (T0) i jednog mjeseca nakon primjene (T1).....	94
Tablica 5.5.2.5. Međugrupne usporedbe promjena koncentracija citokina i kemokina u sinovijalnoj tekućini između skupina liječenih mikrofragmentiranim masnim tkivom (MFAT) i hijaluronskom kiselinom (HA) .....	97
Tablica 5.5.3.1. Koncentracija fenilalanina u krvnoj plazmi kroz vrijeme u skupinama liječenim mikrofragmentiranim masnim tkivom (MFAT) i hijaluronskom kiselinom (HA) s prikazom unutargrupne statistike.....	99
Tablica 5.5.3.2. Usporedba promjene koncentracije fenilalanina između skupina liječenih aplikacijom mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) i hijaluronske kiseline (HA).....	100
Tablica 5.6.1.1. Broj i postotak vrijednosti unutar mjernog raspona za svaki analit u uzorcima mikrofragmentiranog masnog tkiva.....	101
Tablica 5.6.1.2. Deskriptivna statistika koncentracija citokina i kemokina u uzorcima mikrofragmentiranog masnog tkiva .....	102
Tablica 5.6.2.1. Deskriptivna statistika uzoraka mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) analiziranih metodom protočne citometrije (n = 33).....	105
Tablica 5.6.3.1. Usporedba parametara protočne citometrije između KOOS Bol <i>respondera</i> i <i>non-respondera</i> .....	106
Tablica 5.6.4.1. Usporedba parametara protočne citometrije između dGEMRIC <i>respondera</i> i <i>non-respondera</i> .....	107

## Popis slika

Slika 1.2.1. Prikaz strukture izvanstaničnog matriksa hrskavice i njegovih promjena u osteoartritisu.....	3
Slika 1.2.2. Prikaz strukturnih i histoloških značajki hrskavice, subhondralne kosti i sinovijalne ovojnice u zdravom zglobu koljena.....	5
Slika 1.2.3. Strukturne i histološke promjene hrskavice, subhondralne kosti i sinovijalne ovojnice u ranom stadiju osteoartritisa .....	6
Slika 1.2.4. Strukturne i histološke promjene hrskavice, subhondralne kosti i sinovijalne ovojnice u uznapredovalom osteoartritisu .....	7
Slika 1.4.1.1. Shematski prikaz učinaka mezenhimnih matičnih stanica (MSC).....	12
Slika 1.5.1. Shema ključnih upalnih procesa i čimbenika uključenih u patogenezu osteoartritisa.....	20
Slika 5.1.1. CONSORT dijagram tijeka ispitanika koji prikazuje regrutaciju, provjeru podobnosti, randomizaciju, praćenje i analizu.....	51
Slika 5.2.1.1. Usporedba promjena KOOS podskala (razlika stanja nakon 6 mjeseci od intervencije i početnog stanja) između skupina liječenih mikrofragmentiranim masnim tkivom (MFAT) i hijaluronskom kiselinom (HA).....	54
Slika 5.2.2.1. Tijek vrijednosti WOMAC podskala (Bol, Ukočenost, Funkcija i Ukupni skor) kroz vrijeme nakon intraartikularne injekcije mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) ili hijaluronske kiseline (HA).....	58
Slika 5.2.4.1. Udio ispitanika koji su odgovorili na terapiju ( <i>respondera</i> ) u svakoj terapijskoj skupini prema unaprijed definiranim pragovima minimalno klinički značajne razlike (MCID): KOOS Bol ( $\geq 10$ ), VAS kretanje ( $> 2$ ) i WOMAC Ukupni skor ( $\geq 15$ ). ..	64
Slika 5.3.1.1. Promjene dGEMRIC indeksa od početnog mjerenja do 6 mjeseci u svakoj anatomskoj regiji interesa (ROI), prikazane odvojeno za MFAT (A) i HA (B) skupinu.....	69

Slika 5.3.1.2. Udio regija od interesa (ROI) koje su pokazale klinički značajno poboljšanje ( $\geq 10\%$  porasta dGEMRIC indeksa) 6 mjeseci nakon liječenja ..... 70

Slika 5.3.2.1. Promjene MOAKS skora za sinovitis i izljev nakon intraartikularne primjene mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) i hijaluronske kiseline (HA)..... 73

**1. Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.**

## **1. UVOD**

### **1.1. Epidemiologija i klinički značaj osteoartritisa koljena**

Osteoarthritis (OA) je najčešće progresivno muskuloskeletno stanje koje može utjecati na zglobove, ali najčešće pogađa kukove i koljena, koji nose najveće mehaničko opterećenje (1). Procjenjuje se da 240 milijuna ljudi u cijelom svijetu ima simptomatski OA (2). Prevalencija OA koljena značajno se povećala tijekom posljednjih desetljeća i nastavlja rasti, djelomično zbog sve veće prevalencije pretilosti i drugih čimbenika rizika, ali također neovisno o drugim uzrocima (3). Procjenjuje se da je prevalencija OA koljena kod odraslih osoba starijih od 60 godina otprilike 10% u muškaraca i 18% u žena (2). Prava prevalencija OA zasigurno je i mnogo veća, ali velik dio pacijenata još nije razvio simptome. Upravo je jedan od problema OA što se simptomi javljaju kad već postoje značajnija oštećenja hrskavice i drugih tkiva. Stoga se procjenjuje da u svijetu čak 654 milijuna ljudi ima znakove OA koljena (4). Također, OA koljena najčešći je uzrok bolova u koljenu i funkcionalnog ograničenja u osoba starijih od 45 godina (4).

OA koljena danas je jedan od glavnih uzroka onesposobljenosti. U populaciji iznad 70 godina, OA koljena zauzima sedmo mjesto prema učestalosti uzroka godina života provedenih s onesposobljenošću (YLD, engl. *Years Lived with Disability*) prema podacima *Global Burden of Disease* studije iz 2021. godine (5). Učestalost bolesti raste paralelno s porastom prosječne životne dobi stanovništva, a predviđa se da će do 2040. godine broj pacijenata koji zahtijevaju kirurško liječenje koljena biti višestruko veći (3, 5, 6). Zbog svoje visoke prevalencije, kroničnog tijeka i značajnog utjecaja na kvalitetu života, OA koljena predstavlja veliki javnozdravstveni i ekonomski izazov suvremene medicine (7, 8).

Zbog velikog javnozdravstvenog opterećenja i činjenice da bolest započinje prije pojave simptoma, sve se više istražuju biološki mehanizmi i potencijal ranih terapijskih intervencija koje bi mogle usporiti napredovanje bolesti.

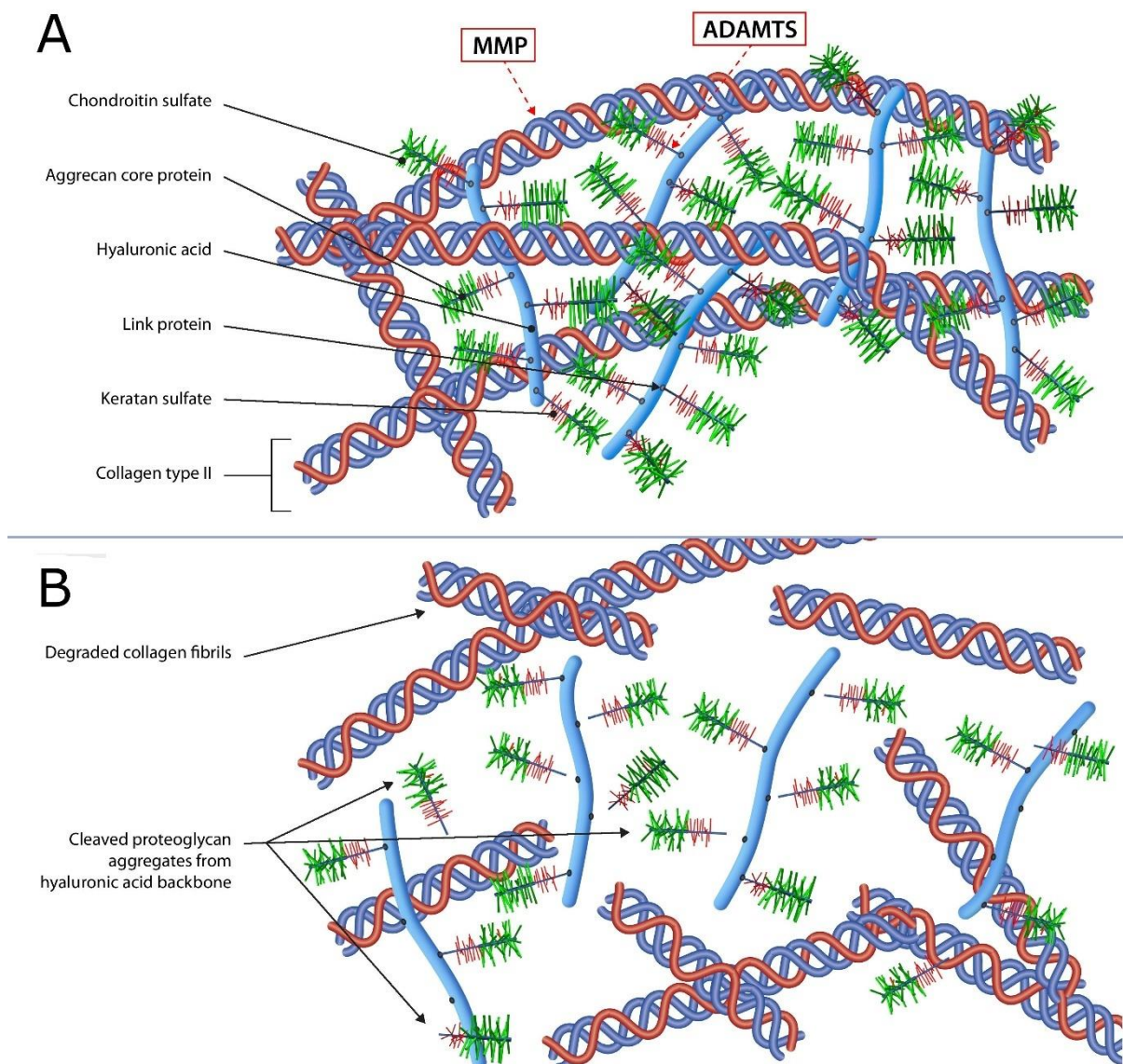
**1. Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.**

## **1.2. Patofiziologija i koncept osteoartritisa kao bolesti cijelog zgloba**

OA koljena karakteriziraju strukturne modifikacije prvenstveno zglobne hrskavice i subhondralne kosti, ali i Hoffinog masnog tkiva, sinovije, ligamenata i mišića, što dovodi do koncepta promatranja OA kao bolesti cijelog zgloba (9, 10).

Zglobna hrskavica u fiziološkim uvjetima ima visoku otpornost na kompresijska opterećenja zahvaljujući uravnoteženom omjeru kolagena tipa II i proteoglikana (hondroitin sulfat i keratan sulfat), koji su organizirani u stabilnu mrežu hijaluronske kiseline, agrekana i link-proteina (slika 1.2.1). Tijekom razvoja OA narušava se homeostaza između sinteze i razgradnje hrskavičnog matriksa, pri čemu proinflammatorni citokini (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i drugi) induciraju ekspresiju metaloproteinaza (MMP) i agrekanaza (ADAMTS), što rezultira degradacijom kolagena i proteoglikana (11). Time se gubi integritet kolagenske mreže i sposobnost hrskavice da zadrži vodu i podnese mehanički stres, a hondrociti prelaze iz anaboličkog u katabolički fenotip, što dodatno potiče progresiju lezija (12).

1. Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.



**Slika Pogreška!** Za dodavanje Heading 2 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno..1. **Prikaz strukture izvanstaničnog matriksa hrskavice i njegovih promjena u osteoartritisu.** (A) Prikazana je zdrava mreža proteoglikana isprepletenih s vlaknima kolagena tipa II. Mjesta cijepanja matriksnih metaloproteinaza (MMP) i disintegrina i metaloproteinaza s trombospondinskim motivima (ADAMTS) označena su crvenim strelicama. (B) Promjene matriksa hrskavice u osteoartritisu definirane su razgradnjom proteoglikana i cijepanjem vlakana kolagena tipa II posredovanih ADAMTS enzima i MMP-ovima. (izvor: izradio autor disertacije; objavljeno u Primorac D, Molnar V, Rod E, Jeleč Ž, Čukelj F, Matišić V, et al. Knee Osteoarthritis: A Review of Pathogenesis and State-Of-The-Art Non-Operative Therapeutic Considerations. Genes 2020;11:854)

Uz oštećenje hrskavice, dolazi do značajnih promjena u subhondralnoj kosti. Rane faze obilježene su povećanom resorpcijom i mikrocirkulacijskim promjenama, dok

**1. Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.**

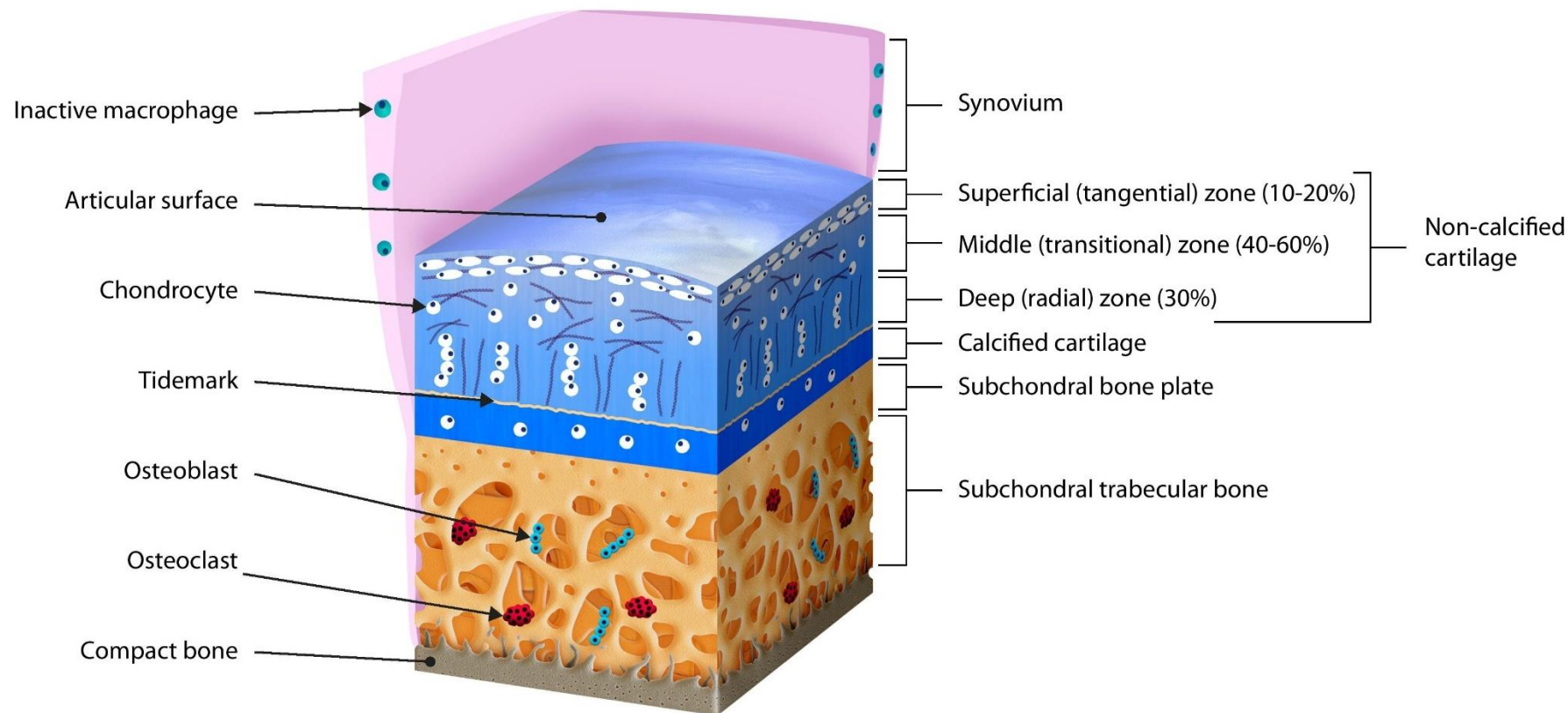
kasnije prevladava subhondralna skleroza, stvaranje koštanih cista i osteofita (slike 1.2.2.-1.2.4.) (13, 14). Subhondralna kost i hrskavica djeluju kao funkcionalna cjelina. Njihova međusobna komunikacija (engl. *crosstalk*) odvija se putem mehaničkih i biokemijskih signala, uključujući TGF- $\beta$ , VEGF i prostaglandine, čime promjene u jednoj komponenti neposredno utječu na drugu (11). Zadebljanje subhondralne koštane ploče i povećana poroznost trabekula mijenjaju raspodjelu sila u zglobu, što dodatno ubrzava razgradnju hrskavice (15).

Sinovijalna membrana također pokazuje značajne patološke promjene. Sinovijalna hipertrofija, povećana vaskularizacija i infiltracija makrofaga i limfocita stvaraju mikrookruženje kronične tinjajuće upale (16). Aktivirane sinovijalne stanice i makrofagi izlučuju citokine i proteolitičke enzime (MMP, ADAMTS) koji dodatno oštećuju hrskavicu i pojačavaju bol putem neurogenih mehanizama (17). Histološki, sinovijalna upala može biti prisutna i u ranim stadijima bolesti, što potvrđuje da upalna komponenta nije sekundarni fenomen, već sastavni dio patofiziologije OA (18).

Osim glavnih strukturnih komponenti zgloba, u proces su uključeni i Hoffino masno tkivo, ligamenti te periartikularni mišići. Hoffino masno tkivo ima aktivnu ulogu u lučenju adipokina (leptin, adiponektin, rezistin) koji moduliraju upalne i degenerativne procese u zglobu (19). Promjene u ligamentima i okolnim mišićima dodatno mijenjaju biomehaniku zgloba i povećavaju lokalna opterećenja, čime se održava začarani krug progresije bolesti (20).

Sve navedeno potvrđuje da OA nije jednostavna degeneracija zglobne hrskavice, već multifaktorska bolest cijelog zglobnog organa koja uključuje mehaničke, upalne i metaboličke čimbenike u kompleksnom patofiziološkom procesu. Upravo zato novi pristupi liječenju trebaju biti usmjereni ne samo na simptomatsko ublažavanje boli, nego i na modulaciju bioloških procesa koji stoje u podlozi bolesti, što otvara prostor za biološke i regenerativne terapije.

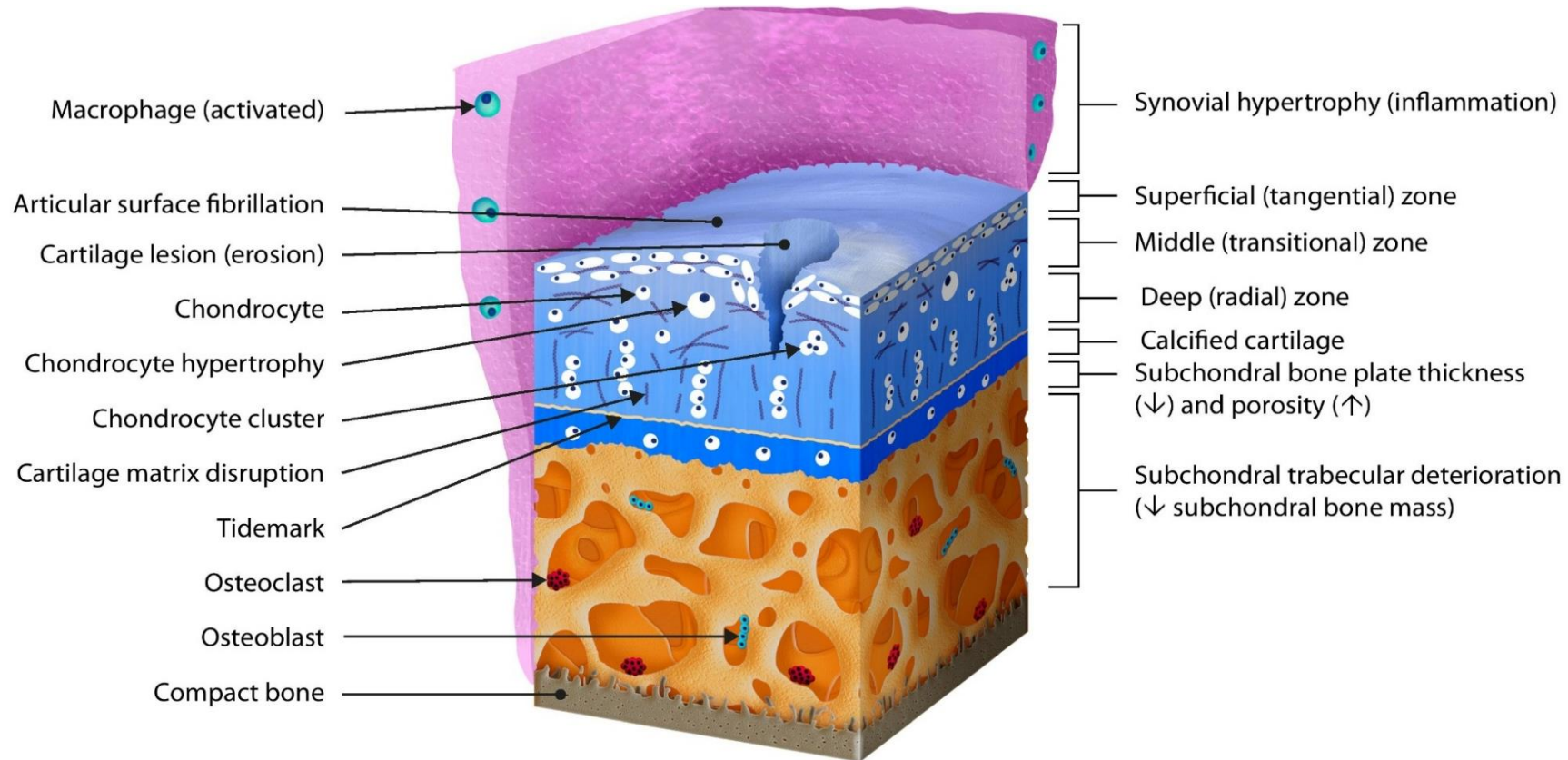
Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. UVOD



**Slika Pogreška! Za dodavanje Heading 2 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno..2. Prikaz strukturalnih i histoloških značajki hrskavice, subhondralne kosti i sinovijalne ovojnice u zdravom zglobu koljena.** (izvor: izradio autor disertacije; objavljeno u

1. Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.

Primorac D, Molnar V, Rod E, Jeleč Ž, Čukelj F, Matišić V, et al. Knee Osteoarthritis: A Review of Pathogenesis and State-Of-The-Art Non-Operative Therapeutic Considerations. Genes 2020;11:854)

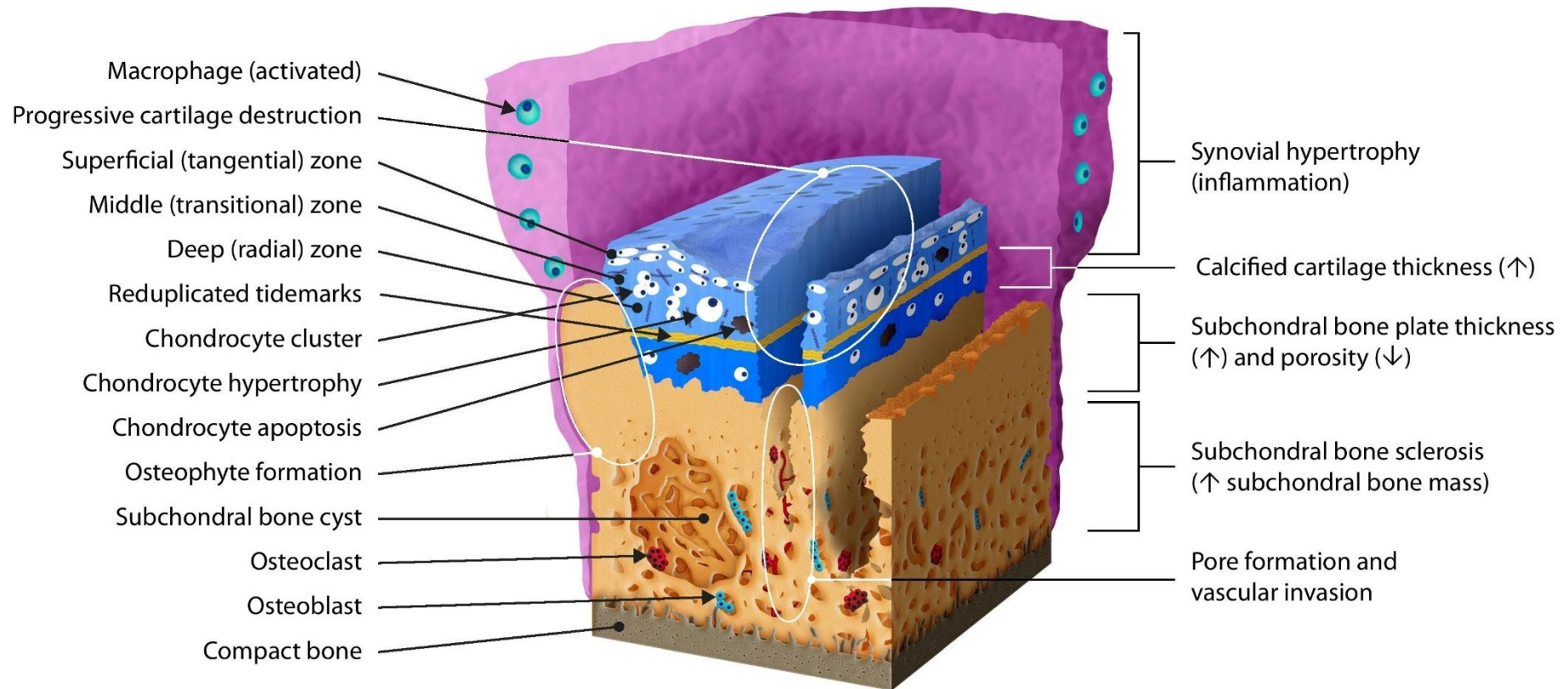


**Slika Pogreška! Za dodavanje Heading 2 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno..3. Strukturne i histološke promjene hrskavice, subhondralne kosti i sinovijalne ovojnice u ranom stadiju osteoartritisa.** Prikazane su početne degenerativne promjene koje uključuju površinske erozije hrskavice, osobito u površinskoj (tangencijalnoj) zoni i srednjoj (tranzicijskoj) zoni, s posljedičnom disrupcijom

**1. Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.**

izvanstaničnog matriksa. Vidljiva je sekundarna hipertrofija hondrocita i stvaranje njihovih nakupina. U drugim zglobnim strukturama prisutno je smanjenje gustoće subhondralne kosti, zadebljanje sinovije te migracija i aktivacija upalnih stanica. (izvor: izradio autor disertacije; objavljeno u Primorac D, Molnar V, Rod E, Jeleč Ž, Čukelj F, Matišić V, et al. Knee Osteoarthritis: A Review of Pathogenesis and State-Of-The-Art Non-Operative Therapeutic Considerations. Genes 2020;11:854)

1. Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.



**Slika Pogreška! Za dodavanje Heading 2 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno..4. Strukturne i histološke promjene hrskavice, subhondralne kosti i sinovijalne ovojnice u uznapredovalom osteoartritisu.** Prikazane su uznapredovale degenerativne promjene uključujući erozije pune debljine hrskavice sve do subhondralne kosti, apoptozu hondrocita, sklerozu subhondralne kosti te nastanak osteofita i subhondralnih cista, uz izraženu vaskularnu infiltraciju. U sinoviji se vidi dodatno zadebljanje ovojnice praćeno infiltracijom imunoloških stanica. (izvor: izradio autor disertacije; objavljeno u Primorac D, Molnar V, Rod E, Jeleč Ž, Čukelj F, Matišić V, et al. Knee Osteoarthritis: A Review of Pathogenesis and State-Of-The-Art Non-Operative Therapeutic Considerations. Genes 2020;11:854)

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. UVOD**

### **1.3. Fenotipizacija osteoartritisa koljena**

S obzirom na izrazitu heterogenost patofizioloških mehanizama koji sudjeluju u razvoju OA koljena, jasno je da pristup liječenju ne može biti univerzalan. U posljednjem desetljeću sve se više naglašava važnost fenotipske klasifikacije OA, čiji je cilj prepoznati podskupine pacijenata s različitim kliničkim, radiološkim i biokemijskim obilježjima te prema tome prilagoditi terapijske pristupe (21–24). Takva klasifikacija omogućuje bolje razumijevanje tijeka bolesti, preciznije definiranje ciljanih populacija u kliničkim istraživanjima i razvoj personalizirane medicine u liječenju OA.

Fenotipizacija OA temelji se na prepoznavanju dominantnih patofizioloških mehanizama u pojedinog bolesnika. Ti mehanizmi uključuju mehanička oštećenja, narušenu biomehaniku, metaboličke promjene, upalne procese te neuropatske i biokemijske čimbenike koji zajednički određuju tijek bolesti i odgovor na terapiju. Dell'Isola i suradnici su tako opisali šest glavnih fenotipova OA koljena: fenotip minimalnih zglobnih promjena, fenotip narušene biomehaničke osovine, fenotip kronične boli, upalni fenotip, fenotip metaboličkog sindroma te fenotip metabolizma kosti i hrskavice (21). Ova klasifikacija otvorila je novo poglavlje u razumijevanju bolesti i istraživanju potencijalnih metoda liječenja sukladno fenotipu (24).

Koncept fenotipizacije ima duboko kliničko značenje jer odražava potrebu da se svaki bolesnik promatra individualno, u kontekstu vlastitih karakteristika, komorbiditeta i bioloških markera (25). Tradicionalni pristup koji sve bolesnike tretira istim terapijama postaje sve manje prihvatljiv, a u središte interesa dolazi ideja personaliziranog liječenja (26). Razumijevanje fenotipa bolesti ključno je za odabir terapije koja ciljano djeluje na dominantni patofiziološki mehanizam u pojedinog bolesnika, čime se povećava učinkovitost liječenja i smanjuje rizik od terapijskog neuspjeha (27).

Posebno zanimljiv fenotip za liječenje nekirurškim metodama je upalni fenotip OA koljena (28). Ovaj fenotip prema klasifikaciji Dell'Isola i suradnika karakteriziraju oštećenja hrskavice uz prisustvo izljeva, bez poremećaja mehaničke osovine, bez komorbiditeta poput dijabetesa, pretilosti ili depresije, odnosno bez odrednica drugih kliničkih fenotipova (21). Prisutnost zglobnog izljeva se objektivizira pomoću MOAKS (engl. *Magnetic Resonance Imaging Osteoarthritis Knee Score*) skora za sinovitis i

**1. Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.**

zglobni izljev koji mora biti jednak 2 ili 3 tj. postojanjem konveksiteta suprapatelarne burze na aksijalnom presjeku magnetske rezonance koljena ili postojanjem distenzije zglobne kapsule na istom presjeku (21, 29). Takva morfološka obilježja odražavaju aktivnu upalnu komponentu bolesti i povezana su s jačom boli, bržom progresijom i lošijim funkcionalnim ishodom (30).

Uloga upale u patogenezi OA predmet je brojnih recentnih istraživanja (31). Upalni fenotip OA koljena time postaje osobito zanimljiv kandidat za biološke terapije koje djeluju protuupalno i imunomodulatorno (32). S obzirom na dokazane učinke hijaluronske kiseline (HA) i mezenhimnih matičnih stanica (MSC) iz masnog tkiva na modulaciju sinovijalne upale, upravo je ovaj fenotip najpogodniji za procjenu učinkovitosti takvih terapijskih pristupa. Dodatno, prepoznavanje upalnog fenotipa omogućuje precizniju selekciju bolesnika, smanjuje heterogenost uzorka u kliničkim istraživanjima te povećava pouzdanost dobivenih rezultata.

#### **1.4. Terapijski pristupi i ograničenja konvencionalnog liječenja**

Kao kronična bolest s dominantnim simptomima boli, ukočenosti i gubitka pokretljivosti, OA koljena i dalje predstavlja značajan terapijski izazov. Unatoč napretku u razumijevanju patofiziologije bolesti, još uvijek ne postoji učinkovita terapija koja bi mogla zaustaviti ili preokrenuti njezin prirodni tijek. Dostupne terapijske mogućnosti temelje se na ublažavanju simptoma i poboljšanju funkcije zgloba, dok se strukturalne promjene u hrskavici i subhondralnoj kosti nastavljaju razvijati.

Konzervativno liječenje obuhvaća nefarmakološke i farmakološke mjere. U nefarmakološke intervencije ubrajaju se redukcija tjelesne težine, prilagodba aktivnosti, fizikalna terapija i ciljani programi vježbanja koji imaju dokazanu korist u smanjenju boli i poboljšanju funkcionalnosti (33, 34). Farmakološko liječenje uključuje primjenu analgetika, nesteroidnih protuupalnih lijekova te povremeno intraartikularnih injekcija kortikosteroida u svrhu kratkotrajnog ublažavanja boli (35, 36). Primjena tzv. simptomatski sporodjelujućih lijekova u OA (engl. *Symptomatic Slow-Acting Drugs in Osteoarthritis*, SYSADOA), poput glukozamina i hondroitin sulfata, pokazala je ograničen učinak, bez jasnih dokaza o utjecaju na strukturu zgloba (37, 38).

## **1. Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.**

Ugradnja totalne endoproteze koljena i dalje je zlatni standard u kirurškom liječenju OA u završnim stadijima bolesti, kada konzervativne mjere više ne pružaju zadovoljavajuće rezultate. U Sjedinjenim Američkim Državama godišnje se ugradi više od 500 000 primarnih endoproteza koljena, a predviđa se da će se taj broj do 2040. godine utrostručiti (39). Međutim, kirurško liječenje ne rješava uzrok bolesti, već njezinu krajnju posljedicu te je stoga neprikladno za mlađe bolesnike i one s ranijim stadijima bolesti.

Zbog činjenice da suvremena medicina još uvijek ne raspolaže metodom koja bi zaustavila napredovanje OA u ranim fazama, brojna istraživanja usmjerena su na bolje razumijevanje patogeneze i prepoznavanje biomarkera koji bi omogućili raniju dijagnozu i pravovremeno liječenje (12, 40). Glavni cilj nekirurškog pristupa jest smanjiti tegobe i usporiti progresiju bolesti, čime se odgađa potreba za kirurškim zahvatom.

U tom kontekstu razvijene su i novije terapijske mjere, uključujući intraartikularne primjene HA i autolognog MFAT koje sadrži MSC. Ove metode sve se češće primjenjuju u kliničkoj praksi zbog povoljnog sigurnosnog profila i potencijalnog regenerativnog učinka, no njihova učinkovitost i dugoročni rezultati još uvijek zahtijevaju sustavno istraživanje i standardizaciju protokola (41). Iako su ove terapijske mogućnosti pronašle svoje mjesto u kliničkoj praksi, sve veći broj izvedenih operacija ugradnje endoproteza koljena još uvijek zahtijeva razvoj novih terapija ili optimizaciju postojećih mogućnosti.

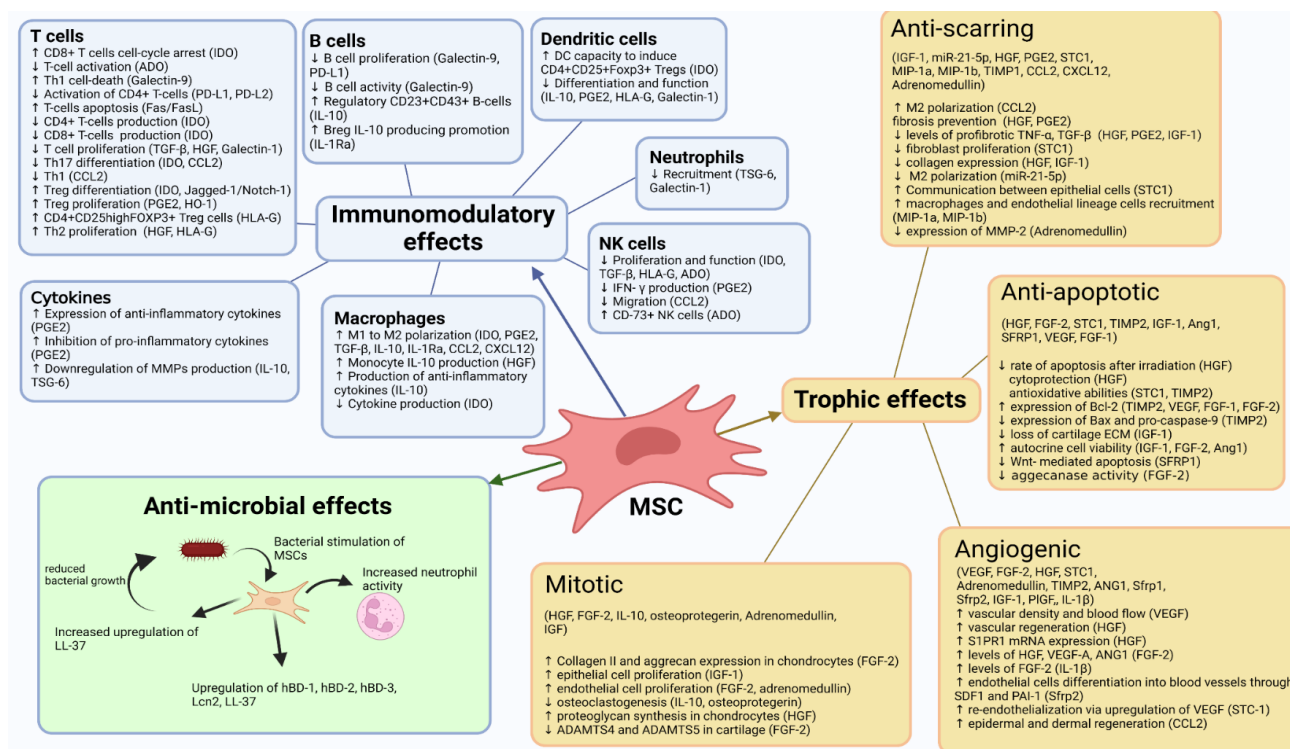
### **1.4.1. Autologno mikrofragmentirano masno tkivo**

Mezenhimne matične stanice (MSC, engl. *mesenchymal stem cells*) multipotentne su stanice sposobne za diferencijaciju u više staničnih linija, uključujući hondroците, osteoblaste i adipocite te posjeduju snažan parakrini i imunomodulatorni učinak (42, 43). Upravo parakrini učinak MSC nameće se kao najbitniji, važniji od direktne diferencijacije MSC u hondroците (44). Biološka uloga MSC-a u OA koljena proizlazi iz sposobnosti da djeluju ne samo regenerativno, već i protuupalno, modulirajući mikrookruženje zgloba kroz sekreciju citokina, rasta i trofičkih faktora (45–47). MSC

**1. Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.**

modulira funkciju stanica imunološkog sustava, uključujući T limfocite, makrofage, dendritičke i prirodne stanice ubojice, čime potiču protuupalni fenotip i smanjuju pretjeranu proizvodnju proupalnih citokina (48–50). Osim imunomodulacijskog učinka, MSC pokazuje i antiapoptotske, anti-fibrotične te angiogene i trofičke učinke koji pridonose regeneraciji zglobnih tkiva (slika 1.4.1.1) (51, 52).

## Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. UVOD



**Slika 1.4.1.1. Shematski prikaz učinaka mezenhimnih matičnih stanica (MSC).** IDO – Indoleamin 2,3-dioksigenaza; ADO – adenosin; PD-L1 – ligand 1 programirane stanične smrti; PD-L2 – ligand 2 programirane stanične smrti; TGF-β – transformirajući faktor rasta β; HGF – faktor rasta hepatocita; CCL2 – engl. *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1); PGE2 – prostaglandin E2; HO-1 – hem oksigenaza-1; HLA-G – antigen humanih leukocita G; IL-10 – interleukin 10; TSG-6 – engl. *tumor necrosis factor-stimulated gene 6*; IL-1Ra – interleukin 1 receptor antagonist; DC – dendritičke stanice; IFN-γ – interferon-γ; HBD – humani β-defenzini; Lcn2 – obitelj lipokaina; FGF – faktor rasta fibroblasta; IGF – faktor rasta inzulina; VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta; STC1 – staniokalcin-1; TIMP2 – inhibitor tkivnih metaloproteinaza 2; ADAMTS – engl. *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*; SDF – engl. *stromal cell-derived factor*; SFRP2 – engl. *secreted frizzled related protein*. (izvor: izradio autor disertacije; objavljeno u Molnar V, Pavelić E, Vrdoljak K, Čemerin M, Klarić E, Matišić V, et al. Mesenchymal Stem Cell Mechanisms of Action and Clinical Effects in Osteoarthritis: A Narrative Review. *Genes* (Basel) 2022;13:949)

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. UVOD**

Masno tkivo predstavlja jedan od najbogatijih izvora MSC u ljudskom organizmu. U usporedbi s koštanom srži ili sinovijom, adipozno tkivo sadrži veći broj MSC po volumenu, uz manju invazivnost zahvata (53–55). MSC iz masnog tkiva odlikuju se jačim imunomodulatornim potencijalom od stanica izoliranih iz koštane srži, što ih čini osobito pogodnima za liječenje bolesti koje uključuju kroničnu upalu niskog stupnja, poput upalnog fenotipa OA koljena (51, 56). Isto su potvrdile i kliničke studije koje su pokazale dobar sigurnosni profil terapija koje sadrže MSC i odlične kliničke rezultate u liječenju OA koljena (51, 57–59).

Unatoč njihovom potencijalu, laboratorijski uzgoj i kultivacija MSC-a povezuju se s nizom izazova i regulatornih ograničenja. Proces izolacije, ekspanzije i pohrane zahtijeva specijalizirane GMP laboratorije, višednevnu kultivaciju te strogu kontrolu uvjeta kako bi se očuvala vijabilnost i stabilnost staničnog fenotipa (60). Takvi postupci podliježu brojnim regulativama koje se razlikuju među državama i kontinentima, što značajno ograničava njihovu rutinsku primjenu u kliničkoj praksi (61).

Zbog tih ograničenja razvijeni su novi pristupi koji omogućuju korištenje autolognog masnog tkiva bez enzimske digestije ili kultivacije stanica. Jedan od takvih pripravaka je MFAT, dobiveno minimalno manipulativnim mehaničkim postupkom fragmentacije i ispiranja adipoznog tkiva (62, 63). Postupak se izvodi u jednom aktu, pri čemu se dobiveni produkt može odmah aplicirati u ciljano područje, bez potrebe za staničnom ekspanzijom ili dodatnim laboratorijskim procesima (62, 64, 65). Takav pristup omogućuje zadržavanje trodimenzionalne arhitekture stromalne vaskularne frakcije (SVF), u kojoj su MSC okružene svojim prirodnim potpornim staničnim nišama i ekstracelularnim matriksom, što može doprinijeti boljem preživljenju i učinkovitosti stanica nakon aplikacije (63).

Analize staničnog sastava pokazale su da MFAT sadrži pericite, endotelne progenitorske stanice, supraadventicijske stromalne stanice, koje zajedno čine mikrookruženje s izraženim regenerativnim potencijalom (66–69). Ta kompleksna stanična interakcija unutar MFAT omogućuje sinergijski učinak između imunomodulacije i trofičke potpore, čime MFAT djeluje kao biološki sustav, a ne samo izvor izoliranih stanica (70).

## **1. Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.**

Kliničke studije pokazale su ohrabrujuće rezultate u liječenju OA koljena primjenom autolognog MFAT. Studije provedene u Specijalnoj bolnici Sv. Katarina pokazale su značajan obrazac smanjenja boli i povećanja pokretljivosti preko poboljšanja KOOS (engl. *Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score*), WOMAC (engl. *Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index*) i VAS (Vizualno analogna skala za bol) upitnika (71–73). Također, indirektnim mjerenjem preko dGEMRIC (delayed Gadolinium-Enhanced Magnetic Resonance Imaging of the Cartilage) indeksa, razina glikozaminoglikana u hrskavici, jedne od ključnih komponenti hrskavičnog matriksa, bila je povećana ili zadržana nakon aplikacije MFAT, suprotno očekivanom smanjenju kroz vrijeme (72, 74). Ti su rezultati u skladu s trendovima objavljenim u međunarodnim istraživanjima koja također potvrđuju povoljan sigurnosni profil i potencijal MFAT za usporavanje degenerativnih promjena u zglobu (75–77).

Unatoč rastućem broju dokaza o učinkovitosti, rezultati dostupnih studija još uvijek su heterogeni zbog razlika u protokolima obrade, količini apliciranog tkiva, odabiru pacijenata i metodologiji evaluacije (41, 67). Usporedne studije između MFAT i drugih intraartikularnih terapija, poput HA ili PRP-a, još su rijetke, što otežava donošenje jednoznačnih zaključaka o relativnoj učinkovitosti pojedinih metoda (78, 79). Potrebna su dodatna randomizirana istraživanja s jasno definiranim kriterijima kako bi se standardizirali protokoli i objektivizirali terapijski učinci MFAT (41).

### **1.4.2. Hijaluronska kiselina**

HA je prirodni polisaharid iz skupine glikozaminoglikana, ključna komponenta sinovijalne tekućine i izvanstaničnog matriksa zglobne hrskavice (80, 81). U zdravom zglobu održava viskoznost sinovijalne tekućine, omogućuje podmazivanje i amortizaciju, te doprinosi prehrani i funkciji hondrocita (82, 83). Kod OA dolazi do smanjenja koncentracije i molekularne mase endogene HA, što uzrokuje gubitak njenih biomehaničkih i bioloških svojstava (83, 84).

U kliničkoj praksi HA se primjenjuje intraartikularnom injekcijom. Terapija može biti u serijama od tri injekcije ili kao jedna injekcija s većom koncentracijom HA, ovisno o

**1. Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.**

pripravku (85). Cilj terapije je nadomjestiti i potaknuti sintezu endogene HA te mehanički poboljšati viskoznost sinovijalne tekućine (86).

Mehanizam djelovanja HA temelji se na kombinaciji mehaničkih i bioloških učinaka. Mehanički učinak uključuje viskosuplementaciju, čime HA poboljšava podmazivanje zgloba i raspodjelu opterećenja (87). HA stimulira sintezu endogene HA u sinovijalnim stanicama te povećava sintezu proteoglikana i kolagena tipa II u hondrocitima, čime pridonosi obnovi zglobnog matriksa i hondroprotekciji uz smanjenje upale u zglobu (83). Osim toga, HA smanjuje nociceptivnu transmisiju i mehanički pritisak na receptore boli, što dovodi do analgetskog učinka (88, 89).

Brojne metaanalize i sustavni pregledi pokazali su da intraartikularna primjena HA može rezultirati klinički značajnim smanjenjem boli i poboljšanjem funkcije u bolesnika s blagim do umjerenim OA koljena (86, 90–93). Klinički učinak obično se postiže nakon 4 tjedna od primjene, s vrhuncem učinka nakon 8 tjedana, a može potrajati i do šest mjeseci nakon intraartikularne primjene (94). U usporedbi s kortikosteroidima, HA pokazuje sporiji početak djelovanja, ali dugotrajniji analgetski i funkcionalni učinak (95, 96).

Iako su radiološki i biokemijski dokazi ograničeni, pojedine studije sugeriraju da HA može smanjiti sinovijalnu upalu i sinovitis vidljiv na magnetskoj rezonanci te potencijalno usporiti degradaciju hrskavičnog matriksa povećanjem sadržaja glikozaminoglikana (97).

HA ima vrlo povoljan sigurnosni profil. Nuspojave su rijetke, a najčešće uključuju prolaznu bol, blago oticanje ili osjećaj nelagode na mjestu injekcije, dok su ozbiljne komplikacije izuzetno rijetke i usporedive s placebom (91, 93, 98).

Iako obje metode, MFAT i HA, bilježe dobre rezultate glede kliničkih učinaka u liječenju OA koljena, u znanstvenim bazama nema dovoljno randomiziranih istraživanja koja su uspoređivale učinke MFAT i HA u liječenju OA koljena. Jedno istraživanje pokazalo je superiornije kliničke učinke autologne stromalne vaskularne frakcije dobivene iz masnoga tkiva u usporedbi s aplikacijom HA (99). Međutim, nijedna studija do sada nije detaljno analizirala učinke liječenja OA koljena aplikacijom MFAT u usporedbi s HA.

**1. Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.**

### **1.4.3. Nedostatak standardizacije ortobioloških terapija**

Unatoč sve većoj primjeni bioloških terapija u liječenju OA koljena, dostupni dokazi ostaju izrazito heterogeni, što otežava usporedbu studija, donošenje čvrstih zaključaka i izradu visokokvalitetnih kliničkih smjernica (41). Pregled aktualnih preporuka međunarodnih stručnih društava dodatno naglašava takvu nedosljednost. Dok se kod intraartikularnih kortikosteroida većina smjernica slaže da mogu pružiti kratkotrajno olakšanje simptoma, a terapija plazmom obogaćenom trombocitima (PRP) najčešće dobiva uvjetne ili negativne preporuke zbog metodološke neujednačenosti studija i nedostatka standardizacije pripravaka, uloga intraartikularne HA značajno varira među društvima (100–103). Neka društva ističu umjerenu preporuku protiv rutinske primjene, dok druga dopuštaju selektivnu uporabu u odabranih pacijenata. Još je veća nepodudarnost prisutna kod bioloških terapija koje sadrže MSC, gdje većina smjernica jasno navodi da zbog nedostatka standardiziranih pripravaka, protokola i kvalitetnih dokaza nije moguće izdati preporuku ili se preporučuje protiv njihove uporabe (100–103). Preporuke smjernica stručnih društava za liječenje OA koljena prikazane su u tablici 1.4.3.1.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. UVOD**

**Tablica 1.4.1. Preporuke stručnih smjernica za najčešće korištene intraartikularne terapijske opcije u liječenju osteoartritisa koljena**

<b>Autor smjernica</b>	<b>Godina izdavanja</b>	<b>KS</b>	<b>HA</b>	<b>PRP</b>	<b>MSC</b>
AAOS	2022	umjerenjena preporuka za kratkotrajno olakšanje simptoma	umjerenjena preporuka protiv rutinske primjene	preporuka s ograničenom razinom dokaza	nije uključeno
ACR/AF	2020	snažna preporuka za kratkotrajnu analgeziju	uvjetna preporuka protiv	snažna preporuka protiv (heterogene studije, nedostatak standardizacije pripreme i primjene)	snažna preporuka protiv (heterogene studije, nedostatak standardizacije pripreme i primjene)
OARSI	2019	uvjetna preporuka za kratkotrajnu analgeziju	uvjetna preporuka za dugoročni učinak kada su višestruki intraartikularni KS kontraindicirani	snažna preporuka protiv (nestandardizirane formulacije, niska kvaliteta dokaza)	snažna preporuka protiv (nestandardizirane formulacije, niska kvaliteta dokaza)
ESCEO	2019	slaba preporuka za kratkotrajnu analgeziju kada bolesnici imaju kontraindikaciju za primjenu NSAID-a ili nedovoljnu analgeziju uz njihovu primjenu	slaba preporuka za primjenu samo kod pacijenata s kontraindikacijom za NSAID ili nedovoljnom analgezijom uz njihovu primjenu	nije uključeno	nije uključeno

AAOS - American Academy of Orthopedic Surgeons; ACR/AF - American College of Rheumatology/ Arthritis Foundation; OARSI - Osteoarthritis Research Society International; ESCEO - European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases; KS – kortikosteroidi; HA – hijaluronska kiselina; PRP – plazma obogaćena trombocitima; MSC – mezenhimne matične stanice; NSAID – nesteroidni protuupalni lijekovi.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. UVOD**

Razlike u preporukama smjernica stručnih društava posljedica su toga što kod svake od spomenutih intraartikularnih terapija za liječenje OA koljena postoji širok spektar različitih formulacija, metoda i načina primjene. HA se proizvodi u brojnim molekularnim masama, koncentracijama i viskoelastičnim svojstvima, primjenjuje se u jednokratnim ili višestrukim dozama te se ponekad kombinira s drugim intraartikularnim lijekovima, što rezultira značajno različitim kliničkim profilima (104–106). Situacija je još složenija kod staničnih terapija. Pod istim terminom, MSC terapija, često se podrazumijevaju izrazito različiti pripravci, od MFAT i SVF-a do kultiviranih MSC iz masnog tkiva, koštane srži ili drugih izvora, iako se radi o biološki i regulatorno potpuno različitim entitetima (107, 108). Promatrajući samo MSC iz masnoga tkiva, razlike u postupcima obrade poput mehaničke fragmentacije masnoga tkiva, uporabe enzima, potreba za kultivacijom te razlike u regulacijama između država, zajedno dovode do još veće heterogenosti u istraživanjima i primjeni tih terapija (109).

Dodatni je izazov činjenica da se u većini objavljenih studija ne zna točan sastav pripravka koji se aplicira u zglob. Broj i vrsta stanica, njihova vijabilnost, ali i biokemijski sastav apliciranog pripravka poput koncentracija citokina, kemokina i drugih bioloških medijatora, sve su to ključne informacije koje gotovo nikada nisu adekvatno prikazane i istražene (41, 110). Stoga heterogenost pripravaka i protokola onemogućuje usporedbu rezultata između studija i predstavlja temeljni razlog zbog kojeg su stanične terapije vrlo oprezno ili negativno zastupljene u stručnim smjernicama. Upravo takva metodološka varijabilnost predstavlja glavni ograničavajući čimbenik te je standardizacija nužan preduvjet za napredak u ovom području. Potrebno je jasno definirati parametre pripravaka koji se primjenjuju, od detaljnog opisa metode dobivanja MFAT, SVF-a ili drugih staničnih terapija, preko protočne citometrije koja bi omogućila precizno određivanje stanične populacije, pa sve do biokemijskih analiza citokina, kemokina, enzima i drugih medijatora prisutnih u uzorku. Isto tako, istraživanja koja uključuju HA trebala bi eksplicitno navesti komercijalni proizvod, koncentraciju, volumen i režim doziranja, kako bi se rezultati mogli uspoređivati unutar istih terapijskih kategorija.

Dodatni napredak očekuje se integracijom biomarkera u klinička istraživanja, što bi omogućilo bolje razumijevanje mehanizama djelovanja bioloških terapija i identifikaciju

**1. Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.**

odgovarajućih pacijenata (111, 112). Jasna fenotipizacija bolesnika s OA u istraživanju predstavlja važan korak prema personaliziranom liječenju i nužna je kako bi se u budućnosti mogli razlikovati bolesnici koji imaju potencijalni odgovor na pojedine terapije (44, 113).

Sve navedeno ukazuje na potrebu za strože dizajniranim, dosljedno provedenim i transparentno izvještavanim kliničkim ispitivanjima. Samo sustavna standardizacija pripravaka, protokola i izvještavanja te uključivanje relevantnih bioloških i staničnih analiza mogu omogućiti objektivnu evaluaciju terapijske učinkovitosti i sigurnosti staničnih terapija. Time će se stvoriti temelji za kvalitetniju usporedbu dostupnih ortobioloških terapija, izradu snažnijih smjernica i korak naprijed prema personaliziranom liječenju OA koljena.

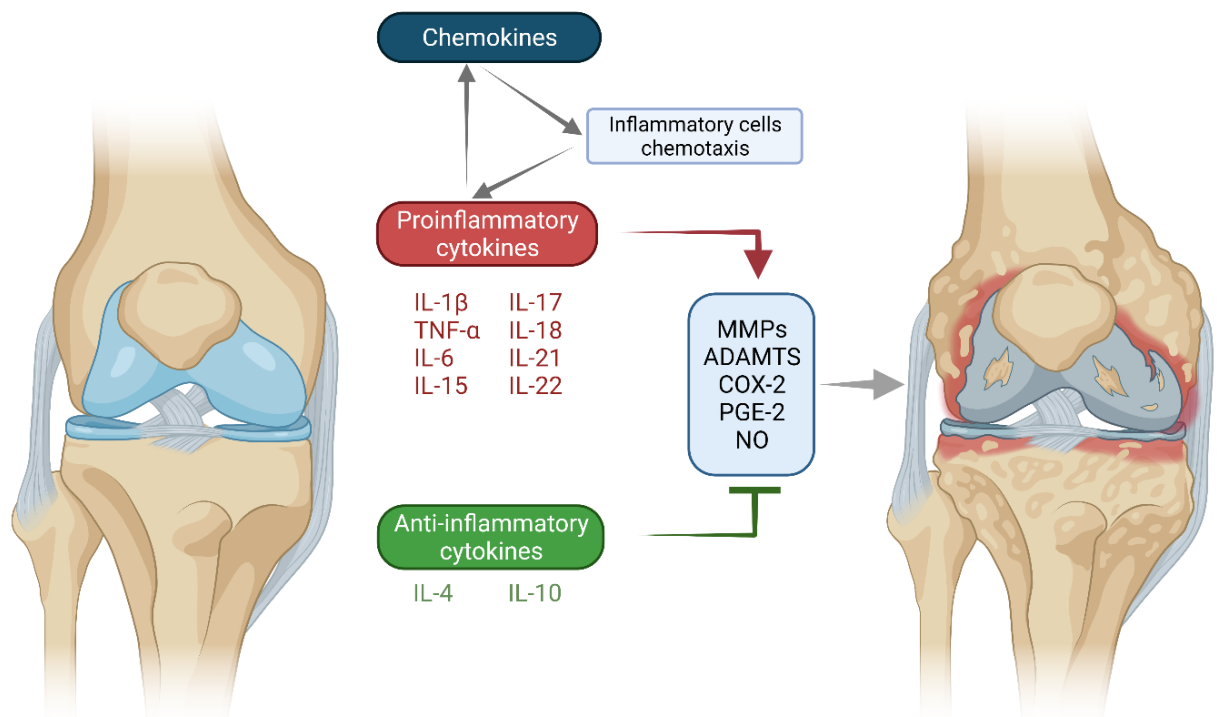
### **1.5. Biomarkeri u dijagnostici i praćenju osteoartritisa koljena**

Osim nastojanja za pronalaskom učinkovitih terapijskih opcija, mnoga su istraživanja usmjerena na identifikaciju biomarkera koji bi omogućili ranu dijagnozu OA (111, 114). Otkrivanje bolesti prije pojave značajnih radioloških promjena omogućuje pravovremeno djelovanje, potencijalno usporavanje tijeka bolesti i odgađanje pojave i progresije kliničkih simptoma. U ranom stadiju OA, terapijske metode poput aplikacije MFAT ili HA mogle bi imati izraženiji učinak na usporavanje progresije i smanjenje potrebe za operacijskim liječenjem u kasnijim fazama, uključujući ugradnju totalne endoproteze koljena (40).

Jednu od ključnih uloga u patogenezi OA imaju citokini i kemokini. Kompleksna mreža citokina i kemokina regulira komunikaciju između stanica, inicira i održava upalne procese te utječe na ravnotežu između anaboličkih i kataboličkih događaja u zglobnim tkivima (115). Promjene u koncentracijama proinflammatornih citokina (npr. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) i antiinflammatornih citokina (npr. IL-4, IL-10), kao i različitih kemokina koji reguliraju migraciju upalnih stanica, povezane su sa stupnjem bolesti i kliničkim stanjem bolesnika (116). Međutim, iako su brojna istraživanja ukazivala na postojanje pojedinih biomarkera te objavljivala korelacije sa stupnjem OA ili težinom boli i drugih simptoma, novija istraživanja govore u prilog promatranju tzv. klastera biomarkera ili

1. **Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.**

njihovih mreža (117). Dinamička interakcija navedenih medijatora (slika 1.5.1) utječe na aktivaciju enzima odgovornih za razgradnju hrskavičnog matriksa, uključujući metaloproteinaze (MMP) i ADAMTS (engl. *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) enzime, ali i promjene svih zglobnih tkiva specifične za OA (118). Ovi procesi potvrđuju suvremeni koncept OA kao bolesti cijelog zgloba, u kojoj sinovija, subhondralna kost, hrskavica i ostala tkiva sudjeluju u međusobno povezanim patofiziološkim mehanizmima koje reguliraju citokinske mreže.



**Slika Pogreška! Za dodavanje Heading 2 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno..1. Shema ključnih upalnih procesa i čimbenika uključenih u patogenezu osteoartritisa.** Narušena ravnoteža između protuupalnih i proinflammatory citokina (u korist proinflammatory) potiče lučenje enzima i drugih medijatora upale koji sudjeluju u patogenezi osteoartritisa. Ti procesi dovode do morfoloških promjena u zglobu, uključujući degeneraciju hrskavice, stvaranje osteofita i sinovitis. Kemokini dodatno potiču upalni odgovor stimulirajući kemotaksiju upalnih stanica, koje potom izlučuju dodatne proinflammatory citokine, stvarajući začarani krug koji znatno otežava liječenje i usporavanje progresije osteoartritisa. IL – interleukin; CCL/CC – kemokinski ligand; TNF- $\alpha$  – engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ; MMP – matriksne metaloproteinaze; ADAMTS – disintegrini i metaloproteinaze s trombospondinskim motivom; COX-2 – ciklooksigenaza-2; PGE-2 – prostaglandin E2; NO – dušikov oksid. (izvor: izradio autor disertacije; objavljeno u Molnar V, Matišić V, Kodvanj I, Bjelica R, Jeleč Ž, Hudetz

**1. Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.**

D, et al. Cytokines and Chemokines Involved in Osteoarthritis Pathogenesis. *Int J Mol Sci* 2021;22:9208.)

Osim proteina uključenih u upalu, istražuju se i drugi biomarkeri povezani s metaboličkim promjenama u OA. Jedan od potencijalno vrijednih biomarkera jest fenilalanin, za kojega je istraživanje pokazalo da mu koncentracija u plazmi raste s progresijom OA koljena kod žena (119). Takvi metabolički pokazatelji dodatno proširuju spektar biomarkera koji bi mogli pomoći u ranom otkrivanju bolesti, stratifikaciji pacijenata i praćenju terapijskog odgovora.

Biomarkeri tako otvaraju brojne nove mogućnosti za razumijevanje patofiziologije OA te za razvoj personaliziranog pristupa liječenju. Ne samo da mogu objektivizirati učinke terapijskih intervencija, nego i popuniti praznine u fenotipizaciji bolesnika, jednom od ključnih preduvjeta modernog, ciljano usmjerenog liječenja OA. Integracija biokemijskih, upalnih i metaboličkih biomarkera omogućuje identifikaciju podskupina bolesnika s različitim biološkim profilima bolesti, što bi u budućnosti moglo olakšati predviđanje terapijskog odgovora i racionalniji odabir ispravne terapije.

Unatoč napretku, dosadašnja istraživanja su često ograničena analizom samo nekoliko pojedinačnih markera. Nijedno prethodno istraživanje nije sustavno obuhvatilo široku paletu biomarkera, uključujući citokine, kemokine i metaboličke pokazatelje poput fenilalanina, niti je usporedilo njihove vrijednosti prije i nakon primjene različitih terapija, poput autolognog MFAT i HA. Funkcije pojedinih citokina i kemokina analiziranih u ovom istraživanju prikazane su u tablici 1.5.1. Takva sveobuhvatna analiza omogućit će objektivniju procjenu terapijskih učinaka i pružiti uvid u biološke promjene unutar zgloba nakon primjene različitih ortobioloških terapija.

**1. Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.**

**Tablica 1.5.1. Funkcije citokina i kemokina uključenih u panel biomarkera za analizu**

Citokin/kemokin	Funkcija	Referenca
IL-1 $\beta$	Proupalni citokin; potiče degradaciju hrskavice i sinovijalnu upalu	(116)
IL-1Ra	Antiinflamatorni citokin; blokira funkciju IL-1 $\beta$	(120)
IL-2	Proupalni citokin; istraženiji u autoimunom odgovoru kod reumatoidnog artritisa, sudjeluje u upalnom odgovoru u mreži s drugim proupalnim citokinima	(121–123)
IL-4	Antiinflamatorni citokin; ima hondroprotektivna svojstva zbog inhibicije sekrecije MMP i regulacije produkcije proteoglikana	(116)
IL-5	Pro- i antiinflamatorna svojstva; promovira upalu, ali i popravak tkiva	(124, 125)
IL-6	Pro- i antiinflamatorna svojstva; regulira produkciju kolagena i proteoglikana te MMP, TIMP i ADAMTS	(116)
IL-8	Kemotaksa neutrofila; povećava koncentraciju kolagena tipa I, MMP-1 i MMP-13, stimulira hipertrofiju hondrocita i kalcifikaciju matriksa	(116)
IL-10	Antiinflamatorni citokin; stimulira sintezu agrekana i kolagena tipa II te inhibira sintezu MMP	(116)
IL-12	Proupalni citokin; promovira upalu i potiče lučenje IL-1 $\beta$ i TNF- $\alpha$	(126, 127)
IL-13	Antiinflamatorni citokin; inhibira učinke TNF- $\alpha$ , inhibira ciklooksigenaze 2 (COX-2) i MMP	(128, 129)
IL-15	Proupalni citokin; potiče proizvodnju MMP	(116)
IL-17A	Proupalni citokin; potiče proizvodnju MMP, ali i drugih proupalnih citokina poput IL-6 i TNF- $\alpha$	(116)
IL-18	Proupalni citokin; sudjeluje u sinovijalnoj upali i potiče lučenje IL-1 $\beta$ i TNF- $\alpha$	(116)
IL-21	Proupalni citokin; promovira produkciju Th17 limfocita i upalnu reakciju	(116)
IL-22	Proupalni citokin; promovira aktivnosti MMP-1	(116)
TNF- $\alpha$	Proupalni citokin; sudjeluje u degradaciji i inhibiciji sinteze proteoglikana i kolagena	(116)
IFN- $\gamma$	Pro- i antiinflamatorna svojstva; inhibira IL-1 $\beta$ posredovanu produkciju MMP, promovira regeneraciju nakon ozljede, ali i sudjeluje u upalnom procesu putem protein kinaze R (PKR)	(130–132)
TGF- $\beta$ 1	Dvojna uloga: održava zdravu hrskavicu, ali u osteoartritisu dovodi do hipertrofije hondrocita, formiranja osteofita i boli	(133–135)
TGF- $\beta$ 2	Dvojna uloga: promovira popravak i inhibira destrukciju zdrave hrskavice, ali i uzrokuje sinovijalnu fibrozu, formiranje osteofita i oštećenja hrskavice	(134–136)
TGF- $\beta$ 3	Dvojna uloga: održava zdravu hrskavicu, a u osteoartritisu pridonosi progresiji bolesti, ali također i stimulira mezenhimne matične stanice da formiraju novu hrskavicu	(134, 135, 137)
MMP-1	Degradacija kolagena tipa I, II i III	(138)
MMP-2	Degradacija proteoglikana te kolagena tipa I, IV, V, VII i X	(138)

**1. Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.**

Citokin/kemokin	Funkcija	Referenca
MMP-3	Aktivacija drugih MMP, degradacija proteoglikana te kolagena tipa II, IV i IX	(138)
MMP-8	Degradacija kolagena tipa I, II i III	(138)
MMP-9	Degradacija proteoglikana te kolagena tipa I, IV, V, VII i X; aktivira citokine i kemokine	(138)
MMP-13	Degradacija kolagena tipa I, II, III, IV i IX te proteoglikana	(138)
TIMP1	Inhibira MMP	(138, 139)
TIMP2	Inhibira MMP	(138, 140)
TIMP4	Inhibira MMP, sudjeluje u regulaciji ravnoteže MMP/TIMP	(138, 141)
sICAM-1	Veže monocite za sinoviju i promovira lučenje proupalnih citokina	(142, 143)
V-CAM1	Promovira adheziju monocita i makrofaga na upaljenu sinoviju čime dodatno promovira upalu u zglobu	(144, 145)
VEGF	Uloga u progresiji osteoartritisa kroz angiogenezu, formaciju osteofita, sinovitis i bol	(146, 147)
Leptin	Potiče hondroците na lučenje MMP i destrukciju kolagena i proteoglikana	(148, 149)
CCL2 (MCP-1)	Kemotaksija monocita	(116)
CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )	Rekrutacija makrofaga	(116)
CCL4 (MIP-1 $\beta$ )	Rekrutacija makrofaga i aktivacija imunoloških stanica	(116)
CCL5 (RANTES)	Kemotaksa T-stanica i monocita	(116)
CCL7 (MCP-3)	Kemotaksa monocita; polarizacija makrofaga prema M1 fenotipu	(150)
CXCL-12 (SDF-1)	Regeneracija tkiva; mobilizira mezenhimne matične stanice na mjesto ozljede, ali i inducira kataboličke faktore poput MMP-13	(116)

IL – interleukin; TNF- $\alpha$  – engl. *tumor necrosis factor alfa*; IFN- $\gamma$  – interferon gama; TGF- $\beta$  – engl. *transforming growth factor beta*; MMP – matriksne metaloproteinaze; TIMP – tkivni inhibitori metaloproteinaza; ICAM-1 – engl. *intercellular adhesion molecule 1*; VCAM-1 – engl. *vascular cell adhesion molecule 1*; VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta; CCL – engl. *C-C motif chemokine ligand*; CXCL – engl. *C-X-C motif chemokine ligand*; MCP – engl. *monocyte chemoattractant protein*; MIP – engl. *macrophage inflammatory protein*; RANTES – engl. *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*; SDF-1 – engl. *stromal cell-derived factor 1*; ADAMTS – engl. *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif*.

### 1.6. Slikovne metode i njihova uloga u evaluaciji terapije osteoartritisa koljena

Nedostatak objektivnih pokazatelja uspješnosti liječenja jedan je od većih problema u ortopedskim istraživanjima. Klinički skorovi (engl. *Patient-Reported Outcome Measures*; PROMs), kao nezaobilazni standard kod procjene uspješnosti liječenja, suviše su subjektivni te ne odražavaju učinak terapije na tkivnoj razini. Iako je smanjenje boli i poboljšanje funkcije glavni cilj svakog liječenja u ortopediji (151), isto tako je važno imati i neovisni, kvantitativni pokazatelj uspješnosti liječenja, a takve

**1. Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.**

najbolje nude radiološke metode s visokom rezolucijom i ponovljivošću poput magnetske rezonance (152).

Dvije metode naročito se ističu u kontekstu evaluacije terapija kod OA koljena: semikvantitativne metode magnetske rezonance za određivanje morfoloških promjena tkiva (npr. MOAKS) i metode kompozicijske analize koje mjere biokemijsku strukturu hrskavice (npr. dGEMRIC).

MOAKS (engl. *Magnetic Resonance Imaging Osteoarthritis Knee Score*) predstavlja standardizirani semikvantitativni klasifikacijski sustav za procjenu strukturnih promjena u koljenu uzrokovanih OA-om. Metodu su razvili Hunter i suradnici kako bi omogućili sustavno bilježenje i kvantifikaciju promjena u svim ključnim zglobnim strukturama koje OA zahvaća, uključujući zglobnu hrskavicu, subhondralnu kost, meniskus, sinoviju, ligamente i periartikularna meka tkiva (29). MOAKS omogućuje precizno praćenje morfoloških promjena, uključujući lezije koštane srži, gubitak hrskavice, osteofite, ciste, lezije meniska, sinovitis i zglobni izljev.

dGEMRIC predstavlja naprednu kvantitativnu MRI tehniku koja omogućuje procjenu biokemijskog sastava i integriteta zglobne hrskavice, s naglaskom na koncentraciju glikozaminoglikana (GAG) (153). Ova metoda temelji se na činjenici da su GAG molekule negativno nabijene te da njihova koncentracija utječe na distribuciju gadolinijskog kontrasta unutar hrskavice. Nakon intravenske primjene kontrastnog sredstva, negativno nabijeni gadolinijevi ioni preferirano prodiru u područja s nižim sadržajem GAG-a, gdje dolazi do skraćenja T1 relaksacijskog vremena. Na temelju dobivenih T1 vrijednosti moguće je generirati kvantitativne T1 mape koje odražavaju biokemijsko stanje hrskavice na način da kraća relaksacijska vremena označavaju nižu koncentraciju GAG-a i veći stupanj degeneracije, dok dulja vremena upućuju na očuvanju strukturu i veću biološku kvalitetu hrskavice (74). Upotreba dGEMRIC-a omogućuje da se ne promatra samo promjena volumena ili debljine hrskavice, nego i promjena unutarnje strukture tkiva, što može imati smisla u ranijim fazama bolesti ili pri procjeni terapijskih učinaka prije nego nastanu vidljive morfološke promjene (154).

Dostupnost ovih metoda otvara prostor za brojna istraživanja u području OA. S obzirom na limitacije brojnih istraživanja u vidu nedostatka objektivnih pokazatelja,

**1. Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.**

Uključenje semikvantitativnih i kvantitativnih metoda magnetske rezonance u istraživanja konzervativnih terapija u OA može popuniti praznine u dosadašnjim istraživanjima. Promatrajući terapije poput intraartikularne aplikacije HA i autolognog MFAT, ni jedna studija dosad nije uspoređivala učinke dviju terapija metodom magnetske rezonance uz analizu dGEMRIC indeksa. Uključenjem radioloških biomarkera u klinička istraživanja značajno bi se povećala znanstvena vrijednost istraživanja jer slikovne metode pružaju objektivne i reproducibilne pokazatelje promjena unutar zgloba, ponajprije hrskavice, ali i ostalih struktura koje sudjeluju u patogenezi OA.

### **1.7. Znanstvena opravdanost i jedinstvenost istraživanja**

S obzirom na izrazitu heterogenost dosadašnjih kliničkih studija kod OA koljena, složenu patofiziologiju bolesti koja obuhvaća cijeli zglob i prepoznatu potrebu za fenotipskom klasifikacijom pacijenata, neophodna su istraživanja koja sustavno kombiniraju kliničke, radiološke i biokemijske pokazatelje. Posebno je važno fokusirati se na jasno definirane fenotipove, među kojima upalni fenotip OA koljena predstavlja podskupinu bolesnika s najvećim potencijalom za odgovor na biološke i imunomodulatorne terapije kojima se može ciljati uzrok bolesti.

Unatoč rastućem interesu za ortobiološke terapije poput autolognog MFAT i HA, dosadašnja istraživanja često su ograničena heterogenim odabirom pacijenata, nedostatnom karakterizacijom primijenjenih pripravaka i oslanjanjem isključivo na subjektivne kliničke ishode. Uloga objektivnih pokazatelja uspješnosti liječenja, uključujući napredne radiološke i biokemijske parametre, još uvijek je nedovoljno istražena, a posebice nedostaju randomizirane studije koje su izravno usporedile MFAT i HA u homogenoj populaciji bolesnika.

Upravo se ovim istraživanjem nastoji popuniti te praznine. Po prvi put se u istom istraživanju kombiniraju: precizna fenotipska selekcija bolesnika s upalnim fenotipom OA koljena, usporedba MFAT i HA u randomiziranom kliničkom istraživanju te istodobna evaluacija kliničkih, radioloških i biokemijskih pokazatelja. Posebnu vrijednost predstavlja integracija naprednih MRI metoda poput dGEMRIC-a i MOAKS-

**1. Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.**

a, koje omogućuju objektivnu procjenu biokemijskih promjena hrskavice i strukturnih promjena svih zglobnih tkiva, uz analizu širokog spektra citokina, kemokina i metaboličkih biomarkera u plazmi i sinovijalnoj tekućini.

Nadalje, ovo je prvo istraživanje koje detaljno karakterizira MFAT i na staničnoj i na biokemijskoj razini, uključujući protočnu citometriju i analizu citokina u samom pripravku, čime se jasno definira biološki sastav terapije, što je dosad predstavljalo jedan od najvećih nedostataka u literaturi.

Ovakav multidisciplinarni pristup omogućuje cjelovit uvid u djelovanje MFAT i HA te stvara temelje za bolju standardizaciju, prepoznavanje biomarkera terapijskog odgovora i razvoj personaliziranih terapijskih strategija u liječenju OA koljena. Time se ovo istraživanje pozicionira kao prvi integrirani model procjene ortobioloških terapija u OA i daje važan doprinos razvoju suvremene regenerativne ortopedije.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. HIPOTEZA**

## **2. HIPOTEZA**

Primjena MFAT će rezultirati značajnim poboljšanjem simptoma, smanjenjem bolova, i povećanjem funkcionalnosti kod pacijenata s OA koljena u usporedbi s aplikacijom HA. Također, MFAT će dovesti do većeg povećanja koncentracije glikozaminoglikana u hrskavici koljena, te do značajnijih promjena koncentracija određenih citokina i kemokina u plazmi ili sinovijalnoj tekućini te fenilalanina u plazmi ispitanika.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. CILJ ISTRAŽIVANJA**

### **3. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Ciljevi istraživanja su dati preciznije informacije o djelovanju MFAT u jednoj skupini ispitanika s OA koljena u usporedbi s aplikacijom HA u drugoj skupini ispitanika s OA koljena. Specifični ciljevi su:

- Ispitati učinak aplikacije MFAT i HA na bol i funkciju koljena koristeći upitnike (VAS, KOOS WOMAC) prije terapijske intervencije te 1 i 6 mjeseci nakon terapijske intervencije.
- Ispitati radiološke učinke liječenja analizom koncentracije glikozaminoglikana (GAG) u artikularnoj hrskavici koljena koristeći gadolinijem osnaženo oslikavanje magnetskom rezonancom (dGEMRIC) prije te 6 mjeseci nakon terapijske intervencije, uz određivanje MOAKS klasifikacije osteoartrotskih promjena prije te 1 i 6 mjeseci nakon terapijske intervencije.
- Ispitati koncentraciju citokina i kemokina u krvnoj plazmi koristeći multiplex enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) prije te 1 i 6 mjeseci terapijske intervencije te koncentraciju citokina i kemokina u sinovijalnoj tekućini prije te 1 mjesec nakon terapijske intervencije (kod ispitanika kod kojih se uspije aspirirati sinovijalna tekućina pri intervenciji i kontrolnom pregledu).
- Ispitati koncentraciju fenilalanina u krvnoj plazmi koristeći tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) prije te 1 i 6 mjeseci nakon terapijske intervencije.
- Analizirati koncentraciju citokina i kemokina u uzorcima MFAT te analizirati iste uzorke metodom protočne citometrije za dobivanje informacija o broju i vijabilnosti stanica, vrstama stanica i njihovim omjerima.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. MATERIJAL I METODE**

#### **4. MATERIJAL I METODE**

##### **4.1. Ustroj studije**

Provedeno je prospektivno, intervencijsko, randomizirano i dvostruko slijepo kliničko istraživanje u sklopu europskog istraživačkog projekta pod nazivom „Klinička i molekularna fenotipizacija osteoartritisa: personalizirani pristup dijagnostici i liječenju“ (KK.01.2.1.02.0173). Uključivanje sudionika započelo je u veljači 2020., a posljednji ispitanik uključen je 31. svibnja 2023. godine. Istraživanje je koordinirala Specijalna bolnica Sv. Katarina (Zagreb, Hrvatska) u suradnji s Klinikom za traumatologiju Kliničkog bolničkog centra Sestre Milosrdnice i Zavodom za opću i sportsku traumatologiju i ortopediju Kliničke bolnice Merkur. Etičko odobrenje izdano je od strane etičkih povjerenstava svih sudjelujućih ustanova (Sv. Katarina: UR 22/5-I, 25. ožujka 2022.; KB Merkur: UR BR-0311-2758, 31. ožujka 2022.; KBC Sestre milosrdnice: 251-29-11/3-22-02, 7. travnja 2022.). Studija je registrirana u međunarodnom registru kliničkih ispitivanja ISRCTN (ID: ISRCTN88966184).

U istraživanje su uključeni odrasli bolesnici u dobi od 30 do 75 godina s primarnim OA koljena koji su zadovoljavali stroge kriterije uključenja i isključenja. Svi su klasificirani kao bolesnici s upalnim fenotipom OA na temelju anamneze, kliničkog pregleda, komorbiditeta i analize radioloških snimki tj. rendgenskih snimaka i magnetske rezonancije (MR) koljena. Bolesnici s obostranim simptomima koljena bili su podvrgnuti evaluaciji oba zgloba. Ako su oba koljena zadovoljavala radiološke kriterije uključenja, u daljnju analizu uključeno je koljeno s izraženijim simptomima.

Ukupno je u studiju randomizirano 53 bolesnika, i to u omjeru 2:1. Trideset i pet ispitanika primilo je jednu intraartikularnu aplikaciju autolognog MFAT s mezenhimnim matičnim stanicama (MSC), dok je u 18 ispitanika aplicirana HA. Detaljni proces selekcije bolesnika, randomizacija, praćenje i analiza prikazani su na CONSORT (engl. *Consolidated Standards of Reporting Trials*) dijagramu u rezultatima.

Svi ispitanici praćeni su tijekom šest mjeseci nakon intervencije, koristeći kombinaciju subjektivnih upitnika o zdravstvenom stanju (PROMs), MR oslikavanja koljena te biokemijske analize krvi i sinovijalne tekućine. PROMs (KOOS, WOMAC i VAS) prikupljeni su na početku, nakon 1 mjeseca te nakon 6 mjeseci, dok je dGEMRIC MR

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. MATERIJAL I METODE**

snimanje provedeno na početku i nakon 6 mjeseci. Biokemijske analize, odnosno analize citokina i kemokina, nakon primarne analize prije intervencije, ponovljene su u sinovijalnoj tekućini 1 mjesec nakon intervencije, a u krvi tj. krvnoj plazmi nakon 1 i 6 mjeseci od terapijske intervencije. U krvi je u istim vremenskim točkama analizirana i koncentracija fenilalanina. Dodatno je u vrijeme terapijske intervencije rađena objektivizacija MFAT i to metodom protočne citometrije za analizu broja i vrste stanica te vijabilnosti te biokemijski analizom citokina i kemokina.

Primarni ishodi uključivali su promjenu vrijednosti PROMs-a i dGEMRIC indeksa kroz navedena vremenska razdoblja.

Sekundarni ishodi obuhvaćali su:

- ispitivanje povezanosti promjena u kliničkim rezultatima s promjenama dGEMRIC indeksa
- analizu promjena koncentracija citokina i kemokina u sinovijalnoj tekućini i krvnoj plazmi nakon aplikacije MFAT ili HA
- analizu promjena koncentracija fenilalanina u krvnoj plazmi nakon terapijske intervencije
- objektivizaciju uzoraka MFAT uz određivanje profila citokina i kemokina te staničnu analizu metodom protočne citometrije.

Svi prikupljeni podaci bili su anonimizirani te pohranjeni u sigurnu, lozinkom zaštićenu bazu podataka, u skladu s GDPR regulativom i načelima Dobre kliničke prakse (engl. *Good Clinical Practice*, GCP). Istraživanje je ustrojeno kao randomizirani klinički pokus.

## **4.2. Ispitanici**

Ispitanici u istraživanju bili su bolesnici s bolovima u koljenu i OA koljena kao uzrokom bolova. Ispitanici su bili odabrani i stratificirani prema anamnezi, rezultatima ortopedskog pregleda, nalazima radioloških metoda poput RTG snimaka (anteroposteriorni snimak, lateralne snimke, Rosenberg, aksijalne snimke patele,

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. MATERIJAL I METODE**

panoramske snimke donjih ekstremiteta) i naprednih metoda oslikavanja pomoću magnetske rezonance sukladno MOAKS klasifikaciji. Istraživanje je uključilo 53 bolesnika s OA koljena koji su zadovoljili detaljne kriterije uključenja tj. isključenja iz istraživanja. Ispitanici u ovom istraživanju podijeljeni su u dvije glavne skupine - eksperimentalnu i kontrolnu. Eksperimentalna skupina sastojala se od bolesnika koji boluju od OA koljena, a koji su bili liječeni aplikacijom MFAT koji sadrži MSC. Kontrolna skupina također je obuhvaćala bolesnike s OA koljena koji su zadovoljili kriterije istraživanja, ali su oni bili liječeni aplikacijom HA. Bolesnici su bili nasumično raspoređeni u dvije skupine u omjeru 2:1 (35 bolesnika liječenih aplikacijom MFAT koji sadrži mezenhimne matične stanice i 18 bolesnika liječenih aplikacijom HA).

#### **4.2.1. Odabir upalnog fenotipa osteoartritisa koljena**

Uzorak ispitanika pažljivo je oblikovan s ciljem postizanja fenotipske homogenosti. Strogi kriteriji uključenja i isključenja definirani su kako bi se obuhvatila skupina bolesnika koja odgovara upalnom fenotipu OA koljena (21, 22). Upalni fenotip OA koljena, prema Dell'Isoli karakteriziraju oštećenja hrskavice uz prisustvo izljeva, bez poremećaja mehaničke osovine, bez komorbiditeta poput dijabetesa, pretilosti ili depresije, odnosno bez odrednica drugih kliničkih fenotipova (21, 22).

Prisutnost zglobnog izljeva kvantificirana je pomoću MOAKS sustava za procjenu sinovitisa i izljeva. Da bi ispitanik bio klasificiran kao pripadnik upalnog fenotipa, morao je imati MOAKS ocjenu sinovitisa/izljeva 2 ili 3, što odgovara konveksitetu suprapatelarne burze ili distenziji zglobne kapsule na aksijalnim presjecima MR-a koljena (21, 29).

Odabir upravo ovog fenotipa temelji se na činjenici da njegove karakteristike najbolje odgovaraju konzervativnom, odnosno nekirurškom pristupu liječenja OA koljena. To je jedini fenotip u kojem se terapijama poput aplikacije MFAT, koja sadrži mezenhimne matične stanice, ili aplikacije HA može utjecati na osnovni uzrok problema, smanjiti upalni proces te posljedično ublažiti simptome OA koljena (51, 86, 155). Zbog toga je odabir upalnog fenotipa bio ključan za osiguravanje fenotipske homogenosti ispitanika i pouzdanu procjenu terapijskog učinka.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. MATERIJAL I METODE**

#### **4.2.2. Kriteriji uključenja i isključenja iz istraživanja**

Kako bi se u istraživanje uključili bolesnici koji zadovoljavaju jasno definirane kriterije upalnog fenotipa OA koljena, postavljen je niz strogih kriterija uključenja i isključenja s ciljem diferencijacije ovog fenotipa od ostalih kliničkih varijanti bolesti. U tu svrhu provedena je detaljna fenotipska klasifikacija bolesnika temeljena na anamnezi, kliničkom pregledu te radiološkim nalazima, uključujući standardne rendgenske snimke koljena, panoramsku snimku donjih ekstremiteta i magnetsku rezonanciju koljena.

Primjenom navedenih dijagnostičkih postupaka nastojalo se izdvojiti skupinu ispitanika s obilježjima upalnog fenotipa OA, kako ga definiraju Dell'Isola i suradnici, a koji obuhvaća bolesnike s izraženijom sinovijalnom upalom, prisutnošću izljeva i ograničenim oštećenjem hrskavice, bez značajne devijacije mehaničke osi te bez izraženih metaboličkih ili sistemskih poremećaja. Tako su iz istraživanja isključeni bolesnici s indeksom tjelesne mase (BMI) iznad 30, prisutnim dijabetesom, devijacijom mehaničke osi donjih ekstremiteta većom od 5°, depresijom i drugim čimbenicima koji su mogli upućivati na prisutnost metaboličkog, mehaničkog, fenotipa kronične boli ili drugih kliničkih varijanti OA.

Kriteriji po kojima se definiraju klinički fenotipovi OA koljena te brojni drugi kriteriji isključenja definirani su s ciljem osiguravanja usporedivosti ispitanika između terapijskih skupina i smanjenja rizika od potencijalnog *selection biasa* i *confounding biasa*, odnosno pristranosti u odabiru ispitanika i utjecaja smetajućih čimbenika na interpretaciju rezultata (156). Detaljan popis svih kriterija uključenja i isključenja prikazan je u tablici 4.2.2.1.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. MATERIJAL I METODE**

**Tablica 4.2.2.1. Kriteriji uključenja i isključenja iz kliničkog istraživanja**

<b>Kriteriji uključenja</b>	<b>Kriteriji isključenja</b>
Bolesnici s OA koljena stariji od 30 i mlađi od 75 godina	Maligne bolesti, sistemske upalne bolesti (npr. reumatoidni artritis, psorijatični artritis) ili druge sistemske bolesti koje mogu uzrokovati bol u koljenu ili sistemsku upalu
Kellgren–Lawrence stupanj OA 2–3 ILI Iwano stupanj patelofemoralnog OA 2–3	BMI > 30 ili dijabetes
Simptomi (bol) u koljenu prisutni najmanje 6 mjeseci	≥6 bolnih točaka raspoređenih iznad i ispod struka, bilateralno i aksilarno
Devijacija mehaničke osovine donjih ekstremiteta <5°	Depresija prema CESD-R upitniku
Mogućnost praćenja i suradnje tijekom istraživanja	Kellgren–Lawrence stupanj 4 ILI Iwano stupanj 4
Potpisan informirani pristanak	Kellgren–Lawrence stupanj 1 I Iwano stupanj 1
	MOAKS sinovitis/izljev skor < 2 (bez izljeva na MR-u)
	Posttraumatski OA koljena
	Povijest kirurških zahvata na zahvaćenom koljenu
	Devijacija mehaničke osi > 5° (varus ili valgus)
	Nestabilnost koljena
	Lezije meniska ili druge strukturne lezije kao glavni uzrok simptoma (npr. „bucket-handle“ ili radijalne rupture meniska)
	Ozljeda koljena unutar 3 mjeseca
	Intraartikularna injekcija unutar 3 mjeseca (kortikosteroidi, HA, PRP i dr.)
	Druge muskuloskeletne bolesti (npr. Marfanov sindrom, osteogenesis imperfecta) koje onemogućuju kliničku evaluaciju
	Nemogućnost apstinencije od NSAID-a 7 dana prije intervencije i tijekom praćenja
	Alergija na lidokain ili adrenalin
	Koagulopatija, trombocitopenija ili antikoagulantna terapija s PV < 0,70
	Sustavna imunosupresivna terapija
	Hondromatoza ili vilonodularni sinovitis
	Aktivna infekcija zgloba
	Trudnoća ili planirana trudnoća tijekom trajanja istraživanja
	Povijest kemoterapije ili radioterapije ekstremiteta ili mjesta uzimanja masnog tkiva
	Psihijatrijski poremećaji koji mogu ograničiti suradljivost
	Nemogućnost dolaska na kontrolne preglede

OA – osteoartritis; BMI – indeks tjelesne mase; CESD-R – *Center for Epidemiologic Studies Depression Scale Revised*; MR – magnetska rezonancija; MOAKS – *MRI Osteoarthritis Knee Score*; NSAID – nesteroidni protuupalni lijekovi; PV – protrombinsko vrijeme.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. MATERIJAL I METODE**

### **4.2.3. Postupak selekcije ispitanika**

Kako bi se osigurao dovoljno velik uzorak ispitanika, uz istodobno očuvanje fenotipske homogenosti, bilo je nužno provesti opsežan probir pacijenata prema jasno definiranim kriterijima uključenja i isključenja. S obzirom na izrazitu heterogenost bolesnika s OA koljena te prisutnost različitih kliničkih fenotipova bolesti, postupak selekcije zahtijevao je sustavan i višestupanjski pristup. Temeljni cilj bio je identificirati i uključiti bolesnike s obilježjima upalnog fenotipa OA koljena, uz istodobno isključivanje bolesnika koji pripadaju drugim fenotipskim varijantama.

Kako bi se osigurao dovoljan broj ispitanika koji zadovoljavaju stroge kriterije, selekcija bolesnika provedena je u više ustanova: u Specijalnoj bolnici Sv. Katarina, Klinici za traumatologiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice te na Zavodu za opću i sportsku traumatologiju i ortopediju Kliničke bolnice Merkur. U svakoj ustanovi bolesnici su bili inicijalno pregledani u ortopedskim ambulancama od strane liječnika istraživača, a bolesnici s kliničkom sumnjom na OA koljena bili su uključeni u daljnju dijagnostičku obradu prema unaprijed definiranoj metodologiji.

Dijagnostički algoritam obuhvaćao je standardizirani pristup procjeni OA koljena: uzimanje detaljne anamneze, klinički pregled, te izvođenje rendgenskih snimaka koljena (anteroposteriorna, lateralna, Rosenberg i aksijalna projekcija patele). Bolesnici koji su zadovoljavali osnovne anamnestičke, kliničke i radiološke kriterije upućeni su na dodatno oslikavanje magnetskom rezonancijom koljena u Specijalnu bolnicu Sv. Katarina i panoramske radiografske snimke donjih ekstremiteta za procjenu mehaničke osi. U Specijalnoj bolnici Sv. Katarina izvršena je detaljna radiološka analiza sukladno kriterijima istraživanja. Analizom radiografskih snimki, osim procjene stupnja OA koljena prema Kellgren–Lawrence ljestvici za femorotibijalni zglob te Iwano ljestvici za patelofemoralni zglob, precizno su izmjerene mehaničke osovine donjih ekstremiteta za svakog upućenog bolesnika kako bi se oni s neodgovarajućim stupnjem bolesti ili prevelikom devijacijom mehaničke osovine ( $\geq 5$  stupnjeva valgus ili varus deformacije) isključili iz daljnjeg istraživanja. Također, nakon snimanja magnetske rezonance koljena, uz analizu ozljeda meniska i ligamenata, izvršeno je određivanje MOAKS s posebnim naglaskom na evaluaciju sinovitisa i zglobnog izljeva. Dodatno su isključeni svi bolesnici sa značajnim ozljedama meniska ili ligamenata te

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. MATERIJAL I METODE**

bolesnici s premalo izljeva u zglobu koljena prema MOAKS skoru za sinovitis i izljevu (skor < 2) koji nemaju ključnu odrednicu upalnog fenotipa OA koljena.

Uz radiološku obradu, svi su bolesnici prošli dodatnu kliničku i psihološku procjenu, koja je uključivala primjenu CESD-R upitnika (Center for Epidemiologic Studies Depression Scale Revised) radi isključenja bolesnika s depresijom, kao i provjeru drugih komorbiditeta koji bi mogli utjecati na fenotipsku klasifikaciju. Na temelju integriranih podataka dobivenih iz anamneze, ortopedskog pregleda i slikovnih pretraga, provedena je fenotipska stratifikacija bolesnika te konačna provjera podobnosti za uključivanje u istraživanje u skladu s kriterijima prikazanim u tablici 4.2.2.1.

U slučaju bolesnika s obostranim OA koljena, u istraživanje je uključeno samo koljeno s izraženijim simptomima, što je utvrđeno na temelju kliničkog pregleda i rezultata ortopedskih upitnika. U ispitanika s obostranim OA jednakog intenziteta boli, koljeno za liječenje odabrano je nasumično.

Svaki je sudionik potpisao informirani pristanak, koji je sadržavao sve potrebne informacije o tijeku istraživanja, kontrolnim pregledima i preporukama za ponašanje tijekom praćenja.

Ovaj višestupanjski proces selekcije provodio se u razdoblju od veljače 2020. do svibnja 2023. godine, a koordinirao ga je istraživački tim Specijalne bolnice Sv. Katarina. Takav multidisciplinarni pristup, koji je uključivao suradnju između triju kliničkih ustanova, omogućio je uključivanje reprezentativne skupine bolesnika s upalnim fenotipom OA koljena, uz istodobno smanjenje rizika od *selection biasa* i osiguravanje visoke razine metodološke kontrole.

Završetkom procesa selekcije oblikovana je fenotipski homogena skupina bolesnika s upalnim fenotipom OA koljena koji su zadovoljili sve kriterije uključivanja i isključivanja. Ova pažljivo odabrana skupina činila je osnovu za provedbu daljnjih istraživačkih postupaka, uključujući randomizaciju, zasljepljivanje, primjenu terapijskih intervencija te procjenu kliničkih, radioloških i biokemijskih ishoda. U nastavku su detaljno opisane metode korištene u svakom segmentu istraživanja, od postupaka liječenja do praćenja ispitanika i statističkih metoda.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. MATERIJAL I METODE**

### **4.3. Metode**

U istraživanje su bili uključeni bolesnici s OA koljena u dobi od 30 do 75 godina, koji su zadovoljili sve kriterije uključivanja i isključivanja. Probir bolesnika za sudjelovanje u studiji provodio se u više kliničkih ustanova: Specijalnoj bolnici Sv. Katarina (Zagreb), Klinici za traumatologiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice te na Zavodu za opću i sportsku traumatologiju i ortopediju Kliničke bolnice Merkur.

Sve aktivnosti povezane s provođenjem istraživanja, a vezane uz sudionike, obavljane su u Specijalnoj bolnici Sv. Katarina, uključujući ispunjavanje kliničkih upitnika, izvođenje radiološke dijagnostike, uzimanje uzoraka krvi i sinovijalne tekućine, kao i izvođenje terapijskih intervencija.

Biokemijska analiza uzoraka krvi, sinovijalne tekućine i mikrofragmentiranog masnog tkiva provedena je u partnerskoj istraživačkoj instituciji Labena d.o.o. (Ljubljana, Slovenija), u skladu s validiranim protokolima i standardima dobre laboratorijske prakse.

#### **4.3.1. Randomizacija i maskiranje**

Bolesnici izabranog fenotipa randomizirani su u dvije terapijske skupine, pri čemu je u jednoj skupini provedena aplikacija MFAT (Lipogems®; Lipogems International SpA, Milan, Italija) (n = 35) u zglob koljena, dok je druga skupina primila intraartikularnu aplikaciju HA (Hyalubrix 60®; Fidia S.p.A., Padova, Italija) (n = 18). Randomizacija je provedena u omjeru 2:1 u korist MFAT skupine, s ciljem povećanja izloženosti novom biološkom liječenju i dobivanja preciznijih procjena njegovih učinaka, uz istodobno zadržavanje HA kao aktivnog komparatora.

Randomizacija je provedena pomoću internetskog alata random.org, a svim ispitanicima dodijeljen je jedinstveni anonimizirani identifikacijski kod korišten za praćenje podataka i analizu rezultata. Ovaj postupak omogućio je ravnomjernu i nepristranu raspodjelu ispitanika između terapijskih skupina.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. MATERIJAL I METODE**

Zasljepljivanje (*blinding*) provedeno je s ciljem očuvanja objektivnosti rezultata i sprječavanja pristranosti kod ispitanika. Bolesnici nisu bili upoznati s terapijom koju primaju, kako njihovo očekivanje ne bi utjecalo na ispunjavanje kliničkih upitnika i ponašanje tijekom istraživanja. Kako bi se zasljepljivanje očuvalo, svi su ispitanici, neovisno o grupnoj alokaciji, prošli postupak subkutane lipoaspiracije abdominalnog masnog tkiva i njegove mikrofragmentacije pomoću Lipogems® sustava. Ispitanici randomizirani u HA skupinu primili su intraartikularnu injekciju HA, dok su njihovi uzorci MFAT krioprezervirani za buduće istraživačke potrebe u laboratoriju banke tkiva Klinike za traumatologiju KBC-a Sestre milosrdnice.

Po završetku istraživanja, nakon zaključivanja analize podataka, bolesnicima je otkriveno kojoj su terapijskoj skupini pripadali, radi očuvanja integriteta podataka i metodološke nepristranosti. U svrhu etičnosti i zadržavanja suradljivosti ispitanika, bolesnicima iz HA skupine ponuđena je mogućnost da se nakon završetka istraživanja njihovi uzorci MFAT odmrznu te, nakon potvrde sigurnosti i kvalitete, apliciraju u bolno koljeno. Nakon odmrzavanja provedena je mikrobiološka kontrola sterilnosti te analiza uzorka metodom protočne citometrije uz analizu vijabilnosti, broja i omjera stanica.

Ovo je istraživanje provedeno kao dvostruko slijepo kliničko ispitivanje. Ispitanici nisu bili upoznati s dodijeljenim oblikom terapije, a radiolog koji je provodio dGEMRIC i MOAKS analize također nije imao uvid u grupnu alokaciju. Kliničke upitnike (KOOS, WOMAC, VAS) ispitanici su ispunjavali samostalno koristeći anonimne identifikacijske kodove. Sve laboratorijske analize (citokini, kemokini, fenilalanin) provedene su bez znanja o alokaciji pacijenata, čime je dodatno osigurana objektivnost i metodološka nepristranost.

#### **4.3.2. Intervencije**

Postupci lipoaspiracije, pripreme MFAT i intraartikularne aplikacije provedeni su prema standardiziranom protokolu u sterilnim uvjetima.

Ispitanici su tijekom zahvata bili u ležećem položaju na operacijskom stolu. Nakon dezinfekcije i pripreme operacijskog polja, u području uzimanja masnog tkiva (najčešće

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. MATERIJAL I METODE**

abdominalna regija) primijenjena je lokalna anestezija s 2% lidokainom, nakon čega je načinjen mali kožni rez (6–8 mm). U potkožno masno tkivo infiltrirano je približno 250 mL tumescentne otopine, koja je sadržavala 40 mL 2% lidokaina i jednu ampulu adrenalina razrijeđenu u fiziološkoj otopini, kako bi se smanjilo krvarenje i mehanička trauma tkiva.

Masno tkivo je aspirirano tupom kanilom pod negativnim tlakom, kontroliranim pokretima naprijed-natrag. Dobiveni lipoaspirat odmah je procesiran pomoću Lipogems® Ortho Kit sustava (Lipogems International SpA, Milan, Italija), zatvorenog sterilnog sustava koji omogućuje mehaničku mikrofragmentaciju i ispiranje masnog tkiva bez enzimatske obrade ili stanične ekspanzije. Nakon obrade, 7 mL MFAT preneseno je u šprice od 10 mL i pripremljeno za intraartikularnu primjenu u MFAT skupini. Uzorci MFAT ispitanika iz HA skupine bili su krioprezervirani u banci tkiva Klinike za traumatologiju KBC-a Sestre milosrdnice za moguće buduće istraživačke ili kliničke potrebe. Nakon završetka postupka uzimanja masnog tkiva, na donorsko mjesto postavljena je elastična kompresijska poveska radi prevencije nastanka potkožnih hematoma.

Za oba terapijska pristupa primijenjen je identičan protokol intraartikularne aplikacije. Ispitanici su ležali na leđima, s ispruženim koljenom, a mjesto iniciranja označeno je prije same aplikacije. Nakon sterilne pripreme kože, igla kalibra 21G uvedena je u sinovijalni prostor pod kontinuiranim ultrazvučnim navođenjem u stvarnom vremenu. Prije aplikacije, iz koljena je aspirirana sinovijalna tekućina, a zatim je kroz istu iglu aplicirana odgovarajuća terapija: 7 mL MFAT (Lipogems®) u ispitivanoj skupini te 60 mg HA visokog molekularnog sastava (Hyalubrix 60®, Fidia Farmaceutici, Italija) u kontrolnoj skupini.

Postupak aplikacije proveden je bez potrebe za sedacijom ili dodatnom anestezijom, osim eventualne lokalne analgezije u području uboda. Svi postupci izvodili su se u aseptičnim uvjetima uz nadzor educiranog medicinskog osoblja.

Tijekom i nakon terapijske intervencije ispitanici su praćeni radi mogućih nuspojava ili komplikacija vezanih uz postupak, uključujući lokalnu bol, otok, izljev, sinovitis, povišenu tjelesnu temperaturu ili alergijsku reakciju. Svi potencijalni neželjeni događaji

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. MATERIJAL I METODE**

dokumentirani su i evaluirani na kontrolnim pregledima nakon 1 i 6 mjeseci. Nuspojava je definirana kao svaki nepovoljni ili nenamjerni klinički znak, simptom ili bolest koja se vremenski podudara s intervencijom, neovisno o uzročnoj povezanosti s liječenjem.

Učinci primijenjenih intervencija praćeni su kombinacijom kliničkih, radioloških i biokemijskih pokazatelja s ciljem procjene učinkovitosti liječenja. Klinički ishodi procjenjivani su standardiziranim upitnicima koji kvantificiraju subjektivno poboljšanje simptoma i funkcije koljena, dok su radiološke i biokemijske metode omogućile objektivizaciju strukturnih i molekularnih promjena u zglobu tijekom praćenja. U nastavku su detaljno opisane primijenjene metode evaluacije kliničkih ishoda.

### **4.3.3. Klinički ishodi**

Klinički ishodi praćeni su pomoću triju standardiziranih i validiranih upitnika o subjektivnoj procjeni ishoda liječenja (engl. *Patient-Reported Outcome Measures*, PROMs) kod bolesnika s OA koljena: KOOS, WOMAC i VAS. Ovi alati zajedno omogućuju višedimenzionalnu procjenu subjektivnih tegoba, funkcionalnosti i kvalitete života bolesnika s OA koljena. Upitnici su ispunjavani u tri vremenske točke: prije terapijske intervencije, 1 mjesec nakon intervencije te 6 mjeseci nakon intervencije. Ispitanici, koji nisu bili upoznati s terapijom koju primaju, upitnike su ispunjavali samostalno i anonimno. Ovakav pristup omogućio je usporedbu kratkoročnih i srednjoročnih učinaka MFAT i HA terapije na subjektivne pokazatelje boli, funkcionalnosti i kvalitete života te osigurao standardizirane uvjete procjene tijekom cijelog istraživanja.

Upitnik KOOS razvijen je s ciljem sveobuhvatne procjene simptoma i funkcionalnih ograničenja kod bolesnika s ozljedama i OA koljena (157). Sastoji se od pet podskala koje obuhvaćaju simptome (KOOS Simptomi), bol (KOOS Bol), funkcioniranje u svakodnevnim aktivnostima (engl. *Activities of Daily Living*, KOOS ADL), funkcioniranje u sportskim i slobodnim aktivnostima (engl. *Sports and Recreational Activities*, KOOS SPORT/REC) te kvalitetu života (engl. *Quality of Life*, KOOS QoL). Svaka se tvrdnja ocjenjuje Likertovom skalom od 0 do 4, a rezultati se transformiraju na raspon od 0 do 100, pri čemu viši rezultat označava bolju funkciju i manju

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. MATERIJAL I METODE**

simptomatologiju. U ovom istraživanju posebna je pozornost posvećena analizama podskala KOOS Bol i KOOS Simptomi, budući da one najpreciznije odražavaju promjene u ključnim obilježjima upalnog fenotipa OA koljena tj. u boli, osjećaju ukočenosti, izljevu, opsegu pokreta i škripanju u koljenu. KOOS upitnik validiran je na hrvatskom jeziku te je dostupan na službenoj mrežnoj stranici (158).

WOMAC upitnik, jedan od najčešće korištenih instrumenata za procjenu kliničkih ishoda kod OA koljena i kuka, obuhvaća tri podskale koje procjenjuju bol (5 pitanja), ukočenost (2 pitanja) i funkcionalnu sposobnost (17 pitanja) te ukupni skor koji predstavlja zbroj svih podskala (159). Svako pitanje ocjenjuje se na Likertovoj skali od 0 („bez problema“) do 4 („vrlo teško“), a rezultati se mogu prikazivati kao zbroj bodova (0–96) ili transformirati u skalu od 0 do 100, gdje viši rezultat označava teže simptome. WOMAC je validiran na hrvatskom jeziku te je, kao i KOOS, javno dostupan u hrvatskoj verziji putem službene mrežne stranice (160). U ovom istraživanju korištena je apsolutna skala tj. zbroj bodova prema Likertovim ocjenama za svaku podskalu pitanja i za ukupni skor.

VAS ljestvica korištena je za procjenu intenziteta boli u mirovanju i pri kretanju. Ispitanici su subjektivno označavali razinu boli od 0 do 10 pri čemu 0 označava stanje bez bolova, a 10 najjaču moguću bol. Za razliku od KOOS-a i WOMAC-a, VAS nije upitnik u užem smislu, već jednostavna numerička procjena subjektivnog doživljaja boli i kao takva ne zahtijeva kulturološku validaciju. Ova metoda omogućuje brzu i osjetljivu procjenu promjena u intenzitetu boli tijekom praćenja.

Kako bi se osigurala klinički značajna interpretacija rezultata, uz analizu kontinuiranih vrijednosti izračunat je i status odgovora na terapiju (engl. *responder status*) prema unaprijed definiranim pragovima minimalne klinički značajne razlike (engl. *Minimal Clinically Important Difference*, MCID). U ovom su istraživanju definirani pragovi: poboljšanje od najmanje 10 bodova za KOOS Bol, 15 bodova za WOMAC Ukupni skor i 3 boda za VAS pri kretanju (161–167). Ispitanici s početnim vrijednostima koje su premašivale unaprijed definirane pragove učinka stropa ili učinka poda (engl. *ceiling effect* / *floor effect*) isključeni su iz analize odgovora na liječenje, budući da visoke (KOOS Bol > 85) ili niske (WOMAC Ukupni skor < 15 i VAS pri kretanju < 3) početne vrijednosti nisu dopuštale detektiranje klinički relevantnog poboljšanja. Pragovi MCID

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. MATERIJAL I METODE**

vrijednosti i kriteriji učinka stropa odabrani su prema relevantnim međunarodnim publikacijama koje su validirale iste pokazatelje za populaciju bolesnika s OA koljena (161–167).

Kombiniranom primjenom navedenih upitnika omogućena je detaljna i pouzdana procjena subjektivnog učinka liječenja, kako u pogledu smanjenja boli, tako i poboljšanja funkcionalnosti i kvalitete života bolesnika s OA koljena. Rezultati dobiveni kliničkim upitnicima uspoređeni su s objektivnim pokazateljima morfoloških i biokemijskih promjena u zglobu, dobivenima primjenom radioloških i laboratorijskih metoda, čime je osigurana sveobuhvatna procjena učinkovitosti liječenja.

#### **4.3.4. Radiološke metode**

Radiološka evaluacija provedena je s ciljem objektivizacije strukturnih i biokemijskih promjena u zglobu koljena nakon primjene MFAT i HA terapije. U tu svrhu korištene su dvije komplementarne MRI metode: MOAKS kao semikvantitativni alat za procjenu morfoloških i upalnih promjena te dGEMRIC kao kvantitativna metoda za procjenu biokemijskog sastava zglobne hrskavice. Ove dvije tehnike omogućile su istodobnu procjenu makrostrukturnih i mikrostrukturnih aspekata zgloba, čime je ostvarena sveobuhvatna analiza učinaka terapijskih intervencija.

Sva MRI snimanja provedena su na uređaju Siemens MAGNETOM® Lumina 3T (Siemens Healthineers, Erlangen, Njemačka), a interpretaciju i analizu svih nalaza izveo je isti iskusni muskuloskeletni radiolog. Radiolog nije bio upoznat s alokacijom pacijenata u terapijske skupine, čime je osigurana metodološka nepristranost i dosljednost u analizi svih snimki.

U ovom istraživanju MOAKS metoda korištena je kako bi se kvantificirale i usporedile promjene zglobnih struktura kroz tri vremenske točke: prije terapijske intervencije te 1 i 6 mjeseci nakon liječenja. Poseban je naglasak stavljen na praćenje promjena u podskali za sinovitis i izljev, koja kvantificira količinu zglobne tekućine i stupanj distenzije zglobne čahure, kao važan odraz upalnog statusa koljena. U sustavu MOAKS, ocjena manja od 2 ukazuje na fiziološku količinu zglobne tekućine ili blagi

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. MATERIJAL I METODE**

izljev bez klinički značajne upale, dok ocjene 2 i 3 označavaju izraženiji izljev ili sinovijalnu hipertrofiju. Upravo je ovaj kriterij korišten u fenotipskoj klasifikaciji ispitanika. U istraživanje su uključeni samo bolesnici s MOAKS sinovitis/izljev skorom 2 ili 3, što je omogućilo odabir upalnog fenotipa OA koljena.

Sva MRI snimanja ocijenio je isti iskusni muskuloskeletni radiolog, koji nije bio upoznat s grupnom alokacijom pacijenata. Na taj je način osigurana metodološka dosljednost i uklonjen rizik od subjektivne pristranosti u interpretaciji nalaza. MOAKS metoda time je poslužila kao pouzdan alat za objektivno praćenje strukturnih i upalnih promjena u koljenu tijekom praćenja, te kao most između kliničkih simptoma i morfoloških pokazatelja bolesti.

U ovom istraživanju dGEMRIC analiza provedena je radi objektivne evaluacije promjena u sastavu zglobne hrskavice tijekom šestomjesečnog praćenja, s ciljem utvrđivanja potencijalnog regenerativnog učinka MFAT terapije u usporedbi s HA. Svim ispitanicima intravenski je aplicirano kontrastno sredstvo gadolinij Gd-DTPA (Dotarem®, Guerbet, Francuska) u dozi od 0,2 mmol/kg tjelesne mase (odnosno 0,4 mL/kg). Neposredno nakon aplikacije kontrasta ispitanici su hodali 20 minuta radi omogućavanja ravnomjerne difuzije kontrasta u sinovijalnu tekućinu i zglobnu hrskavicu. Magnetska rezonancija koljena provedena je 120 minuta nakon aplikacije kontrasta na uređaju Siemens MAGNETOM® Lumina 3T (Siemens Healthineers, Erlangen, Njemačka), uz potpuno standardizirane uvjete magnetskog polja, temperature i koncentracije kontrasta.

Analiza dGEMRIC sekvenci obavljena je prije terapijske intervencije i šest mjeseci nakon nje, u sklopu istog radiološkog protokola. Kvantitativna analiza T1 relaksacijskih vremena provedena je pomoću softvera syngoMapIt (Siemens, Erlangen, Njemačka). Za svako koljeno definirano je sedam regija od interesa (ROI) koje obuhvaćaju anatomske najrelevantnije zone hijaline hrskavice: medijalni i lateralni kondil femura, medijalni i lateralni kondil tibije, trohleju te medijalnu i lateralnu fasetu patele (72, 168). Regije su pažljivo označene na područjima najveće debljine hrskavice (tzv. *hotspot*), a u svakoj regiji izmjerene su vrijednosti dGEMRIC indeksa na početku i nakon šest mjeseci. Za potrebe usporedne analize, iste anatomske zone označene su u obje

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno..** MATERIJAL I METODE  
vremenske točke kako bi se izbjegle varijacije u odabiru mjernog područja i osigurala točnost praćenja promjena u GAG sadržaju.

Svi MR prikazi analizirani su od strane istog iskusnog muskuloskeletnog radiologa koji nije bio upoznat s terapijskom alokacijom pacijenata, čime je dodatno osigurana objektivnost i metodološka ujednačenost analize. Artikulacijske površine bez prisutne hrskavice, u kojima mjerenje dGEMRIC indeksa nije bilo moguće, označene su vrijednošću „0“ kako bi se izbjeglo iskrivljenje prosječnih vrijednosti.

Kombiniranom primjenom semikvantitativne MOAKS metode i kvantitativne dGEMRIC analize omogućeno je sveobuhvatno praćenje strukturnih i biokemijskih promjena u zglobu koljena nakon primjene MFAT i HA terapije. Dok MOAKS pruža uvid u morfološke i upalne aspekte bolesti, dGEMRIC omogućuje kvantifikaciju promjena u biokemijskom sastavu hrskavice, osobito u pogledu koncentracije GAG. Na taj način ove dvije metode međusobno se nadopunjuju, čineći snažan alat za objektivnu evaluaciju učinaka liječenja OA koljena.

#### **4.3.5. Biokemijske metode**

Unutar izabranog fenotipa izvršena je analiza uzoraka plazme i sinovijalne tekućine u cilju utvrđivanja prisutnosti i vrijednosti citokina, kemokina, te analiza fenilalanina u krvnoj plazmi kao temelj za identifikaciju potencijalnih biomarkera vezanih uz nastanak i progresiju OA koljena. Uz navedeno utvrđena je prisutnost i koncentracija citokina i kemokina u uzorcima MFAT. Posebno izrađeni panel citokina i kemokina razvijen je za ovo istraživanje. Panel je uključio sljedeće citokine i kemokine: IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP1, TIMP2, TIMP4, sICAM-1, V-CAM-1, VEGF, Leptin, CCL2 (MCP1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CXCL-12 (SDF-1). Navedene analize izvršene su metodom multiplex ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) na uređaju Bio-Plex® 200 System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD) u laboratoriju Labena d.o.o. (Ljubljana, Slovenija). Koncentracije fenilalanina u krvnoj plazmi analizirane su metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC; engl.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. MATERIJAL I METODE**

*High performance liquid chromatography*) pomoću ClinRep® Complete Kit: Aromatic Amino Acids (plasma) HPLC kit-a (RECIPE Chemicals & Instruments GmbH, München, Njemačka) u laboratoriju KBC Ljubljana posredstvom Labena d.o.o. S obzirom na visoke troškove zasebnih analiza, analize su izvršene u skupinama tj. analizirano je više uzoraka u isto vrijeme na istom uređaju. Prikupljeni uzorci plazme, sinovijalne tekućine i MFAT bili su pripremljeni i čuvani na -80 °C u Banci tkiva i stanica Klinike za traumatologiju KBC Sestre milosrdnice te potom, po skupljenom dovoljnom broju uzoraka za analizu, u skupinama te u odgovarajućim spremnicima sa suhim ledom i u odgovarajućim uvjetima, transportirani u laboratorij Labena d.o.o. Prije početka istraživanja, protokol krioprezervacije uzoraka te naknadne analize istih je validiran te je potvrđeno da čuvanje uzoraka ne utječe na rezultate analiza.

Nakon izvršenih početnih analiza prije terapijske intervencije, ponovljene analize citokina i kemokina iz sinovijalne tekućine te krvne plazme izvršene su 1 mjesec nakon inicijalnog terapijskog zahvata u svih 53 bolesnika izabranog fenotipa, kao i analiza fenilalanina u plazmi. Fenilalanin te citokini i kemokini u krvnoj plazmi analizirani su i 6 mjeseci poslije zahvata intraartikularne aplikacije MFAT u jednoj te HA u drugoj skupini.

#### **4.3.6. Objektivizacija mikrofragmentiranog masnog tkiva**

Prilikom pripremanja pripravka MFAT za intraartikularnu aplikaciju u koljena ispitanika u istraživanju, izdvojeni su uzorci MFAT za analizu metodom protočne citometrije radi dobivanja informacija o broju stanica, vijabilnosti stanica, vrstama i omjerima stanica unutar MFAT. U istraživanju su korištena dva protočna citometra: CytoFlex (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) te DyFlex (Beckman Coulter, Miami, FL, SAD). Oba citometra imala su istu konfiguraciju tj. iste detektore za analizu fluorescencije te su bili standardizirani na jednaki način čime su stvoreni preduvjeti da rezultati analize uzoraka mjerenih na različitim uređajima budu usporedivi.

Analizirani su ukupni broj nukleiranih stanica te posebno leukociti (CD45+), a unutar CD45- frakcije identificirane su sljedeće fenotipske populacije stanica: endotelni progenitori (CD31+CD34+CD73±CD90±CD105±CD146±), periciti (CD31-CD34-CD73±CD90+CD105-CD146+) i supraadventicijske stromalne stanice

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno..** MATERIJAL I METODE (CD31–CD34+CD73<sup>high</sup>CD90+CD105–CD146–). Unutar populacije endotelnih progenitorskih stanica, dodatno su identificirane one sa sniženom ekspresijom CD31 i CD34 markera (CD34<sup>low</sup>CD31<sup>low</sup>) te one s povišenom ekspresijom istih markera (CD34<sup>high</sup>CD31<sup>high</sup>). Pomoću citometra analizirana je i vijabilnost stanica sadržanih u uzorcima MFAT. Također, analizirani su udjeli svake stanične populacije u ukupnom broju stanica.

#### **4.4. Sigurnost i zaštita ispitanika i istraživanja**

Osiguravanje sigurnosti ispitanika i zaštite integriteta istraživanja predstavljalo je jedan od temeljnih zahtjeva tijekom provedbe ovog kliničkog istraživanja. S obzirom na biološku prirodu primijenjenih terapijskih intervencija te kompleksnost pratećih biokemijskih i radioloških analiza, bilo je nužno ugraditi jasne mehanizme kontrole rizika i očuvanja znanstvene valjanosti podataka. Svi postupci provedeni su u skladu s Deklaracijom iz Helsinkija, GCP smjernicama te važećim zakonskim propisima Republike Hrvatske. Poseban naglasak stavljen je na praćenje sigurnosti ispitanika, kontrolu uporabe lijekova koji bi mogli interferirati s ishodom istraživanja, sustavno prikupljanje i upravljanje podacima te zaštitu osobnih informacija sudionika u skladu s Općom uredbom o zaštiti podataka (GDPR, 2016/679).

##### **4.4.1. Korištenje protuupalnih lijekova tijekom istraživanja**

Uporaba nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAID) može negativno utjecati na procese cijeljenja i regeneracije tkiva, a njihovo produljeno poluvrijeme raspada u sinovijalnoj tekućini može mijenjati koncentracijske profile citokina i kemokina u sinovijalnoj tekućini i perifernoj krvi. Budući da bi takvi učinci mogli kompromitirati interpretaciju biokemijskih rezultata i narušiti integritet istraživanja, ispitanicima je naloženo da ne uzimaju NSAID najmanje sedam dana prije aplikacije MFAT ili HA, kao ni tijekom cjelokupnog šestomjesečnog praćenja.

Sudionicima je, u slučaju potrebe za analgetskom terapijom, preporučen paracetamol u dozi od 250–1000 mg (maksimalno 4000 mg dnevno). Uporaba paracetamola nije

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. MATERIJAL I METODE**

se smatrala kriterijem isključenja jer taj lijek nema značajan protuupalni učinak niti utječe na biokemijski profil sinovijalne tekućine i krvi. Ispitanici su bili dužni prije uzimanja bilo kojeg lijeka konzultirati liječnika uključenog u studiju.

#### **4.4.2. Praćenje nuspojava i sigurnosni nadzor**

Sigurnosni nadzor provodio se kontinuirano tijekom cijelog istraživanja. Glavni istražitelj i suradnici redovito su analizirali podatke radi identifikacije mogućih neželjenih događaja (nuspojava) povezanih s liječenjem, uključujući: umjereni do izraženi izljev, sinovitis, lokalnu ili sistemsku infekciju te znakove toksičnosti.

Studija bi bila privremeno obustavljena u slučaju da više od jednog od prvih deset uključenih pacijenata u ispitivanoj skupini doživi ozbiljnu nuspojavu koja se može izravno pripisati istraživanoj intervenciji. Ozbiljne nuspojave definirane su kao one koje su opasne po život, zahtijevaju hospitalizaciju, ili rezultiraju trajnim oštećenjem zdravlja, invaliditetom ili smrtnim ishodom. Svi neželjeni događaji dokumentirani su, analizirani te prijavljeni zajedno s objavljenim rezultatima istraživanja.

#### **4.4.3. Prikupljanje i upravljanje podacima**

Demografski podaci, rezultati upitnika i svi ostali istraživački podatci pohranjivani su u elektroničkoj bazi podataka izrađenoj posebno za potrebe ovog istraživanja. Primarni izvorni dokumenti čuvani su u registratorima ispitanika unutar zaključanog prostora Specijalne bolnice Sv. Katarina, gdje je provedena i centralna pohrana uzoraka i zapisa.

Kvaliteta prikupljenih podataka osiguravana je redovitim provjerama valjanosti i raspona vrijednosti, uz ručnu i računalnu detekciju mogućih pogrešaka. Proces upravljanja podacima uključivao je čišćenje baze, kontrolu distribucije varijabli i pripremu izvedenih parametara za statističku analizu. Svako odstupanje od protokola bilježilo se i arhiviralo radi transparentnosti i sljedivosti.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. MATERIJAL I METODE**

#### **4.4.4. Zaštita osobnih podataka i etička načela**

Svi sudionici potpisali su pisani informirani pristanak prije uključivanja u istraživanje. Prije randomizacije provedena je i usmena procjena razumijevanja sadržaja pristanka kako bi se osigurala puna informiranost i dobrovoljno sudjelovanje. Radi zaštite povjerljivosti, svi uzorci i prikupljeni podaci označeni su jedinstvenim identifikacijskim kodovima, a samo istraživači Specijalne bolnice Sv. Katarina imali su pristup poveznici između identifikacijskog koda i osobnih podataka.

Konačni skup podataka korišten za analize bio je anonimiziran te nije sadržavao informacije koje bi mogle identificirati pojedine ispitanike. Anonimizirani podaci trajno su pohranjeni i kao takvi korišteni u statističkoj analizi, uz mogućnost pristupa svim članovima istraživačkog tima. Svi rezultati, pozitivni ili negativni, bit će objavljeni u znanstvenim publikacijama i mogu biti prikazani na stručnim kongresima i znanstvenim skupovima prije završnog objavljivanja, uz potpuno poštivanje etičkih i pravnih načela.

#### **4.5. Statističke metode**

Kategorijske varijable prikazane su apsolutnim i relativnim frekvencijama, dok su numeričke i ordinalne varijable opisane aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju normalne distribucije, odnosno medijanom i interkvartilnim rasponom kada je distribucija odstupala od normale ili kada je broj ispitanika u podskupinama bio mali. Normalnost raspodjele ispitana je Shapiro–Wilkovim testom. Kod statističke analize podataka na relativno malom uzorku ( $N < 30$ ) prednost je dana neparametrijskim testovima, čak i u slučaju normalne raspodjele podataka dobivene Shapiro-Wilkovim testom.

Za procjenu promjena unutar skupina korišten je t-test za zavisne uzorke kada su raspodjele bile normalne, a broj uzoraka veći od 30 (dGEMRIC indeks za pojedine regije), dok je za većinu ishoda, uključujući KOOS, WOMAC, VAS, MOAKS podskale, citokine, kemokine, fenilalanin i parametre protočne citometrije, korišten Wilcoxonov test zbog nenormalnih distribucija ili malih uzoraka. Promjene u sinovijalnoj tekućini analizirane su isključivo Wilcoxonovim testom zbog vrlo malog broja uparenih uzoraka.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. MATERIJAL I METODE**

Razlike između skupina MFAT i HA ispitane su Mann–Whitney U testom za sve ordinalne i nenormalno distribuirane numeričke podatke, uključujući kliničke upitnike, radiološke ishode, koncentracije citokina i fenilalanina te parametre protočne citometrije. Parametrijski t-test za nezavisne uzorke nije korišten zbog razlike u broju uzoraka među skupinama i smanjenog broja uzoraka u HA skupini. Kategorijske varijable uspoređene su Hi-kvadrat testom ( $\chi^2$ ) ili Fisherovim egzaktnim testom kada su očekivane frekvencije bile niske.

S obzirom na ciljeve istraživanja, heterogenost subjektivnih kliničkih i objektivnih pokazatelja te potrebu za jasnom kliničkom interpretacijom, primijenjen je pristup temeljen na *responder* analizi umjesto klasičnih korelacijskih metoda. Klinički *responderi* definirani su unaprijed prema međunarodno prihvaćenim pragovima: poboljšanje KOOS Bol  $\geq 10$  bodova, WOMAC Ukupni skor  $\geq 15$  bodova i smanjenje VAS pri kretanju  $\geq 3$  cm. Kod *responder* analize provedeno je i isključivanje ispitanika s početno visokim (KOOS Bol) ili početno niskim (WOMAC Ukupni skor, VAS u kretanju) vrijednostima skora kako bi se smanjila mogućnost učinka stropa ili učinka poda.

Strukturalni odgovor procijenjen je metodom dGEMRIC, pri čemu je porast indeksa  $\geq 10\%$  u pojedinom ROI-u definiran kao klinički značajan, dok je ukupni dGEMRIC odgovor definiran kao prisutnost takvog poboljšanja u najmanje 3 od 7 analiziranih regija koljena. Povezanost kliničkog i strukturalnog odgovora ispitana je Fisherovim egzaktnim testom usporedbom KOOS Bol *responder* statusa i dGEMRIC *responder* statusa.

MOAKS podskale analizirane su kao ordinalne varijable te su njihove promjene kroz vrijeme procijenjene Wilcoxonovim testom, a razlike između terapijskih skupina Mann–Whitney U testom.

Koncentracije citokina i kemokina u plazmi i sinovijalnoj tekućini te vrijednosti fenilalanina analizirane su neparametrijskim testovima zbog male veličine uzorka i varijabilnosti distribucija, pri čemu su promjene unutar skupina ispitane Wilcoxonovim testom, a razlike između skupina Mann–Whitney U testom.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. MATERIJAL I METODE**

Parametri protočne citometrije (broj stanica, vijabilnost, udjeli pericita, supraadventicijskih stromalnih stanica, endotelnih progenitora i endotelnih stanica) analizirani su istim statističkim pristupom, uključujući i usporedbu staničnih parametara između kliničkih i radioloških *respondera* i *non-respondera*.

Statistička analiza provedena je korištenjem softverskog paketa IBM SPSS Statistics verzija 26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, SAD), dok su svi grafikoni izrađeni u programu GraphPad Prism verzija 9.4.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, SAD). Analiza je provedena prema načelu per-protocol, uključujući isključivo ispitanike koji su primili dodijeljenu intervenciju i dovršili praćenje bez značajnih protokolnih odstupanja. Razina statističke značajnosti postavljena je na  $p < 0,05$ . Prethodno definirana snaga testa (70 – 80%) odnosila se na glavne ishode istraživanja, uključujući kliničke upitnike i dGEMRIC, dok su biokemijske i citometrijske analize interpretirane uzimajući u obzir ograničenja uzorka.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

## 5. REZULTATI

### 5.1. Karakteristike ispitanika

Ukupno je u ortopedskim ambulantom pregledano 18589 pacijenata, od čega je 339 bolesnika s OA koljena detaljno procijenjeno za uključanje u istraživanje. U istraživanje je uključeno 53 bolesnika s OA koljena koji su zadovoljavali kriterije uključanja te su randomizirani u dvije skupine liječenja: ispitivanu skupinu, odnosno skupinu liječenu aplikacijom MFAT (n = 35) te kontrolnu skupinu liječenu aplikacijom HA (n = 18). Prosječna dob cijele kohorte iznosila je  $55,6 \pm 9,4$  godine. Unutar kohorte, bilo je 40 (75,5%) žena i 13 (24,5%) muškaraca. Nije bilo značajnih razlika među skupinama prema dobi, spolu ili indeksu tjelesne mase (tablica 5.1.1).

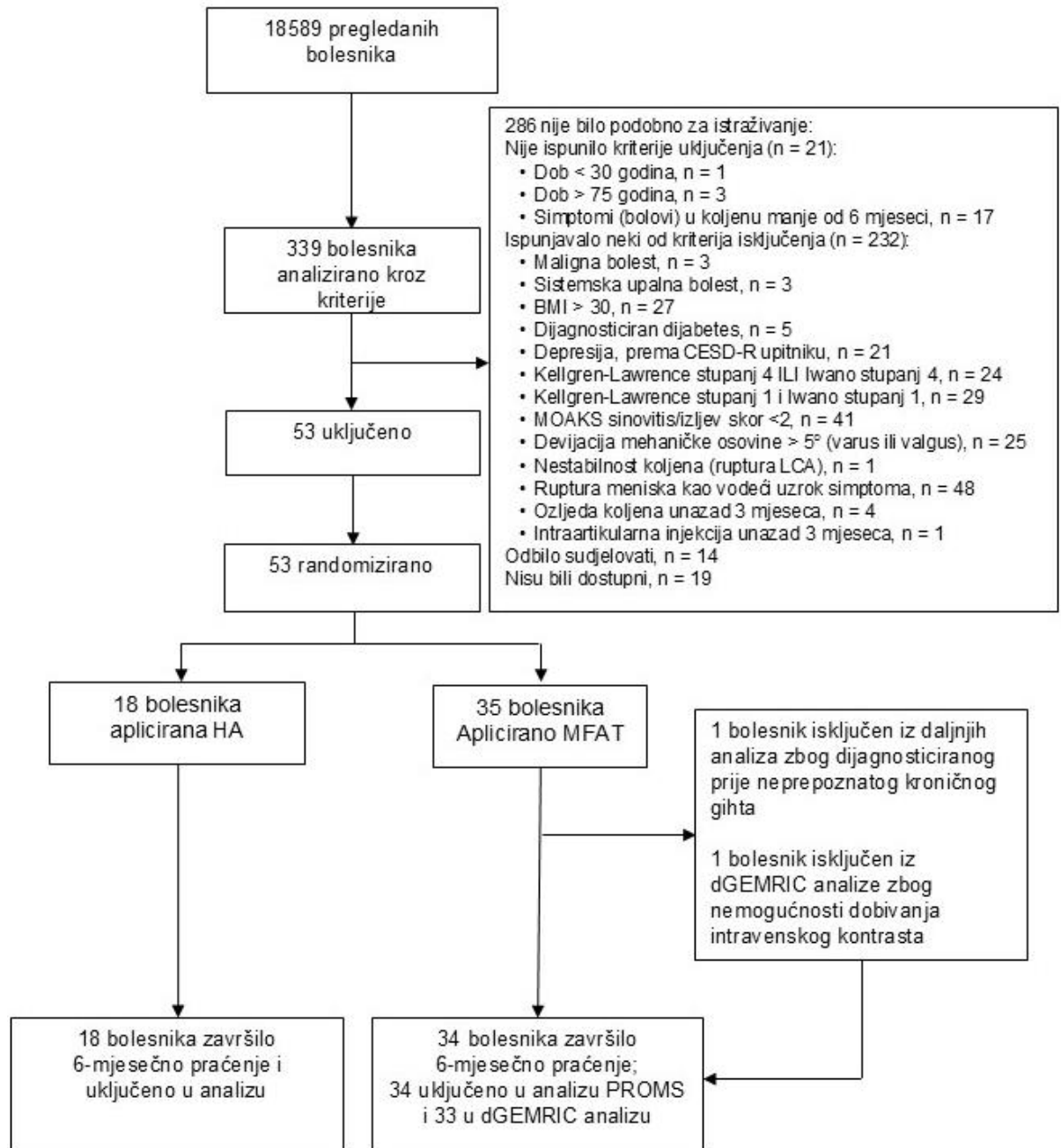
**Tablica** Pogreška! Za dodavanje Heading 2 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno..1. **Osnovne demografske značajke na početku praćenja**

	MFAT (n = 35)	HA (n = 18)	p
Dob (godine, aritmetička sredina $\pm$ SD)	53,9 $\pm$ 9,0	58,7 $\pm$ 9,5	0,104*
Spol (% žena)	74,3%	77,8%	0,780*
BMI (kg/m <sup>2</sup> , aritmetička sredina $\pm$ SD)	26,6 $\pm$ 2,4	26,8 $\pm$ 2,5	0,851*

\* Mann-Whitney U test; \* Hi-kvadrat test; SD – standardna devijacija (SD); MFAT – mikrofragmentirano masno tkivo; HA – hijaluronska kiselina.

Jedan ispitanik iz ispitivane skupine isključen je iz svih postterapijskih analiza zbog naknadno potvrđenog kroničnog gihta koji je bio dominantan uzrok bolesnikovih tegoba s koljenom. Jedna ispitanica isključena je iz dGEMRIC analize zbog neuspjele primjene kontrasta na kontrolnom MR-u nakon 6 mjeseci. Detaljni prikaz stratifikacije bolesnika te tijeka ispitanika kroz istraživanje opisan je u CONSORT dijagramu (slika 5.1.1).

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno..** **REZULTATI**



**Slika** Pogreška! Za dodavanje Heading 2 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno..1. **CONSORT dijagram tijekom ispitanika koji prikazuje regrutaciju, provjeru podobnosti, randomizaciju, praćenje i analizu.** Od 339 bolesnika kod kojih su se detaljno analizirali kriteriji uključivanja/isključenja, 53 bolesnika randomizirana su za terapijsku intervenciju, odnosno aplikaciju mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) ili hijaluronske kiseline (HA) u zglob koljena. Podobnost je određena korištenjem strogih radioloških, kliničkih i MR kriterija fenotipizacije. Razlozi isključenja bolesnika iz istraživanja detaljno su navedeni, uključujući specifične razloge zbog kojih su određeni bolesnici isključeni iz postterapijskih analiza.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

## **5.2. Klinički ishodi (PROMs)**

Na početku praćenja nije bilo statistički značajnih razlika između MFAT i HA skupine u KOOS podskalama, WOMAC (ukupno i podskale) ni u VAS (bol u mirovanju i kretanju), što potvrđuje usporedivost skupina pri uključenju.

### **5.2.1. KOOS**

Obje su skupine imale statistički značajna poboljšanja u svim KOOS podskalama (Simptomi, Bol, ADL, Sport/Rec, QoL) 1 i 6 mjeseci nakon intervencije u odnosu na početno stanje ( $p < 0,01$ , Wilcoxonov test). U MFAT skupini poboljšanja su bila konzistentna i progresivna. Sve podskale dodatno su se značajno poboljšale u razdoblju praćenja od 1 do 6 mjeseci nakon intervencije ( $p < 0,01$ , Wilcoxonov test). U HA skupini poboljšanja su bila značajna od početnih vrijednosti do 1. i 6. mjeseca, no dodatno poboljšanje između 1. i 6. mjeseca uglavnom nije bilo značajno ( $p > 0,05$ , Wilcoxonov test), što upućuje na plato u kliničkom odgovoru nakon početnog kliničkog poboljšanja. Iznimno, kvaliteta života ispitanika u HA skupini, prema podskali KOOS upitnika za kvalitetu života (KOOS QoL), dodatno se poboljšala između 1. i 6. mjeseca praćenja ( $p = 0,028$ , Wilcoxonov test). Potpuna deskriptivna statistika za svaku KOOS podskalu u sve tri vremenske točke (početno mjerenje, 1 mjesec i 6 mjeseci), uključujući unutargrupne usporedbe i p-vrijednosti, prikazana je u tablici 5.2.1.1.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

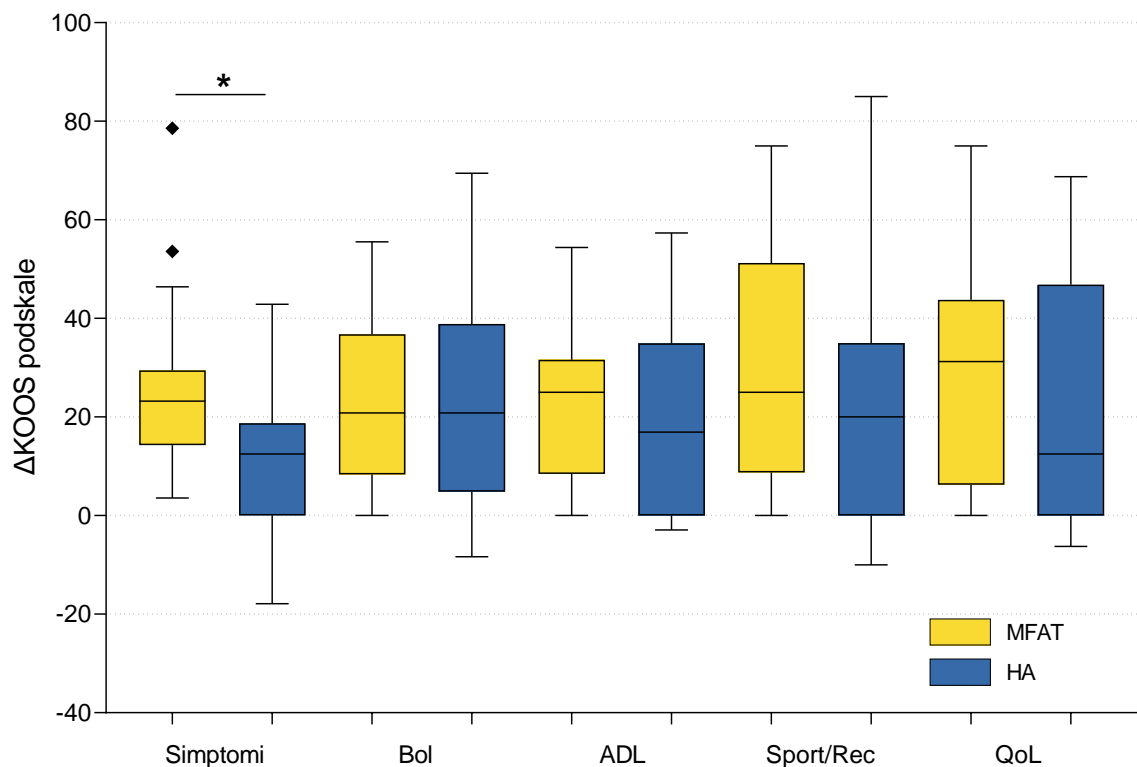
**Tablica 5.2.1.1. Deskriptivna statistika za svaku KOOS podskalu prije intervencije (0M), nakon 1 mjeseca (1M) i nakon 6 mjeseci (6M) od intraartikularne aplikacije mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) ili hijaluronske kiseline (HA).**

KOOS podskale	Skupina	0M (aritmetička sredina ± SD)	1M (aritmetička sredina ± SD)	6M (aritmetička sredina ± SD)	p (1M - 0M)*	p (6M -0M)*	p (6M - 1M)*
KOOS Simptomi	MFAT	62,5 ± 19,8	77,5 ± 16,7	87,5 ± 14,1	< 0,001 <sup>+</sup>	< 0,001 <sup>+</sup>	< 0,001 <sup>+</sup>
	HA	68,8 ± 19,7	80,4 ± 16,0	81,6 ± 21,4	0,001 <sup>+</sup>	0,008 <sup>+</sup>	0,387
KOOS Bol	MFAT	56,4 ± 19,0	70,8 ± 18,2	79,4 ± 19,2	< 0,001 <sup>+</sup>	< 0,001 <sup>+</sup>	< 0,001 <sup>+</sup>
	HA	57,4 ± 18,7	72,2 ± 16,1	79,8 ± 19,3	0,001 <sup>+</sup>	0,001 <sup>+</sup>	0,060
KOOS ADL	MFAT	58,5 ± 19,4	72,4 ± 19,4	81,1 ± 19,6	< 0,001 <sup>+</sup>	< 0,001 <sup>+</sup>	< 0,001 <sup>+</sup>
	HA	59,4 ± 20,5	71,5 ± 17,9	78,7 ± 20,7	0,001 <sup>+</sup>	0,002 <sup>+</sup>	0,186
KOOS Sport/Rec	MFAT	24,8 ± 22,2	39,6 ± 30,3	54,6 ± 30,7	< 0,001 <sup>+</sup>	< 0,001 <sup>+</sup>	< 0,001 <sup>+</sup>
	HA	25,8 ± 20,6	37,8 ± 22,6	45,6 ± 26,1	0,002 <sup>+</sup>	0,004 <sup>+</sup>	0,113
KOOS QoL	MFAT	30,0 ± 17,6	43,9 ± 23,4	59,7 ± 22,8	< 0,001 <sup>+</sup>	< 0,001 <sup>+</sup>	< 0,001 <sup>+</sup>
	HA	33,7 ± 18,7	44,8 ± 22,1	57,3 ± 26,7	0,002 <sup>+</sup>	0,002 <sup>+</sup>	0,028 <sup>+</sup>

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Tablica dodatno uključuje unutargrupne usporedbe za svaku podskalu kroz sljedeće vremenske intervale: 1 mjesec u odnosu na početne vrijednosti (1M - 0M), 6 mjeseci u odnosu na početne vrijednosti (6M – 0M) te 6 mjeseci u odnosu na 1 mjesec nakon intervencije (6M – 1M). \* p-vrijednosti izračunate su korištenjem Wilcoxonovog testa; <sup>+</sup> p < 0,05; KOOS – Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score; ADL – Funkcioniranje u svakodnevnom životu (engl. *Activities of Daily Living*); Sport/Rec – Funkcioniranje u sportskim i slobodnim aktivnostima (engl. *Sports and Recreational Activities*); QoL – Kvaliteta života (engl. *Quality of Life*).

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

Uspoređujući srednje vrijednosti tj. aritmetičke sredine (engl. *mean*) za sve podskale KOOS upitnika, vidljivo je kako je skupina liječena aplikacijom MFAT bilježila veće promjene tj. poboljšanja u odnosu na skupinu liječenu aplikacijom HA (tablica 5.2.1.2). Međutim, usporedbe među skupinama u poboljšanju KOOS podskala nakon 6 mjeseci od inicijalnog liječenja nisu pokazale statistički značajne razlike za bol, funkcioniranje u svakodnevnom životu, funkcioniranje u sportskim i slobodnim aktivnostima te kvalitetu života ( $p > 0,05$ , Mann–Whitney U test). Međutim, skupina koja je bila liječena aplikacijom MFAT pokazala je statistički značajno veće poboljšanje podskale KOOS Simptomi od HA skupine ( $p = 0,008$ ), što odražava superiorniji učinak MFAT na simptome zgloba poput ukočenosti, pokretljivosti, otekline i krepitacija (slika 5.2.1.1, tablica 5.2.1.2).



**Slika 5.2.1.1. Usporedba promjena KOOS podskala (razlika stanja nakon 6 mjeseci od intervencije i početnog stanja) između skupina liječenih mikrofragmentiranim masnim tkivom (MFAT) i hijaluronskom kiselinom (HA).** Box-plot dijagrami prikazuju distribuciju promjena rezultata, s medijanom, interkvartilnim rasponom i odstupajućim vrijednostima (engl. *outliers*). Skupina MFAT pokazala je značajno veće poboljšanje u KOOS Simptomi podskali ( $p = 0,008$ ), dok u ostalim podskalama nisu nađene značajne razlike među skupinama. \*  $p < 0,05$ , Mann–Whitney U test. Kvadrati predstavljaju odstupajuće vrijednosti. KOOS – Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score; ADL – Funkcioniranje u svakodnevnom životu (engl. *Activities of Daily Living*); Sport/Rec – Funkcioniranje u sportskim i slobodnim aktivnostima (engl. *Sports and Recreational Activities*); QoL – Kvaliteta života (engl. *Quality of Life*).

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

**Tablica 5.2.1.2. Deskriptivna statistika za promjene KOOS podskala nakon 6 mjeseci od intraartikularne aplikacije mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) ili hijaluronske kiseline (HA)**

KOOS podskala	Skupina	Aritmetička sredina $\pm$ SD	Medijan (Q1 – Q3)	p*
$\Delta$ KOOS Bol	HA	22,4 $\pm$ 22,0	20,8 (5,6 – 38,9)	0,623
	MFAT	23,0 $\pm$ 15,0	20,8 (8,3 – 36,1)	
$\Delta$ KOOS Simptomi	HA	12,7 $\pm$ 16,0	12,5 (0,0 – 17,9)	0,008 <sup>+</sup>
	MFAT	25,0 $\pm$ 15,6	23,2 (14,3 – 28,6)	
$\Delta$ KOOS ADL	HA	19,3 $\pm$ 19,6	16,9 (0,0 – 33,8)	0,307
	MFAT	22,6 $\pm$ 14,8	25,0 (8,8 – 30,9)	
$\Delta$ KOOS Sport/Rec	HA	19,7 $\pm$ 23,7	20,0 (0,0 – 35,0)	0,122
	MFAT	29,7 $\pm$ 24,6	25,0 (10,0 – 50,0)	
$\Delta$ KOOS QoL	HA	23,6 $\pm$ 25,4	12,5 (0,0 – 43,8)	0,323
	MFAT	29,8 $\pm$ 22,0	31,3 (6,3 – 43,8)	

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu promjene nakon 6 mjeseci u odnosu na početno stanje, standardnu devijaciju (SD) te medijan s interkvartilnim rasponom (Q1 – Q3) za svaku skupinu, kao i p-vrijednost za statistički značajnu razliku među skupinama. Iako Mann–Whitney U test procjenjuje razlike u rangovima, prikazane su srednje vrijednosti kako bi se ilustrirala veličina kliničkog poboljšanja. \* Mann–Whitney U test; <sup>+</sup> p < 0,05; KOOS – *Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score*; ADL – Funkcioniranje u svakodnevnom životu (engl. *Activities of Daily Living*); Sport/Rec – Funkcioniranje u sportskim i slobodnim aktivnostima (engl. *Sports and Recreational Activities*); QoL – Kvaliteta života (engl. *Quality of Life*).

### 5.2.2. WOMAC

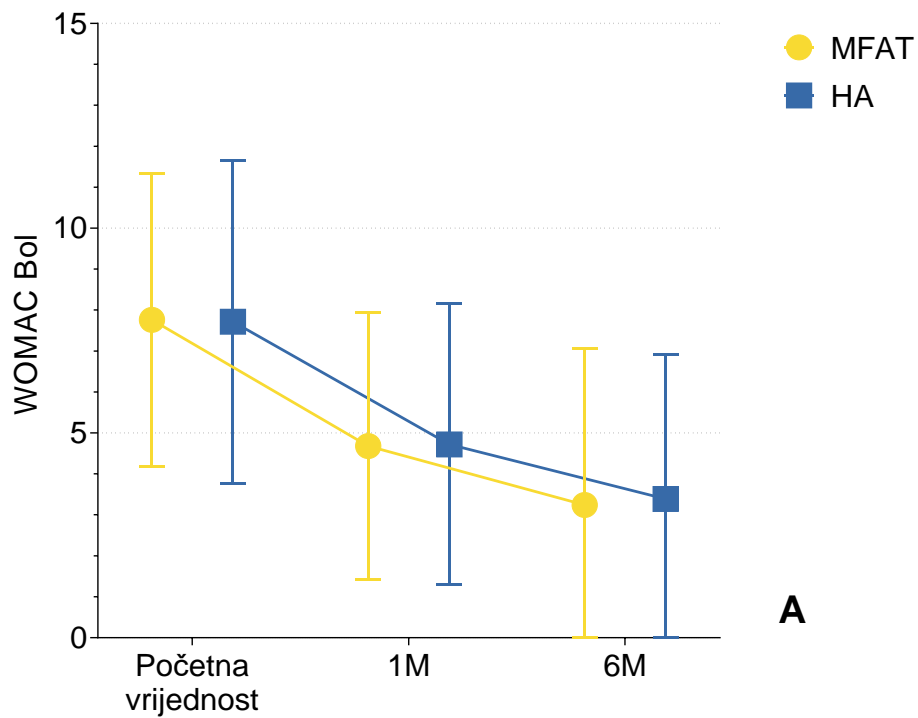
Objе skupine liječenja pokazale su značajna poboljšanja u svim WOMAC podskalama (Bol, Ukočenost, Funkcija i Ukupni skor) nakon 1 i 6 mjeseci u usporedbi s početnim stanjem (za sve unutargrupne usporedbe p < 0,01, Wilcoxonov test).

U MFAT skupini poboljšanja su bila kontinuirana, pri čemu su sve podskale pokazale statistički značajan napredak ne samo u razdoblju od početnog mjerenja do 1. mjeseca, nego i od 1. do 6. mjeseca (p < 0,01), što ukazuje na terapijski učinak koji se održava kroz vrijeme.

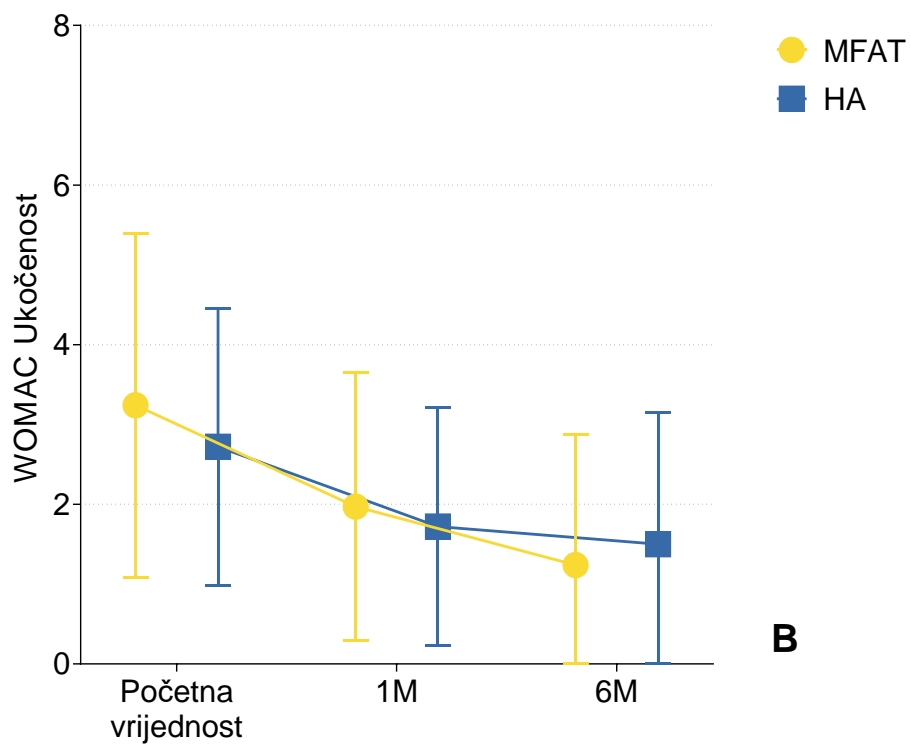
**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

Skupina HA ostvarila je značajna poboljšanja u svim podskalama WOMAC upitnika od početnog mjerenja do oba kontrolna pregleda ( $p < 0,01$ , Wilcoxonov test). Međutim, veličina dodatnog poboljšanja od 1. do 6. mjeseca bila je manja i nije dosegla statističku značajnost ni u jednoj podskali ( $p > 0,05$ , Wilcoxonov test), što sugerira da je glavnina kliničke koristi ostvarena u ranom postintervencijskom razdoblju, uz ograničen dodatni napredak nakon toga. Longitudinalni trendovi u svakoj podskali WOMAC upitnika prikazani su na slici 5.2.2.1. Deskriptivna statistika (srednja vrijednost  $\pm$  SD) za sve WOMAC podskale na početku, nakon 1 mjeseca i nakon 6 mjeseci u obje skupine, kao i p-vrijednosti unutargrupnih usporedbi za svako vremensko razdoblje, prikazani su u tablici 5.2.2.1.

Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI

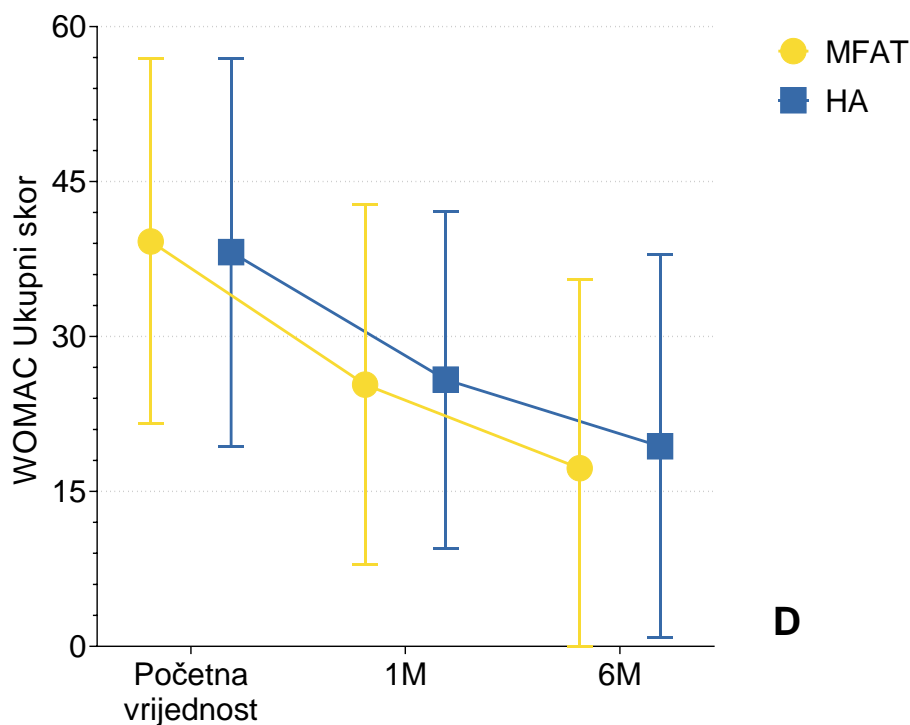
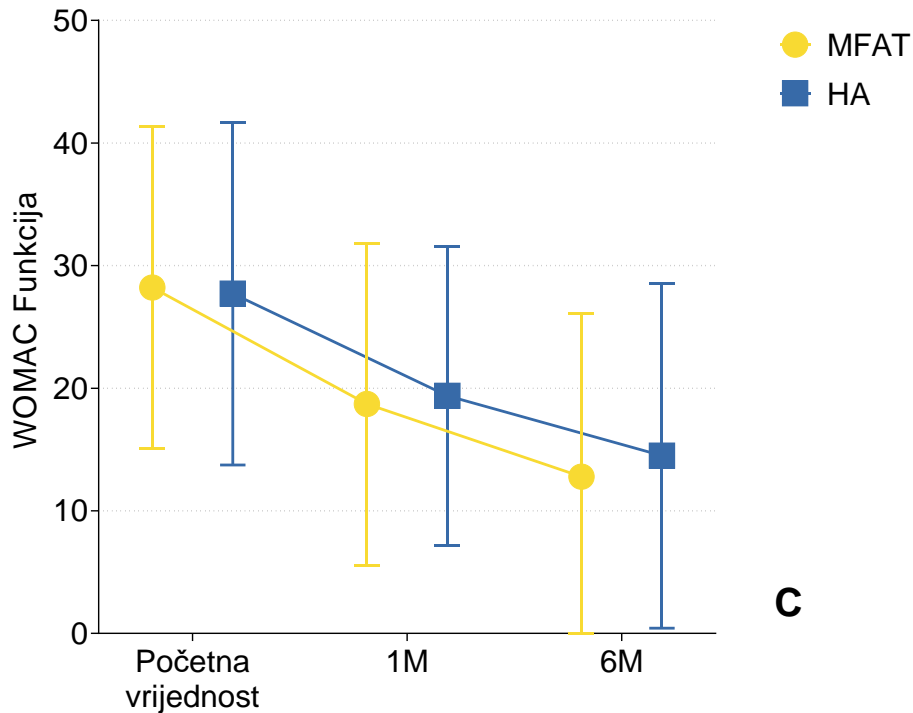


A



B

Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI



**Slika 5.2.2.1. Tijek vrijednosti WOMAC podskala (Bol, Ukočenost, Funkcija i Ukupni skor) kroz vrijeme nakon intraartikularne injekcije mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) ili hijaluronske kiseline (HA).** Svaki graf prikazuje srednje vrijednosti  $\pm$  SD na početku, nakon 1 mjeseca i nakon 6 mjeseci praćenja. U MFAT skupini su zabilježene statistički značajne promjene i nakon 1 mjeseca i nakon 6 mjeseci praćenja, kao i tijekom praćenja od 1. do 6. mjeseca ( $p < 0,01$ ), pokazujući trajan učinak nakon liječenja aplikacijom MFAT. Suprotno tome, u HA skupini su značajna poboljšanja postignuta od početnog mjerenja do 1. mjeseca ( $p < 0,01$ ), nakon čega nije bilo daljnjih značajnih promjena do 6. mjeseca ( $p > 0,05$ ), što upućuje na efekt platoa između 1. i 6. mjeseca.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

**Tablica 5.2.2.1. Deskriptivna statistika za svaku WOMAC prije intervencije (0M), nakon 1 mjeseca (1M) i nakon 6 mjeseci (6M) od intraartikularne aplikacije mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) ili hijaluronske kiseline (HA).**

WOMAC podskale	Skupina	0M (aritmetička sredina ± SD)	1M (aritmetička sredina ± SD)	6M (aritmetička sredina ± SD)	p (1M - 0M)	p (6M - 0M)	p (6M - 1M)
WOMAC Bol	MFAT	7,8 ± 3,6	4,7 ± 3,3	3,2 ± 3,8	< 0,001 <sup>+</sup>	< 0,001 <sup>+</sup>	0,001 <sup>+</sup>
	HA	7,7 ± 4,0	4,7 ± 3,4	3,4 ± 3,5	0,001 <sup>+</sup>	0,002 <sup>+</sup>	0,082
WOMAC Ukočenost	MFAT	3,2 ± 2,1	2,0 ± 1,7	1,2 ± 1,6	< 0,001 <sup>+</sup>	< 0,001 <sup>+</sup>	0,003 <sup>+</sup>
	HA	2,7 ± 1,7	1,7 ± 1,5	1,5 ± 1,7	0,004 <sup>+</sup>	0,007 <sup>+</sup>	0,340
WOMAC Funkcija	MFAT	28,2 ± 13,2	18,7 ± 13,1	12,8 ± 13,3	< 0,001 <sup>+</sup>	< 0,001 <sup>+</sup>	< 0,001 <sup>+</sup>
	HA	27,7 ± 14,0	19,4 ± 12,2	14,5 ± 14,0	0,001 <sup>+</sup>	0,002 <sup>+</sup>	0,129
WOMAC Ukupni skor	MFAT	39,2 ± 17,7	25,4 ± 14,4	17,3 ± 18,3	< 0,001 <sup>+</sup>	< 0,001 <sup>+</sup>	< 0,001 <sup>+</sup>
	HA	38,2 ± 18,8	25,8 ± 16,3	19,4 ± 18,5	0,001 <sup>+</sup>	0,001 <sup>+</sup>	0,139

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Tablica dodatno uključuje unutargrupne usporedbe za svaku podskalu kroz sljedeće vremenske intervale: 1 mjesec u odnosu na početne vrijednosti (1M – 0M), 6 mjeseci u odnosu na početne vrijednosti (6M – 0M) te 6 mjeseci u odnosu na 1 mjesec nakon intervencije (6M – 1M). \* p-vrijednosti izračunate su korištenjem Wilcoxonovog testa; <sup>+</sup> p < 0,05; WOMAC – *Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index*.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

Uspoređujući rezultate među skupinama, nije bilo statistički značajnih razlika u poboljšanju WOMAC podskala (Bol, Ukočenost, Funkcija ili Ukupni skor) od početnog mjerenja do 6 mjeseci (sve  $p > 0,05$ , Mann–Whitney U test). Ipak, prosječna poboljšanja bila su dosljedno veća u MFAT skupini u svim podskalama (tablica 5.2.2.2).

**Tablica 5.2.2.2. Deskriptivna statistika promjena u WOMAC podskalama od početnog mjerenja do 6 mjeseci nakon intraartikularne aplikacije mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) ili hijaluronske kiseline (HA)**

WOMAC podskala	Skupina	aritmetička sredina ± SD	medijan (Q1 – Q3)	p*
ΔWOMAC Bol	HA	-4,3 ± 4,3	-4,0 (-7,0 – -2,0)	0,801
	MFAT	-4,5 ± 3,2	-4,0 (-8,0 – -2,0)	
ΔWOMAC Ukočenost	HA	-1,2 ± 1,5	-1,0 (-2,0 – 0,0)	0,174
	MFAT	-2,0 ± 1,8	-2,0 (-3,0 – -1,0)	
ΔWOMAC Funkcija	HA	-13,2 ± 13,5	-11,5 (-23,0 – 0,0)	0,312
	MFAT	-15,4 ± 10,0	-17,0 (-21,0 – -6,0)	
ΔWOMAC Ukupni skor	HA	-18,8 ± 18,5	-17,5 (-33,0 – -2,0)	0,260
	MFAT	-21,9 ± 13,5	-24,0 (-31,0 – -10,0)	

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu promjene nakon 6 mjeseci u odnosu na početno stanje, standardnu devijaciju (SD) te medijan s interkvartilnim rasponom (Q1 – Q3) za svaku skupinu, kao i p-vrijednost za statistički značajnu razliku među skupinama. Iako Mann–Whitney U test procjenjuje razlike u rangovima, prikazane su srednje vrijednosti kako bi se ilustrirala veličina kliničkog poboljšanja. \* Mann–Whitney U test; WOMAC – *Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index*.

Zaključno, i MFAT i HA pružili su klinički značajne koristi, uz sličan terapijski odgovor u obje skupine prema WOMAC upitniku.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

### **5.2.3. VAS**

Obje terapijske skupine imale su statistički značajno smanjenje boli mjereno VAS-om u mirovanju i kretanju nakon 1 i 6 mjeseci u usporedbi s početnim stanjem ( $p < 0,01$ ). U MFAT skupini analgetski učinak održao se i nakon 1. mjeseca, pri čemu je smanjenje boli u mirovanju i pri pokretu ostalo statistički značajno od 1. do 6. mjeseca ( $p < 0,01$ ), što ukazuje na postupne i trajne terapijske učinke.

U HA skupini također je zabilježeno značajno smanjenje boli od početnog stanja do oba kontrolna mjerenja. Međutim, nakon prvog mjeseca smanjenje boli pri pokretu se stabiliziralo te nije došlo do daljnjeg statistički značajnog poboljšanja od 1. do 6. mjeseca ( $p = 0,115$ ). To ukazuje na smanjeni srednjoročni analgetski učinak HA u kretanju. Nasuprot tome, bol u mirovanju nastavila se značajno smanjivati od 1. do 6. mjeseca ( $p = 0,023$ ), što sugerira trajniji učinak na statičku bol. Potpuna deskriptivna statistika za oba VAS mjerenja, uključujući srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom te unutargrupne p-vrijednosti, prikazana je u tablici 5.2.3.1.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

**Tablica 5.2.3.1. Deskriptivna statistika razine boli prema vizualno analognoj skali (VAS) u mirovanju i kretanju prije intervencije (0M), nakon 1 mjeseca (1M) i nakon 6 mjeseci (6M) od intraartikularne aplikacije mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) ili hijaluronske kiseline (HA).**

VAS podskala	Skupina	0M (aritmetička sredina ± SD)	1M (aritmetička sredina ± SD)	6M (aritmetička sredina ± SD)	p (1M - 0M)*	p (6M - 0M)*	p (6M - 1M)*
VAS mirovanje	MFAT	3,5 ± 2,2	2,4 ± 2,1	1,6 ± 2,3	< 0,001 <sup>+</sup>	< 0,001 <sup>+</sup>	0,001 <sup>+</sup>
	HA	3,1 ± 2,3	2,1 ± 1,6	1,3 ± 1,7	0,007 <sup>+</sup>	0,003 <sup>+</sup>	0,023 <sup>+</sup>
VAS kretanje	MFAT	5,4 ± 2,2	3,7 ± 2,1	2,8 ± 2,0	< 0,001 <sup>+</sup>	< 0,001 <sup>+</sup>	0,002 <sup>+</sup>
	HA	4,8 ± 2,1	3,4 ± 2,5	2,8 ± 2,4	0,003 <sup>+</sup>	0,001 <sup>+</sup>	0,115

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Tablica dodatno uključuje unutargrupne usporedbe za svaku podskalu kroz sljedeće vremenske intervale: 1 mjesec u odnosu na početne vrijednosti (1M – 0M), 6 mjeseci u odnosu na početne vrijednosti (6M – 0M) te 6 mjeseci u odnosu na 1 mjesec nakon intervencije (6M – 1M). \* p-vrijednosti izračunate su korištenjem Wilcoxonovog testa; <sup>+</sup> p < 0,05.

## Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI

Nije nađena statistički značajna razlika između skupina u promjenama (delta vrijednostima) od početka do 6 mjeseci ni za bol u mirovanju, ni za bol pri pokretu (Tablica 5.2.3.2). To ukazuje da oba pristupa imaju usporedive srednjoročne analgetske učinke, mjereno VAS skalom.

**Tablica 5.2.3.2. Deskriptivna statistika promjena u boli prema vizualno analognoj skali (VAS) za bol u mirovanju i kretanju od početnog mjerenja do 6 mjeseci nakon intraartikularne aplikacije mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) ili hijaluronske kiseline (HA)**

VAS podskala	Skupina	Aritmetička sredina $\pm$ SD	Medijan (Q1 – Q3)	p*
$\Delta$ VAS mirovanje	HA	-1,7 $\pm$ 2,1	-1,0 (-3,0 – 0,0)	0,459
	MFAT	-1,9 $\pm$ 1,6	-2,0 (-3,0 – 0,0)	
$\Delta$ VAS kretanje	HA	-2,1 $\pm$ 1,8	-2,0 (-3,0 – 0,0)	0,355
	MFAT	-2,6 $\pm$ 2,0	-2,5 (-4,0 – -1,0)	

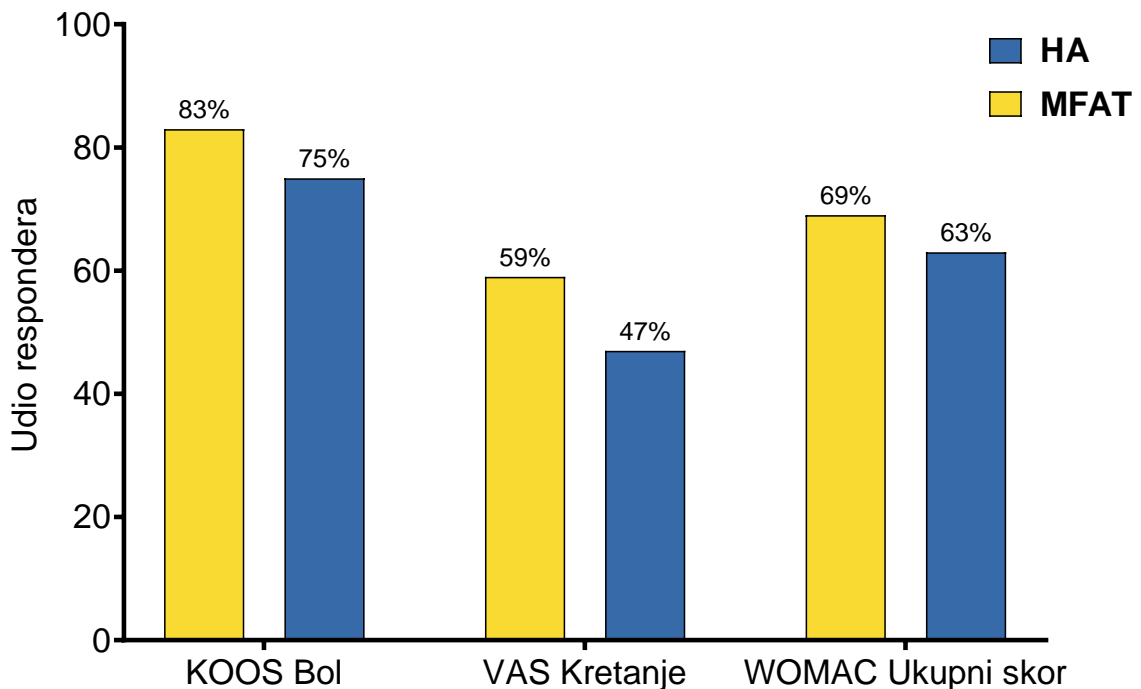
Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu promjene nakon 6 mjeseci u odnosu na početno stanje, standardnu devijaciju (SD) te medijan s interkvartilnim rasponom (Q1 – Q3) za svaku skupinu, kao i p-vrijednost za statistički značajnu razliku među skupinama. Iako Mann–Whitney U test procjenjuje razlike u rangovima, prikazane su srednje vrijednosti kako bi se ilustrirala veličina kliničkog poboljšanja. \* Mann-Whitney U test.

### 5.2.4. Analiza odgovora na terapiju (*responderi*)

Uz analize kontinuiranih ishoda, odnosno promjena vrijednosti kliničkih upitnika, izračunati su udjeli *respondera* (ispitanika koji su odgovorili na terapiju) u svakoj terapijskoj skupini, koristeći unaprijed definirane pragove minimalno klinički značajne razlike (MCID): KOOS Bol ( $\geq 10$ ), WOMAC Ukupni skor ( $\geq 15$ ) i VAS pri kretanju ( $\geq 3$ ). Ispitanici kod kojih je postojao početni „učinak stropa“ (engl. *ceiling effect*) ili „učinak poda“ (engl. *floor effect*), tj. ispitanici kod kojih su početne vrijednosti upitnika bile previsoke ili preniske za izračun MCID-a (KOOS Bol  $> 85$ , WOMAC Ukupni skor  $< 15$ , VAS pri kretanju  $< 3$ ) izuzeti su iz ovih analiza.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

Iako nije postignuta statistički značajna razlika pri međugrupnim usporedbama za KOOS Bol ( $p = 0,698$ , Fisherov egzaktni test), VAS kretanje ( $p = 0,452$ , Hi-kvadrat test) i WOMAC Ukupni skor ( $p = 0,741$ , Fisherov egzaktni test), MFAT skupina je dosljedno imala veće stope odgovora u svim analiziranim ishodima (slika 5.2.4.1). Točan broj *respondera* i *non-respondera* za svaki ishod, a nakon isključenja ispitanika zbog učinka stropa ili učinka poda, prikazani su tablici 5.2.4.1.



**Slika 5.2.4.1. Udio ispitanika koji su odgovorili na terapiju (*respondera*) u svakoj terapijskoj skupini prema unaprijed definiranim pragovima minimalno klinički značajne razlike (MCID): KOOS Bol ( $\geq 10$ ), VAS pri kretanju ( $> 2$ ) i WOMAC Ukupni skor ( $\geq 15$ ).** Iako nisu pronađene statistički značajne razlike ( $p > 0,05$  za sve usporedbe), skupina liječena aplikacijom mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) je dosljedno pokazivala veće stope odgovora u svim mjernim ishodima u odnosu na skupinu liječenu aplikacijom hijaluronske kiseline (HA), što sugerira trend prema većoj kliničkoj koristi. KOOS – *Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score*; VAS – vizualno analogni skala za bol; WOMAC – *Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index*.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

**Tablica 5.2.4.1. Analiza statusa odgovora na terapiju (*responder* analiza) za rezultate kliničkih upitnika temeljena na unaprijed definiranim pragovima minimalne klinički značajne razlike (MCID)**

PROM	Vrijednost učinka stropa ili učinka poda	MCID	Broj ispitanika nakon isključenja zbog učinka stropa ili poda	Skupina	Broj <i>respondera</i>	Broj <i>non-respondera</i>
KOOS Bol	≥85	10	46	HA	12	4
				MFAT	25	5
VAS kretanje	≤2	3	44	HA	7	8
				MFAT	17	12
WOMAC ukupni	≤15	15	48	HA	10	4
				MFAT	22	10

Analiza je provedena nakon primjene kriterija isključenja zbog učinka stropa ili učinka poda. Prikazan je i broj ispitanika nakon isključenja zbog učinka stropa ili učinka poda te broj *respondera* i *non-respondera* unutar svake skupine (MFAT i HA). MFAT – mikrofragmentirano masno tkivo; HA – hijaluronska kiselina; KOOS – *Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score*; VAS – vizualno analogna skala za bol; WOMAC – *Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index*.

Ove analize temeljene na *responderima* pružaju dodatnu razinu kliničkog tumačenja, pokazujući da je veći udio pacijenata liječenih aplikacijom MFAT postigao klinički značajne promjene, iako razlike između skupina na razini ukupnih rezultata nisu dosegle statističku značajnost.

### 5.3. Slikovni ishodi na temelju rezultata magnetske rezonancije

#### 5.3.1. dGEMRIC

Kako bi se prikazao učinak intraartikularne terapije kod OA koljena na proteoglikanski sastav hijaline hrskavice, korišten je dGEMRIC indeks kao dobro utemeljen biomarker koncentracije GAG u hrskavičnom matriksu, mjereno preko magnetske rezonance uz korištenje gadolinijevog kontrasta. Ova metoda pruža neizravnu procjenu sadržaja GAG-a mjerenjem T1 vremena nakon primjene kontrasta, što se može smatrati pokazateljem biokemijskog stanja hrskavice i aktivnosti hondrocita.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

Uključujući 7 regija interesa (ROI) po ispitaniku, ukupno je procijenjeno 357 ROI hrskavice pomoću dGEMRIC metode na početku i nakon 6 mjeseci od inicijalnog liječenja. Pet ROI-eva isključeno je iz analize jer je njihova početna vrijednost dGEMRIC indeksa bila nula, što je onemogućilo izračun postotne promjene. Preostalo je 352 ROI-a dostupnih za završnu analizu usporedbe.

Analiza unutar skupina korištenjem t-testa za zavisne uzorke (za parametrijske podatke) ili Wilcoxonovog testa (za neparametrijske podatke; dGEMRIC za medijalnu tibiju i veličinu uzorka <20) pokazala je statistički značajno povećanje dGEMRIC indeksa od početnog mjerenja do 6 mjeseci u svih sedam anatomske regije u obje terapijske skupine ( $p < 0,01$  za sve usporedbe; tablica 5.3.1.1, slika 5.3.1.1). Ovi rezultati pokazuju da je liječenje aplikacijom i MFAT i HA rezultiralo mjerljivim povećanjem sadržaja GAG-a u zglobnoj hrskavici tijekom 6-mjesečnog praćenja.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

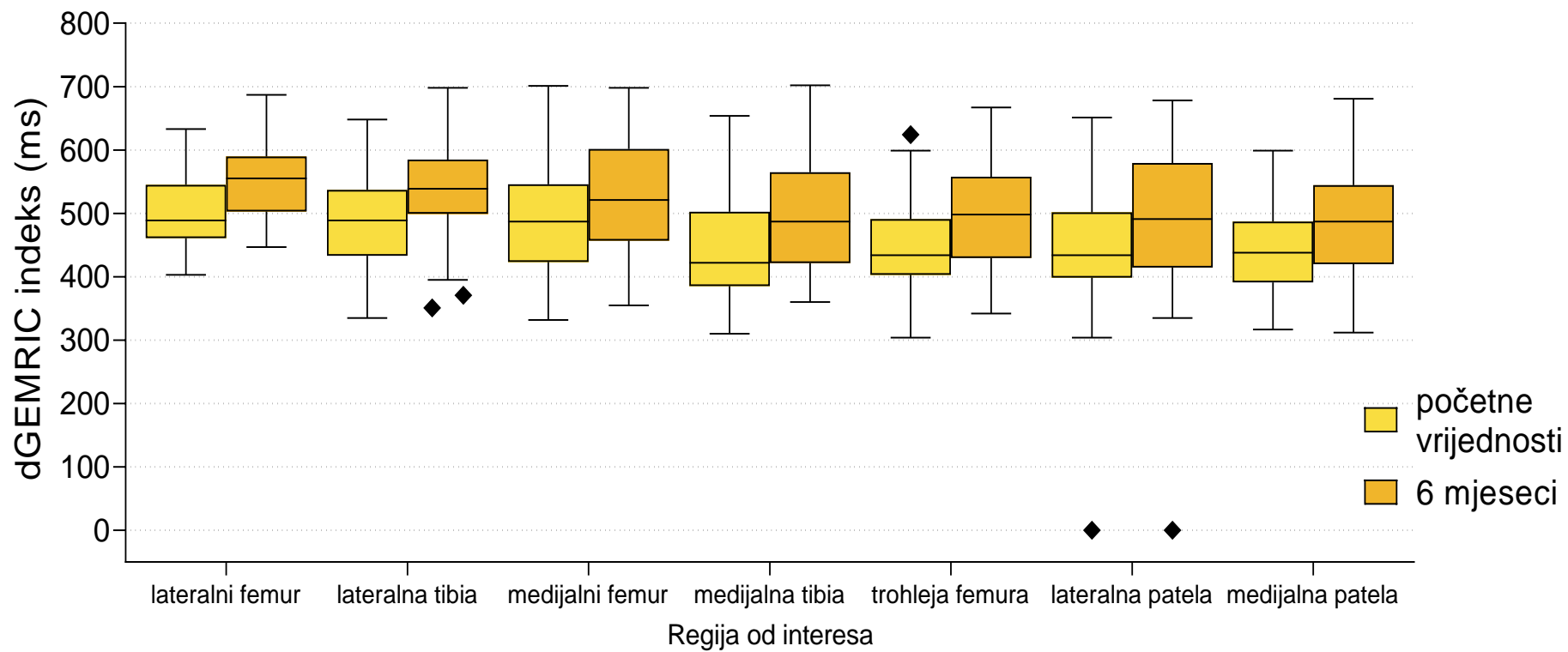
**Tablica 5.3.1.1. Deskriptivna statistika dGEMRIC indeksa za 7 regija interesa (ROI) hrskavice koljena prije (0M) i šest mjeseci nakon (6M) aplikacije mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) ili hijaluronske kiseline (HA) s prikazom unutargrupnih i međugrupnih usporedbi**

ROI	dGEMRIC MFAT - 0M (aritmetička sredina ± SD)	dGEMRIC MFAT - 6M (aritmetička sredina ± SD)	p*	dGEMRIC HA - 0M (aritmetička sredina ± SD)	dGEMRIC HA - 6M (aritmetička sredina ± SD)	p+	dGEMRIC MFAT srednja promjena (%)	dGEMRIC HA srednja promjena (%)	p (MFAT vs. HA) <sup>†</sup>
Lateralni femur	499,9 ± 60,3	555,0 ± 65,5	< 0,001	519,7 ± 55,4	560,1 ± 76,9	0,001	11,3%	7,7%	0,174
Lateralna tibija	487,4 ± 77,3	541,6 ± 80,9	< 0,001	507,1 ± 92,0	543,8 ± 97,1	0,006	11,5%	7,5%	0,211
Medijalni femur	489,1 ± 87,1	532,7 ± 96,7	< 0,001	500,7 ± 68,0	543,5 ± 80,7	0,002	9,2%	8,7%	0,737
Medijalna tibija	440,9 ± 79,8	497,6 ± 89,7	< 0,001 <sup>+</sup>	428,2 ± 78,0	464,4 ± 73,0	0,002	13,3%	9,2%	0,156
Trohleja	446,2 ± 65,9	497,5 ± 81,5	< 0,001	449,9 ± 61,0	494,9 ± 88,5	< 0,001	11,6%	9,6%	0,574
Lateralna patela <sup>§</sup>	452,6 ± 83,7	500,5 ± 96,5	< 0,001	464,4 ± 70,8	502,2 ± 79,5	0,001	10,7%	8,2%	0,358
Medijalna patela <sup>§</sup>	441,0 ± 79,0	485,5 ± 91,2	< 0,001	454,8 ± 73,4 <sup>*</sup>	490,0 ± 81,9 <sup>*</sup>	0,001 <sup>*</sup>	10,1%	7,8%	0,343

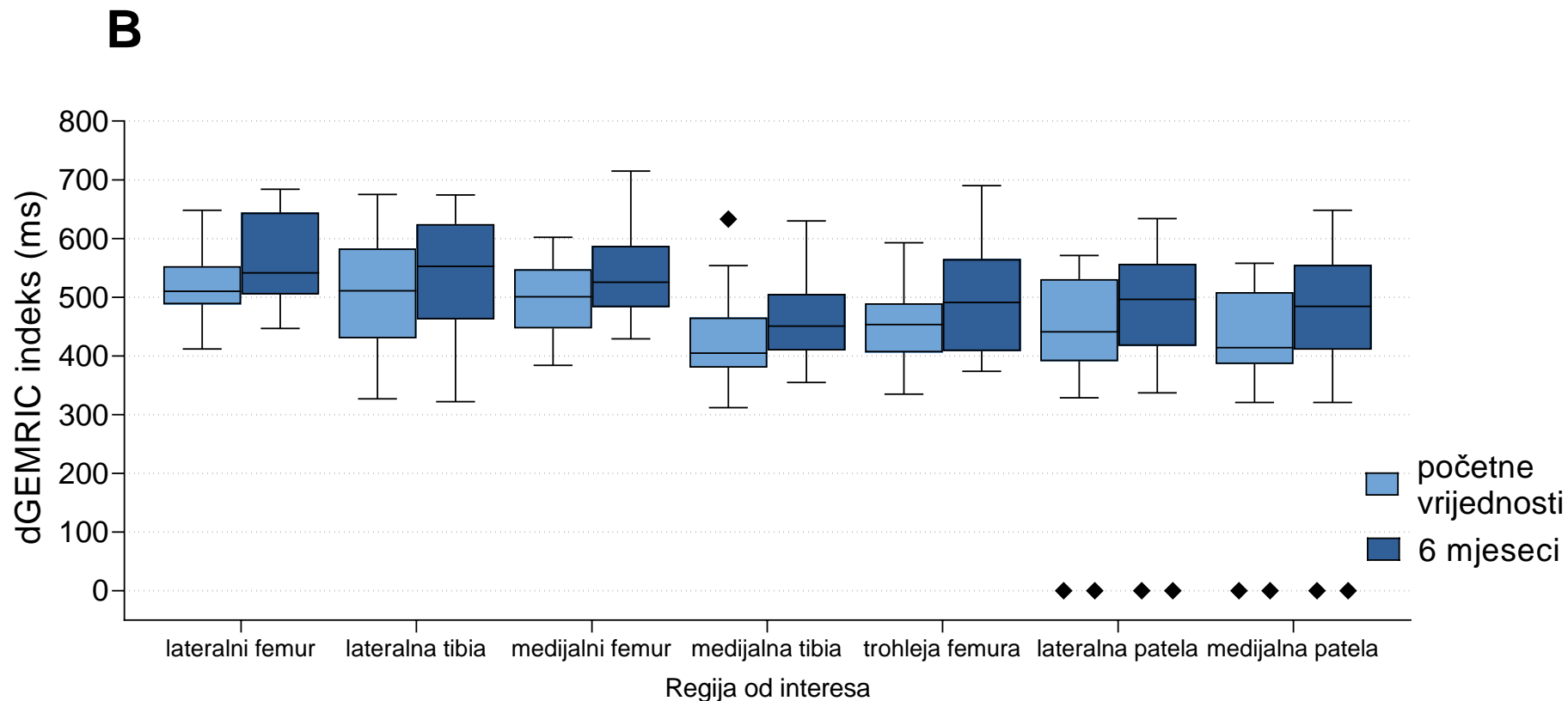
Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD) dGEMRIC indeksa na početku (0M) i nakon 6 mjeseci (6M) u MFAT i HA skupini s unutargrupnim usporedbama. Također su prikazane srednje relativne promjene u svakoj skupini te međugrupna usporedba koja nije pokazala statistički značajne razlike. \* t test za zavisne uzorke; <sup>+</sup> Wilcoxonov test; <sup>†</sup> Mann-Whitney U test; <sup>§</sup> statistika ne uključuje regije bez hrskavice (dGEMRIC = 0); ROI – regija interesa hrskavice; dGEMRIC – *delayed Gadolinium-Enhanced Magnetic Resonance Imaging of Cartilage*.

Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI

**A**



Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI

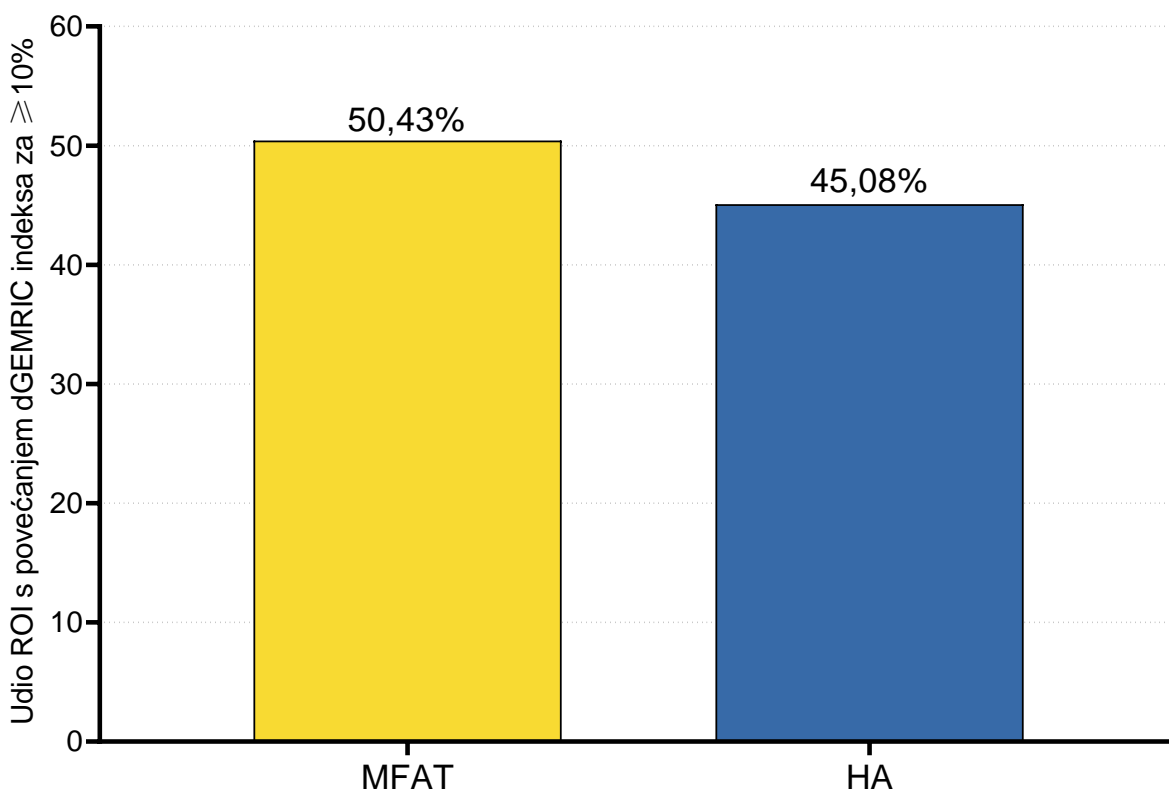


**Slika 5.3.1.1. Promjene dGEMRIC indeksa od početnog mjerenja do 6 mjeseci u svakoj anatomskoj regiji interesa (ROI), prikazane odvojeno za MFAT (A) i HA (B) skupinu.** Box-plot prikazi predstavljaju medijan i interkvartilni raspon, svijetle boje označavaju početne vrijednosti, a tamnije nijanse vrijednosti nakon 6-mjesečnog praćenja. Statistički značajna poboljšanja uočena su u svim regijama u obje skupine (t-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test,  $p < 0,01$  za sve regije). Kvadrati predstavljaju odstupajuće vrijednosti. dGEMRIC - dGEMRIC – *delayed Gadolinium-Enhanced Magnetic Resonance Imaging of the Cartilage.*; MFAT – mikrofragmentirano masno tkivo; HA – hijaluronska kiselina.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

Klinički relevantno poboljšanje, definirano kao  $\geq 10\%$  porasta dGEMRIC indeksa u odnosu na početno mjerenje, zabilježeno je u 171 od 352 ROI-a (48,58%). Nerelevantne promjene ( $< 10\%$  porasta ili smanjenja) uočene su u 180 ROI-a (51,14%), dok je samo jedan ROI (0,28%) pokazao klinički značajno pogoršanje ( $\geq 10\%$  smanjenja). Udio ROI-a s klinički relevantnim poboljšanjem bio je 45,08% (55/122) u HA skupini i 50,43% (116/230) u MFAT skupini (slika 5.3.1.2). Jedino klinički značajno pogoršanje zabilježeno je u MFAT skupini (1/230 ROI-a; 0,43%), dok u HA skupini nije bilo pogoršanja.

Iako je udio ROI-a s klinički značajnim poboljšanjem bio veći u MFAT skupini, raspodjela kategorija ishoda nije se značajno razlikovala između skupina ( $p = 0,467$ ).



**Slika 5.3.1.2. Udio regija od interesa (ROI) koje su pokazale klinički značajno poboljšanje ( $\geq 10\%$  porasta dGEMRIC indeksa) 6 mjeseci nakon liječenja.** Klinički značajno poboljšanje zabilježeno je u 55 od 122 ROI-a (45,08%) u HA skupini i 116 od 230 ROI-a (50,43%) u MFAT skupini. Jedno klinički značajno pogoršanje ( $\geq 10\%$  smanjenja) zabilježeno je u MFAT skupini (0,43%), dok u HA skupini nije bilo pogoršanja. dGEMRIC - dGEMRIC – *delayed Gadolinium-Enhanced Magnetic Resonance Imaging of the Cartilage.*; MFAT – mikrofragmentirano masno tkivo; HA – hijaluronska kiselina.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

Postotne promjene dGEMRIC indeksa nakon liječenja uspoređene su između MFAT i HA skupine za svaki ROI. Iako nisu pronađene statistički značajne razlike (sve  $p > 0,05$ , Mann–Whitney U test), ROI-evi u MFAT skupini dosljedno su pokazivali veća srednja poboljšanja u sadržaju GAG-a u usporedbi s HA skupinom. Najizraženija srednja promjena dGEMRIC indeksa zabilježena je u medijalnoj tibiji (+13,3% MFAT naspram +9,2% HA). Dodatno, gotovo sve regije u MFAT skupini (osim medijalnog femura) pokazale su srednji porast veći od unaprijed definiranog MCID praga od 10%. Suprotno tome, nijedna regija u HA skupini nije postigla takva srednja poboljšanja. Regionalna distribucija početnih vrijednosti i terapijskih odgovora prikazana je u tablici 5.3.1.1.

Kako bi se ovi rezultati prikazali iz perspektive pacijenata, definirani su i dGEMRIC *responderi* kao ispitanici kod kojih je najmanje tri od sedam ROI-eva pokazalo klinički značajno poboljšanje ( $\geq 10\%$  porasta dGEMRIC indeksa). Prema ovom kriteriju, 50% (9/18) pacijenata u HA skupini i 54,5% (18/33) pacijenata u MFAT skupini klasificirano je kao dGEMRIC *responderi*. Međutim, nije pronađena statistički značajna razlika u udjelu *respondera* između skupina ( $\chi^2 = 0,001$ ,  $p = 0,986$ , Hi-kvadrat test).

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

### **5.3.2. MOAKS**

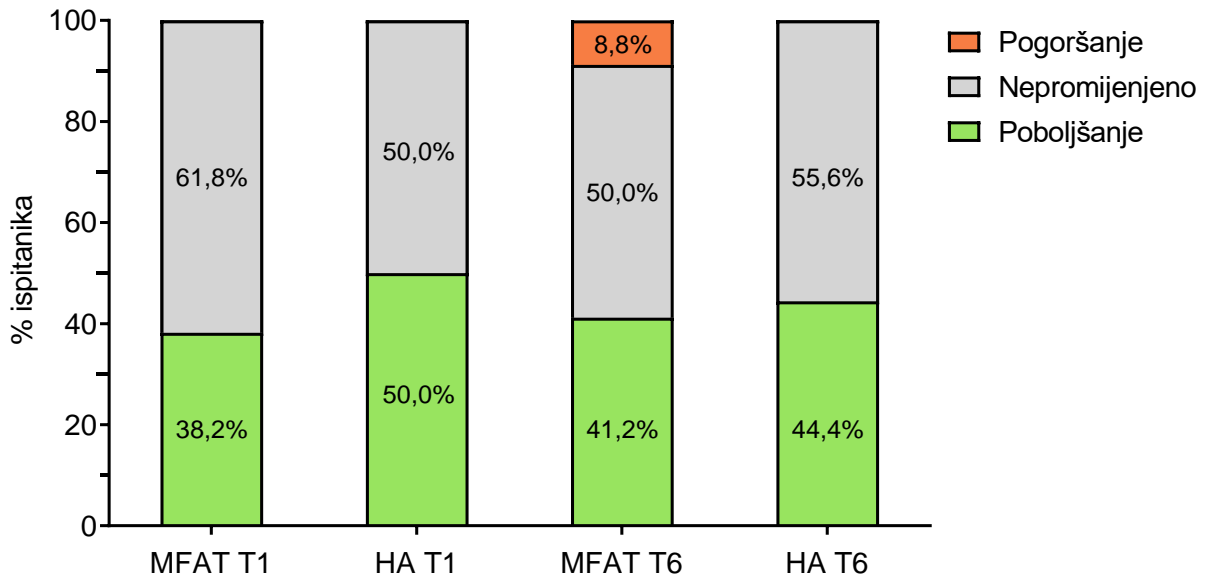
Analizom MRI snimki prema MOAKS klasifikaciji procijenjene su morfološke promjene u hrskavici, subhondralnoj kosti, meniscima, ligamentima, tetivama i periartikularnim strukturama, kao i prisutnost sinovitisa i izljeva.

Cilj analize bio je utvrditi eventualne promjene morfoloških obilježja kroz tri vremenske točke praćenja (početno, nakon 1 mjeseca i nakon 6 mjeseci) te usporediti učinke intraartikularne aplikacije MFAT i HA.

U većini MOAKS podjedinica (oštećenje hrskavice, lezije koštane srži, osteofiti, promjene meniska i ligamenata te periartikularne lezije) nije zabilježena značajna promjena tijekom praćenja. Manje od 10 % ispitanika imalo je bilo kakvu promjenu skora između pojedinih vremenskih točaka, a takve izolirane promjene nisu bile statistički značajne ni unutar skupina ni između terapijskih skupina. Ovi nalazi ukazuju na stabilan morfološki status zglobnih struktura u obje skupine tijekom šestomjesečnog praćenja.

Jedini MOAKS podskor koji je pokazao statistički značajne promjene bio je MOAKS sinovitis/izljev. U obje terapijske skupine zabilježeno je značajno smanjenje sinovitisa u odnosu na početno stanje, već nakon 1 mjeseca i održano nakon 6 mjeseci. U MFAT skupini zabilježeno je poboljšanje u 38,2 % bolesnika nakon 1 mjeseca i u 41,2 % nakon 6 mjeseci, dok su u HA skupini poboljšanja zabilježena u 50 % i 44,4 % bolesnika. Wilcoxonovim testom potvrđena je značajna unutargrupna promjena za MFAT ( $p = 0,001$  za T1–T0;  $p = 0,007$  za T6–T0) i HA skupinu ( $p = 0,003$  za T1–T0;  $p = 0,005$  za T6–T0). Međutim, nije nađena statistički značajna razlika između skupina ni nakon 1 mjeseca ( $p = 0,549$ ) ni nakon 6 mjeseci ( $p = 0,715$ ; Mann-Whitney U test). Prikaz raspodjele ispitanika s poboljšanjem, nepromijenjenim ili pogoršanim MOAKS sinovitis/izljev skorom prikazan je na slici 5.3.2.1.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**



**Slika 5.3.2.1. Promjene MOAKS skora za sinovitis i izljev nakon intraartikularne primjene mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) i hijaluronske kiseline (HA).** Prikazan je postotak ispitanika s poboljšanjem (smanjenje skora  $\geq 1$  stupanj), nepromijenjenim i pogoršanim stanjem (povećanje skora  $\geq 1$  stupanj) nakon 1 mjeseca (T1) i 6 mjeseci (T6) u obje terapijske skupine. U skupinama liječenim aplikacijom MFAT i HA zabilježeno je statistički značajno smanjenje MOAKS sinovitis/izljev skora u odnosu na početne vrijednosti (MFAT:  $p = 0,001$  za T1–T0;  $p = 0,007$  za T6–T0; HA:  $p = 0,003$  za T1–T0;  $p = 0,005$  za T6–T0; Wilcoxonov test), dok između skupina nije bilo značajne razlike ( $p = 0,549$  i  $p = 0,715$ ; Mann-Whitney U test).

Objе terapije dovele su do izraženog smanjenja upalne aktivnosti unutar zgloba, pri čemu je učinak bio usporediv između MFAT i HA.

Sveukupno, rezultati MOAKS analize ukazuju da intraartikularne aplikacije MFAT i HA tijekom šestomjesečnog praćenja ne uzrokuju progresiju morfoloških promjena, a istodobno dovode do značajnog smanjenja sinovitisa, što potvrđuje njihov povoljan protuupalni učinak u ranoj fazi OA.

#### **5.4. Korelacija kliničkih i radioloških ishoda**

Provedena je analiza na razini *respondera* kako bi se procijenila povezanost strukturnih i simptomatskih poboljšanja nakon liječenja. Bolesnici su klasificirani kao

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

dGEMRIC *responderi* ako je najmanje tri od sedam analiziranih regija hrskavice pokazalo porast dGEMRIC indeksa od najmanje 10% u razdoblju od početnog mjerenja do šest mjeseci. KOOS Bol *responderi* definirani su kao oni s poboljšanjem od najmanje 10 bodova u odnosu na početno stanje, u skladu s unaprijed definiranim MCID pragom.

Jedan bolesnik isključen je iz ove analize zbog nedostatka dGEMRIC podataka na kontrolnom pregledu, a dodatnih šest pacijenata isključeno je jer im je početni KOOS Bol rezultat bio  $\geq 85$ , što je ukazivalo na učinak stropa i onemogućilo klasifikaciju odgovora.

Od preostalih 45 pacijenata, utvrđena je statistički značajna povezanost između dGEMRIC i KOOS Bol statusa *respondera* ( $p = 0,001$ , Fisherov egzaktni test). Svi dGEMRIC *responderi* ( $n = 23$ ) bili su ujedno i KOOS Bol *responderi*, dok nijedan od KOOS Bol *non-respondera* ( $n = 8$ ) nije bio dGEMRIC *responder* (tablica 5.4.1). Važno je istaknuti da je pozitivna prediktivna vrijednost (PPV) dGEMRIC odgovora za poboljšanje KOOS Bol iznosila 100%, što znači da je, kada je zabilježeno strukturno poboljšanje, simptomatsko olakšanje uvijek bilo prisutno. Također se mora naglasiti da je analiza rađena na svim bolesnicima, bez obzira na dodijeljenu terapijsku skupinu, što naglašava funkciju dGEMRIC indeksa kao markera kliničkog odgovora na bol.

Slični trendovi uočeni su i u zasebnim analizama za obje terapijske skupine. Povezanost je ostala statistički značajna u MFAT skupini ( $p = 0,042$ , Fisherov egzaktni test), dok u HA skupini nije dosegla statističku značajnost ( $p = 0,077$ , Fisherov egzaktni test).

Nije pronađena statistička povezanost između dGEMRIC odgovora i poboljšanja u KOOS Simptomi podskali, bilo u ukupnoj populaciji ili po skupinama liječenja (sve  $p > 0,05$ ). Budući da je KOOS Simptomi podskala široka i višedimenzionalna tj. da obuhvaća različite vrste simptoma poput ukočenosti, izljeva, krepitacija i pokretljivosti, za daljnju analizu i interpretaciju zadržana je samo KOOS Bol podskala.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

**Tablica Pogreška! Za dodavanje Heading 2 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno..1. Kontingencijska tablica statusa dGEMRIC i KOOS Bol respondera (ispitanika koji su odgovorili na terapiju)**

	<b>KOOS Bol responderi</b>	<b>KOOS Bol non-responderi</b>
dGEMRIC responderi	23	0
dGEMRIC non-responderi	14	8

Broj ispitanika (n = 45) za ovu analizu je manji od ukupnog broja ispitanika u istraživanju zbog isključivanja ispitanika sa stropnim učinkom za KOOS Bol skalu. KOOS – *Knee Injury and Osteoarthritis Outcome*; dGEMRIC – *delayed Gadolinium-Enhanced Magnetic Resonance Imaging of the Cartilage*.

## **5.5. Biokemijski ishodi**

### **5.5.1. Analiza citokina i kemokina u krvnoj plazmi**

Uzorci krvne plazme analizirani su metodom *multiplex enzyme-linked immunosorbent assay* (Bio-Plex® 200 System, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Za potrebe istraživanja izrađen je panel od 39 citokina i kemokina, koji je obuhvaćao upalne, protuupalne, regulatorne i remodelirajuće biomolekule, a mjerjen je u uzorcima plazme ispitanika liječenih intraartikularnom aplikacijom MFAT te onih liječenih aplikacijom HA. Cilj analize citokinskog profila u plazmi ispitanika bio je procijeniti sistemski imunološki odgovor nakon intraartikularne terapije, odnosno potencijalne razlike u dinamici pro- i antiinflamatornih medijatora između MFAT i HA skupine nakon primijenjene terapije.

S obzirom na ograničenja metode u pogledu granica detektabilnosti (LOD, engl. *limit of detection*), dio analita nije bio mjerljiv u svim uzorcima plazme ili je bio mjerljiv samo u manjem broju uzoraka. Rezultati prikazani u tablicama 5.5.1.1 i 5.5.1.2 odnose se na udio uzoraka čije su vrijednosti bile unutar detektabilnog raspona tj. bez oznake OOR (engl. *out of range*) u pojedinim vremenskim točkama (T0 – prije terapijske intervencije, T1 – jedan mjesec nakon intervencije i T6 – šest mjeseci nakon intervencije).

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

**Tablica 5.5.1.1. Detektabilnost i dostupnost podataka za analizu citokina i kemokina u plazmi u skupini liječenoj aplikacijom mikrofragmentiranog masnog tkiva**

<b>Analit</b>	<b>% unutar raspona T0*</b>	<b>% unutar raspona T1*</b>	<b>% unutar raspona T6*</b>	<b>N parova T0–T1<sup>+</sup></b>	<b>N parova T0–T6<sup>+</sup></b>
IL-1 $\beta$	62%	62%	59%	16	17
IL-4	0%	0%	9%	0	0
IL-6	94%	94%	97%	31	32
IL-8	100%	100%	100%	34	34
MCP-1	100%	100%	100%	34	34
MCP-3	12%	18%	24%	2	1
MIP-1 $\alpha$	100%	100%	100%	34	34
SDF-1 $\alpha$ + $\beta$	100%	100%	100%	34	34
TNF- $\alpha$	100%	100%	100%	34	34
IL-10	0%	0%	0%	0	0
IL-12	0%	0%	0%	0	0
IL-13	0%	0%	0%	0	0
IL-15	0%	0%	0%	0	0
IL-17A	0%	0%	0%	0	0
IL-18	82%	82%	79%	26	25
IL-1ra	0%	0%	0%	0	0
IL-2	0%	0%	0%	0	0
IL-5	3%	3%	3%	1	1
MIP-1 $\beta$	97%	100%	100%	33	33
RANTES	97%	100%	100%	33	33
VEGF	0%	0%	0%	0	0
IL-12	18%	21%	18%	6	6
IL-22	0%	0%	0%	0	0
MMP-1	3%	9%	3%	31	33
MMP-2	100%	100%	100%	34	34
MMP-3	100%	100%	100%	34	34
ICAM-1	100%	100%	100%	34	34
IL-21	97%	97%	100%	32	33
Leptin	100%	100%	100%	34	34
MMP-13	15%	15%	15%	4	4
MMP-8	97%	97%	100%	33	33
MMP-9	97%	97%	97%	33	33
VCAM-1	100%	100%	100%	34	34
TGF- $\beta$ 1	100%	100%	97%	34	33
TGF- $\beta$ 2	100%	100%	97%	34	33
TGF- $\beta$ 3	100%	100%	97%	34	33

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

Analit	% unutar raspona T0*	% unutar raspona T1*	% unutar raspona T6*	N parova T0–T1 <sup>+</sup>	N parova T0–T6 <sup>+</sup>
TIMP-1	100%	100%	100%	34	34
TIMP-2	100%	100%	100%	34	34
TIMP-4	100%	100%	100%	34	34

\* udio uzoraka bez OOR oznaka u svakoj vremenskoj točki (T0, T1, T6); <sup>+</sup> broj ispitanika s valjanom vrijednošću u dvije vremenske točke (T0 i T1 te T0 i T6), korišten za usporedbu unutar skupine.

**Tablica 5.5.1.2. Detektabilnost i dostupnost podataka za analizu citokina i kemokina u plazmi u skupini liječenoj aplikacijom hijaluronske kiseline**

Analit	% unutar raspona T0*	% unutar raspona T1*	% unutar raspona T6*	N parova T0–T1 <sup>+</sup>	N parova T0–T6 <sup>+</sup>
IL-1 $\beta$	61%	56%	56%	8	8
IL-4	11%	11%	0%	1	0
IL-6	100%	94%	100%	17	18
IL-8	100%	100%	100%	18	18
MCP-1	100%	100%	100%	18	18
MCP-3	33%	39%	50%	5	4
MIP-1 $\alpha$	100%	100%	100%	18	18
SDF-1 $\alpha$ + $\beta$	100%	100%	100%	18	18
TNF- $\alpha$	100%	94%	94%	17	17
IL-10	0%	0%	0%	0	0
IL-12	0%	0%	0%	0	0
IL-13	0%	0%	0%	0	0
IL-15	0%	0%	0%	0	0
IL-17A	0%	0%	0%	0	0
IL-18	67%	72%	72%	12	12
IL-1ra	0%	0%	0%	0	0
IL-2	0%	0%	0%	0	0
IL-5	0%	0%	0%	0	0
MIP-1 $\beta$	100%	100%	100%	18	18
RANTES	100%	100%	100%	18	18
VEGF	0%	0%	0%	0	0
IL-12	39%	44%	44%	7	7
IL-22	0%	0%	0%	0	0
MMP-1	6%	6%	6%	1	1
MMP-2	100%	100%	100%	18	18
MMP-3	100%	100%	100%	18	18
ICAM-1	100%	100%	100%	18	18

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

<b>Analit</b>	<b>% unutar raspona T0*</b>	<b>% unutar raspona T1*</b>	<b>% unutar raspona T6*</b>	<b>N parova T0–T1<sup>+</sup></b>	<b>N parova T0–T6<sup>+</sup></b>
IL-21	100%	100%	100%	18	18
Leptin	100%	100%	100%	18	18
MMP-13	28%	33%	28%	5	4
MMP-8	100%	100%	100%	18	18
MMP-9	100%	100%	100%	18	18
VCAM-1	100%	100%	100%	18	18
TGF-β1	100%	100%	100%	18	18
TGF-β2	100%	100%	100%	18	18
TGF-β3	100%	100%	100%	18	18
TIMP-1	100%	100%	100%	18	18
TIMP-2	100%	100%	100%	18	18
TIMP-4	100%	100%	100%	18	18

\* udio uzoraka bez OOR oznaka u svakoj vremenskoj točki (T0, T1, T6); <sup>+</sup> broj ispitanika s valjanom vrijednošću u dvije vremenske točke (T0 i T1 te T0 i T6), korišten za usporedbu unutar skupine.

U istim su tablicama navedeni i brojevi parova uzoraka, odnosno broj ispitanika kod kojih su vrijednosti pojedinog analita bile mjerljive u obje vremenske točke (T0 i T1, T0 i T6), što je omogućilo provođenje unutargrupnih analiza promjena koncentracija.

Analiti koji su bili mjerljivi u manje od 50 % uzoraka u većini vremenskih točaka nisu uključeni u daljnje statističke analize.

Također, pojedine vrijednosti bile su ekstrapolirane izvan standardne krivulje kalibracije. Takve ekstrapolirane vrijednosti predstavljaju rezultate koje uređaj procjenjuje izvan pouzdanog mjernog raspona, što može smanjiti preciznost interpretacije. Stoga su analiti kod kojih je više od 30 % vrijednosti bilo ekstrapolirano interpretirani s povećanim oprezom.

Nakon izbacivanja analita s manje od 50% iskazanih vrijednosti iz daljnjih analiza, sljedeći citokini i kemokini su analizirani u unutargrupnim i međugrupnim statistikama: IL-1β, IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1α, SDF-1α+β, TNF-α, IL-18, MIP-1β, RANTES, MMP-2, MMP-3, ICAM-1, IL-21, Leptin, MMP-8, MMP-9, VCAM-1, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-4.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

Vrijednosti svakog citokina/kemokina su zaokružene na dvije decimale i prikazane kao medijan s interkvartilnim rasponom (IQR) za svaku točku mjerenja (T0, T1 i T6) te su rezultati za obje skupine prikazani u tablicama 5.5.1.3. i 5.5.1.4.

S obzirom na nedostatak pojedinih mjerenja kod određenih citokina, prisutnost ekstrapoliranih vrijednosti i nenormalne distribucije podataka prema Shapiro-Wilksovom testu, u statističkoj analizi unutargrupnih i međugrupnih usporedbi korišteni su neparametrijski testovi. Unutargrupnom analizom Wilcoxonovim testom utvrđene su značajne promjene za nekoliko markera u MFAT skupini nakon 1 mjeseca praćenja. Statistički značajan porast koncentracije zabilježen je kod sljedećih citokina: MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MMP-3, ICAM-1, Leptin, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, TIMP-1 i TIMP-2, dok su se koncentracija SDF-1 $\alpha$ + $\beta$  i MMP-2 statistički značajno snizila. Zbog višestrukog testiranja, p-vrijednosti su dodatno korigirane Benjamini-Hochberg postupkom za smanjenje stopa lažnih otkrića. Nakon korekcije p-vrijednosti, statistički značajan ( $q < 0,05$ ) ostao je porast koncentracija MCP-1, ICAM-1, Leptin i TIMP-1, dok je trend promjene ( $0,05 < q < 0,10$ ) bio i dalje prisutan kod MIP-1 $\alpha$ , SDF-1 $\alpha$ + $\beta$ , MMP-2, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3 i TIMP-2. U skupini liječenoj HA, p-vrijednost manju od 0,05 nakon 1 mjeseca od aplikacije zabilježile su rast koncentracija MCP-1, MMP-3, ICAM-1 i TIMP-2, dok je pad zabilježen kod MIP-1 $\beta$  i IL-21. Ipak, nijedna od tih razlika nije ostala značajna nakon korekcije p-vrijednosti zbog višestrukog testiranja (svi  $q > 0,05$ ).

Nakon 6 mjeseci praćenja, u odnosu na vrijednosti prije aplikacije MFAT, Wilcoxonov test pokazao je statističku značajnost u porastu vrijednosti IL-1 $\beta$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , MMP-3 i TIMP-1 te u padu vrijednosti MMP-2 i VCAM-1. Nakon korekcije zbog višestrukog testiranja, statistička značajnost ( $q < 0,05$ ) očuvana je u porastu MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  i TIMP-1, dok je trend promjene ( $0,05 < q < 0,10$ ) bio istaknut za IL-1 $\beta$ , MMP-2 i MMP-3.

S druge strane, kod ispitanika u HA skupini razlika nakon 6 mjeseci u odnosu na početne vrijednosti nakon Wilcoxonovog testa bila je značajna za porast MMP-3, ICAM-1, TIMP-2 i TIMP-4 ( $p < 0,05$ ), ali je samo za TIMP-2 taj porast bio značajan i nakon primjene Benjamini-Hochberg korekcije p-vrijednosti ( $q < 0,05$ ). Sve p-vrijednosti nakon primjene Wilcoxonovog testa, kao i q-vrijednosti nakon korekcije zbog višestrukog testiranja prikazane su u tablicama 5.5.1.3. i 5.5.1.4.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

**Tablica 5.5.1.3. Koncentracije citokina i kemokina u krvnoj plazmi prije liječenja (T0) te jedan (T1) i šest (T6) mjeseci nakon liječenja mikrofragmentiranim masnim tkivom s prikazom unutargrupne statistike**

<b>Citokin</b>	<b>T0 Medijan (Q1 – Q3)</b>	<b>T1 Medijan (Q1 – Q3)</b>	<b>T6 Medijan (Q1 – Q3)</b>	<b>p (T1–T0)</b>	<b>q (T1–T0)</b>	<b>p (T6–T0)</b>	<b>q (T6–T0)</b>
IL-1 $\beta$ *	0,02 (0,02 – 0,06)	-	0,06 (0,04 – 0,06)	-	-	0,016 <sup>+</sup>	0,068 <sup>t</sup>
IL-6*	5,33 (2,07 – 6,46)	3,88 (2,52 – 6,37)	5,44 (2,70 – 6,93)	0,688	0,792	0,290	0,464
IL-8	5,67 (4,56 – 6,74)	6,65 (4,75 – 7,53)	6,94 (4,99 – 7,91)	0,069	0,113	0,035	0,104
MCP-1	35,55 (28,73 – 46,97)	44,45 (34,04 – 55,14)	47,36 (35,53 – 52,05)	< 0,001 <sup>+</sup>	0,001 <sup>§</sup>	< 0,001 <sup>+</sup>	0,003 <sup>§</sup>
MIP-1 $\alpha$	2,97 (2,58 – 3,81)	3,49 (2,74 – 4,56)	3,79 (2,95 – 4,99)	0,018 <sup>+</sup>	0,067 <sup>t</sup>	0,002 <sup>+</sup>	0,017 <sup>§</sup>
SDF-1 $\alpha$ + $\beta$	1401,93 (1258,74 – 1519,95)	1345,29 (1130,73 – 1511,22)	1438,84 (1251,55 – 1511,52)	0,043 <sup>+</sup>	0,097 <sup>t</sup>	0,993	0,993
TNF- $\alpha$ *	6,34 (4,38 – 7,52)	5,91 (4,49 – 7,41)	6,61 (4,80 – 8,15)	0,063	0,111	0,003 <sup>+</sup>	0,017 <sup>§</sup>
IL-18*	11,03 (5,62 – 16,07)	11,16 (4,87 – 14,65)	8,98 (7,03 – 15,35)	0,889	0,889	0,861	0,939
MIP-1 $\beta$	125,08 (98,77 – 142,58)	116,32 (98,35 – 134,78)	121,69 (95,54 – 137,76)	0,503	0,657	0,741	0,889
RANTES	2070,51 (969,78 – 3993,23)	1751,97 (935,41 – 3467,23)	1642,51 (781,54 – 2917,76)	0,330	0,475	0,131	0,242
MMP-2	16591,70 (12617,34 – 22107,05)	14227,51 (10782,93 – 20245,08)	15452,50 (13250,42 – 20399,35)	0,025 <sup>+</sup>	0,071 <sup>t</sup>	0,029 <sup>+</sup>	0,100
MMP-3	3220,67 (1903,51 – 5059,77)	3590,24 (2258,10 – 6233,74)	3848,74 (2680,87 – 5138,88)	0,033 <sup>+</sup>	0,085	0,017 <sup>+</sup>	0,068 <sup>t</sup>
ICAM-1	414049,60 (357910,51 – 626018,67)	419193,73 (384083,39 – 575031,36)	422973,16 (351563,75 – 626924,60)	0,002 <sup>+</sup>	0,016 <sup>§</sup>	0,066	0,159

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

Citokin	T0 Medijan (Q1 – Q3)	T1 Medijan (Q1 – Q3)	T6 Medijan (Q1 – Q3)	p (T1–T0)	q (T1–T0)	p (T6–T0)	q (T6–T0)
IL-21*	14,05 (8,31 – 28,15)	12,25 (9,22 – 26,11)	12,93 (7,99 – 26,11)	0,769	0,842	0,805	0,920
Leptin	39114,93 (19535,87 – 68206,15)	45907,34 (23217,15 – 79004,46)	45708,75 (24820,08 – 79628,28)	0,003 <sup>+</sup>	0,016 <sup>§</sup>	0,114	0,228
MMP-8	1266,01 (941,83 – 2128,30)	1348,48 (980,06 – 2508,00)	1273,54 (941,83 – 2449,27)	0,514	0,657	0,993	0,993
MMP-9	93074,04 (67221,51 – 114587,64)	84274,95 (53274,84 – 112980,09)	73042,37 (57343,07 – 104738,21)	0,574	0,694	0,098	0,215
VCAM-1	721337,63 (590172,19 – 899572,43)	734132,57 (564715,50 – 820662,53)	681647,50 (548267,37 – 832017,11)	0,110	0,169	0,045 <sup>+</sup>	0,119
TGF-β1	6943,65 (4198,09 – 12322,62)	10107,39 (4205,96 – 16693,41)	7736,96 (4008,79 – 15304,79)	0,021 <sup>+</sup>	0,067 <sup>t</sup>	0,448	0,632
TGF-β2	935,97 (781,11 – 999,25)	1002,50 (754,65 – 1181,31)	927,83 (762,78 – 1088,15)	0,059	0,111	0,728	0,889
TGF-β3	256,38 (176,84 – 418,80)	408,06 (163,59 – 526,74)	256,58 (155,63 – 562,25)	0,046 <sup>+</sup>	0,097 <sup>t</sup>	0,421	0,632
TIMP-1	75995,41 (69258,89 – 84696,15)	84941,27 (76861,19 – 100724,91)	84907,66 (72453,14 – 97386,38)	< 0,001 <sup>+</sup>	0,001 <sup>§</sup>	< 0,001 <sup>+</sup>	0,003 <sup>§</sup>
TIMP-2	90735,02 (81380,41 – 97618,38)	93231,87 (84198,79 – 99739,16)	92834,53 (82210,57 – 100003,20)	0,019 <sup>+</sup>	0,067 <sup>t</sup>	0,180	0,308
TIMP-4	1954,02 (1572,30 – 2198,94)	1776,49 (1534,54 – 2534,31)	1854,49 (1451,94 – 2240,54)	0,844	0,883	0,478	0,637

Podaci su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom (Q1 – Q3). Koncentracije su izražene u pg/mL. Statističke razlike između vremenskih točaka procijenjene su Wilcoxonovim testom. q-vrijednosti predstavljaju korigirane p-vrijednosti nakon Benjamini–Hochberg korekcije stope lažnih otkrića zbog višestrukog testiranja.

\*Citokini i kemokini s više od 30% ekstrapoliranih vrijednosti; <sup>+</sup> p < 0,05; <sup>t</sup> q < 0,10; <sup>§</sup> q < 0,05.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

**Tablica 5.5.1.4. Koncentracije citokina i kemokina u krvnoj plazmi prije liječenja (T0) te jedan (T1) i šest (T6) mjeseci nakon liječenja hijaluronskom kiselinom s prikazom unutargrupne statistike**

Citokin	T0 Medijan (Q1 – Q3)	T1 Medijan (Q1 – Q3)	T6 Medijan (Q1 – Q3)	p (T1-T0)	q (T1-T0)	p (T6-T0)	q (T6-T0)
IL-1 $\beta$ *	0,05 (0,02 – 0,08)	-	0,08 (0,04 – 0,10)	-	-	0,292	0,607
IL-6*	4,70 (3,40 – 5,67)	4,83 (4,17 – 6,14)	5,09 (3,40 – 6,14)	0,605	0,663	0,552	0,736
IL-8	5,71 (5,17 – 8,12)	6,14 (5,32 – 7,59)	5,74 (5,04 – 7,32)	0,349	0,506	0,981	0,981
MCP-1	33,51 (24,51 – 47,56)	37,21 (35,11 – 51,78)	38,43 (31,80 – 51,91)	0,025 <sup>+</sup>	0,133	0,053	0,220
MIP-1 $\alpha$	2,75 (2,06 – 3,69)	3,05 (2,84 – 3,51)	3,05 (2,41 – 3,53)	0,463	0,627	0,379	0,607
SDF-1 $\alpha$ + $\beta$	1188,86 (926,94 – 1472,73)	1276,99 (1035,55 – 1439,34)	1207,33 (1070,75 – 1501,69)	0,557	0,640	0,913	0,953
TNF- $\alpha$ *	5,68 (3,27 – 8,07)	5,37 (4,56 – 8,83)	6,35 (5,14 – 7,74)	0,287	0,503	0,055	0,220
IL-18*	13,43 (5,04 – 15,55)	10,71 (6,66 – 18,98)	9,98 (2,71 – 16,89)	0,859	0,898	0,657	0,788
MIP-1 $\beta$	126,52 (107,73 – 141,17)	120,14 (100,19 – 131,77)	113,33 (93,06 – 138,64)	0,035 <sup>+</sup>	0,133	0,078	0,256
RANTES	3019,79 (1987,18 – 4516,41)	1988,99 (890,50 – 3598,46)	2452,61 (2091,54 – 3121,63)	0,122	0,281	0,122	0,326
MMP-2	13418,81 (7238,90 – 16154,71)	13939,80 (11761,62 – 19193,28)	13191,23 (8473,51 – 16126,41)	0,058	0,191	0,199	0,477
MMP-3	1970,39 (1646,78 – 3595,74)	3040,86 (2396,51 – 3891,25)	2602,87 (2148,07 – 5047,60)	0,006 <sup>+</sup>	0,133	0,035 <sup>+</sup>	0,208
ICAM-1	467631,38 (397979,79 – 729300,96)	467560,08 (410829,74 – 727183,67)	477745,89 (421868,32 – 708312,51)	0,022 <sup>+</sup>	0,133	0,028 <sup>+</sup>	0,208

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

Citokin	T0 Medijan (Q1 – Q3)	T1 Medijan (Q1 – Q3)	T6 Medijan (Q1 – Q3)	p (T1-T0)	q (T1-T0)	p (T6-T0)	q (T6-T0)
IL-21*	22,23 (10,13 – 37,24)	18,50 (6,91 – 39,26)	13,21 (6,91 – 43,30)	0,031 <sup>+</sup>	0,133	0,453	0,680
Leptin	27692,44 (21591,16 – 51082,97)	38184,76 (22738,19 – 60452,10)	36044,64 (26879,72 – 79459,32)	0,306	0,503	0,349	0,607
MMP-8	1782,32 (1026,48 – 2307,95)	1279,93 (912,95 – 2498,89)	1498,03 (970,63 – 2584,88)	0,352	0,506	0,372	0,607
MMP-9	76794,94 (58571,37 – 124134,81)	62961,18 (48087,28 – 101714,34)	87012,51 (47199,52 – 125137,51)	0,102	0,262	0,616	0,779
VCAM-1	683298,48 (528935,40 – 885195,31)	695844,16 (525577,86 – 764107,57)	696474,77 (618465,35 – 837665,96)	0,983	0,983	0,372	0,607
TGF-β1	18064,01 (7532,79 – 21905,49)	10077,91 (4469,62 – 17000,81)	12360,93 (5796,76 – 18418,14)	0,306	0,503	0,744	0,812
TGF-β2	1010,60 (905,40 – 1273,17)	924,95 (759,52 – 1112,53)	1034,42 (872,68 – 1144,13)	0,078	0,224	0,744	0,812
TGF-β3	563,22 (274,56 – 621,15)	341,03 (179,98 – 557,82)	356,25 (218,86 – 604,49)	0,248	0,503	0,528	0,736
TIMP-1	90507,26 (76294,87 – 100128,05)	89879,07 (78460,36 – 104215,80)	93070,68 (80949,87 – 130382,90)	0,557	0,640	0,085	0,256
TIMP-2	86627,74 (81984,83 – 95520,38)	91983,12 (87507,31 – 100436,06)	96320,80 (85590,57 – 104901,22)	0,028 <sup>+</sup>	0,133	0,001 <sup>+</sup>	0,033 <sup>†</sup>
TIMP-4	1959,51 (1733,99 – 2599,06)	1860,73 (1657,21 – 2407,57)	2385,75 (1897,97 – 2712,86)	0,528	0,640	0,028 <sup>+</sup>	0,208

Podaci su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom (Q1 – Q3). Koncentracije su izražene u pg/mL. Statističke razlike između vremenskih točaka procijenjene su Wilcoxonovim testom. q-vrijednosti predstavljaju korigirane p-vrijednosti nakon Benjamini–Hochberg korekcije stope lažnih otkrića zbog višestrukog testiranja.

\*Citokini i kemokini s više od 30% ekstrapoliranih vrijednosti; <sup>+</sup> p < 0,05; <sup>†</sup> q < 0,05.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

Međugrupnom usporedbom metoda MFAT i HA nađene su značajne razlike za nekoliko citokina/kemokina nakon 1 te nakon 6 mjeseci praćenja. Nakon 1 mjeseca od terapijske intervencije, skupina liječena s MFAT-om imala je značajniji pad koncentracije MMP-2, značajniji rast koncentracije TIMP-1, dok je razlika promjena koncentracija TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 i TGF- $\beta$ 3 bila značajna uslijed blagog rasta koncentracije u MFAT skupini te pada u skupini liječenoj s HA-om. Ipak, nakon korekcija p-vrijednosti zbog višestrukog testiranja, nijedna promjena koncentracije analita nije zadržala statistički značajnu razliku (svi  $q > 0,05$ , a samo je promjena koncentracije MMP-2 imala trend većeg pada u MFAT skupini ( $q = 0,055$ )).

Usporedbom promjena koncentracija citokina i kemokina nakon 6 mjeseci, također su utvrđene značajne razlike nekoliko citokina Mann-Whitney U testom. Tako je u skupini MFAT zabilježen značajniji pad koncentracije MMP-2 i VCAM-1 u odnosu na HA, dok je u HA skupini bio značajniji rast TIMP-2. Razlika u promjeni koncentracije TIMP-4 bila je također značajna uslijed blagog pada u MFAT skupini i blagog rasta u HA skupini. Međutim, nijedna od tih razlika nije preživjela korekciju zbog višestrukog testiranja (svi  $q > 0,05$ ).

Iako su pojedine razlike u promjenama koncentracija (posebno MMP-2 i TGF- $\beta$  izoformi) pokazale trend međugrupne divergencije, nakon korekcije zbog višestrukog testiranja nije utvrđena značajna razlika između MFAT i HA, što sugerira da su obje terapije dovodile do sličnih sistemskih učinaka na razini plazmatskih citokina.

Svi medijani promjena s interkvartilnim rasponom nakon 1 i 6 mjeseci u obje skupine, zajedno s p-vrijednostima nakon primjene Mann-Whitney U testa za međugrupnu usporedbu te q-vrijednostima nakon Benjamini-Hochberg korekcije zbog višestrukog testiranja prikazani su u tablici 5.5.1.5.

Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI

Tablica 5.5.1.5. Međugrupne usporedbe promjena koncentracija citokina i kemokina u krvnoj plazmi između skupina liječenih mikrofragmentiranim masnim tkivom (MFAT) i hijaluronskom kiselinom (HA)

Citokin	$\Delta T1$ MFAT	$\Delta T1$ HA	p ( $\Delta T1$ )	q ( $\Delta T1$ )	$\Delta T6$ MFAT	$\Delta T6$ HA	p ( $\Delta T6$ )	q ( $\Delta T6$ )
	Medijan (Q1 – Q3)	Medijan (Q1 – Q3)			Medijan (Q1 – Q3)	Medijan (Q1 – Q3)		
IL-1 $\beta$ *	-	-	-	-	0,03 (0,00 – 0,04)	0,03 (0,00 – 0,06)	1,000	1,000
IL-6*	0,00 (-1,94 – 1,47)	0,39 (-1,23 – 1,57)	0,431	0,620	0,72 (-1,03 – 2,00)	0,00 (-0,60 – 1,72)	0,592	0,858
IL-8	0,42 (-0,46 – 1,43)	0,68 (-0,35 – 1,64)	0,977	0,977	0,43 (-0,33 – 1,94)	-0,05 (-0,99 – 1,19)	0,208	0,623
MCP-1	6,17 (2,11 – 10,32)	8,56 (1,83 – 13,81)	0,817	0,857	8,36 (0,52 – 15,08)	6,05 (-2,11 – 11,31)	0,453	0,858
MIP-1 $\alpha$	0,28 (0,00 – 0,84)	0,15 (-0,26 – 0,63)	0,414	0,620	0,32 (0,00 – 1,18)	0,30 (-0,14 – 0,87)	0,197	0,623
SDF-1 $\alpha$ + $\beta$	-43,68 (-211,80 – 62,10)	-26,91 (-117,52 – 252,04)	0,110	0,423	19,01 (-172,10 – 132,82)	-12,38 (-126,21 – 192,41)	0,954	0,995
TNF- $\alpha$ *	0,57 (-0,28 – 1,05)	0,37 (-0,30 – 1,34)	0,803	0,857	0,86 (0,00 – 1,47)	0,54 (-0,28 – 1,62)	0,834	0,910
IL-18*	1,10 (-2,55 – 2,77)	-0,33 (-4,63 – 3,22)	0,819	0,857	0,35 (-3,67 – 3,34)	0,33 (-5,55 – 1,43)	0,465	0,858
MIP-1 $\beta$	-2,80 (-14,51 – 13,37)	-15,38 (-29,08 – -0,12)	0,193	0,445	3,06 (-12,30 – 15,76)	-11,37 (-18,33 – 6,56)	0,124	0,596
RANTES	-95,38 (-1016,27 – 752,37)	-801,72 (-2245,46 – 529,04)	0,344	0,599	-148,61 (-1034,89 – 503,51)	-648,70 (-1445,70 – 961,32)	0,679	0,858
MMP-2	-1671,82 (-5536,20 – 1071,79)	2607,00 (-191,92 – 4274,56)	0,002 <sup>+</sup>	0,055 <sup>t</sup>	-1719,57 (-3931,15 – 864,86)	1992,17 (-2022,63 – 4434,88)	0,038 <sup>+</sup>	0,227
MMP-3	165,75 (-239,07 – 1445,43)	913,59 (361,16 – 1492,70)	0,155	0,445	297,37 (-268,25 – 1173,35)	688,92 (-77,86 – 1902,17)	0,397	0,858
ICAM-1	17004,15 (-6147,08 – 41285,70)	20441,92 (9275,79 – 43503,06)	0,604	0,771	14009,80 (-9326,92 – 47906,51)	45327,31 (-4960,81 – 87900,00)	0,155	0,619
IL-21*	0,47 (-3,00 – 2,15)	-2,86 (-5,07 – 0,68)	0,177	0,445	0,00 (-1,81 – 2,79)	-0,23 (-6,44 – 4,09)	0,567	0,858
Leptin	6915,66 (211,64 – 19613,36)	4028,92 (-2939,80 – 8019,16)	0,155	0,445	3492,93 (-3556,38 – 13450,78)	4535,13 (-10639,01 – 13853,91)	0,832	0,910

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

Citokin	$\Delta T1$ MFAT	$\Delta T1$ HA	p ( $\Delta T1$ )	q ( $\Delta T1$ )	$\Delta T6$ MFAT	$\Delta T6$ HA	p ( $\Delta T6$ )	q ( $\Delta T6$ )
	Medijan (Q1 – Q3)	Medijan (Q1 – Q3)			Medijan (Q1 – Q3)	Medijan (Q1 – Q3)		
MMP-8	41,71 (-169,93 – 276,62)	-58,46 (-299,95 – 92,76)	0,296	0,599	9,64 (-286,02 – 216,37)	108,14 (-117,96 – 611,17)	0,554	0,858
MMP-9	-9352,49 (-22687,91 – 16500,27)	-15712,93 (-22420,47 – 6501,12)	0,365	0,599	-3880,44 (-27895,41 – 6460,49)	-7103,48 (-25337,56 – 10333,28)	0,636	0,858
VCAM-1	-24058,16 (-89391,88 – 38238,83)	-4231,25 (-58173,63 – 67555,42)	0,327	0,599	-38698,92 (-104931,55 – 26300,00)	15242,13 (-37922,52 – 103540,45)	0,038 <sup>+</sup>	0,227
TGF- $\beta$ 1	2174,95 (-536,03 – 5812,71)	-2700,35 (-5063,16 – 4749,77)	0,028 <sup>+</sup>	0,151	530,33 (-3922,26 – 3671,28)	404,27 (-12811,83 – 4392,03)	0,478	0,858
TGF- $\beta$ 2	96,77 (-55,15 – 205,08)	-115,72 (-231,76 – 56,82)	0,014 <sup>+</sup>	0,118	50,91 (-117,47 – 182,49)	-21,86 (-242,90 – 228,33)	0,665	0,858
TGF- $\beta$ 3	37,51 (-25,72 – 184,83)	-29,49 (-171,44 – 63,45)	0,033 <sup>+</sup>	0,151	19,59 (-154,20 – 143,18)	-1,28 (-330,48 – 172,87)	0,334	0,858
TIMP-1	11277,72 (2004,23 – 21309,74)	1665,27 (-6843,33 – 9158,07)	0,015 <sup>+</sup>	0,118	8495,70 (1194,36 – 13619,68)	5664,12 (-3628,19 – 24524,67)	0,803	0,910
TIMP-2	3415,52 (-1680,79 – 6140,07)	4022,51 (947,06 – 8178,91)	0,658	0,797	2505,48 (-1266,60 – 4986,21)	7660,19 (2754,72 – 9367,32)	0,006 <sup>+</sup>	0,135
TIMP-4	-65,45 (-280,43 – 148,66)	-164,40 (-385,00 – 278,79)	0,489	0,661	-106,02 (-334,42 – 168,88)	353,02 (-7,40 – 567,62)	0,024 <sup>+</sup>	0,227

Promjene ( $\Delta T1$  i  $\Delta T6$ ) predstavljaju razliku u koncentraciji između početnog mjerenja ( $T0$ ) i mjerenja nakon 1 odnosno 6 mjeseci. Podaci su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom (Q1 – Q3). Promjene koncentracija izražene su u pg/mL. Statistička usporedba između skupina provedena je Mann–Whitney U testom. q-vrijednosti predstavljaju korigirane p-vrijednosti nakon Benjamini–Hochberg korekcije stope lažnih otkrića zbog višestrukog testiranja.

\*Citokini i kemokini s više od 30% ekstrapoliranih vrijednosti; <sup>+</sup> p < 0,05; <sup>†</sup> q < 0,10.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

### **5.5.2. Analiza citokina i kemokina u sinovijalnoj tekućini**

Uzorci sinovijalne tekućine prikupljeni su u dvije vremenske točke tj. u trenutku intervencije (T0), neposredno prije intraartikularne aplikacije MFAT ili HA, te jedan mjesec nakon intervencije (T1), prilikom kontrolnog pregleda. Aspiracija sinovijalne tekućine provedena je kroz suprapatelarni prostor pod aseptičkim uvjetima.

Unatoč odabiru ispitanika s izraženim upalnim fenotipom OA koljena, koji je definiran prisutnošću izljeva (MOAKS skor za sinovitis i izjev  $\geq 2$ ), u dijelu ispitanika nije bilo moguće prikupiti dovoljnu količinu sinovijalne tekućine ni u početnoj točki (T0). Tako je uzorak SF uspješno prikupljen u 13 od 35 ispitanika (37,1%) u MFAT skupini te u 10 od 18 ispitanika (55,6%) u HA skupini. Nakon isključivanja jednog bolesnika s kroničnim gihtom, konačan broj ispitanika s dostupnim početnim uzorcima iznosio je 13/34 (38,2%) u MFAT skupini i 10/18 (55,6%) u HA skupini.

Pri kontrolnom pregledu, aspiracija sinovijalne tekućine bila je uspješna u po 8 ispitanika u svakoj skupini, čime je za potrebe unutargrupne i međugrupne analize ukupno bilo dostupno 16 ispitanika (8 MFAT i 8 HA) s parovima vrijednosti u točkama T0 i T1.

Analiti su određeni istim multiplex sustavom i istim panelom od 39 biomarkera kao i u uzorcima plazme. Kao i u slučaju analiza plazme, neki od analita nisu bili mjerljivi u svim uzorcima, budući da su koncentracije bile izvan mjerljivog raspona (OOR, engl. *out of range*). U statističku obradu uključeni su samo oni citokini i kemokini koji su bili mjerljivi u  $\geq 50$  % parova uzoraka (T0 i T1).

Detektabilnost, odnosno udio uzoraka s vrijednostima unutar detektabilnog raspona u pojedinoj vremenskoj točki, kao i broj parova uzoraka s valjanim mjerenjima, prikazani su u tablicama 5.5.2.1 i 5.5.2.2 za MFAT i HA skupinu.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

**Tablica 5.5.2.1. Detektabilnost i dostupnost podataka za analizu citokina i kemokina u sinovijalnoj tekućini u skupini liječenoj mikrofragmentiranim masnim tkivom**

<b>Analit</b>	<b>% unutar raspona T0*</b>	<b>% unutar raspona T1*</b>	<b>N parova T0–T1<sup>+</sup></b>
IL-1 $\beta$	100%	100%	8
IL-4	15%	13%	1
IL-6	85%	75%	6
IL-8	85%	100%	7
MCP-1	100%	100%	8
MCP-3	0%	0%	0
MIP-1 $\alpha$	15%	13%	1
SDF-1 $\alpha$ + $\beta$	100%	100%	8
TNF- $\alpha$	15%	13%	1
IL-10	0%	0%	0
IL-12)	8%	25%	0
IL-13	0%	0%	0
IL-15	0%	0%	0
IL-17A	0%	0%	0
IL-18	92%	100%	8
IL-1ra	69%	88%	6
IL-2	69%	75%	6
IL-5	54%	63%	3
MIP-1 $\beta$	77%	88%	7
RANTES	15%	13%	0
VEGF	0%	0%	0
IL-22	0%	0%	0
MMP-1	92%	100%	7
MMP-2	100%	100%	8
MMP-3	100%	100%	8
ICAM-1	100%	100%	8
IL-21	100%	100%	8
Leptin	100%	100%	8
MMP-13	0%	13%	0
MMP-8	31%	38%	3
MMP-9	100%	100%	8

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

<b>Analit</b>	<b>% unutar raspona T0*</b>	<b>% unutar raspona T1*</b>	<b>N parova T0–T1<sup>+</sup></b>
VCAM-1	100%	100%	8
TGF-β1	100%	100%	8
TGF-β2	100%	100%	8
TGF-β3	92%	100%	7
TIMP-1	100%	100%	8
TIMP-2	100%	100%	8
TIMP-4	100%	100%	8

\* udio uzoraka bez OOR oznaka u vremenskoj točki T0 ili T1; <sup>+</sup> broj ispitanika s valjanom vrijednošću u obje vremenske točke (T0 i T1), korišten za usporedbu unutar skupine.

**Tablica 5.5.2.2. Detektabilnost i dostupnost podataka za analizu citokina i kemokina u sinovijalnoj tekućini u skupini liječenoj aplikacijom hijaluronske kiseline**

<b>Analit</b>	<b>% unutar raspona T0*</b>	<b>% unutar raspona T1*</b>	<b>N parova T0–T1<sup>+</sup></b>
IL-1β	90%	100%	8
IL-4	0%	0%	0
IL-6	90%	75%	6
IL-8	100%	100%	8
MCP-1	100%	100%	8
MCP-3	0%	0%	0
MIP-1α	20%	13%	1
SDF-1α+β	100%	100%	8
TNF-α	30%	25%	1
IL-10	0%	100%	0
IL-12)	0%	100%	0
IL-13	0%	13%	0
IL-15	0%	0%	0
IL-17A	0%	0%	0
IL-18	80%	100%	7
IL-1ra	60%	63%	5
IL-2	60%	63%	5
IL-5	40%	38%	3

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

<b>Analit</b>	<b>% unutar raspona T0*</b>	<b>% unutar raspona T1*</b>	<b>N parova T0–T1<sup>+</sup></b>
MIP-1 $\beta$	40%	88%	3
RANTES	20%	13%	0
VEGF	0%	0%	0
IL-22	0%	0%	0
MMP-1	80%	75%	6
MMP-2	100%	100%	8
MMP-3	100%	100%	8
ICAM-1	100%	100%	8
IL-21	100%	100%	8
Leptin	100%	100%	8
MMP-13	100%	100%	8
MMP-8	20%	25%	0
MMP-9	100%	100%	8
VCAM-1	100%	100%	8
TGF- $\beta$ 1	100%	100%	8
TGF- $\beta$ 2	100%	100%	8
TGF- $\beta$ 3	100%	100%	8
TIMP-1	100%	100%	8
TIMP-2	100%	100%	8
TIMP-4	100%	100%	8

\* udio uzoraka bez OOR oznaka u vremenskoj točki T0 ili T1; <sup>+</sup> broj ispitanika s valjanom vrijednošću u obje vremenske točke (T0 i T1), korišten za usporedbu unutar skupine.

U skupini liječenoj aplikacijom MFAT, Wilcoxonovim testom utvrđen je statistički značajan porast koncentracija nekoliko analita između početnog mjerenja (T0) i mjerenja nakon jednog mjeseca (T1): IL-8, leptina, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TIMP-2 i TIMP-4, dok je istodobno zabilježen pad koncentracije IL-21.

Međutim, nakon korekcije p-vrijednosti zbog višestrukog testiranja prema Benjamini–Hochberg postupku, nijedna od navedenih promjena nije ostala statistički značajna (sve  $q > 0,05$ ).

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

U HA skupini zabilježen je jedino značajan porast koncentracije leptina ( $p = 0,012$ ), no ta razlika također nije bila statistički značajna nakon Benjamini-Hochberg korekcije p-vrijednosti zbog višestrukog testiranja ( $q > 0,05$ ).

Medijani i interkvartilni rasponi za obje vremenske točke (T0 i T1), kao i p-vrijednosti nakon Wilcoxonovog testa te q-vrijednosti nakon Benjamini-Hochberg korekcije prikazani su za obje skupine ispitanika u tablicama 5.5.2.3. i 5.5.2.4.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

**Tablica 5.5.2.3. Koncentracije citokina i kemokina u sinovijalnoj tekućini prije liječenja (T0) te jedan (T1) mjesec nakon liječenja mikrofragmentiranim masnim tkivom s prikazom unutargrupne statistike**

<b>Citokin</b>	<b>T0 Medijan (Q1 – Q3)</b>	<b>T1 Medijan (Q1 – Q3)</b>	<b>p (T1–T0)</b>	<b>q (T1–T0)</b>
IL-1 $\beta$ *	1,09 (0,55 – 1,89)	1,63 (0,95 – 1,89)	0,528	0,759
IL-8	15,65 (10,44 – 36,18)	25,99 (16,57 – 48,23)	0,018*	0,117
MCP-1	125,48 (84,13 – 208,67)	151,37 (122,44 – 215,90)	0,161	0,338
SDF-1 $\alpha$ + $\beta$	3314,60 (2993,31 – 3570,61)	3083,38 (2818,43 – 3318,15)	0,401	0,658
IL-18*	2,80 (0,97 – 10,24)	6,04 (1,48 – 8,27)	0,674	0,805
IL-1Ra*	775,20 (740,62 – 832,39)	922,73 (763,66 – 1203,71)	0,080	0,229
IL-2*	34,58 (32,76 – 38,26)	35,79 (33,36 – 38,26)	0,715	0,805
IL-6	234,16 (21,31 – 346,81)	123,71 (25,15 – 841,36)	0,463	0,710
MIP-1 $\beta$	13,60 (12,70 – 19,48)	14,49 (10,86 – 26,36)	1,000	1,000
MMP-1*	6254,96 (2904,97 – 17447,12)	8229,54 (2074,71 – 16964,16)	0,735	0,805
MMP-2	179471,23 (160275,11 – 197278,49)	200346,70 (172679,52 – 217605,35)	0,327	0,627
MMP-3	493445,51 (373706,66 – 628405,72)	630394,88 (374783,86 – 674081,14)	0,401	0,658
ICAM-1	151296,61 (136144,30 – 280310,81)	228167,60 (161824,70 – 271633,76)	0,735	0,805

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

<b>Citokin</b>	<b>T0 Medijan (Q1 – Q3)</b>	<b>T1 Medijan (Q1 – Q3)</b>	<b>p (T1–T0)</b>	<b>q (T1–T0)</b>
IL-21	84,42 (65,14 – 90,82)	39,19 (35,91 – 58,68)	0,012 <sup>+</sup>	0,117
Leptin	9729,03 (6130,97 – 14541,10)	13121,05 (8399,77 – 23057,02)	0,018 <sup>+</sup>	0,117
MMP-9	1270,21 (999,82 – 2480,48)	946,71 (513,99 – 2167,96)	0,889	0,929
VCAM-1	1260850,00 (568545,49 – 1577900,00)	1255550,00 (670772,18 – 1958150,00)	0,674	0,805
TGF-β1	979,68 (852,67 – 1222,97)	1353,65 (1069,18 – 1937,89)	0,036 <sup>+</sup>	0,117
TGF-β2	325,55 (282,46 – 451,98)	481,17 (351,21 – 662,57)	0,025 <sup>+</sup>	0,117
TGF-β3	29,81 (23,15 – 34,57)	41,63 (31,12 – 45,53)	0,128	0,328
TIMP-1*	390840,06 (245589,58 – 505520,24)	441070,16 (227521,27 – 537951,71)	0,161	0,338
TIMP-2	138792,21 (114623,10 – 152855,89)	155164,39 (119161,04 – 184473,36)	0,036 <sup>+</sup>	0,117
TIMP-4	1122,18 (1043,86 – 1194,10)	1272,65 (1080,39 – 1665,94)	0,036 <sup>+</sup>	0,117

Podaci su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom (Q1 – Q3). Koncentracije su izražene u pg/mL. Statističke razlike između vremenskih točaka procijenjene su Wilcoxonovim testom. q-vrijednosti predstavljaju korigirane p-vrijednosti nakon Benjamini–Hochberg korekcije stope lažnih otkrića zbog višestrukog testiranja.

\*Citokini i kemokini s više od 30% ekstrapoliranih vrijednosti; <sup>+</sup> p < 0,05.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

**Tablica 5.5.2.4. Promjene koncentracija citokina i kemokina u sinovijalnoj tekućini u skupini liječenoj hijaluronskom kiselinom (HA) između početnog mjerenja (T0) i jednog mjeseca nakon primjene (T1)**

<b>Citokin</b>	<b>T0 Medijan (Q1 – Q3)</b>	<b>T1 Medijan (Q1 – Q3)</b>	<b>p (T1–T0)</b>	<b>q (T1–T0)</b>
IL-1 $\beta$ *	2,16 (1,22 – 3,22)	1,69 (0,68 – 3,15)	0,206	0,505
IL-8	18,47 (11,09 – 34,16)	15,33 (10,79 – 35,13)	0,484	0,591
MCP-1	103,70 (89,85 – 197,28)	169,45 (110,97 – 244,89)	0,050	0,366
SDF-1 $\alpha$ + $\beta$	2626,89 (2492,23 – 3899,54)	2889,25 (2626,40 – 3760,11)	0,263	0,578
IL-18*	9,03 (1,78 – 10,19)	3,30 (1,16 – 6,04)	0,173	0,476
IL-1Ra*	717,43 (647,19 – 717,43)	763,70 (740,62 – 786,69)	0,138	0,476
IL-2*	33,36 (32,16 – 37,02)	34,57 (30,97 – 34,57)	0,465	0,591
IL-6	67,00 (25,62 – 427,64)	153,67 (3,17 – 403,49)	0,173	0,476
MMP-1*	5940,07 (1218,81 – 16607,38)	4189,77 (1311,50 – 10355,50)	0,116	0,476
MMP-2	231105,11 (110260,35 – 284610,36)	246004,94 (108174,96 – 324994,66)	0,674	0,742
MMP-3	396954,37 (131495,46 – 542189,89)	318814,02 (146163,17 – 534318,64)	0,889	0,889
ICAM-1	167732,88 (111221,23 – 301363,40)	176436,55 (104684,29 – 247939,71)	0,401	0,588
IL-21	61,86 (39,19 – 90,81)	71,58 (52,17 – 90,80)	0,397	0,588

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

<b>Citokin</b>	<b>T0 Medijan (Q1 – Q3)</b>	<b>T1 Medijan (Q1 – Q3)</b>	<b>p (T1–T0)</b>	<b>q (T1–T0)</b>
Leptin	13776,35 (10407,54 – 23216,43)	22605,66 (14767,66 – 28850,96)	0,012 <sup>+</sup>	0,258
MMP-9	1538,00 (571,70 – 2824,61)	1266,63 (406,48 – 2468,07)	0,401	0,588
VCAM-1	872084,81 (650205,56 – 1764300,00)	901461,49 (557384,72 – 1666000,00)	0,889	0,889
TGF-β1	1355,04 (1030,42 – 1474,08)	1406,45 (1187,67 – 1669,88)	0,484	0,591
TGF-β2	478,23 (317,25 – 524,89)	490,21 (450,48 – 557,66)	0,674	0,742
TGF-β3	39,02 (27,16 – 48,84)	31,13 (19,11 – 56,62)	0,327	0,588
TIMP-1*	403833,41 (156861,53 – 509792,19)	284270,98 (161401,69 – 475020,26)	0,161	0,476
TIMP-2	145851,49 (107475,01 – 163612,73)	146645,63 (103415,14 – 164404,46)	0,327	0,588
TIMP-4	1390,92 (997,94 – 1701,84)	1543,36 (1006,78 – 1932,03)	0,050	0,366

Podaci su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom (Q1 – Q3). Koncentracije su izražene u pg/mL. Statističke razlike između vremenskih točaka procijenjene su Wilcoxonovim testom. q-vrijednosti predstavljaju korigirane p-vrijednosti nakon Benjamini–Hochberg korekcije stope lažnih otkrića zbog višestrukog testiranja.

\*Citokini i kemokini s više od 30% ekstrapoliranih vrijednosti; <sup>+</sup> p < 0,05.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

Za usporedbu promjena koncentracija između skupina liječenih aplikacijom MFAT i HA primijenjen je Mann–Whitney U test.

Analizom je utvrđeno da su promjene koncentracija IL-8 i IL-21 značajno razlikovale između skupina ( $p = 0,004$  i  $p = 0,009$ ). U MFAT skupini zabilježen je porast koncentracije IL-8 uz istodobni pad IL-21, dok je u HA skupini opažen obrnut obrazac, odnosno pad IL-8 te porast IL-21 nakon 1 mjeseca od intervencije.

Nakon korekcije p-vrijednosti zbog višestrukog testiranja Benjamini–Hochbergovim postupkom, navedene razlike nisu ostale statistički značajne, no zadržan je trend međugrupne razlike ( $q = 0,084$  za IL-8 i  $q = 0,094$  za IL-21).

Medijani i interkvartilni rasponi promjena koncentracija, kao i pripadajuće p- i q-vrijednosti, prikazani su u tablici 5.5.2.5.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

**Tablica 5.5.2.5. Međugrupne usporedbe promjena koncentracija citokina i kemokina u sinovijalnoj tekućini između skupina liječenih mikrofragmentiranim masnim tkivom (MFAT) i hijaluronskom kiselinom (HA)**

<b>Citokin</b>	<b><math>\Delta T1</math> MFAT Medijan (IQR)</b>	<b><math>\Delta T1</math> HA Medijan (IQR)</b>	<b>p (<math>\Delta T1</math> MFAT vs HA)</b>	<b>q (<math>\Delta T1</math> MFAT vs HA)</b>
IL-1 $\beta$ *	0,07 (-0,48 – 0,95)	-0,34 (-1,14 – 0,13)	0,226	0,546
IL-8	12,81 (7,60 – 17,06)	-4,00 (-5,53 – 3,50)	0,004 <sup>†</sup>	0,084 <sup>†</sup>
MCP-1	38,31 (-17,43 – 96,17)	38,62 (7,58 – 73,53)	0,834	0,873
SDF-1 $\alpha$ + $\beta$	-216,92 (-456,19 – 202,76)	89,09 (-25,18 – 407,84)	0,248	0,546
IL-18*	-0,22 (-5,80 – 5,22)	-1,31 (-5,41 – 0,13)	0,487	0,733
IL-1Ra*	159,08 (0,00 – 652,30)	93,43 (46,27 – 139,50)	0,715	0,828
IL-2*	0,60 (0,00 – 3,03)	0,00 (-2,45 – 2,41)	0,580	0,733
IL-6	-142,50 (-378,03 – 24,01)	-28,98 (-342,92 – -6,98)	0,873	0,873
MIP-1 $\beta$	-0,90 (-4,21 – 3,55)	-	-	-
MMP-1*	-1168,03 (-1936,92 – 2505,53)	-1708,32 (-2660,47 – 293,38)	0,391	0,733
MMP-2	27471,76 (-12225,31 – 50370,93)	5327,47 (-24634,96 – 40384,30)	0,600	0,733
MMP-3	62085,45 (-58751,37 – 112073,33)	2350,58 (-19336,02 – 11774,75)	0,093	0,409
ICAM-1	10528,09 (-35034,43 – 41423,62)	-13930,20 (-30619,96 – 9049,93)	0,529	0,733

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

Citokin	$\Delta T1$ MFAT Medijan (IQR)	$\Delta T1$ HA Medijan (IQR)	p ( $\Delta T1$ MFAT vs HA)	q ( $\Delta T1$ MFAT vs HA)
IL-21	-25,95 (-54,91 – -19,41)	12,79 (-12,86 – 25,95)	0,009 <sup>+</sup>	0,094 <sup>†</sup>
Leptin	4168,56 (2229,33 – 7405,65)	3694,36 (2222,65 – 9358,17)	0,753	0,828
MMP-9	-125,76 (-697,46 – 696,41)	-138,48 (-1468,23 – 233,43)	0,600	0,733
VCAM-1	55850,00 (-81590,28 – 178560,07)	18800,08 (-135839,44 – 126200,00)	0,529	0,733
TGF- $\beta$ 1	293,39 (4,52 – 887,93)	152,80 (-141,00 – 283,17)	0,208	0,546
TGF- $\beta$ 2	101,50 (27,18 – 295,54)	33,64 (-76,85 – 133,23)	0,141	0,445
TGF- $\beta$ 3	15,72 (2,62 – 19,86)	-12,49 (-16,06 – 5,64)	0,132	0,445
TIMP-1*	14593,48 (-4208,81 – 77630,54)	-7586,63 (-58278,79 – 2055,37)	0,059	0,323
TIMP-2	16171,17 (3384,37 – 32838,83)	-2397,39 (-4120,65 – 1666,51)	0,059	0,323
TIMP-4	175,40 (20,73 – 470,75)	81,92 (25,37 – 357,27)	0,401	0,733

Promjene ( $\Delta T1$  i  $\Delta T6$ ) predstavljaju razliku u koncentraciji između početnog mjerenja ( $T0$ ) i mjerenja nakon 1 odnosno 6 mjeseci. Podaci su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom (Q1 – Q3). Promjene koncentracija izražene su u pg/mL. Statistička usporedba između skupina provedena je Mann–Whitney U testom. q-vrijednosti predstavljaju korigirane p-vrijednosti nakon Benjamini–Hochberg korekcije stope lažnih otkrića zbog višestrukog testiranja.

\*Citokini i kemokini s više od 30% ekstrapoliranih vrijednosti; <sup>+</sup> p < 0,05; <sup>†</sup> q < 0,10.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

### **5.5.3. Analiza koncentracija fenilalanina u krvnoj plazmi**

Koncentracija fenilalanina u krvnoj plazmi mjerena je prije terapije (T0), mjesec dana nakon terapije (T1) te šest mjeseci nakon terapije (T6) u obje terapijske skupine (MFAT i HA).

Analiza je provedena radi procjene mogućih metaboličkih promjena tijekom biološkog liječenja te praćenja potencijalnih sustavnih učinaka MFAT.

Rezultati su izraženi kao medijan i interkvartilni raspon (IQR). Razlike kroz vrijeme unutar svake skupine analizirane su Wilcoxonovim testom, dok su međugrupne razlike u promjeni koncentracije između skupina ( $\Delta T1$ ,  $\Delta T6$ ) procijenjene Mann–Whitney U testom.

U obje terapijske skupine zabilježen je statistički značajan porast koncentracije fenilalanina tijekom praćenja ( $p < 0,05$ ). U MFAT skupini medijan koncentracije porastao je s 39,43  $\mu\text{mol/L}$  (35,56 – 43,16) prije terapije na 45,41  $\mu\text{mol/L}$  (41,49 – 51,22) nakon šest mjeseci. U skupini liječenoj HA-om zabilježen je sličan porast, s 39,94  $\mu\text{mol/L}$  (38,22 – 43,35) na 47,66  $\mu\text{mol/L}$  (46,36 – 49,47). Medijani i interkvartilni rasponi za svaku vremensku točku, kao i p-vrijednosti za unutargrupne usporedbe prikazani su u tablici 5.5.3.1.

**Tablica 5.5.3.1. Koncentracija fenilalanina u krvnoj plazmi kroz vrijeme u skupinama liječenim mikrofragmentiranim masnim tkivom (MFAT) i hijaluronskom kiselinom (HA) s prikazom unutargrupne statistike**

Skupina	T0 Medijan (Q1 – Q3)	T1 Medijan (Q1 – Q3)	T6 Medijan (Q1 – Q3)	p (T1–T0)	p (T6–T0)
MFAT	39,43 (35,56 – 43,16)	43,24 (39,82 – 49,69)	45,41 (41,49 – 51,22)	< 0,001	< 0,001
HA	39,94 (38,22 – 43,35)	46,34 (40,18 – 52,11)	47,66 (46,36 – 49,47)	0,004	< 0,001

Prikazane su koncentracije fenilalanina u krvnoj plazmi izražene kao medijan i interkvartilni raspon (Q1 – Q3). Vrijednosti su iskazane u  $\mu\text{mol/L}$ . Statistička analiza provedena je Wilcoxonovim testom.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

Međugrupne usporedbe promjena ( $\Delta T1$  i  $\Delta T6$ ) nisu pokazale značajne razlike između skupina ( $p = 0,985$  i  $p = 0,453$ , tablica 5.5.3.2).

Povećanje koncentracije fenilalanina tijekom praćenja bilo je, dakle, prisutno u obje skupine neovisno o vrsti primijenjene terapije.

**Tablica 5.5.3.2. Usporedba promjene koncentracije fenilalanina između skupina liječenih aplikacijom mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) i hijaluronske kiseline (HA)**

	$\Delta T1$ Medijan (Q1 – Q3)	p ( $\Delta T1$ MFAT vs HA)	$\Delta T6$ Medijan (Q1 – Q3)	p ( $\Delta T6$ MFAT vs HA)
MFAT	5,53 (1,44 – 8,88)	0,985	6,06 (3,08 – 10,02)	0,453
HA	6,52 (0,46 – 10,17)		7,17 (4,55 – 9,61)	

Tablica prikazuje promjene koncentracija fenilalanina nakon jedan ( $\Delta T1$ ) i šest ( $\Delta T6$ ) mjeseci u odnosu na početnu vrijednost. Promjene koncentracija su iskazane u  $\mu\text{mol/L}$ . Statistička usporedba između skupina provedena je Mann–Whitney U testom.

## **5.6. Analiza mikrofragmentiranog masnog tkiva**

### **5.6.1. Analiza citokina i kemokina u mikrofragmentiranom masnom tkivu**

U uzorcima mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) analiziran je panel od 39 citokina, kemokina, enzima i inhibitora matriks-metaloproteinaza, korištenjem multiplex sustava Bio-Plex® 200 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Cilj analize bio je utvrditi prisutnost i koncentracije upalnih, protuupalnih i regenerativnih biomolekula unutar samog MFAT pripravka, čime se procjenjuje njegov biološki potencijal.

U tablici 5.6.1.1 prikazan je postotak valjanih mjerenja (vrijednosti unutar mjernog raspona, tj. bez oznaka „out of range“) za svaki analit. Analiti s  $\geq 50\%$  valjanih mjerenja uključeni su u deskriptivnu statističku analizu, dok su oni s manjim udjelom valjanih podataka isključeni iz daljnjih analiza.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

**Tablica 5.6.1.1. Broj i postotak vrijednosti unutar mjernog raspona za svaki analit u uzorcima mikrofragmentiranog masnog tkiva**

<b>Analit</b>	<b>N</b>	<b>% u rasponu</b>
IL-1 $\beta$	33	100%
IL-8	33	100%
MCP-1	27	82%
MCP-3	33	100%
SDF-1 $\alpha$ + $\beta$	33	100%
TNF- $\alpha$	20	61%
IFN-g	2	6%
IL-10	29	88%
IL-13	33	100%
IL-15	0	0%
IL-17A	33	100%
IL-18	21	64%
IL-1ra	33	100%
IL-2	0	0%
IL-4	0	0%
IL-5	16	48%
IL-6	33	100%
MIP-1 $\alpha$	31	94%
MIP-1 $\beta$	33	100%
RANTES	33	100%
VEGF	0	0%
IL-12	33	100%
IL-22	33	100%
MMP-1	33	100%
MMP-2	18	55%
MMP-3	33	100%
ICAM-1	16	48%
IL-21	33	100%
Leptin	33	100%
MMP-13	33	100%
MMP-8	33	100%

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

Analit	N u rasponu*	% u rasponu*
MMP-9	33	100%
VCAM-1	31	94%
TGF- $\beta$ 1	33	100%
TGF- $\beta$ 2	33	100%
TGF- $\beta$ 3	33	100%
TIMP-1	33	100%
TIMP-2	33	100%
TIMP-4	33	100%

\* broj ispitanika s mjerljivim vrijednostima određenog citokina tj. bez OOR (engl. *out of range*) u uzorku MFAT; + udio uzoraka bez OOR oznaka.

U tablici 5.6.1.2 prikazane su koncentracije izražene kao medijan i interkvartilni raspon (Q1 – Q3). Dodatno, za svaki analit naveden je i udio ekstrapoliranih vrijednosti, odnosno rezultata izvan standardne krivulje kalibracije koji su interpretirani s oprezom.

**Tablica 5.6.1.2. Deskriptivna statistika koncentracija citokina i kemokina u uzorcima mikrofragmentiranog masnog tkiva**

Analit	Medijan (Q1 – Q3)	% ekstrapoliranih vrijednosti
IL-1 $\beta$ *	0,11 (0,08 – 0,15)	94%
IL-8*	0,87 (0,44 – 1,17)	42%
MCP-1	5,24 (2,70 – 8,62)	0%
MCP-3*	13,67 (10,34 – 16,39)	97%
SDF-1 $\alpha$ + $\beta$	181,80 (100,48 – 265,39)	9%
TNF- $\alpha$ *	1,84 (0,85 – 2,92)	75%
IL-10	5,73 (3,59 – 8,72)	0%
IL-13	0,81 (0,69 – 1,04)	24%
IL-17A*	3,56 (2,99 – 4,00)	100%
IL-18*	1,29 (0,56 – 1,95)	81%
IL-1ra	137,83 (92,11 – 261,75)	0%
IL-6	1,77 (1,43 – 2,28)	12%
MIP-1 $\alpha$	0,44 (0,24 – 1,20)	0%
MIP-1 $\beta$	17,84 (12,38 – 26,82)	0%

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

<b>Analit</b>	<b>Medijan (Q1 – Q3)</b>	<b>% ekstrapoliranih vrijednosti</b>
RANTES	301,60 (233,19 – 522,44)	0%
IL-12*	1,73 (1,51 – 1,94)	100%
IL-22*	24,88 (21,31 – 28,04)	91%
MMP-1*	304,42 (283,95 – 332,22)	100%
MMP-2*	740,35 (466,71 – 885,13)	94%
MMP-3*	230,16 (205,89 – 247,83)	88%
IL-21	17,49 (15,46 – 21,57)	0%
Leptin	8 324,26 (4 785,25 – 11 813,36)	0%
MMP-13	2 900,24 (2 833,55 – 3 100,36)	0%
MMP-8	1 492,35 (1 290,65 – 1 706,51)	0%
MMP-9	7 574,95 (4 971,61 – 11 162,75)	0%
VCAM-1	4 178,27 (3 552,93 – 5 391,02)	0%
TGF-β1	607,04 (387,03 – 713,85)	0%
TGF-β2	102,43 (87,71 – 116,09)	0%
TGF-β3	29,00 (18,62 – 45,08)	0%
TIMP-1	485,08 (373,71 – 682,58)	3%
TIMP-2	6 415,51 (4 347,46 – 7 829,57)	0%
TIMP-4	620,05 (393,86 – 825,42)	3%

Prikazane su koncentracije izražene kao medijan i interkvartilni raspon (Q1 – Q3) za sve citokine i kemokine. Vrijednosti su izražene u pg/mL.

\* Analiti s > 30 % ekstrapoliranih vrijednosti su interpretirani uz oprez.

Većina citokina i kemokina u MFAT uzorcima imala je visoku detektabilnost, s više od 80 % vrijednosti unutar mjernog raspona.

Ipak, nekoliko analita pokazalo je povećan udio ekstrapoliranih vrijednosti (> 30 %), uključujući IL-1β, MCP-3, TNF-α, IL-17A, IL-18, IL-12, IL-22, MMP-1, MMP-2 i MMP-3, pa su njihovi rezultati interpretirani uz dodatni oprez.

Usporedbom medijana koncentracija analita izmjerenih u MFAT s koncentracijama istih analita u sinovijalnoj tekućini, vidljivo je da su vrijednosti u MFAT uglavnom niže.

Iznimka je MMP-9, koji pokazuje znatno više koncentracije u MFAT nego u sinovijalnoj tekućini, što može upućivati na veću enzimsku aktivnost u samom tkivnom pripravku.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

S druge strane, analiti koji su u sinovijalnoj tekućini bili ispod granice detekcije (OOR<), poput protuupalnih citokina IL-10 i IL-13, bili su mjerljivi u MFAT uzorcima, što upućuje na prisutnost protuupalnih komponenti i potencijalni imunomodulatorni profil MFAT.

### **5.6.2. Analiza mikrofragmentiranog masnog tkiva metodom protočne citometrije**

Od 35 ispitanika kojima je apliciran MFAT u istraživanju, analiza staničnog sastava provedena je na 32 ispitanika. Jedan ispitanik otpao je tijekom istraživanja zbog otkrivenog kroničnog gihta koji je postojao i prije fenotipske stratifikacije. Kod jednog ispitanika bio je nedostatan volumen uzorka MFAT za analizu protočnom citometrijom, dok kod jednog ispitanika uređaj nije mogao analizirati stanični sastav.

Analiza uzoraka MFAT metodom protočne citometrije pokazala je heterogenu staničnu populaciju uz dobru vijabilnost stanica. Medijan vijabilnosti živih stanica iznosio je 62,2%, što ukazuje na dobru očuvanost staničnih komponenti u dobivenom uzorku.

Najzastupljenija stanična populacija bili su endotelni progenitori, dok je udio pericita i supraadventicijskih stromalnih stanica masnog tkiva bio manji. Među progenitorskim subpopulacijama prevladavale su CD34<sup>low</sup>CD31<sup>low</sup> stanice, dok su CD34<sup>high</sup>CD31<sup>high</sup> endotelni progenitori bili prisutni u manjem postotku.

Ukupan broj stanica po mililitru MFAT pokazao je širok raspon među ispitanicima, uz medijan od približno  $4,6 \times 10^5$  stanica/mL. Kvantitativni podaci za sve analizirane stanične populacije prikazani su u tablici 5.6.2.1.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

**Tablica 5.6.2.1. Deskriptivna statistika uzoraka mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) analiziranih metodom protočne citometrije (n = 33)**

<b>Parametar</b>	<b>Medijan (Q1 – Q3)</b>	<b>Aritmetička sredina ± SD</b>
Ukupan broj stanica/mL	458 232,85 (332 669,44 – 604 144,81)	520 656,34 ± 341 664,55
Leukociti/mL	74 597,70 (44 992,79 – 104 269,57)	100 402,00 ± 83 381,49
Endotelni progenitori/mL	291 835,31 (215 925,42 – 451 471,21)	346 876,10 ± 245 685,74
CD34 <sup>+</sup> highCD31 <sup>+</sup> high endotelni progenitori/mL	37 581,74 (24 751,04 – 50 587,53)	41 174,75 ± 28 105,75
CD34 <sup>+</sup> lowCD31 <sup>+</sup> low endotelni progenitori/mL	256 376,62 (180 696,83 – 411 300,43)	305 399,94 ± 230 589,04
Periciti/mL	27 637,12 (19 653,74 – 55 252,64)	35 937,69 ± 23 141,01
Supraadventicijske stromalne stanice masnog tkiva/mL	20 561,81 (13 061,03 – 38 169,71)	29 073,40 ± 25 884,19
Vijabilnost stanica (%)	62,17 (56,59 – 69,48)	62,16 ± 11,28
Leukociti (%)	18,27 (10,78 – 24,91)	20,29 ± 12,00
Endotelni progenitori (%)	68,97 (55,32 – 75,03)	64,81 ± 12,58
CD34 <sup>+</sup> highCD31 <sup>+</sup> high endotelni progenitori (%)	7,53 (4,39 – 12,32)	8,83 ± 5,89
CD34 <sup>+</sup> lowCD31 <sup>+</sup> low endotelni progenitori (%)	57,37 (46,36 – 67,31)	55,92 ± 13,96
Periciti (%)	6,43 (4,62 – 9,02)	7,24 ± 4,05
Supraadventicijske stromalne stanice masnog tkiva (%)	4,93 (2,73 – 6,62)	5,28 ± 2,95

Podaci su prikazani kao medijan (Q1–Q3) te aritmetička sredina ± standardna devijacija (SD). Udio pojedinih staničnih populacija izražen je kao postotak u ukupnom broju nukleiranih stanica.

### **5.6.3. Utjecaj staničnog sastava mikrofragmentiranog masnog tkiva na kliničke ishode**

Kako bi se ispitao mogući odnos između bioloških karakteristika primijenjenog mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) i kliničkog učinka terapije, analiziran je stanični sastav MFAT uzoraka u odnosu na klinički odgovor prema KOOS Bol upitniku.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

U usporedbi pacijenata koji su imali klinički značajan odgovor prema KOOS Bol upitniku (responderi; n = 25) s onima koji nisu zadovoljili kriterij odgovora (*non-responderi*; n = 5), nije utvrđena statistički značajna razlika u ukupnom broju stanica, vijabilnosti niti u brojnosti pojedinih staničnih populacija dobivenih protočnom citometrijom (sve  $p > 0,05$ ; tablica 5.6.3.1).

**Tablica 5.6.3.1. Usporedba parametara protočne citometrije između KOOS Bol respondera i non-respondera**

Parametar	KOOS Bol responderi Medijan (Q1–Q3)	KOOS Bol non-responderi Medijan (Q1–Q3)	p
Ukupan broj stanica/mL	424 009,77 (326 465,70 – 557 763,85)	342 322,11 (205 605,79 – 458 232,85)	0,323
Leukociti/mL	74 197,61 (42 839,81 – 93 580,26)	65 987,17 (46 006,58 – 100 232,51)	0,862
Endotelni progenitori/mL	281 312,15 (223 076,79 – 419 116,69)	133 129,75 (120 771,24 – 348 165,32)	0,193
CD34 <sup>+</sup> highCD31 <sup>+</sup> high endotelni progenitori/mL	38 154,17 (24 751,04 – 50 587,53)	42 013,78 (27 962,39 – 42 045,51)	0,862
CD34 <sup>+</sup> lowCD31 <sup>+</sup> low endotelni progenitori/mL	235 790,27 (190 880,72 – 364 538,72)	104 283,26 (67 274,33 – 315 507,75)	0,193
Periciti/mL	29 434,37 (21 376,71 – 43 353,88)	11 308,32 (9 090,58 – 25 615,22)	0,193
Supraadventicijske stromalne stanice masnog tkiva/mL	21 642,58 (14 053,90 – 38 169,71)	13 153,19 (10 951,77 – 19 676,47)	0,318
Vijabilnost živih stanica (%)	62,04 (56,28 – 68,91)	77,15 (61,90 – 77,86)	0,129

Podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon (Q1 – Q3). Statistička analiza je provedena Mann–Whitney U testom. Zbog malog broja *non-respondera* (n = 5) rezultati su interpretirani uz oprez, a vrijednosti predstavljaju orijentacijski prikaz bez dovoljne statističke snage za otkrivanje razlika. KOOS - *Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score*.

Analizirani su ukupni broj stanica po mililitru MFAT, broj i udio leukocita, endotelnih progenitora (uključujući podskupine CD34<sup>+</sup>highCD31<sup>+</sup>high i CD34<sup>+</sup>lowCD31<sup>+</sup>low), pericita te supraadventicijskih stromalnih stanica.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

Medijani i interkvartilni rasponi za svaku varijablu prikazani su orijentacijski, s obzirom na vrlo mali broj *non-respondera*, što značajno ograničava statističku snagu analize i mogućnost detekcije stvarnih razlika.

Unatoč tome, raspodjela vrijednosti nije upućivala na jasan trend u korist bilo koje skupine, što sugerira da se u ovom uzorku kvantitativni sastav MFAT bitno ne razlikuje između bolesnika koji su klinički odgovorili na terapiju i onih koji nisu.

#### **5.6.4. Utjecaj staničnog sastava mikrofragmentiranog masnog tkiva na radiološke ishode**

Kako bi se procijenio mogući odnos između staničnih karakteristika primijenjenog MFAT i promjena GAG u hrskavici procijenjenih dGEMRIC metodom, provedena je usporedba parametara protočne citometrije između bolesnika sa značajnim poboljšanjem dGEMRIC indeksa (*dGEMRIC responderi*) i onih bez poboljšanja (*dGEMRIC non-responderi*).

Analiza nije pokazala statistički značajne razlike u ukupnom broju stanica, vijabilnosti niti u brojnosti pojedinih staničnih populacija između *dGEMRIC respondera* i *non-respondera* (sve  $p > 0,05$ ; tablica 5.6.4.1).

**Tablica 5.6.4.1. Usporedba parametara protočne citometrije između dGEMRIC respondera i non-respondera**

<b>Parametar</b>	<b>dGEMRIC responderi Medijan (Q1–Q3)</b>	<b>dGEMRIC non-responderi Medijan (Q1–Q3)</b>	<b>p</b>
Ukupan broj stanica/mL	416 327,76 (326 465,70 – 476 453,18)	501 895,00 (342 322,11 – 554 690,14)	0,447
Leukociti/mL	66 504,40 (41 700,62 – 94 510,70)	74 997,78 (46 006,58 – 100 232,51)	0,593
Endotelni progenitori/mL	246 265,75 (227 585,84 – 357 059,97)	328 912,21 (125 517,29 – 395 972,07)	0,961
CD34 <sup>+</sup> highCD31 <sup>+</sup> high endotelni progenitori/mL	38 199,89 (24 889,35 – 50 319,01)	42 013,78 (27 768,91 – 62 405,32)	0,627

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. REZULTATI**

Parametar	dGEMRIC <i>responderi</i> Medijan (Q1–Q3)	dGEMRIC <i>non-responderi</i> Medijan (Q1–Q3)	p
CD34 <sup>+</sup> lowCD31 <sup>+</sup> low endotelni progenitori/mL	229 733,34 (200 699,47 – 317 908,65)	314 745,89 (93 645,79 – 357 826,52)	0,961
Periciti/mL	25 694,44 (20 483,16 – 36 035,00)	31 208,18 (16 068,08 – 59 851,07)	0,467
Supraadventicijske stromalne stanice masnog tkiva/mL	20 549,62 (12 968,87 – 33 468,13)	18 324,01 (10 951,77 – 42 410,13)	1,000
Vijabilnost živih stanica (%)	67,25 (60,04 – 69,95)	56,59 (49,50 – 62,17)	0,102

Podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon (Q1 – Q3). Statistička analiza je provedena Mann–Whitney U testom. dGEMRIC - *delayed Gadolinium-Enhanced MRI of Cartilage*.

Medijani i interkvartilni rasponi prikazani su za svaku analiziranu staničnu populaciju, uključujući leukocite, endotelne progenitore (CD34<sup>+</sup>highCD31<sup>+</sup>high i CD34<sup>+</sup>lowCD31<sup>+</sup>low), pericite i supraadventicijske stromalne stanice masnog tkiva.

Rezultati pokazuju da u ovom uzorku kvantitativni sastav MFAT nije bio povezan s biokemijskim poboljšanjem hrskavičnog tkiva nakon intraartikularne primjene.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

## **6. RASPRAVA**

### **6.1. Opći pregled i glavna zapažanja**

Ovo randomizirano, dvostruko slijepo kliničko istraživanje usporedilo je učinak intraartikularne aplikacije autolognog MFAT i HA u strogo fenotipiziranoj skupini bolesnika s ranim do umjerenim upalnim fenotipom OA koljena te je kao takvo prvo izvedeno. Obje su terapije rezultirale klinički značajnim poboljšanjem boli, ukočenosti, funkcije i kvalitete života, mjereno validiranim upitnicima (KOOS, WOMAC, VAS). Poboljšanje je bilo vidljivo već nakon 1 mjeseca i održalo se do 6 mjeseci praćenja. Iako između skupina nije zabilježena razlika u većini promatranih domena, bolesnici liječeni aplikacijom MFAT pokazali su statistički značajno veće poboljšanje u podskali KOOS Simptomi u odnosu na HA, što odražava jači učinak na simptome povezane sa sinovitisom, oteklinom zgloba, krepitacijama i osjećajem ukočenosti. Istodobno, niti jedna od terapijskih intervencija nije bila povezana sa značajnim nuspojavama, što potvrđuje povoljan sigurnosni profil obje metode.

Uz kliničke ishode, u obje terapijske skupine zabilježen je porast dGEMRIC indeksa u svim analiziranim hrskavičnim regijama 6 mjeseci nakon terapije, što upućuje na povećanje sadržaja GAG u ekstracelularnom matriksu zglobne hrskavice. Taj je porast bio statistički značajan unutar svake skupine, ali bez značajne međugrupne razlike, pri čemu su trendovi u nekoliko regija išli u smjeru izraženijeg učinka MFAT. Posebno je značajno da su kliničke promjene (smanjenje boli prema KOOS Bol) i biokemijske promjene hrskavice (porast dGEMRIC indeksa) bile međusobno usklađene. Svi bolesnici s porastom dGEMRIC indeksa imali su i kliničko poboljšanje prema KOOS Bol skali, dok nije zabilježen obrnuti obrazac. Time se potvrđuje klinička relevantnost dGEMRIC-a kao objektivnog pokazatelja odgovora na terapiju u OA koljena.

U okviru biokemijskog dijela istraživanja, analizirane su koncentracije citokina i kemokina u krvnoj plazmi prije te jedan i šest mjeseci nakon intervencije, koncentracija fenilalanina u plazmi u istim vremenskim točkama, koncentracija citokina i kemokina sinovijalnoj tekućini prije i jedan mjesec nakon intervencije, kao i sastav i biološki profil samog MFAT. Sve planirane analize provedene su u potpunosti, čime su ostvareni svi sekundarni ciljevi istraživanja. U plazmi je zabilježeno više statistički značajnih

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

promjena koncentracija citokina u MFAT skupini u odnosu na HA, što ukazuje na jači sustavni biološki odgovor na terapiju, iako smjer i kliničko značenje tih promjena zahtijevaju dodatnu interpretaciju koja je detaljno razmotrena u zasebnim potpoglavljima diskusije. Analize sinovijalne tekućine i MFAT uzoraka potvrdile su prisutnost širokog spektra pro- i antiinflamatornih medijatora, dok su rezultati protočne citometrije potvrdili visoku vijabilnost stanične populacije i prisutnost mezenhimnih, endotelnih i imunomodulatornih stanica u različitim omjerima, što dodatno potkrepljuje biološki potencijal MFAT.

Polazna hipoteza da će primjena MFAT rezultirati značajnim poboljšanjem simptoma, smanjenjem boli i povećanjem funkcionalnosti u odnosu na HA potvrđena je kroz statistički značajan i klinički relevantan učinak u KOOS Simptomi domeni, uz konzistentno poboljšanje i u drugim skalama funkcije i boli. Hipoteza da će MFAT dovesti do većeg povećanja GAG sadržaja u hrskavici analizom dGEMRIC je djelomično potvrđena. Obje terapije pokazale su povoljan učinak, bez međugrupne statističke razlike, ali s trendom izraženijim u MFAT skupini. Treći dio hipoteze, koji se odnosio na značajnije promjene koncentracija citokina, kemokina i fenilalanina, također je ispitan i potvrđen u dijelu. U MFAT skupini uočen je veći broj biokemijskih promjena kroz vrijeme, no njihova interpretacija zahtijeva složeniji kontekstualni pristup i bit će razmotrena u narednim potpoglavljima diskusije.

Sveukupno, provedbom planiranih analiza obuhvaćeni su svi definirani ciljevi istraživanja: ispitani su klinički, radiološki, biokemijski i stanični učinci MFAT i HA, kvantificirani su objektivni biomarkeri odgovora na terapiju te je potvrđena mogućnost integracije kliničkih i molekularnih pokazatelja u evaluaciji terapijskog učinka kod OA koljena. Dobiveni rezultati podupiru koncept fenotipski vođenog, personaliziranog liječenja OA i ukazuju na potencijal MFAT kao biološke terapije posebno učinkovite u bolesnika s izraženom sinovijalnom komponentom bolesti.

Ovim istraživanjem po prvi je put u istoj studiji integriran klinički, radiološki, biokemijski i stanični pristup evaluaciji terapijskog učinka MFAT i HA, čime ono predstavlja originalan i dosad jedinstven doprinos razumijevanju mehanizama djelovanja ortobioloških terapija u OA koljena.

## **6.2. Klinički ishodi**

Procjena subjektivnih kliničkih ishoda odnosno kliničkih upitnika koje samostalno ispunjavaju bolesnici (PROMs) ključna je u evaluaciji učinkovitosti bioloških terapija kod OA koljena, ali i općenito u ortopediji. Za razliku od tradicionalnih radioloških ili laboratorijskih parametara, PROMs omogućuju izravno kvantificiranje percepcije boli, ukočenosti, funkcionalnih ograničenja i kvalitete života iz perspektive samog bolesnika, što ih čini zlatnim standardom u procjeni terapijskog učinka u suvremenim kliničkim ispitivanjima OA (169). Najčešće korišteni alati u tom kontekstu su validirani upitnici KOOS, WOMAC te VAS, koji zajedno pokrivaju širok spektar domena, od specifičnih simptoma i boli do ukupne funkcionalne sposobnosti i kvalitete života (157, 159).

Ovo istraživanje, prema dostupnoj literaturi, prvo je randomizirano kontrolirano ispitivanje koje izravno uspoređuje autologno MFAT i HA u fenotipski homogenoj skupini bolesnika s ranim do umjerenim upalnim fenotipom OA koljena. Takav dizajn omogućio je analizu terapijskog učinka u precizno definiranoj populaciji, u kojoj sinovijalna aktivnost i upalna komponenta bolesti imaju ključnu ulogu u simptomima i progresiji OA (16, 170). Time je omogućeno razlikovanje učinaka terapija koje djeluju primarno mehanički (kao HA) od onih koje mogu imati i biološke, imunomodulatorne učinke (poput MFAT).

Iako je MFAT već uspoređivan s drugim konzervativnim metodama za liječenje OA koljena poput PRP-a, nedostaju istraživanja u kojima se MFAT izravno uspoređuje s najraširenijom i standardnom injektivnom terapijom, poput HA (171). Provedeno istraživanje nastojalo je popuniti nedostatak informacija i ponuditi nove uvide u to kako bi biološke terapije poput MFAT mogle djelovati u ovom specifičnom OA fenotipu.

Primarni cilj kliničkog dijela istraživanja bio je kvantificirati i usporediti klinički odgovor na liječenje aplikacijom MFAT i HA kroz više dimenzija simptoma i funkcionalnosti pomoću navedenih upitnika, dok je sekundarni cilj bio procijeniti vremensku dinamiku odgovora, razlikujući kratkoročne učinke (1 mjesec nakon intervencije) od srednjoročnih učinaka (6 mjeseci nakon intervencije).

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

Analiza kliničkih ishoda provedena je zasebno za svaki validirani upitnik (KOOS, WOMAC i VAS), čime je omogućeno detaljno praćenje promjena u specifičnim domenama simptoma i funkcije. Analizirajući rezultate KOOS, WOMAC i VAS skorova, oba su liječenja rezultirala klinički značajnim poboljšanjima nakon 1 i 6 mjeseci u odnosu na početno stanje prije same intervencije. Međutim, MFAT je pokazao trajnije učinke kroz više skorova i podskorova, osobito između 1. i 6. mjeseca, što sugerira progresivnu terapijsku putanju. Nasuprot tome, skupina HA pokazala je rane koristi nakon 1 mjeseca, koje su se većinom zadržale do 6 mjeseci nakon terapije, ali bez dodatnog statističkog poboljšanja na većini podskala različitih upitnika. Ta dinamika osobito je relevantna kliničarima koji traže dugotrajnija, nekirurška rješenja za rani do umjereni OA koljena.

Analizirajući srednjoročni učinak terapija nakon 6 mjeseci, usporedbe između skupina nisu pokazale statistički značajne razlike u KOOS Bol, ADL, Sport/Rec ili QoL podskalama. Međutim, skupina MFAT ostvarila je značajno veće poboljšanje u KOOS Simptomi podskali u odnosu na HA (prosječna promjena 25,0 vs. 12,7;  $p = 0,008$ ). Ova podskala odražava simptomatologiju poput ukočenosti zgloba, izljeva tj. otekline i mehaničkih simptoma poput krepitacija, koji su prvenstveno pod utjecajem lokalne upale i sinovijalne aktivnosti. Bolji rezultat MFAT u podskali KOOS Simptomi može se objasniti njegovim specifičnim mehanizmom djelovanja u zglobu, koji nije ograničen na mehaničku lubrikaciju, što je glavni učinak HA, već uključuje i izražene biološke učinke na mikrookoliš u zglobu koljena. Biološka osnova takvog učinka može se pripisati parakrinoj aktivnosti mezenhimnih stromalnih stanica prisutnih u MFAT, koje luče citokine i faktore rasta s dokazanim protuupalnim i imunomodulatornim djelovanjem na sinovijalne stanice i hondrocite. Takav učinak vjerojatno doprinosi obnovi homeostaze u zglobu te smanjenju upalno posredovanih simptoma poput otekline, krepitacija i ukočenosti. Ovi su nalazi u skladu s prethodnim pretkliničkim i ranim kliničkim studijama koje upućuju da mezenhimne matične stanice iz masnog tkiva mogu modulirati upalu i poduprijeti popravak zglobnog tkiva, što vjerojatno objašnjava njihov klinički učinak u upalnom fenotipu OA koljena (51, 172).

Sličan obrazac vidljiv je i u WOMAC i VAS skalama. Skupina MFAT pokazala je konzistentna i statistički značajna poboljšanja u svim WOMAC domenama između dvije kontrolne točke ( $p < 0,01$ ). Suprotno tome, skupina HA imala je značajno

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

poboljšanje od početka do 1. mjeseca, ali bez daljnjeg napretka do 6. mjeseca ( $p > 0,05$ ). Slična je tendencija smanjenja bolova opažena i u VAS skali, osobito za bol pri pokretu. Kao i kod WOMAC podskala, HA je postigla učinke nakon 1 mjeseca te zadržala učinke do 6 mjeseci poslije terapije, ali bez dodatnog statističkog poboljšanja između dvije kontrolne točke, dok je bol u pokretu na VAS skali u MFAT skupini nastavila značajno padati i do 6 mjeseci nakon inicijalnog liječenja, naglašavajući održiv analgetski potencijal MFAT.

Kako bismo dodatno naglasili klinički učinak apliciranih terapija, proveli smo analizu *respondera* na temelju utvrđenih pragova minimalne klinički značajne razlike (MCID):  $\geq 10$  za KOOS Bol,  $\geq 15$  za WOMAC Ukupni skor i  $\geq 3$  za VAS pri pokretu. Iako nijedna razlika između skupina nije dosegla statističku značajnost, MFAT je dosljedno pokazivao više stope *respondera*: KOOS Bol (83% naspram 75%), WOMAC Ukupni skor (69% naspram 63%) i VAS pri pokretu (59% naspram 47%). Iako razlike nisu bile statistički značajne, trend ide u prilog MFAT, s više bolesnika koji postižu klinički smisleno poboljšanje.

Ovakva *responder* analiza omogućuje dodatni klinički kontekst, budući da statistički značajna promjena ne mora nužno odražavati i klinički relevantno poboljšanje. Naime, i vrlo male razlike koje bolesnik subjektivno ne percipira mogu postati „značajne“ u većim uzorcima ( $p < 0,05$ ), dok istodobno propuštaju odražavati stvarni učinak terapije na kvalitetu života. Upravo zato ortopedске smjernice i suvremeni autori naglašavaju potrebu interpretacije rezultata kroz pragove kliničke važnosti poput MCID, umjesto oslanjanja isključivo na p-vrijednosti (173–175).

Odabir MCID-a od 10 bodova za KOOS Bol dobro je potkrijepljen literaturom. Nekoliko istraživanja u populacijama s OA koljena identificiralo je različite pragove kliničke značajnosti za ovu podskalu ovisno o kliničkom kontekstu i metodi procjene, što potvrđuje ispravnost našeg MCID odabira za KOOS Bol (161–164). U tom svjetlu, prosječno poboljšanje KOOS Bol u oba terapijska kraka nadmašilo je MCID prag, dodatno potvrđujući kliničku korisnost obiju intervencija. KOOS Bol podskor odabran je kao kriterij za podjelu na *respondere* i *non-respondere* zbog svoje jednostavnosti i mogućnosti da kroz mali broj pitanja valorizira promjenu glavnog simptoma OA koljena, a to je bol.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

S obzirom da je naše istraživanje prvo randomizirano kliničko istraživanje koje je usporedilo učinke MFAT i HA, nedostaje istraživanja za usporedbu rezultata. Postoje istraživanja koja su uspoređivala učinke MFAT i drugih terapije te isto tako istraživanja koja su uspoređivala učinke HA s drugim staničnim terapijama.

Jedino randomizirano, dvostruko slijepo istraživanje koje je uspoređivalo MFAT s drugom terapijom objavili su Barford i suradnici. U svom istraživanju, autologo MFAT uspoređivali su s placebo, tj. aplikacijom fiziološke otopine u zglob koljena (176). Iako u njihovom istraživanju nije utvrđena statistički značajna razlika u promjenama KOOS skora između MFAT i placebo nakon 6 mjeseci, mora se naglasiti da ispitanici nisu bili fenotipizirani te da su imali vrlo blage kriterije uključenja i isključenja. To najbolje ilustrira činjenica da su u istraživanje uključeni bolesnici s OA koljena s BMI < 40 kg/m<sup>2</sup>, iako je dobro poznato da već bolesnici s BMI > 30 kg/m<sup>2</sup> pripadaju metaboličkom fenotipu OA koljena. Također nisu isključeni bolesnici s komorbiditetima poput depresije, dijabetesa, malignih bolesti i sl., a prije uključenja u istraživanje bolesnicima nije rađena niti magnetska rezonancija kako bi se isključili bolesnici sa značajnom ozljedom meniska ili drugih struktura koje bi mogli uzrokovati dominantne simptome u koljenu. O učincima pretilosti na učinkovitost liječenja OA koljena govore brojna istraživanja. Učinci bioloških terapija OA značajno su slabiji kod pretilih pacijenata u usporedbi s onima normalnog indeksa tjelesne mase. Annaniemi i suradnici pokazali su da su bolesnici s BMI > 30 kg/m<sup>2</sup> postizali manji klinički odgovor na terapiju intraartikularnom aplikacijom PRP-a u odnosu na nepretile bolesnike, pri čemu se pretilost često navodi kao kriterij isključenja u sličnim istraživanjima (177). Nadalje, Tang i suradnici su u predkliničkom modelu dokazali da pretilost smanjuje terapijski potencijal mezenhimnih matičnih stanica iz masnog tkiva, vjerojatno zbog promjena u staničnoj populaciji i mikrookolišu (178). Osim mehaničkog preopterećenja, pretilost pridonosi i kroničnoj upali niskog stupnja posredovanoj adipokinima, što dodatno pogoršava klinički tijek i patogenezu OA (179). Uspoređujući promjene KOOS podskorova za MFAT skupinu u istraživanju Barforda i suradnika s promjenama KOOS podskorova u našem istraživanju, vidljivo je kako su srednje promjene KOOS podskorova nakon 6 mjeseci značajno manje nego u našem istraživanju. Dok su srednje promjene KOOS podskorova u MFAT skupini u našem istraživanju bile sve iznad 20 bodova na KOOS ljestvici, nijedna od promjena podskorova u spomenutom

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

istraživanju nije bila veća od 15 bodova. Sve to govori u prilog potrebe da se kod randomiziranih kliničkih istraživanja u području OA koljena postavi kriterij isključenja za bolesnike s BMI > 30 kg/m<sup>2</sup> kako bi se izbjegao neodgovarajući odabir ispitanika (engl. *selection bias*), kako bi rezultati bili interpretativni i usporedivi s drugim istraživanjima te kako bi se osigurala homogena populacija u kojoj mehanički i metabolički čimbenici pretilosti ne bi utjecali na terapijski odgovor.

Još jedno od istraživanja koje je uspoređivalo MFAT s drugom terapijom je istraživanje Baria i suradnika u kojem su uspoređivali učinke MFAT i jedne injekcije PRP-a kod OA koljena (171). U svome istraživanju, nakon 6 mjeseci praćenja, nisu naišli na značajne promjene među metodama u smanjenju kliničkih simptoma mjerenih putem KOOS skora. Ponovno, uz manjak fenotipizacije ispitanika, kriteriji uključenja/isključenja bili su oskudni uz ponovno uključanje ispitanika s BMI < 40 kg/m<sup>2</sup>, što umanjuje usporedivost rezultata.

U nedostatku direktnog uspoređivanja učinaka MFAT i HA, postoji veći broj istraživanja pa čak i meta-analiza koje uspoređuju učinke liječenja HA s drugim staničnim terapijama, uključujući stromalnu vaskularnu frakciju (SVF) i MSC. Hong i sur. izvijestili su o boljim ishodima SVF-a u odnosu na HA nakon 6 mjeseci, uključujući poboljšanja VAS i WOMAC, što je potvrđeno i u meta-analizi Han i suradnika koja je uspoređivala SVF i HA te je također išla u prilog staničnoj terapiji glede smanjenja boli i funkcionalnog poboljšanja (99, 180). Slično, metaanaliza Jin i suradnika koja je usporedila aplikaciju MSC i HA sugerira veću učinkovitost stanične terapije u odnosu na HA, osobito u funkcionalnim skorovima poput WOMAC, ali i u učinku na hrskavicu prema magnetskoj rezonanci (181).

Ipak, te se studije razlikuju prema izvoru tkiva, metodama obrade (npr. enzimatska digestija, kultivacija) te često nemaju fenotipsku stratifikaciju. Fenotipska stratifikacija sve se više prepoznaje kao nužan korak u dizajnu kliničkih studija OA, s obzirom na heterogenost bolesti i različit odgovor na terapiju (182, 183). Naše istraživanje doprinosi visokokvalitetnim randomiziranim dokazima u prilog kliničkoj koristi neenzimatski obrađenog, autolognog MFAT, apliciranog kao jedinstvena intraartikularna injekcija, u fenotipski homogenoj istraživačkoj skupini. Konačno, u razdoblju praćenja

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

nisu zabilježene nuspojave ni u jednoj skupini, podupirući odličan sigurnosni profil obiju terapija u promatranom vremenu (98, 184).

Dobiveni rezultati potvrđuju da obje terapije pružaju klinički mjerljive i subjektivno relevantne koristi, pri čemu MFAT pokazuje izraženiji i dugotrajniji učinak u domenama povezanim sa sinovitisom. Kako bi se razumjeli biološki i strukturni mehanizmi koji stoje iza tih učinaka, u idućem poglavlju analizirani su radiološki ishodi dobiveni dGEMRIC metodom i analizom MOAKS skorova.

### **6.3. Slikovni ishodi**

Slikovni ishodi u ovom istraživanju analizirani su kombiniranjem kvantitativnih i semikvantitativnih MRI metoda, čime je omogućena cjelovita procjena biokemijskih i morfoloških promjena u zglobu koljena nakon primjene intraartikularnih bioloških terapija. Takav dvostruki pristup temelji se na razumijevanju OA kao bolesti cijelog zgloba, gdje promjene u hrskavici, sinoviji, subhondralnoj kosti i drugim strukturama nastaju istodobno i međusobno su povezane (9, 12).

Korištenjem dGEMRIC-a, kao validiranog kvantitativnog biomarkera za procjenu koncentracije GAG, omogućeno je detektiranje ranih biokemijskih promjena u hrskavičnom matriksu koje prethode morfološkim oštećenjima. Suprotno tome, MOAKS pruža semikvantitativni prikaz morfoloških promjena u cijelom zglobu, uključujući hrskavicu, subhondralnu kost, meniske, ligamente, sinoviju i periartikularne strukture.

Kombinacija ovih dvaju pristupa pruža jedinstven uvid u sinergiju između biokemijskih i strukturnih učinaka terapije te omogućuje razlikovanje suptilnih promjena u sastavu matriksa hrskavice od makroskopskih promjena vidljivih na klasičnim MRI sekvencama. Upravo ovakav multimodalni pristup ključan je u evaluaciji bioloških terapija poput MFAT i HA, koje svoje učinke ostvaruju kompleksnim biološkim mehanizmima, prvenstveno kroz imunomodulaciju i poticanje sinovijalne homeostaze.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

### **6.3.1. dGEMRIC**

dGEMRIC je validirani kvantitativni slikovni biomarker koji odražava sadržaj GAG u izvanstaničnom matriksu zglobne hrskavice. Tehnika se oslanja na obrnuti odnos između negativno nabijenog gadolinijskog kontrasta i GAG molekula, pružajući neizravan, ali precizan uvid u biokemijski integritet hrskavice i raspodjelu GAG-a (168). Njegova primjena u kliničkim istraživanjima omogućuje objektivnu, neinvazivnu procjenu biokemijske kvalitete hrskavice te je sve češće prihvaćena kao marker rane degeneracije hrskavice i terapijskog odgovora (185). Prema našim saznanjima, ovo je prvo randomizirano kliničko istraživanje koje procjenjuje biološke učinke MFAT u usporedbi s HA koristeći dGEMRIC u bolesnika s OA koljena.

U našoj kohorti i MFAT i HA pokazali su statistički značajna unutargrupna povećanja dGEMRIC indeksa u svih sedam evaluiranih anatomskih regija, što sugerira mjerljivo poboljšanje sadržaja GAG u hrskavici tijekom šest mjeseci praćenja. Ključna metodološka posebnost ove studije jest usvajanje praga  $\geq 10\%$  porasta dGEMRIC indeksa kao kriterija klinički relevantnog poboljšanja. To odstupa od ranijih studija u Specijalnoj bolnici Sv. Katarina koje su koristile prag  $\geq 15\%$  pri procjeni bioloških učinaka MFAT na kvalitetu hrskavice (72,74). S obzirom na nedavne pomake u ponovljivosti dGEMRIC-a i potvrde iz vanjskih studija, prag od 10% procijenjen je primjerenim za detekciju smislenih biokemijskih promjena u hrskavici (168, 186, 187). Stoga je uporaba nižeg praga opravdana i analitički i na temelju novih spoznaja iz šireg područja.

Prema tom kriteriju, 50,4% hrskavičnih regija ispitanika liječenih aplikacijom MFAT i 45,1% onih liječenih aplikacijom HA pokazalo je klinički relevantno poboljšanje, uz samo jedan ROI (u skupini MFAT) s klinički značajnim pogoršanjem. Iako nije nađena statistički značajna razlika između skupina u udjelu ROI-eva s klinički relevantnim poboljšanjem, ova je analiza bila dio unaprijed specificiranog primarnog slikovnog ishoda, u skladu s ciljem ispitivanja da se kvantitativno oslikavanje integrira s kliničkom evaluacijom u fenotipski specifičnoj OA populaciji. Gotovo jednak udio dGEMRIC *respondera* u obje terapijske skupine (54,5% MFAT vs. 50% HA) dodatno podupire zaključak da su obje terapije dovele do mjerljivih poboljšanja sastava hrskavice, ali s usporedivom ukupnom učinkovitošću ( $\chi^2 = 0,001$ ,  $p = 0,986$ ).

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

Naši nalazi upućuju da i MFAT i HA pridonose povećanju sadržaja GAG-a u hrskavici, što se očituje višim dGEMRIC indeksima u svim evaluiranim regijama. Iako između terapija nije bilo statistički značajnih razlika na odabranom pragu, opažena poboljšanja vjerojatno proizlaze iz različitih temeljnih mehanizama. MFAT može djelovati primarno putem MSC iz masnog tkiva koje potiču anabolički popravak i sintezu izvanstaničnog matriksa, dok HA vjerojatno djeluje moduliranjem metabolizma hondrocita i stimulacijom produkcije GAG-a (51, 83, 188, 189). Najnoviji dokazi dodatno podupiru ove mehanističke razlike. MSC iz masnog tkiva djeluju ponajprije imunomodulacijom sinovijalnog mikrookoliša, posredovanom parakrinim signaliziranjem, izvanstaničnim vezikulama i supresijom kataboličkih medijatora (51, 190). MFAT na taj način pruža i trofičku potporu koja može poboljšati homeostazu zgloba i popravak hrskavice (190).

Nasuprot tome, intraartikularna HA pokazala je i dodatne biokemijske učinke izvan same lubrikacije, uključujući modulaciju upale, antioksidativno djelovanje te stimulaciju sinteze proteoglikana i kolagena putem CD44-posredovanog signaliziranja [42].

Zajedno, ovi nalazi naglašavaju da MFAT i HA djeluju različitim, ali komplementarnim mehanizmima, što može objasniti razlike u kliničkim i strukturnim ishodima opaženima u našem istraživanju. Osjetljivost dGEMRIC tehnike na detekciju suptilnih biokemijskih promjena ističe njezinu potencijalnu korisnost u longitudinalnom praćenju intraartikularnih terapija usmjerenih na modificiranje tijekom OA. Povećanja GAG-a opažena u obje skupine upućuju na mogući učinak modifikacije strukture, osobito relevantan za ranu intervenciju. Ipak, potrebna su dugoročnija istraživanja kako bi se utvrdilo prevode li se ta biokemijska poboljšanja u stvarnu modifikaciju bolesti.

Zanimljivo, ovi se nalazi razlikuju od jedine druge studije koja je procjenjivala učinak HA na GAG u hrskavici putem dGEMRIC-a. U nerandomiziranom kliničkom ispitivanju van Tiel i sur., tri tjedne intraartikularne injekcije HA u bolesnika s ranom fazom OA nisu rezultirale značajnom promjenom dGEMRIC indeksa nakon 14 tjedana, unatoč kliničkom poboljšanju simptoma (187). Nekoliko ključnih razlika može objasniti divergentne ishode, uključujući varijacije u formulaciji HA, režimu injekcija, odabiru bolesnika i, osobito, trajanju praćenja (14 tjedana vs 6 mjeseci). Za razliku od van Tielove kohorte, naše se ispitivanje usredotočilo na fenotipski stratificiranu populaciju i primijenilo dulje razdoblje promatranja. Ovi nalazi sugeriraju da HA, pod specifičnim

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

uvjetima, doista može inducirati skromna, ali mjerljiva poboljšanja sastava hrskavice tijekom vremena. Takav učinak je mogao proći nezapaženo u prethodnim studijama s kraćim praćenjem i manje ciljanim odabirom pacijenata.

Usporedba s prijašnjim studijama provedenima u Specijalnoj bolnici Sv. Katarina također naglašava važnost odabira bolesnika i težine bolesti. Za razliku od sadašnje kohorte s Kellgren Lawrence tibiofemoralnim ili lwano patelofemoralnim OA stupnja 2–3, ranije su studije uključivale isključivo bolesnike s terminalnim OA (Kellgren Lawrence 4. stupnja) (72, 74). U našem istraživanju sklonost dGEMRIC odgovoru u bolesnika s manje teškim OA podupire hipotezu da što je intervencija ranija, to je veća odgovarajuća biološka dobit, osobito u sastavu matriksa hrskavice. Meng i sur. također su pokazali promjene GAG-a nakon primjene MSC-a, što naglašava ulogu bioloških terapija u modificiranju biokemije hrskavice (188). Nalazi ovih studija ukazuju na potencijal MFAT da pruži klinički relevantan učinak i na kvalitetu hrskavičnog tkiva i na simptomatsko olakšanje, što potvrđuju rezultati analize ortopedskih skorova (KOOS, WOMAC i VAS) u bolesnika s upalnim fenotipom OA koljena.

S druge strane, nijedna objavljena studija nije koristila dGEMRIC niti izravno uspoređivala MFAT i HA, što dodatno ističe novost naše kombinirane strukturne i simptomatske procjene. HA je, također, široko proučavana i poznato je da privremeno poboljšava lubrikaciju zgloba i modulira upalu (83). Međutim, nedostatak studija koje istražuju njihove komparativne učinke na biokemiju hrskavice, osobito uz osjetljive strukturne biomarkere poput dGEMRIC-a, ograničava kliničko razumijevanje njihova potencijala modifikacije bolesti. Ostaje nejasno predstavljaju li takva biokemijska poboljšanja, osobito nakon HA, održanu modifikaciju tijekom bolesti ili prolazne promjene, što zahtijeva dulje praćenje.

### **6.3.2. MOAKS**

Semikvantitativni MRI sustav MOAKS omogućuje sveobuhvatnu procjenu strukturnih promjena unutar koljenskog zgloba uključujući hrskavicu, lezije koštane srži, osteofite, meniske, ligamente, sinoviju tj. izljev i periartikularne strukture. Sustav je razvijen s

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

ciljem standardizirane analize svih OA promjena u zglobu i ističe se kao referentni alat u istraživanjima OA (29).

U literaturi je također istaknuto da u kratkoročnim intervalima morfološke promjene, osim onih povezanih s upalom i izljevom, rijetko dosežu razinu detekcije semikvantitativnim MRI alatima, što znači da očekivanje značajnih strukturnih promjena u tako kratkom roku može biti neutemeljeno (191–193).

U našoj kohorti, analiza MOAKS podjedinica pokazala je da većina zglobnih struktura (hrskavica, koštane lezije, osteofiti, menisci te ligamenti i periartikularne strukture) ostaju stabilne kroz razdoblje praćenja. Takva stabilnost može se interpretirati kao pozitivan nalaz jer sugerira odsutnost progresije degenerativnih promjena u ranom do umjerenom upalnom fenotipu OA koljena te istovremeno potvrđuje da značajna morfološka regeneracija nije bila očekivana u ovom vremenskom okviru zbog prirode semikvantitativne metode.

Ovaj nalaz podupire sigurnosni i neutralni strukturni profil primijenjenih terapija (MFAT i HA) u ranoj do umjerenj fazi bolesti te sugerira da nijedna terapija nije potaknula progresiju vidljivih oštećenja, što je važno s aspekta sigurnosti primjene bioloških terapija.

Od svih MOAKS komponenti, jedina značajno promjenjiva bila je MOAKS skor za sinovitis/izljev. U obje terapijske skupine, i to već nakon 1 mjesec, a potom in nakon 6 mjeseci, evidentirano je smanjenje sinovijalne upale i izljeva, što potvrđuje protuupalni učinak kako MFAT tako i HA (svi  $p < 0,05$ ). Ovaj rezultat može se interpretirati kao jedan od ključnih mehanizama kliničkog poboljšanja (manja bol, smanjena ukočenost) i potpore sinovijalnoj homeostazi.

U pogledu mehanizama, stanične terapije koje sadrže MSC (npr. MFAT) dokazano djeluju putem imunomodulacije sinovijalnog mikrookoliša, uključujući supresiju proinflammatoryh citokina te promicanje antiinflammatoryh medijatora (194). S druge strane, intraartikularna aplikacija HA utječe na sinovijalnu signalizaciju (npr. putem CD44 receptora), modulira upalni odgovor i potiče sintezu proteoglikana i kolagena (83, 195). Time smanjenje sinovitisa u našem ispitivanju može biti vidljiv korak prema stabilizaciji intraartikularnog mikrookoliša i smanjenju daljnje degeneracije (170).

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

Semikvantitativni MOAKS mjeri morfološku dimenziju OA promjena. Suprotno tome, kvantitativna metoda dGEMRIC mjeri biokemijski sastav hrskavice (koncentraciju GAG). U našoj studiji, odsustvo značajnih promjena u većini MOAKS komponenti u kombinaciji s dokazanim porastom dGEMRIC indeksa ukazuje na to da biokemijske promjene u hrskavičnom matriksu prethode vidljivim morfološkim promjenama. Stoga dGEMRIC nadopunjuje MOAKS kao osjetljiviji marker ranih promjena u OA. Ova implikacija jasno upućuje na potrebu kombiniranja kvantitativnih i semikvantitativnih MRI alata kod dizajniranja budućih istraživanja u području bioloških terapija OA, kako bi se cjelovito zahvatio terapijski odgovor i strukturalna modifikacija.

U ovom istraživanju intraartikularne terapije aplikacijom MFAT i HA rezultirale su stabilnim morfološkim nalazima bez progresije degenerativnih promjena te značajnim smanjenjem sinovitisa, što potvrđuje njihov sigurni i protuupalni učinak u ranom do umjerenom upalnom fenotipu OA koljena.

Zajednička interpretacija nalaza MOAKS i dGEMRIC analize pruža integriran prikaz učinaka terapije na morfološkoj i biokemijskoj razini te potvrđuje opravdanost kombiniranog pristupa u evaluaciji bioloških terapija OA koljena. Uzimajući u obzir pokazani značajni porast dGEMRIC indeksa u obje terapijske skupine, ovi podaci dodatno sugeriraju da kvantitativne metode poput dGEMRIC-a imaju potencijal postati validirani objektivni biomarkeri za praćenje bioloških terapija u ranoj do umjerenj fazi OA, čime nadopunjuju kliničku evaluaciju i semikvantitativne morfološke metode.

#### **6.4. Korelacija kliničkih i radioloških ishoda**

Nakon što je potvrđeno postojanje biokemijskih poboljšanja u hrskavičnom matriksu (porast dGEMRIC indeksa) i stabilnih morfoloških nalaza prema MOAKS analizi, sljedeći je korak bio procijeniti imaju li te slikovne promjene kliničku refleksiju u simptomima bolesti. Jedan od ključnih ciljeva istraživanja bio je utvrditi postoji li povezanost između biokemijskih promjena hrskavičnog sastava, objektiviziranih dGEMRIC indeksom, i kliničkog poboljšanja, prvenstveno olakšanja boli.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

Kako bismo procijenili odnos između strukturnog i simptomatskog odgovora na razini pojedinog bolesnika, provedena je analiza *respondera*, odnosno ispitanika koji su odgovorili na terapiju. *Responder* analizom, često korištenom u suvremenim OA istraživanjima, izbjegava se gubitak informacija koji proizlazi iz prosječnih vrijednosti te se bolje reflektira individualni terapijski odgovor. Umjesto oslanjanja na srednje vrijednosti dGEMRIC-a kroz sve regije hrskavice, koje mogu prikriti fokalna poboljšanja ili pogoršanja, strukturni smo odgovor definirali prema broju regija s klinički značajnim poboljšanjem. Ovaj pristup izbjegava pristranost zbog izoliranih pogoršanja i bolje odražava stvarni biološki odgovor selektivnih lezija zgloba. Nije opažen odnos između dGEMRIC odgovora i poboljšanja KOOS Simptomi, vjerojatno zbog subjektivnije i varijabilnije naravi te podskale koja uključuje ukočenost, krepitacije i doživljaj otekline, parametre koji su manje izravno povezani s biokemijskim sastavom hrskavice. Nasuprot tome, KOOS Bol je bliže vezan uz nociceptivno opterećenje, što ga čini prikladnijim parametrom za usporedbu sa slikovnim biomarkerima poput dGEMRIC-a (196).

Naši rezultati pokazuju snažnu povezanost između dGEMRIC-om definiranog strukturnog odgovora i poboljšanja KOOS Bol podskale. Zanimljivo, svi bolesnici klasificirani kao dGEMRIC *responderi* ujedno su premašili prag *respondera* na KOOS Bol podskali, i u objedinjenoj kohorti i unutar svake terapijske skupine. Značajna povezanost između dGEMRIC i KOOS Bol odgovora potvrđena je Fisherovim egzaktnim testom ( $p = 0,001$ ), uz pozitivnu prediktivnu vrijednost od 100%, što implicira da je biokemijsko poboljšanje hrskavice uvijek bilo praćeno kliničkim olakšanjem tj. smanjenjem bolova. Prema našim saznanjima, ovo je prva studija koja pokazuje tako visoko prediktivno slaganje između slikovnog biomarkera i kliničkog skora u OA koljena. Obrnuto, samo kliničko poboljšanje nije uvijek bilo praćeno mjerljivim promjenama na dGEMRIC-u. Otprilike trećina KOOS Bol *respondera* nije klasificirana kao dGEMRIC *responder*, što naglašava da simptomatski odgovor može nastajati i drugim putevima, uključujući protuupalne učinke, placebo i dr. Dodatno je ključno za napomenuti da nijedan *non-responder* prema KOOS Bol podskali nije pokazao pozitivan strukturni odgovor mjerljiv dGEMRIC-om, što sugerira da je značajan porast koncentracije GAG, a time i mogućnost modifikacije tijekom bolesti malo vjerojatno u odsutnosti kliničkog poboljšanja. Ovo dosljedno povezivanje strukturnog i

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

simptomatskog odgovora učvršćuje translacijsku vrijednost dGEMRIC-a kao klinički smislenog biomarkera za biološke intervencije u OA (153). Zajedno, naši nalazi jačaju racionalnost uključivanja slikovnih ishoda poput dGEMRIC-a u buduća OA istraživanja, osobito ona koja procjenjuju biološke terapije s ciljem postizanja i strukturne modifikacije i simptomatskog poboljšanja.

Prethodna istraživanja koja su kao ishod liječenja OA koristila dGEMRIC indeks većinom su se usredotočila na uznapredovale stadije bolesti ili su procjenjivale odgovor hrskavice nakon kirurških zahvata (72, 74, 153). Tek je nekolicina sustavno istražila promjene u koncentraciji GAG kao odgovor na biološke terapije poput MFAT ili HA. Pokazujući mjerljiva povećanja GAG u bolesnika s Kellgren-Lawrence tibiofemoralnim ili lwano patelofemoralnim OA stupnja 2–3 nakon liječenja aplikacijom MFAT i HA, naše istraživanje postavlja temelje za buduća istraživanja koja bi sigurno mogla, koristeći metode poput dGEMRIC, istražiti biološke intervencije i u uznapredovalijim stadijima OA, uključujući Kellgren-Lawrence 4. stupnja.

Ovi rezultati ohrabruju širu primjenu MR tehnika osjetljivih na hrskavicu i podupiru daljnja istraživanja bioloških terapija uz korištenje fenotipizacije OA bolesnika. Iako Kellgren-Lawrence stupanj 4 predstavlja biološki izazovan stadij, naši podaci iz ranih do umjerenih stadija ukazuju na to da kvantitativni slikovni biomarkeri poput dGEMRIC-a mogu postati ključni alat u razvoju personaliziranih terapijskih strategija i praćenju modificirajućih učinaka bioloških terapija u OA koljena.

## **6.5. Biokemijski ishodi**

OA koljena sve se više prepoznaje kao bolest cijelog zgloba koja, uz degeneraciju zglobne hrskavice, uključuje i promjene sinovije, subhondralne kosti te okolnog mikrokoliša (9). Upalna komponenta, osobito sinovitis i izljev, pokazala se važnim patofiziološkim obilježjem koje je povezano s jačinom boli, funkcionalnim ograničenjem i progresijom bolesti (16). U tom kontekstu, identificiran je tzv. upalni fenotip OA koljena, definiran prema MRI kriterijima (MOAKS sinovitis/izljev  $\geq 2$ ), kod kojeg se pretpostavlja da terapije usmjerene na modulaciju upalnog odgovora mogu imati izraženiji terapijski učinak (21, 28).

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

U ovom istraživanju ciljano je odabrana populacija bolesnika s upalnim fenotipom OA koljena, s pretpostavkom da će promjene biokemijskih pokazatelja nakon intraartikularne primjene MFAT odražavati imunomodulacijski i parakrini učinak terapije (197). Također se isto htjelo istražiti za aplikaciju HA zbog njezina lokalnog protuupalnog učinka (198). Takav pristup omogućava detaljniju procjenu bioloških učinaka ovih intervencija unutar jasno definiranog fenotipskog okvira bolesti.

Za pravilnu interpretaciju biokemijskih ishoda potrebno je istaknuti nekoliko metodoloških aspekata. Uzorkovanje plazme provedeno je prije intervencije (T0) te jedan mjesec (T1) i šest mjeseci (T6) nakon primjene terapije, dok je sinovijalna tekućina prikupljena u manjem broju ispitanika prije (T0) i mjesec dana nakon intervencije (T1). Analiza citokina i kemokina provedena je multiplex ELISA metodom, a koncentracija fenilalanina u plazmi određena je HPLC metodom. U svrhu smanjenja utjecaja konfuznih čimbenika (engl. *confounding factors*), svi ispitanici bili su instruirani da ne koriste nesteroidne protuupalne lijekove (NSAID) tijekom trajanja istraživanja, a pogotovo neposredno prije biokemijskih analiza.

Temeljna znanstvena pretpostavka istraživanja polazi od poznatih mehanizama djelovanja MSC-a sadržanih u MFAT. Brojna istraživanja pokazuju da je njihov učinak primarno posredovan parakrinim signalima i imunomodulacijskim djelovanjem, a ne izravnom diferencijacijom u hrskavične stanice (51, 199). Sekrecija citokina, kemokina, faktora rasta i ekstracelularnih vezikula dovodi do modulacije sinovijalnog mikrokoliša, poticanja endogene reparacije i inhibicije daljnje degeneracije hrskavice (197). U skladu s tim, biokemijski ishodi u ovom istraživanju analizirani su s ciljem da se procijeni odražavaju li promjene u profilu citokina i drugih analita sustavni i lokalni odgovor na primijenjene terapije te potencijalni imunomodulacijski učinak MFAT u odnosu na HA.

### **6.5.1. Analiza citokina i kemokina u krvnoj plazmi**

U plazmi su nakon intervencije zabilježene promjene u više analita i u MFAT i u HA skupini, uključujući porast pojedinih protuupalnih markera (npr. TIMP) ali i poraste dijela proupalnih citokina/kemokina (npr. MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ). Dio nalaza bio je

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

statistički značajan u neispravljenim testovima, no nakon Benjamini-Hochberg korekcije p-vrijednosti zbog višestrukog testiranja samo je podskupina promjena ostala robusna. Konkretno, nakon aplikacije MFAT nakon 1 mjeseca uočeni su statistički značajni ( $q < 0,05$ ) porasti koncentracija MCP-1, ICAM-1, leptina i TIMP-1, dok je trend promjene, nakon korekcije na višestruka testiranja ( $0,05 < q < 0,01$ ) bio vidljiv u padu koncentracije MMP-2 te u porastu koncentracija MIP-1 $\alpha$ , SDF-1 $\alpha$ + $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3 i TIMP-2. Nakon 6 mjeseci od aplikacije MFAT, statistički značajan ( $q < 0,05$ ) je bio porast koncentracija MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  i TIMP-1, uz trend promjene ( $0,05 < q < 0,01$ ) kod porasta koncentracije IL-1 $\beta$  i MMP-3 te pada koncentracije MMP-2. Uz to valja naglasiti kako je više od 30% vrijednosti koncentracija TNF- $\alpha$  bilo ekstrapolirano tj. izvan preciznog mjernog raspona pa su zaključci glede takvih analiza uzeti s dodatnim oprezom, kao što je već i opisano u dostupnoj literaturi (200). S druge strane, u skupini liječenoj aplikacijom HA, nakon korekcije p-vrijednosti zbog višestrukog testiranja većina do tad statistički značajnih promjena ( $p < 0,05$ ) nije zadržala značajnost. Tako 1 mjesec nakon intervencije nije bilo statistički značajne promjene nijednog citokina ili kemokina, dok je nakon 6 mjeseci zabilježen jedino značajan porast koncentracije TIMP-2 ( $q = 0,033$ ). Ipak, potrebno je naglasiti da iako su različiti citokini i kemokini zabilježili značajne promjene u MFAT i HA skupini, pri međugrupnoj usporedbi, a nakon korekcije zbog višestrukog testiranja, ni za jednu promjenu koncentracija citokina ili kemokina nije nađena statistički značajna razlika između skupina (svi  $q > 0,05$ ).

U našoj analizi većina proupalnih citokina i kemokina koji su pokazali porast nakon primjene MFAT pripada osi tipično povišenoj u upalnom fenotipu OA koljena (201, 202). Tu se prvenstveno ubrajaju MCP-1 (CCL2) i MIP-1 $\alpha$  (CCL3), čije su povišene razine ranije opisane u plazmi bolesnika s OA, osobito u azijskim kohortama i u ranim stadijima bolesti, čak i prije progresije vidljive na radiološkim snimkama (203, 204). Van Spil i suradnici navode da je njihovo različito tumačenje povišenih ili normalnih vrijednosti u plazmi bolesnika s OA plod heterogenosti same bolesti i bolesnika pri brojnim istraživanjima, zbog čega je interpretabilnost samih tih kemokina kao takvih snižena bez sustavne fenotipizacije bolesnika s OA koljena u budućim istraživanjima (205). Oba kemokina regrutiraju monocite u sinoviju i potiču produkciju TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-1 $\beta$ , stvarajući time pozitivnu povratnu petlju koja pogoduje održavanju sinovitisa i

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

progresiji OA (204, 206, 207). Njihov porast u našoj skupini ispitanika s upalnim fenotipom OA koljena stoga se može tumačiti više kao odraz podloge bolesti nego kao izravni učinak terapije (207).

Porast TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  nakon 6 mjeseci od aplikacije MFAT nadovezuje se na istu upalnu os, budući da ti citokini imaju ključnu ulogu u kataboličkoj signalizaciji hrskavice i poticanju ekspresije MMP-3 i MMP-13 te u smanjenju sinteze kolagena tipa II i agrekana (116, 208). Zanimljivo, CCL2 i CCL3 dodatno induciraju MMP-3, što može objasniti blagi porast njegove plazmatske koncentracije u MFAT skupini (207).

Promatrani trend pada plazmatske koncentracije MMP-2 nakon primjene MFAT terapije može ukazivati na smanjenje kataboličke aktivnosti unutar zglobnog mikrookruženja, što je u skladu s prijelazom prema reparacijskoj fazi remodeliranja izvanstaničnog matriksa i pojačanom ekspresijom inhibitora poput TIMP-1, čemu su doprinijeli prethodno opisani nalazi u pretkliničkim studijama (209, 210). Taj pomak dodatno podupire porast TIMP-1, endogenog inhibitora MMP-ova koji se u sekretumu MSC-a izlučuje zajedno s TIMP-2, koji je također pokazao trend rasta koncentracije nakon 1 mjeseca od aplikacije MFAT, te fiziološki ograničava degradaciju matriksa (209, 210). Njegovo povišenje može predstavljati kompenzatorni antikatabolički odgovor, dok pad MMP-2 odgovara smanjenju proteolitičke aktivnosti i stabilizaciji izvanstaničnog matriksa. U skupini liječenoj HA, nakon 6 mjeseci od terapije zabilježen je izoliran porast TIMP-2 koji inhibira MMP-13 pa se može smatrati povoljnim pokazateljem remodelirajućeg odgovora (211).

Na uzastopne faze imunološke aktivacije i rezolucije upućuje i ponašanje adhezijskih molekula. Porast ICAM-1 nakon 1 mjeseca može predstavljati ranu fazu povećane adhezije leukocita i aktivacije endotela i sinovijalnih stanica (142). Dodatno, SDF-1, kemokin koji može imati dvostruku ulogu u patogenezi OA, djeluje s jedne strane kao medijator kataboličkih procesa potičući migraciju hondrocita te sinovijalnih stanica i posljedičnu degradaciju hrskavice, dok s druge strane može sudjelovati u reparacijskim i regeneracijskim mehanizmima putem mobilizacije MSC-a (212–214). U ovom istraživanju zabilježen je trend porasta koncentracije SDF-1 $\alpha$ + $\beta$  u plazmi jedan mjesec nakon aplikacije MFAT, što se može tumačiti na više načina, kao odraz

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

patofizioloških zbivanja povezanih s OA, ali i kao potencijalni marker početne aktivacije reparacijskih procesa induciranih terapijom.

Leptin ima jednu od ključnih uloga u patogenezi OA koljena kod pretilih osoba (BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>) (215). Koncentracije leptina koreliraju s BMI pretilih pacijenata, a više koncentracije dovode do ranijeg razvoja OA u pretilih bolesnika (216, 217). Iako se povišenje koncentracije leptina u plazmi može pripisati metaboličkom profilu ispitanika kada se radi o pretilim bolesnicima tj. metaboličkom fenotipu OA koljena, u našem istraživanju svi su takvi bolesnici bili isključeni iz istraživanja na temelju kriterija isključenja (21). Ipak, 1 mjesec nakon aplikacije MFAT zabilježen je porast koncentracije leptina u plazmi, stoga se može zaključiti kako uloga leptina u patogenezi OA koljena nije isključivo vezana za pretilu bolesnike te se njegova funkcija mora dodatno istražiti.

U konačnici, povišenje TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 3 1 mjesec nakon aplikacije MFAT može se tumačiti kao znak aktivacije reparacijskih i regeneracijskih signala, što je u skladu s poznatim parakrinim učinkom MSC-a koji luče TGF- $\beta$ -izoforme i posredno potiču sintezu komponenti izvanstaničnog matriksa zglobne hrskavice (67, 218, 219).

Kada se promatraju zajedno, ove promjene ukazuju na međusobno suprotstavljene, ali komplementarne procese. Dok porast proupalnih citokina i kemokina (CCL2, CCL3, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MMP-3) nakon 6 mjeseci od aplikacije MFAT, odražava aktivnost upalne osi karakteristične za upalni fenotip OA, istodobno povišenje anti-kataboličkih medijatora (TIMP-1) i pad MMP-2 upućuju na adaptivni pokušaj ograničavanja degradacije matriksa i prijelaz prema reparacijskom obrascu remodeliranja. Takav mješoviti signal potvrđuje da se biokemijski učinci bioloških terapija ne mogu tumačiti izolirano na razini pojedinog citokina, nego ih treba promatrati unutar međusobno povezanih osi i citokinske mreže, kako su to istaknuli Mobasheri i suradnici u recentnim radovima o biomarkerima i endotipovima OA (111, 201, 220, 221)

Unatoč ovim opaženim obrascima i biološki objašnjivim trendovima, važno je napomenuti kako plazma predstavlja manje specifičan odraz intraartikularne biologije u odnosu na sinovijalnu tekućinu (222). Biokemijske promjene koje nastaju unutar zgloba mogu se u perifernoj cirkulaciji razrijediti i djelomično asimilirati u sustavni

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

pozadinski signal, što rezultira slabijom osjetljivošću i manjom izraženošću biomarkera u plazmi (223). Pregledni radovi i sustavni pregledi pokazali su da sinovijalna tekućina pouzdanije odražava stanje sinovijalnog mikrookoliša, s višim koncentracijama biomarkera, većom korelacijom s morfološkim i strukturnim promjenama zgloba te manjim utjecajem sistemskih čimbenika (223, 224). Stoga je za očekivati da će promjene u sinovijalnoj tekućini biti izraženije i konzistentnije u usporedbi s onima u plazmi, dok su plazmatske promjene po prirodi suptilnije i sporije te vjerojatnije odražavaju dugoročne učinke potencijalne modifikacije bolesti, a ne ranu lokalnu reakciju nakon terapijske intervencije (111).

Osim ovih bioloških ograničenja interpretacije plazmatskih vrijednosti, pouzdanost rezultata dodatno uvjetuju i tehnički čimbenici laboratorijskih mjerenja. Multiplex određivanje citokina u plazmi, iako omogućuje istodobnu kvantifikaciju velikog broja analita, podložno je određenim metodološkim ograničenjima koja mogu utjecati na pouzdanost i usporedivost rezultata. Ključni izvori varijabilnosti uključuju razlike između analitičkih platformi i pojedinih serija reagensa (tzv. *inter-platform* i *inter-batch* varijabilnost), osjetljivost na predanalitičke i postanalitičke uvjete (vrijeme obrade, broj ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja, hemoliza) te ograničenu preciznost pri niskim koncentracijama citokina koje se nalaze blizu granice detekcije, odnosno ispod donje granice kvantifikacije (LLOQ, engl. *Lower Limit of Quantification*).

Ove tehničke razlike nisu samo laboratorijski detalj, već imaju izravne posljedice na interpretaciju bioloških rezultata. Validacijski radovi pokazali su da se iste plazmatske uzorke može različito kvantificirati ovisno o korištenoj platformi i seriji reagensa, osobito kod citokina niskog raspona koncentracija (200, 225). Takve tehničke razlike mogu utjecati na pouzdanost i statističku stabilnost rezultata, osobito kada su promjene male i blizu granice značajnosti.

U ovom istraživanju poduzete su mjere kojima se navedeni rizici nastoje minimizirati. Tako su svi uzorci čuvani na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , transportirani u suhom ledu do laboratorija gdje je provedena analiza te analizirani prema unaprijed standardiziranom protokolu. Ipak, s obzirom na neizbježan stupanj tehničke i biološke varijabilnosti, rezultati su interpretirani s naglaskom na konzistentne obrasce promjena kroz više analita i vremenskih točaka, uz primjenu Benjamini–Hochbergove korekcije p-vrijednosti za

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

višestruka testiranja. Takav pristup omogućuje zadržavanje biološke vjerodostojnosti uz kontrolu metodoloških ograničenja.

Uzimajući u obzir i biološku složenost i tehničku varijabilnost mjerenja, plazmatski nalazi zahtijevaju opreznu interpretaciju te integraciju s drugim biokemijskim i kliničkim pokazateljima. U plazmi je zabilježena kombinacija porasta i pada različitih analita u obje terapijske skupine, pri čemu je samo dio promjena zadržao statističku značajnost nakon Benjamin–Hochbergove korekcije zbog višestrukog testiranja. Nakon korekcije, u MFAT skupini značajno su porasle koncentracije MCP-1, ICAM-1, leptina i TIMP-1 nakon 1 mjeseca te MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  i TIMP-1 nakon 6 mjeseci, dok je u HA skupini jedina značajna promjena bila porast koncentracije TIMP-2 nakon 6 mjeseci. U kontekstu upalnog fenotipa OA koljena, takvi obrasci odražavaju faznu i višesmjernu dinamiku upalnog odgovora te ograničenu osjetljivost plazme kao odraza intraartikularnih procesa. Dodatno, povišene bazalne vrijednosti upalnih medijatora u ovoj kohorti vjerojatno su smanjile mogućnost uočavanja većih relativnih promjena nakon terapije. U kombinaciji s poznatom tehničkom i biološkom varijabilnošću multiplex metoda, to potvrđuje potrebu da se interpretacija plazmatskih nalaza temelji na konzistentnim, korigiranim signalima kroz vrijeme, uz paralelno razmatranje rezultata iz sinovijalne tekućine te kliničkih i radioloških ishoda. Takav integrirani pristup, koji promatra citokinske promjene unutar međusobno povezanih mreža umjesto izolirano po pojedinačnim analitima, u skladu je s aktualnim smjernicama za fenotipsku i endotipsku stratifikaciju bolesnika s OA, kako to ističu Mobasher i suradnici (111, 221).

### **6.5.2. Analiza citokina i kemokina u sinovijalnoj tekućini**

Nakon analize promjena u plazmi, provedena je usporedna procjena citokinskog i kemokinskog profila u sinovijalnoj tekućini, budući da ona preciznije odražava lokalne upalne i reparacijske procese unutar zgloba te se stoga smatra najizravnijim biokemijskim pokazateljem intraartikularne aktivnosti bolesti (222–224). Cilj analize bio je procijeniti lokalne promjene citokinskog profila unutar zglobnog mikrokoliša nakon intraartikularne primjene MFAT ili HA.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

Glavno ograničenje ove analize proizlazi iz tehničkih poteškoća pri aspiraciji sinovijalne tekućine. Unatoč činjenici da su svi ispitanici, sukladno kriterijima upalnog fenotipa OA koljena, imali izražen sinovitis i izljev (MOAKS skor za sinovitis/izljev  $\geq 2$ ), uspješna aspiracija sinovijalne tekućine ostvarena je tek u 13 od 34 ispitanika u MFAT skupini i u 10 od 18 u HA skupini prije intervencije, dok su u kontrolnom pregledu nakon 1 mjeseca zabilježeni uspješni parovi uzoraka u 8 ispitanika iz svake skupine. Takav broj čini statističku snagu analize izrazito ograničenom i smanjuje vjerojatnost održavanja značajnosti nakon korekcije za višestruka testiranja. Slične poteškoće u aspiraciji sinovijalne tekućine opisane su i u ranijim studijama OA koljena, gdje je unatoč kliničkom i radiološkom izljevu učestalost uspješnih punkcija bila niska, što dodatno potvrđuje da je sinovijalna tekućina u OA često minimalna, viskozna i ponekad nemoguća za aspiraciju, čak i uz ultrazvučno navođenje (226, 227).

U sinovijalnoj tekućini, nakon Benjamini-Hochberg korekcije p-vrijednosti za višestruka testiranja, nijedna od promjena koncentracija analiziranih citokina, kemokina i inhibitora matriksnih metaloproteinaza nije ostala statistički značajna ni u MFAT ni u HA skupini. Ovakav ishod vjerojatno je posljedica vrlo malog broja parova uzoraka, jer je s tako malim uzorkom teško očekivati održavanje značajnosti nakon stroge korekcije zbog višestrukog testiranja, što su istaknuli i autori prethodnih studija koje su analizirale sinovijalni citokinski profil nakon bioloških terapija (224).

Prije korekcije, u MFAT skupini zabilježena su povećanja koncentracija IL-8, leptina, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TIMP-2 i TIMP-4, uz smanjenje IL-21, dok je u HA skupini porasla samo koncentracija leptina.

Ovi trendovi, iako statistički nesigurni nakon korekcije, u skladu su s prethodnim istraživanjima koja su pokazala da su IL-8 i leptin među biomarkerima najčešće povišenima u sinovijalnoj tekućini bolesnika s OA te da odražavaju aktivaciju sinovijalnih fibroblasta i adipokinsko-upalne signalne putove (223, 228, 229). Povećanje TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 2 može predstavljati rani reparacijski odgovor jer ovi faktori potiču sintezu osnovnih komponenti hrskavičnog matriksa (kolagen II, agrekan) i pomažu održavanju hondrocitnog fenotipa, istodobno inhibirajući MMP-13 i proinflammatorne citokine poput IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  (136, 230). Porast TIMP-2 i TIMP-4 može odražavati povećanu antikataboličku aktivnost i inhibiciju MMP-ova u zglobnom

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

mikrookruženju, što je ranije potvrđeno na razini sinovijalnog tkiva i in vitro hondrocitnih kultura, a u skladu je i sa zabilježenim promjenama u plazmi (231).

Premda mali broj uzoraka onemogućuje donošenje čvrstih zaključaka, analiza sinovijalne tekućine bila je važna jer OA primarno zahvaća zglobni mikrookoliš, a promjene u sinovijalnom eksudatu odražavaju lokalnu staničnu i citokinsku dinamiku koja može izostati u plazmi zbog razrjeđenja i sistemskih utjecaja. Upravo zato sinovijalna tekućina predstavlja ključni, iako tehnički zahtjevniji, izvor biokemijskih podataka o intraartikularnom učinku primijenjenih terapija.

U konačnici, iako nakon korekcije za višestruka testiranja nije bilo statistički značajnih promjena, trendovi zabilježeni prije korekcije, uključujući povišenje IL-8, leptina, TGF- $\beta$  izoformi te TIMP-2 i TIMP-4, uz smanjenje IL-21, mogu ukazivati na ranu aktivaciju reparacijskih mehanizama i početak rezolucije upale u sinovijalnom mikrookolišu nakon aplikacije MFAT. Međutim, zbog malog broja uparenih uzoraka ovi se nalazi mogu tumačiti samo hipotetno. Buduća istraživanja s većim brojem ispitanika i uspješnijim postotkom aspiracije sinovijalne tekućine nužna su za preciznije definiranje utjecaja MFAT i HA terapija na lokalni citokinski profil.

### **6.5.3. Analiza koncentracija fenilalanina u krvnoj plazmi**

Uz brojne poznate biomarkere OA koljena iz obitelji citokina i kemokina, jedan od potencijalno novih biomarkera koji je tek nedavno prepoznat u literaturi kao mogući metabolički pokazatelj OA jest fenilalanin.

U našoj analizi koncentracija fenilalanina u plazmi porasla je u obje terapijske skupine (MFAT i HA), bez značajne razlike između njih. To je u suprotnosti s dostupnim radovima koji fenilalanin navode kao biomarker rizika za napredovanje OA koljena, osobito kod žena. Zhai i suradnici pokazali su da viša razina fenilalanina u plazmi značajno povezana s radiografskim napredovanjem bolesti (119, 232). Povišene vrijednosti fenilalanina zabilježene su i u sinovijalnom tkivu bolesnika s OA koljena u usporedbi sa zdravim kontrolama (233). Budući da je većina ispitanika u našem istraživanju bila ženskog spola, a unatoč kliničkom i radiološkom poboljšanju,

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

uključujući porast koncentracija GAG u zglobnoj hrskavici, fenilalanin je rastao, sugerira se da njegova upotreba kao biomarkera terapijskog odgovora zahtijeva dodatno preispitivanje. U literaturi se porast fenilalanina tumači kao posljedica poremećene konverzije fenilalanina u tirozin zbog smanjene aktivnosti fenilalanin-hidroksilaze u uvjetima oksidativnog i upalnog stresa, ali i kao odraz pojačanog katabolizma proteina i adaptivnog metabolizma aminokiselina u hondrocitima tijekom OA progresije.

S druge strane, intraartikularna aplikacija N-acetil fenilalanina u prekliničkim studijama pokazala se kao terapija koja dovodi do povećanja debljine hrskavice uz smanjenje aktivnosti kataboličkih enzima i remodeliranja ekstracelularnog matriksa (234). Iako se ne radi o endogenom fenilalaninu, već o farmakološkom derivatu s acetiliranom amino skupinom, rezultati te studije naglašavaju potrebu za dodatnim istraživanjem funkcije fenilalanina i njegovih metabolita u patogenezi OA.

S obzirom na to da su ispitanici u našem istraživanju bili upalnog fenotipa OA koljena te da se ključni klinički i radiološki ishodi liječenja moraju promatrati kroz smanjenje upale i izljeva, moguće je da fenilalanin odražava stanične ili metaboličke promjene koje nisu izravno vezane uz smanjenje upale, već uz kompenzacijske procese u hrskavici ili sinoviji.

Stoga interpretaciju rasta fenilalanina u našem istraživanju valja ograničiti. Povećanje njegove koncentracije u plazmi ne može se automatski smatrati pokazateljem progresije bolesti ili neuspjeha terapije. Potrebna su daljnja istraživanja s većim uzorcima, višim frekvencijama mjerenja i integracijom metaboličkih i slikovnih pokazatelja kako bi se razjasnila funkcija fenilalanina u OA.

## **6.6. Analiza mikrofragmentiranog masnog tkiva**

### **6.6.1. Biokemijska analiza mikrofragmentiranog masnog tkiva**

U svrhu procjene biokemijske aktivnosti MFAT analiziran je široki panel citokina, kemokina, čimbenika rasta i enzima remodeliranja izvanstaničnog matriksa. Cilj ove analize bio je utvrditi profil upalnih, protuupalnih i regenerativnih biomolekula sadržanih

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

u samom pripravku te time indirektno procijeniti njegov potencijal za modulaciju zglobnog mikrookoliša nakon intraartikularne primjene. Takav pristup temelji se na pretpostavci da rani terapijski učinci MFAT proizlaze iz promjene biokemijskog profila zglobnog mikrookoliša, a potom iz parakrinih i imunomodulatornih mehanizama SVF-a koji sadrži MSC, a manje iz diferencijacije samih MSC-a (44). MSC podrijetlom iz masnoga tkiva poznate su po sekreciji citokina i čimbenika koji potiču proliferaciju i migraciju stanica, inhibiraju upalne putove te moduliraju fenotip makrofaga iz proupalnog M1 u reparacijski M2 tip, što se u literaturi navodi kao glavni mehanizam protuupalnog i regeneracijskog djelovanja pripravaka temeljenih na masnom tkivu (51, 235, 236).

U našem istraživanju većina analita u MFAT pokazala je visoku detektabilnost, s više od 80 % vrijednosti unutar mjernog raspona, što potvrđuje prisutnost mješavine pro- i protuupalnih medijatora. Među njima su mjerljive koncentracije protuupalnih citokina IL-10, IL-13 i IL-1Ra, kao i TGF- $\beta$  izoformi, koje se u literaturi povezuju s reparacijskim i anti-kataboličkim učincima (134, 237–239). Istodobno su razine ključnih proupalnih medijatora (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) bile niske, a kod dijela analita (IL-1 $\beta$ , MCP-3, TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-18, IL-12(p70), IL-22, MMP-1, MMP-2 i MMP-3) veći udio rezultata bio je ekstrapoliran izvan mjernog raspona, što zahtijeva oprez pri tumačenju, ali je u skladu s očekivano niskom koncentracijom takvih molekula u masnom tkivu. Ovakav miješani profil, s jasno mjerljivim koncentracijama protuupalnih i reparacijskih medijatora uz relativno niske koncentracije ključnih proupalnih citokina, podudara se s dosadašnjim istraživanjima sekretoma MFAT koja su potvrdila prisutnost IL-1Ra i TGF- $\beta$  izoformi kao dominantnih imunomodulatornih i reparacijskih čimbenika (66, 240, 241). Za razliku od većine ranijih studija, u ovom istraživanju jasno su kvantificirane koncentracije IL-10 i IL-13 u većini MFAT uzoraka, što upućuje na to da MFAT može sadržavati širi spektar protuupalnih komponenti nego što je dosad detaljno dokumentirano (242). Istodobno, koncentracije proupalnih citokina kao što su IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  bile su niže nego u sinovijalnoj tekućini, što je u skladu s imunomodulatornom prirodom MFAT opisanom u prethodnim radovima. Zajednički gledano, ovi nalazi potvrđuju da MFAT sadrži biološki aktivan skup molekula s pretežito protuupalnim i reparacijskim svojstvima, što podupire njegov potencijal za modulaciju upalnog mikrookoliša u OA koljena.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

Usporedba koncentracija analita izmjerenih u MFAT s onima u sinovijalnoj tekućini, iako nije statistički testirana zbog različitih bioloških matrica i nepridruženih uzoraka, omogućuje deskriptivnu procjenu biokemijskog profila pripravka u odnosu na intraartikularni mikrokoliš. Uočeno je da su koncentracije većine citokina i kemokina u MFAT niže nego u sinovijalnoj tekućini, što je biološki očekivano jer sinovijalna tekućina u OA odražava aktivno upalno stanje. Ipak, MMP-9 pokazuje znatno više vrijednosti u MFAT nego u sinovijalnoj tekućini, što može ukazivati na veću enzimsku aktivnost unutar samog pripravka, lučenje samih adipocita, ali i na aktivno remodeliranje matriksa kao dio prirodne funkcije stromalnog mikrokoliša (243, 244). Istodobno, prisutnost inhibitora metaloproteinaza (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-4) i TGF- $\beta$  izoformi potvrđuje postojanje antikataboličke ravnoteže unutar pripravka, što bi moglo imati zaštitni učinak u kontekstu degenerativnih procesa zglobne hrskavice (134, 139, 209).

Zaključno, MFAT u našem istraživanju pokazuje profil obilježen prisutnošću protuupalnih i anti-kataboličkih čimbenika uz ograničene količine klasičnih proupalnih medijatora, što upućuje na imunomodulatorni i potencijalno regenerativni karakter pripravka. Usporedno promatranje s koncentracijama u sinovijalnoj tekućini, iako deskriptivne prirode, dodatno naglašava biološku opravdanost ovakve terapije, jer pripravak unosi u zglob medijatore koji mogu doprinijeti smanjenju upalnog odgovora i remodeliranju oštećenog matriksa. Ipak, interpretaciju rezultata potrebno je temeljiti uz oprez zbog varijabilnosti uzoraka, različitih matrica i dijela analita s visokim udjelom ekstrapoliranih vrijednosti. Iako ovakva biokemijska obilježja MFAT konceptualno podupiru opažene kliničke i slikovne trendove, dizajn ovog istraživanja ne omogućuje izravno povezivanje pojedinih medijatora s konkretnim terapijskim učinkom, već upućuje na potrebu budućih studija koje će MFAT-profil integrirati s longitudinalnim promjenama u plazmi, sinovijalnoj tekućini i kliničkim ishodima. Buduće studije trebale bi uključiti veći broj uzoraka, standardizirane protokole obrade i paralelnu analizu kliničkih i slikovnih pokazatelja kako bi se preciznije definirala uloga pojedinih citokina i kemokina u biološkom učinku MFAT kod OA koljena.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

### **6.6.2. Stanična analiza mikrofragmentiranog masnog tkiva**

Analiza staničnog sastava MFAT u ovom istraživanju predstavlja važan doprinos razumijevanju bioloških mehanizama temeljem kojih MFAT ostvaruje terapijski učinak u OA koljena. Dobiveni rezultati potvrđuju da MFAT, dobiven standardiziranim postupkom mikrofragmentacije lipoaspirata korištenjem Lipogems® sustava, sadrži heterogenu populaciju stanica uz dobru vijabilnost, pri čemu su najzastupljenije endotelne progenitorske stanice, a periciti i supraadventicijske stromalne stanice prisutni su u manjim udjelima. Takav stanični profil u potpunosti je u skladu s ranijim istraživanjima. U studiji Polančeca i suradnika, koja je detaljno karakterizirala imunofenotip MFAT, pokazano je da dominiraju CD31<sup>+</sup> i CD34<sup>+</sup> endotelni progenitori, uz manji udio pericita i supraadventicijskih stromalnih stanica (68). Slično tome, rad Zenić i suradnika također je potvrdio da MFAT sadrži stabilan i ponovljiv udio upravo istih staničnih podskupina, uključujući visoku zastupljenost CD34<sup>+</sup> progenitorskih stanica, što dodatno potvrđuje spoznaje o MFAT i SVF-u, gdje se upravo ove stanice smatraju važnim izvorom angiogenih i parakrinih signala relevantnih za regeneraciju tkiva (245–248).

Usporedbom s navedenim istraživanjima vidljivo je da su rezultati ovog rada iznimno konzistentni s dosadašnjom literaturom: endotelni progenitori čine gotovo 70% (medijan 68,97%) nukleiranih stanica, dok se udjeli pericita i supraadventicijskih stromalnih stanica kreću uglavnom ispod 10%, što je u potpunosti usporedivo s ranijim vrijednostima (68, 69, 245). Ukupni broj stanica po mililitru MFAT (medijan  $4,6 \times 10^5$ ) također se uklapa u raspon  $1-6 \times 10^5$  stanica/mL opisan u prethodnim studijama, potvrđujući stabilnost Lipogems sustava u stvaranju ponovljivog staničnog pripravka (68).

Vijabilnost stanica u ovom istraživanju iznosila je 62%, što je, iako nešto niže od vrijednosti od približno 70–80% opisanih u nekim istraživanjima SVF, u potpunosti očekivano za mehanički obrađeno masno tkivo pacijenata starije dobi s OA (176, 249). Ranija istraživanja ukazuju na to da vijabilnost MFAT može varirati ovisno o dobi donora, komorbiditetima i metodi obrade, a više su vrijednosti obično zabilježene u populacijama mlađih ispitanika (62, 250, 251). Važno je istaknuti kako nekoliko autora naglašava da terapijski učinak MFAT ne ovisi primarno o preživljavanju stanica, nego

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

ponajviše o njihovoj parakrinoj aktivnosti, modulaciji intraartikularne upale i sekreciji bioaktivnih čimbenika koji mijenjaju mikrookoliš zgloba (252). U tom kontekstu posebno je značajan koncept Arnolda Caplana, koji opisuje MSC kao „*medicinal signaling cells*“. Prema ovom modelu učinak MSC-ova ne proizlazi iz njihove integracije u tkivo, već iz njihove sposobnosti da luče citokine, kemokine i druge signalne molekule kojima usmjeravaju reparacijske procese i imunomodulaciju u okolišu zahvaćenog zgloba (46). Taj koncept dodatno objašnjava zašto vijabilnost stanica u MFAT u ovom istraživanju, iako umjerena, nije povezana s kliničkim ni radiološkim ishodima.

Upravo se u pokušaju korelacije staničnih parametara s terapijskim učinkom pokazalo jedno od najvažnijih zapažanja ovog rada. Analiza nije pokazala postojanje statistički značajnih razlika ni u ukupnom broju stanica, ni u udjelu pojedinih subpopulacija, ni u vijabilnosti između KOOS Bol *respondera* i *non-respondera*. Ovi rezultati upućuju na to da unutar standardizirane MFAT procedure stanične varijacije među bolesnicima nisu dovoljne da bi utjecale na klinički odgovor te da je terapijski učinak MFAT primarno određen njegovom sekretomskom aktivnošću, a ne kvantitativnim udjelima pojedinih staničnih subpopulacija. Ovakav nalaz dodatno je potaknut činjenicom da je u istraživanju sudjelovala homogena skupina bolesnika definiranog upalnog fenotipa OA koljena što smanjuje biološku varijabilnost među ispitanicima. Također treba naglasiti da je broj *non-respondera* bio vrlo malen, što smanjuje statističku snagu, no čak i uz taj limit, raspodjela vrijednosti nije pokazala nikakav trend koji bi upućivao na klinički relevantnu razliku.

Jednaki je obrazac pronađen i u odnosu staničnog sastava MFAT i biokemijskih promjena hrskavice procijenjenih dGEMRIC metodom, gdje također nije utvrđena statistički značajna povezanost između staničnih parametara i radiološkog odgovora u vidu promjene koncentracije GAG u hrskavici. To je u skladu s logikom parakrinog djelovanja MSC-a unutar MFAT, u kojoj stanični sastav ne mora nužno korelirati s biološkim djelovanjem i sekrecijom protuupalnih, trofičkih i drugih faktora od strane MSC-a. Stoga odsustvo povezanosti između staničnog sastava i dGEMRIC ishoda potvrđuje da aplikacija MFAT stvara povoljnije okruženje za reparaciju, ali sam sastav MFAT nije primarni određujući čimbenik stupnja biokemijskog poboljšanja.

## **Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

Ukupno gledajući, rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da je stanični sastav MFAT dobivenog Lipogems postupkom stabilan, ponovljiv i u skladu s prethodnim publikacijama, a terapijski učinak nije ovisio o kvantitativnim varijacijama unutar pojedinih staničnih podskupina. To snažno podupire suvremenu paradigmu prema kojoj MSC i srodne stanice djeluju primarno putem sekretoma i imunomodulacije, dok je odgovor na liječenje ponajprije određen biološkim karakteristikama samog bolesnika i sekrecijom MSC-a, a ne razlikama u staničnom profilu MFAT (46, 197, 252). Ovakvi nalazi predstavljaju važan doprinos razumijevanju djelovanja autolognog MFAT u OA koljena i naglašavaju potrebu za daljnjim istraživanjima koja će integrirati stanične, biokemijske i fenotipske karakteristike bolesnika u cilju preciznijeg predviđanja terapijskog odgovora.

### **6.7. Snage istraživanja**

Ovo istraživanje ima više ključnih metodoloških i translacijskih prednosti koje ga čine jedinstvenim u području istraživanja OA koljena. Prije svega, prema našim saznanjima, riječ je o prvom randomiziranom, dvostruko slijepom kliničkom istraživanju koje izravno uspoređuje autologno MFAT i HA u strogo definiranom i fenotipski homogenom uzorku bolesnika s upalnim fenotipom OA koljena. Detaljni kriteriji uključenja i isključenja u istraživanje poput uključivanja isključivo bolesnika s MOAKS sinovitis/izljev  $\geq 2$ , bez mehaničkih devijacija, pretilosti, dijabetesa, depresije ili obilježja drugih fenotipova, značajno smanjuju biološku heterogenost i povećava internu valjanost istraživanja. Time se otklanja većina čimbenika koji mogu prikriti ili umanjiti stvarni terapijski signal bioloških intervencija, a odabrani fenotip ujedno predstavlja podtip OA koljena kod kojeg imunomodulatorne terapije poput MFAT mogu direktno utjecati na uzrok bolesti (16, 21).

Druga velika snaga je multimodalni, integrirani istraživački pristup koji kombinira kliničku evaluaciju, napredno slikovno oslikavanje, biokemijske analize i staničnu karakterizaciju MFAT. Za razliku od većine OA studija koje se oslanjaju isključivo na subjektivne kliničke ishode, ovo istraživanje uključuje četiri razine procjene: validirane kliničke ishode (KOOS, WOMAC, VAS), slikovne ishode putem dGEMRIC indeksa kao

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

kvantitativnog biomarkera koncentracije GAG u hrskavici koljena, široki panel citokina i kemokina u plazmi, sinovijalnoj tekućini i samom MFAT, te protočnu citometriju uzoraka MFAT s analizom staničnog sastava i vijabilnosti. Ova sveobuhvatna analiza omogućuje povezivanje kliničkog učinka s molekularnim, biokemijskim i staničnim promjenama, što je strateški usklađeno s modernim konceptima personalizirane medicine i patofiziologije OA.

Korištenje dGEMRIC indeksa predstavlja jednu od najvećih metodoloških prednosti ove studije. Ovo je prvo istraživanje koje uspoređuje MFAT i HA koristeći kvantitativno MRI mjerenje GAG, uz strogo standardiziran protokol aplikacije gadolinija, definirano vrijeme hodanja nakon kontrasta, fiksirano vrijeme snimanja i analizu od strane istog iskusnog radiologa, čime se smanjuje tehnička varijabilnost. dGEMRIC omogućuje rano otkrivanje biokemijskih promjena hrskavice koje prethode morfološkom propadanju, što dodatno povećava osjetljivost u detekciji terapijskog učinka (168).

Posebno vrijedi istaknuti rigoroznu i višeslojnu *responder* analizu koja uključuje validirane MCID pragove za KOOS Bol, WOMAC Ukupni skor i VAS u kretanju, kao i definirani dGEMRIC *responder* kriterij ( $\geq 10\%$  porasta GAG-a u najmanje tri od sedam analiziranih zglobnih područja). Time se osigurava da opažena poboljšanja nisu samo statistički značajna, nego i klinički relevantna te prepoznatljiva iz perspektive bolesnika. Istovremeno praćenje simptomatskih i strukturnih promjena dodatno smanjuje vjerojatnost da rezultati budu odraz placebo učinka ili metodoloških artefakata.

Još jedna značajna snaga je analitička karakterizacija MFAT korištenjem protočne citometrije, što je izrazito rijetko u sklopu randomiziranih kliničkih pokusa. Ova metoda omogućila je kvantificiranje broja stanica, njihove vijabilnosti i zastupljenosti ključnih subpopulacija poput pericita, supraadventicijskih stromalnih stanica i endotelnih progenitora. Uz to, analiza citokina i kemokina u samom MFAT pruža uvid u biološki potencijal i parakrini profil primijenjenog pripravka, što može poslužiti kao temelj za buduće prediktivne modele odgovora na terapiju.

Visoka razina standardizacije intervencijskih postupaka dodatno jača kvalitetu istraživanja. Svi su ispitanici, bez obzira na dodijeljeni tretman, prošli postupak

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

lipoaspiracije kako bi se održalo dvostruko zasljepljivanje i eliminirao psihološki utjecaj očekivanja na ispunjavanje kliničkih upitnika. MFAT i HA aplicirani su pod identičnim uvjetima i ultrazvučnim navođenjem, dok su svi laboratorijski i dGEMRIC protokoli provedeni uniformno na svim ispitanicima. Time je značajno smanjena tehnička varijabilnost, što uvelike povećava internu konzistenciju studije.

Odabir 6-mjesečnog vremenskog okvira praćenja predstavlja promišljenu i metodološki opravdanu odluku. Budući da se terapijski učinci HA tipično ne protežu dulje od 6–9 mjeseci, dulje praćenje inherentno bi favoriziralo MFAT, koji u literaturi pokazuje potencijalno trajanje učinka i do dvije godine (72, 253). Stoga 6 mjeseci predstavlja najpošteniju i klinički najinformativniju točku usporedbe obaju tretmana. Iako se ovom duljinom praćenja ne mogu donositi zaključci o modifikaciji bolesti, uspješna identifikacija ranih kliničkih i biokemijskih signala predstavlja važnu platformu za buduća, dugoročnija istraživanja.

Sve navedeno čini ovo istraživanje jednim od metodološki najcjelovitijih i translacijski najrelevantnijih radova u području biološkog liječenja OA koljena, s izrazitom prednošću u precizno odabranoj populaciji, višedimenzionalnoj analizi ishoda i dosljednoj primjeni rigoroznih istraživačkih standarda.

## **6.8. Ograničenja istraživanja**

Ovo istraživanje ima nekoliko ograničenja koja je potrebno razmotriti u interpretaciji rezultata. Prvo, relativno mali ukupan uzorak, uvjetovan izuzetno strogim kriterijima uključenja i isključenja, ograničava statističku snagu i mogućnost generalizacije nalaza. Odabir fenotipski vrlo homogenog upalnog podtipa OA koljena zahtijevao je isključivanje velikog broja potencijalnih ispitanika, što je rezultiralo skromnijom kohortom, ali i povećanom internom valjanošću. Randomizacija 2:1, iako opravdana željom za detaljnijom evaluacijom učinaka MFAT-a i povećanjem dostupnosti uzoraka za laboratorijske analize, dovela je do manjeg broja ispitanika u HA skupini i time smanjila snagu međugrupne usporedbe kod statističke analize. Nekoliko ishoda, uključujući dGEMRIC indeks i kliničke upitnike, pokazalo je trendove povoljne za MFAT, ali bez statističke značajnosti. Moguće je da bi veći i uravnoteženiji uzorak pojačao te

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

trendove i potvrdio ih kao statistički značajne, osobito u domenama kliničkih upitnika gdje su srednje razlike dosljedno bile u korist MFAT-a. Buduća istraživanja trebala bi uključivati veće multicentrične kohorte, po mogućnosti kroz međunarodnu suradnju, koristeći standardizirane protokole fenotipizacije OA i metodološke okvire za evaluaciju ortobioloških terapija.

Studija nije uključivala placebo skupinu, već je HA odabrana kao aktivni komparator s obzirom na njezinu široku primjenu u kliničkoj praksi kod ranog do umjerenog OA koljena (40). Uvođenje placeba smatrano je etički neprihvatljivim s obzirom na dostupnost učinkovite standardne skrbi i etičke dvojbe oko uskraćivanja terapije simptomatskim bolesnicima.

Dodatno ograničenje predstavlja jednocentrični dizajn kod provedbe samog liječenja i praćenja ispitanika. Iako takav dizajn omogućuje iznimno dosljednu primjenu kriterija za uključivanje u istraživanje, protokola intervencije i metoda oslikavanja, on smanjuje generalizabilnost dobivenih rezultata. Nadalje, stroga fenotipska selekcija utječe na generalizabilnost jer se rezultati primarno odnose na bolesnike s upalnim fenotipom OA te se ne mogu ekstrapolirati na druge fenotipove, uključujući biomehanički, metabolički ili fenotip kronične boli.

Dodatno ograničenje jest što pri stratifikaciji bolesnika i procjeni kriterija uključivanja/isključivanja nisu analizirane početne vrijednosti kliničkih upitnika poput KOOS Bol skora. Tako nisu filtrirani bolesnici s početno visokim vrijednostima tj. boljom kliničkom slikom što je moglo dovesti do stropa učinka u analizi i potencijalno smanjiti mogućnost detekcije simptomatskog poboljšanja u pojedinim bolesnika.

U pogledu slikovne analize, dGEMRIC metoda iako predstavlja suvremeni i osjetljiv biomarker, ima svoja metodološka ograničenja. Prvo, segmentaciju ROI-eva provodio je jedan iskusni mišićno-skeletni radiolog, što povećava internu dosljednost i standardizira pozicioniranje ROI-eva, ali ne dopušta procjenu varijabilnosti među ispitivačima te smanjuje ponovljivost metode. Drugo, dGEMRIC analiza obavlja se na većim anatomskim regijama interesa (npr. medijalni kondil femura), što ne omogućuje detekciju subregionalnih promjena u hrskavici koje se mogu pojavljivati asimetrično unutar istog kondila ili unutar specifičnih zona opterećenja. Treće, dGEMRIC

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

kvantificira isključivo sadržaj GAG-a, ali ne daje informacije o integritetu kolagenske mreže, sadržaju vode ili biomehaničkim svojstvima hrskavice, zbog čega se ne može donijeti sveobuhvatan zaključak o svim komponentama hrskavičnog matriksa.

Ograničenja su prisutna i u segmentu biokemijskih analiza. U dijelu ispitanika nije bilo moguće aspirirati sinovijalnu tekućinu, što je rezultiralo malim brojem parnih uzoraka tj. uzoraka u dvije vremenske točke, a time i smanjenom statističkom snagom kod analize citokina i kemokina u sinovijalnoj tekućini. Također, višestruka analiza citokina korištenjem Bio-Rad Bioplex kitova za multiplex ELISA-u ima intrinzična tehnička ograničenja, uključujući varijabilnost u postotku analita unutar mjernog raspona, kao i činjenicu da su određeni citokini bili ispod detekcijskog praga, što smanjuje mogućnost pouzdane interpretacije pojedinačnih analita (254). Usprkos tome, ovakva široka analiza citokina i kemokina predstavlja jedinstven translacijski uvid, ali rezultati zahtijevaju potvrdu u većim studijama.

Važno je istaknuti i ograničenja vezana uz protočnu citometriju MFAT. Iako je analiza provedena rigorozno i na dva uređaja usporedivih performansi, sve analize odradio je jedan ispitivač, čime je maksimizirana interna konzistentnost, ali nije bilo moguće procijeniti međuispitivačku reproducibilnost. MFAT, kao autologni biološki pripravak, podložan je utjecajima donorske varijabilnosti poput individualne biologije tkiva i stupnja lokalne mikroinflamacije, što može utjecati na kvantifikaciju staničnih subpopulacija poput pericita, supraadventicijskih stromalnih stanica i endotelnih progenitora, ali i biokemijski (255). Iako su provedene korelacijske analize između staničnih subpopulacija i *responder* statusa (KOOS Bol, dGEMRIC), one nisu identificirale statistički značajne odnose, što može biti posljedica ograničene veličine uzorka.

Naposljetku, trajanje praćenja od šest mjeseci, iako metodološki opravdano radi ispravne usporedbe učinaka MFAT i HA, ne omogućuje procjenu dugoročnih strukturnih ishoda ni mogućeg djelovanja MFAT na progresiju bolesti. Postoje dokazi da se učinci MFAT mogu zadržati i dvije godine nakon aplikacije, dok učinak HA često opada nakon 6–9 mjeseci pa će dugoročne studije biti nužne za konačnu procjenu potencijalnog učinka MFAT na modifikaciju bolesti (72, 94).

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

Sveukupno, iako ova ograničenja zahtijevaju opreznu interpretaciju, ona su uobičajena za ranu fazu translacijskih bioloških istraživanja i ne umanjuju vrijednost ključnih nalaza, već pružaju smjernice za dizajn budućih, većih i sveobuhvatnijih studija.

## **6.9. Znanstveni doprinos i implikacije za buduća istraživanja**

Ovo randomizirano kontrolirano istraživanje predstavlja prvu sustavnu usporedbu MFAT i HA u fenotipski precizno definiranoj skupini bolesnika s ranim do umjerenim upalnim fenotipom OA koljena. Primjenom fenotipski vođenog uključivanja, multimodalnog dizajna i integracije kliničkih, slikovnih, biokemijskih i staničnih analiza, ovo istraživanje daje važan doprinos razumijevanju načina na koji ortobiološke terapije djeluju u jasno definiranoj podskupini OA koljena. Naši podaci pokazuju da u bolesnika s izraženim izljevom i ukočenošću, karakterističnima za upalni fenotip OA koljena, smanjenje simptoma nakon aplikacije MFAT može biti veće nego s HA, što podupire koncept personaliziranog odabira intraartikularne terapije. U populacijama s aktivnom sinovijalnom upalom, u kojima HA ima ograničeno i kratkotrajno djelovanje, MFAT bi mogao ponuditi dugotrajniju modulaciju simptoma i promjenu mikrookoliša samog zgloba, što je u skladu s ciljem da se terapija prilagodi biološkom profilu pojedinog bolesnika, a ne isključivo radiološkoj ili kliničkoj slici. Takvi fenotipski vođeni pristupi mogu poboljšati učinkovitost liječenja i smanjiti nepotrebne intervencije.

Ovo istraživanje također uvodi nekoliko važnih metodoloških doprinosa. Definiranje dGEMRIC *respondera* putem praga od  $\geq 10\%$  poboljšanja u  $\geq 3$  od 7 regija hrskavice koljena predstavlja prvi pokušaj formaliziranja kvantitativnog kriterija za rani strukturni odgovor na terapiju temeljenog na nalazima magnetske rezonance. Premda ovaj prag zahtijeva daljnju validaciju, on pruža ponovljivu, objektivnu i biološki smislenu metodu za klasifikaciju pojedinačnih bolesnika, čime se omogućuje translacija između slikovne i kliničke dimenzije bolesti. Nalazi o korelaciji dGEMRIC *respondera* i KOOS Bol *respondera* sugeriraju da bi dGEMRIC mogao služiti kao rani biomarker terapijskog učinka te potencijalno služiti kao dodatak u donošenju odluka o daljnjem tijeku terapije, što je u skladu s konceptima moderne personalizirane medicine. Ovo istraživanje tako postavlja temelje za buduća istraživanja u kojima će dGEMRIC ili slični kvantitativni biomarkeri magnetske rezonance biti integrirani u evaluacijske i prediktivne modele u OA.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

Značajan doprinos proizlazi i iz uvođenja opsežne biokemijske analize. Paralelnim mjerenjem citokina i kemokina u plazmi, sinovijalnoj tekućini i MFAT, studija omogućuje identificiranje potencijalnih ranih bioloških signala terapijskog odgovora. Iako većina promjena nije bila statistički značajna nakon korekcije za višestruka testiranja, prikupljeni podaci čine jedinstven spektar biomolekularnih profila koji se u kombinaciji s kliničkim i slikovnim ishodima mogu koristiti za razvoj prediktivnih modela. Nadalje, analiza fenilalanina kao sistemskog metaboličkog pokazatelja dodatno doprinosi težnji za identifikacijom biomarkera s potencijalom za stratifikaciju bolesnika. Veća istraživanja s više ispitanika te nalaženje razlika u biokemijskom profilu između različitih fenotipova OA koljena u budućnosti bi mogla dovesti do pronalaska konkretnih biomarkera u dijagnostici i progresiji OA, predikciji kliničkog odgovora, ali i dopuniti postojeće fenotipske klasifikacije OA koljena.

Još jedan važan znanstveni doprinos proizlazi iz detaljne stanične karakterizacije MFAT pomoću protočne citometrije. Ovim pristupom po prvi put je u sklopu randomiziranog kliničkog istraživanja kvantificiran fenotip ključnih staničnih subpopulacija MFAT, uključujući pericite, supraadventicijske stromalne stanice i endotelne progenitore. Takva analiza postavlja temelje za buduća istraživanja u kojima će se pokušati povezati stanični sastav MFAT s terapijskim odgovorom te identificirati potencijalne prediktivne stanične markere. Premda u ovoj studiji korelacijske analize nisu otkrile statistički značajne odnose između pojedinih subpopulacija i kliničkog odgovora, generirani podaci čine referentnu točku za planiranje većih i fenotipski specifičnih istraživanja. U budućnosti bi ovakva analiza mogla omogućiti standardizaciju MFAT pripravaka u smislu određivanja optimalnog ukupnog broja stanica te omjera pojedinačnih stanica za postizanje klinički značajnog odgovora.

Institucionalno, rad demonstrira kako multimodalni pristup s integracijom kliničkih, strukturnih, biokemijskih i staničnih podataka može stvoriti potpuniju sliku patofiziologije OA i terapijskog odgovora. Ovakav dizajn predstavlja model za buduću studiju u OA i drugim muskuloskeletnim bolestima. S obzirom na multidimenzionalnost prikupljenih podataka, ovo istraživanje postavlja temelje za razvoj složenijih prediktivnih modela, uključujući analize temeljene na strojnome učenju, koje bi mogle identificirati obrasce odgovora i pomoći u personalizaciji liječenja na razini pojedinca. Takvi modeli mogli bi integrirati predterapijske kliničke karakteristike, kvantitativne

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. RASPRAVA**

radiološke pokazatelje, biokemijski profil ispitanika i specifične stanične profile MFAT kako bi se unaprijed predvidjelo tko će najviše imati koristi od određene biološke terapije.

S translacijskog stajališta, nalazi imaju implikacije i za zdravstvenu ekonomiku. Iako MFAT ima veći inicijalni trošak od HA, njegova snažna protuupalna svojstva i dugotrajniji učinci mogli bi opravdati uporabu u specifičnim populacijama bolesnika. Potrebne su studije isplativosti kako bi se ispitalo kompenziraju li buduća smanjenja potrošnje zdravstvenih usluga, potreba za analgeticima ili stope konverzije konzervativnog u operacijsko liječenje početni trošak MFAT terapije. Takve su analize ključne prije široke kliničke primjene. Modeliranje isplativosti, koje uzima u obzir ne samo direktne troškove nego i vrijednost odgode operacije, smanjenja potrošnje lijekova, bit će potrebno za punu definiciju zdravstveno-ekonomskog profila MFAT.

Konačno, nalazi ovog istraživanja upućuju na potrebu proširenja istraživanja na uznapredovale stadije OA koljena, uključujući 3.-4. stupanj OA prema Kellgren-Lawrence radiološkoj klasifikaciji, uz paralelnu primjenu osjetljivih slikovnih i biokemijskih biomarkera. Moguće je da pojedini strukturni ili biološki *responderi* postoje i u kasnijim fazama bolesti te bi ih trebalo identificirati kroz dulja praćenja. Integriranjem fenotipske stratifikacije, kvantitativnih slikovnih tehnika i detaljnih bioloških analiza, buduća istraživanja mogla bi omogućiti dublje razumijevanje patofiziologije OA te razvoj precizno vođenih terapijskih algoritama s većom učinkovitošću i manjim rizikom od nepotrebnih intervencija.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. ZAKLJUČAK**

## **7. ZAKLJUČAK**

Ovo randomizirano kontrolirano istraživanje pokazuje da intraartikularna primjena MFAT i HA može rezultirati klinički i strukturno smislenim poboljšanjima u bolesnika s ranim do umjerenim upalnim fenotipom OA koljena. U obje terapijske skupine zabilježeno je povećanje dGEMRIC indeksa, što ukazuje na porast sadržaja GAG i povoljnu biokemijsku modulaciju hrskavice unutar šest mjeseci nakon primjene. Ipak, MFAT je dosljedno pokazivao izraženiji učinak na simptome OA, osobito u domenama ukočenosti, izljeva i mehaničkih simptoma obuhvaćenih u KOOS Simptomi podskali, što je u skladu s njegovim protuupalnim svojstvima i mogućom modulacijom zglobnog mikrookoliša.

Važan nalaz ovog istraživanja jest podudarnost povećanja dGEMRIC indeksa i kliničkog smanjenja boli prema KOOS Bol skali, čime se potvrđuje dGEMRIC kao osjetljiv, klinički relevantan i biološki utemeljen slikovni biomarker. Sukladnost između biokemijskog oporavka hrskavičnog matriksa i subjektivnih simptoma podupire hipotezu da strukturne promjene, iako rane, mogu reflektirati terapijski odgovor te imati prognostičku vrijednost za dugoročne ishode. Ovakav nalaz naglašava ulogu naprednog oslikavanja magnetskom rezonancom kao ključnog alata u evaluaciji bioloških terapija i potencijalnih učinaka na modifikaciju bolesti.

Dodatnu translacijsku vrijednost daje multimodalna analiza biokemijskih i staničnih biomarkera. Značajne promjene koncentracija citokina i kemokina u krvnoj plazmi poput promjena koncentracija MCP-1, ICAM-1, leptina, TIMP-1 nakon 1 mjeseca te promjene koncentracija MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  i TIMP-1 nakon 6 mjeseci od intraartikularne aplikacije MFAT, unatoč korekcije zbog višestrukog testiranja, sugeriraju da poboljšanje simptoma i lokalna promjena zglobnog mikrookoliša može biti praćena i ranim sistemskim biokemijskim odgovorom. Unatoč značajno manjem uzorku u HA skupini, statistički značajan porast TIMP-2 u plazmi nakon 6 mjeseci ukazuje na potencijalni biološki učinak i drugačiji terapijski mehanizam HA. Iako su promjene citokina i kemokina u sinovijalnoj tekućini bile skromne i nisu dosegle statističku značajnost zbog malog uzorka te nakon korekcije za višestruka testiranja, zabilježeni trendovi upućuju na ranu biološku dinamiku unutar zgloba nakon intervencije koju je potrebno dodatno istražiti na većem uzorku. Porast koncentracija

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. ZAKLJUČAK**

fenilalanina u krvnoj plazmi u obje skupine sugerira kompleksniju ulogu fenilalanina u patofiziologiji OA koju je potrebno dodatno istražiti.

Analiza biokemijskog profila samog MFAT potvrdila je postojanje širokog spektra parakrinih čimbenika, dok je protočna citometrija otkrila heterogenu populaciju živih endotelinih progenitora, pericita i supraadventicijskih stromalnih stanica, čime je stvoren temelj za buduća istraživanja i potencijalnu standardizaciju MFAT priprema za širu i prihvaćeniju primjenu.

Nalazi ovog istraživanja pridonose rastućem broju dokaza koji podupiru uporabu ortobioloških terapija u ranoj fazi OA te ističu važnost integracije fenotipskih, slikovnih i biokemijskih alata u procjeni njihova učinka. Iako su i MFAT i HA pokazali povoljan sigurnosni profil te kliničku korisnost, MFAT se nameće kao potencijalno superiorna opcija za bolesnike s upalnim fenotipom OA koljena zbog dominantnijeg učinka na simptome poput ukočenosti i izljeva. Ipak, za donošenje konačnih zaključaka o potencijalu MFAT za modifikaciju bolesti, kao i o njegovim dugoročnim prednostima u odnosu na HA, potrebna su buduća multicentrična istraživanja s većim uzorkom, duljim praćenjem i uključivanjem dodatnih slikovnih i biokemijskih biomarkera.

U konačnici, ovo istraživanje pokazuje da kombinacija fenotipski vođenog dizajna, kvantitativne analize magnetske rezonance, sveobuhvatnih biokemijskih analiza i stanične karakterizacije MFAT može pružiti dublje razumijevanje biološkog odgovora na terapiju kod bolesnika s upalnim fenotipom OA koljena. Takav multimodalni okvir ima potencijal voditi razvoju preciznih, personaliziranih terapijskih algoritama te predstavlja važan korak prema individualiziranom liječenju OA koljena.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. SAŽETAK**

## **8. SAŽETAK**

**Cilj istraživanja:** Cilj istraživanja bio je usporediti kliničke, radiološke i biokemijske učinke intraartikularne aplikacije autolognog mikrofragmentiranog masnog tkiva (MFAT) i hijaluronske kiseline (HA) u bolesnika s upalnim fenotipom osteoartritisa (OA) koljena, uključujući analizu citokina i kemokina te protočnu citometriju MFAT.

**Nacrt studije:** Provedeno je randomizirano dvostruko slijepo kliničko istraživanje s procjenama prije te 1 i 6 mjeseci nakon intervencije (ISRCTN88966184). Svi ispitanici su podvrgnuti lipoaspiraciji radi maskiranja.

**Materijal i metode:** Uključena su 53 ispitanika randomizirana u MFAT (n = 35) ili HA (n = 18) skupinu i praćena šest mjeseci. Klinički ishodi procijenjeni su pomoću KOOS, WOMAC i VAS upitnika, a strukturne promjene dGEMRIC i MOAKS analizom. Strukturni odgovor definiran je porastom dGEMRIC-a  $\geq 10\%$  u  $\geq 3$  regije. Citokini i kemokini analizirani su u plazmi, sinovijalnoj tekućini i MFAT. MFAT je analiziran i protočnom citometrijom, a u plazmi je mjeran fenilalanin.

**Rezultati:** I MFAT i HA doveli su do statistički značajnog kliničkog poboljšanja i povećanja dGEMRIC indeksa. MFAT je pokazao veća prosječna poboljšanja u većini kliničkih skorova i dGEMRIC pokazatelja u odnosu na HA, ali bez postizanja statistički značajne razlike, osim u KOOS Simptomi skor nakon 6 mjeseci od terapije. Analiza na razini *respondera* pokazala je da su svi ispitanici koji su ostvarili strukturni odgovor prema dGEMRIC-u istodobno postigli i klinički značajno smanjenje boli ( $\Delta$ KOOS Bol  $\geq 10$ ), dok nijedan ispitanik nije zabilježio strukturni napredak bez paralelnog simptomatskog poboljšanja. MOAKS analiza pokazala je značajno smanjenje MOAKS sinovitis/izljev skora u obje skupine, bez promjena u drugim podjedinicama. U plazmi su zabilježene značajne unutargrupne promjene više citokina, uključujući MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , ICAM-1, leptin i TIMP-1 u MFAT skupini te TIMP-2 u HA skupini, bez statističkih razlika među skupinama. U sinovijalnoj tekućini uočen je trend reparativne i antiinflamatorne aktivnosti bez statističke značajnosti. Koncentracije fenilalanina u plazmi porasle su u obje skupine. MFAT je pokazao heterogenu staničnu populaciju s očuvanom vijabilnošću i povoljnim protuupalnim biokemijskim profilom.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. SAŽETAK**

**Zaključak:** Aplikacije MFAT i HA dovele su do klinički značajnih poboljšanja u bolesnika s upalnim fenotipom OA koljena. MFAT je pokazao izraženiji simptomatski učinak, pogotovo u smislu ukočenosti, izljeva i krepitacija, uz usporedive radiološke i biokemijske ishode. Rezultati potvrđuju sigurnost i potencijal MFAT-a u ranoj do umjerenoj fazi bolesti. Daljnja istraživanja trebaju uključiti fenotipsku stratifikaciju, napredne tehnike oslikavanja i proširene biokemijske analize radi preciznijeg razumijevanja mehanizama i razvoja personaliziranih terapijskih pristupa.

**Ključne riječi:** citokini; hijaluronska kiselina; koljeno; injekcije, intraartikularne; masno tkivo; mezenhimne matične stanice; osteoartritis

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. SUMMARY**

## **9. SUMMARY**

### **Comparison of Autologous Microfragmented Adipose Tissue Containing Mesenchymal Stem Cells and Hyaluronic Acid in the Treatment of Knee Osteoarthritis**

**Objectives:** The aim of this study was to compare the clinical, radiological, and biochemical effects of intraarticular application of autologous microfragmented adipose tissue (MFAT) and hyaluronic acid (HA) in patients with an inflammatory phenotype of knee osteoarthritis (OA), including analysis of cytokines and chemokines in plasma, synovial fluid, and MFAT, as well as flow cytometric characterization of MFAT.

**Study Design:** A randomized, double-blind clinical trial was conducted with assessments performed at baseline, 1 month, and 6 months after intervention (ISRCTN88966184). All participants underwent lipoaspiration to maintain blinding.

**Material and Methods:** A total of 53 participants were randomized to receive MFAT (n = 35) or HA (n = 18) and were followed for six months. Clinical outcomes were assessed using the KOOS, WOMAC, and VAS questionnaires, while structural changes were evaluated using the dGEMRIC technique and MOAKS scoring. Structural response was defined as a  $\geq 10\%$  increase in dGEMRIC indices in  $\geq 3$  of 7 predefined regions. Cytokines and chemokines were analyzed in plasma, synovial fluid, and MFAT samples. MFAT was further characterized by flow cytometry, and plasma phenylalanine levels were measured.

**Results:** Both MFAT and HA resulted in statistically significant clinical improvement and increased dGEMRIC indices. MFAT demonstrated greater mean improvements in most clinical scores and dGEMRIC parameters compared to HA, although without statistical significance except in the KOOS Symptoms domain at six months. Responder analysis showed that all participants who achieved a structural response also reported clinically meaningful pain reduction ( $\Delta$ KOOS Pain  $\geq 10$ ), and no patient exhibited structural improvement without parallel symptomatic benefit. MOAKS analysis demonstrated a significant reduction in the synovitis/effusion subscore in both groups, with no relevant changes in other domains. Significant within-group changes

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. SUMMARY**

in multiple plasma cytokines were observed, including MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , ICAM-1, leptin, and TIMP-1 in the MFAT group, and TIMP-2 in the HA group, without significant differences between the groups. In synovial fluid, trends reflecting reparative and anti-inflammatory activity were observed without statistical significance. Plasma phenylalanine levels increased in both treatment groups. MFAT exhibited a heterogeneous cellular composition dominated by endothelial progenitor cells, with preserved viability and a favourable anti-inflammatory biochemical profile.

**Conclusion:** Both MFAT and HA produced clinically meaningful improvements in patients with the inflammatory phenotype of knee OA. MFAT demonstrated a more pronounced symptomatic effect especially in terms of joint stiffness, swelling, and crepitus, while radiological and biochemical outcomes were comparable between treatments. The findings support the safety and therapeutic potential of MFAT in early to moderate inflammatory OA. Future research should incorporate phenotypic stratification, advanced MRI techniques, and expanded biochemical profiling to improve understanding of underlying mechanisms and advance the development of personalized therapeutic strategies for knee OA.

**Keywords:** Adipose Tissue; Cytokines; Hyaluronic Acid; Injections, Intra-Articular; Knee Joint; Mesenchymal Stem Cells; Osteoarthritis

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

## **10. LITERATURA**

1. Nelson AE. Osteoarthritis year in review 2017: clinical. *Osteoarthritis Cartilage* 2018;26:319–25.
2. Allen KD, Thoma LM, Golightly YM. Epidemiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2022;30:184–95.
3. Long H, Liu Q, Yin H, Wang K, Diao N, Zhang Y, et al. Prevalence Trends of Site-Specific Osteoarthritis From 1990 to 2019: Findings From the Global Burden of Disease Study 2019. *Arthritis & Rheumatology* 2022;74:1172–83.
4. Duong V, Oo WM, Ding C, Culvenor AG, Hunter DJ. Evaluation and Treatment of Knee Pain: A Review. *JAMA* 2023;330:1568–80.
5. GBD 2021 Osteoarthritis Collaborators. Global, regional, and national burden of osteoarthritis, 1990-2020 and projections to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Rheumatol* 2023;5:e508–22.
6. Shichman I, Roof M, Askew N, Nherera L, Rozell JC, Seyler TM, et al. Projections and Epidemiology of Primary Hip and Knee Arthroplasty in Medicare Patients to 2040-2060. *JB JS Open Access* 2023;8:e22.00112.
7. Li E, Tan J, Xu K, Pan Y, Xu P. Global burden and socioeconomic impact of knee osteoarthritis: a comprehensive analysis. *Front Med (Lausanne)* 2024;11:1323091.
8. Puig-Junoy J, Ruiz Zamora A. Socio-economic costs of osteoarthritis: a systematic review of cost-of-illness studies. *Semin Arthritis Rheum* 2015;44:531–41.
9. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 2012;64:1697–707.
10. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, Goldring MB, et al. Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16072.
11. Goldring SR, Goldring MB. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage–bone crosstalk. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:632–44.
12. Primorac D, Molnar V, Rod E, Jeleč Ž, Čukelj F, Matišić V, et al. Knee Osteoarthritis: A Review of Pathogenesis and State-Of-The-Art Non-Operative Therapeutic Considerations. *Genes* 2020;11:854.
13. Goldring SR. Role of Bone in Osteoarthritis Pathogenesis. *Med Clin North Am* 2009;93:25–35.
14. Burr DB, Gallant MA. Bone remodelling in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:665–73.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

15. Bowes MA, McLure SW, Wolstenholme CB, Vincent GR, Williams S, Grainger A, et al. Osteoarthritic bone marrow lesions almost exclusively collocate with denuded cartilage: a 3D study using data from the Osteoarthritis Initiative. *Ann Rheum Dis* 2016;75:1852–7.
16. Sanchez-Lopez E, Coras R, Torres A, Lane NE, Guma M. Synovial inflammation in osteoarthritis progression. *Nat Rev Rheumatol* 2022;18:258–75.
17. Zou Z, Li H, Yu K, Ma K, Wang Q, Tang J, et al. The potential role of synovial cells in the progression and treatment of osteoarthritis. *Exploration* 2023;3:20220132.
18. Atukorala I, Kwok CK, Guermazi A, Roemer FW, Boudreau RM, Hannon MJ, et al. Synovitis in knee osteoarthritis: a precursor of disease? *Ann Rheum Dis* 2016;75:390–5.
19. Eymard F, Chevalier X. Inflammation of the infrapatellar fat pad. *Joint Bone Spine* 2016;83:389–93.
20. Peters AE, Geraghty B, Bates KT, Akhtar R, Readioff R, Comerford E. Ligament mechanics of ageing and osteoarthritic human knees. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022;10.
21. Dell’Isola A, Steultjens M. Classification of patients with knee osteoarthritis in clinical phenotypes: Data from the Osteoarthritis Initiative. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2018;13:e0191045.
22. Dell’Isola A, Allan R, Smith SL, Marreiros SSP, Steultjens M. Identification of clinical phenotypes in knee osteoarthritis: a systematic review of the literature. *BMC Musculoskelet Disord* 2016;17:425.
23. van der Esch M, Knoop J, van der Leeden M, Roorda LD, Lems WF, Knol DL, et al. Clinical phenotypes in patients with knee osteoarthritis: a study in the Amsterdam osteoarthritis cohort. *Osteoarthritis Cartilage* 2015;23:544–9.
24. Van Spil WE, Kubassova O, Boesen M, Bay-Jensen AC, Mobasher A. Osteoarthritis phenotypes and novel therapeutic targets. *Biochem Pharmacol* 2019;165:41–8.
25. Sawitzke AD. Personalized medicine for osteoarthritis: where are we now? *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2013;5:67–75.
26. Karsdal MA, Christiansen C, Ladel C, Henriksen K, Kraus VB, Bay-Jensen AC. Osteoarthritis--a case for personalized health care? *Osteoarthritis Cartilage* 2014;22:7–16.
27. Deveza LA, Nelson AE, Loeser RF. Phenotypes of osteoarthritis: current state and future implications. *Clin Exp Rheumatol* 2019;37 Suppl 120:64–72.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

28. Cao Y, Tang S, Ding C. Inflammatory phenotype of osteoarthritis and its potential therapies. *Rheumatology & Autoimmunity* 2021;1:92–100.
29. Hunter DJ, Guermazi A, Lo GH, Grainger AJ, Conaghan PG, Boudreau RM, et al. Evolution of semi-quantitative whole joint assessment of knee OA: MOAKS (MRI Osteoarthritis Knee Score). *Osteoarthritis Cartilage* 2011;19:990–1002.
30. Roemer FW, Jarraya M, Collins JE, Kwok CK, Hayashi D, Hunter DJ, et al. Structural phenotypes of knee osteoarthritis: potential clinical and research relevance. *Skeletal Radiol* 2023;52:2021–30.
31. Rahmati M, Mobasheri A, Mozafari M. Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the-art, current prospects, and future challenges. *Bone* 2016;85:81–90.
32. Zhu R, Fang H, Wang J, Ge L, Zhang X, Aitken D, et al. Inflammation as a therapeutic target for osteoarthritis: A literature review of clinical trials. *Clin Rheumatol* 2024;43:2417–33.
33. Messier SP, Beavers DP, Queen K, Mihalko SL, Miller GD, Losina E, et al. Effect of Diet and Exercise on Knee Pain in Patients With Osteoarthritis and Overweight or Obesity: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2022;328:2242–51.
34. Mo L, Jiang B, Mei T, Zhou D. Exercise Therapy for Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *Orthop J Sports Med* 2023;11:23259671231172773.
35. DeRogatis M, Anis HK, Sodhi N, Ehiorobo JO, Chughtai M, Bhave A, et al. Non-operative treatment options for knee osteoarthritis. *Ann Transl Med* 2019;7:S245.
36. Costa BR da, Pereira TV, Saadat P, Rudnicki M, Iskander SM, Bodmer NS, et al. Effectiveness and safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs and opioid treatment for knee and hip osteoarthritis: network meta-analysis. 2021;
37. Uebelhart D. Clinical review of chondroitin sulfate in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2008;16:S19–21.
38. Meng Z, Liu J, Zhou N. Efficacy and safety of the combination of glucosamine and chondroitin for knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Arch Orthop Trauma Surg* 2023;143:409–21.
39. Shichman I, Askew N, Habibi A, Nherera L, Macaulay W, Seyler T, et al. Projections and Epidemiology of Revision Hip and Knee Arthroplasty in the United States to 2040-2060. *Arthroplast Today* 2023;21:101152.
40. Mahmoudian A, Lohmander LS, Mobasheri A, Englund M, Luyten FP. Early-stage symptomatic osteoarthritis of the knee - time for action. *Nat Rev Rheumatol* 2021;17:621–32.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

41. Primorac D, Molnar V, Matišić V, Hudetz D, Jeleč Ž, Rod E, et al. Comprehensive Review of Knee Osteoarthritis Pharmacological Treatment and the Latest Professional Societies' Guidelines. *Pharmaceuticals* 2021;14:205.
42. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 2011;20:5–14.
43. Robert AW, Marcon BH, Dallagiovanna B, Shigunov P. Adipogenesis, Osteogenesis, and Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells: A Comparative Transcriptome Approach. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020;8.
44. Kim EH, Jeon S, Park J, Ryu JH, Mobasheri A, Matta C, et al. Progressing future osteoarthritis treatment toward precision medicine: integrating regenerative medicine, gene therapy and circadian biology. *Exp Mol Med* 2025;57:1133–42.
45. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–7.
46. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med* 2017;6:1445–51.
47. Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regen Med* 2019;4:22.
48. Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. *Front. Immunol.* 2019;10.
49. Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 2012;12:383–96.
50. Wang J, Zhou L, Zhang Y, Huang L, Shi Q. Mesenchymal stem cells - a promising strategy for treating knee osteoarthritis. *Bone Joint Res* 2020;9:719–28.
51. Molnar V, Pavelić E, Vrdoljak K, Čemerin M, Klarić E, Matišić V, et al. Mesenchymal Stem Cell Mechanisms of Action and Clinical Effects in Osteoarthritis: A Narrative Review. *Genes (Basel)* 2022;13:949.
52. Hofer HR, Tuan RS. Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. *Stem Cell Research & Therapy* 2016;7:131.
53. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211–28.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

54. Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007;25:818–27.
55. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003;174:101–9.
56. Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE, Roelofs H. Adipose Tissue-Derived Multipotent Stromal Cells Have a Higher Immunomodulatory Capacity Than Their Bone Marrow-Derived Counterparts. *Stem Cells Transl Med* 2013;2:455–63.
57. Kim KI, Kim MS, Kim JH. Intra-articular Injection of Autologous Adipose-Derived Stem Cells or Stromal Vascular Fractions: Are They Effective for Patients With Knee Osteoarthritis? A Systematic Review With Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Am J Sports Med* 2023;51:837–48.
58. Yang Y, Lan Z, Yan J, Tang Z, Zhou L, Jin D, et al. Effect of intra-knee injection of autologous adipose stem cells or mesenchymal vascular components on short-term outcomes in patients with knee osteoarthritis: an updated meta-analysis of randomized controlled trials. *Arthritis Res Ther* 2023;25:147.
59. Shoukrie SI, Venugopal S, Dhanoa RK, Selvaraj R, Selvamani TY, Zahra A, et al. Safety and Efficacy of Injecting Mesenchymal Stem Cells Into a Human Knee Joint To Treat Osteoarthritis: A Systematic Review. *Cureus* 2022;14:e24823.
60. Sensebé L, Gadelorge M, Fleury-Cappellesso S. Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review. *Stem Cell Res Ther* 2013;4:66.
61. Lysaght T, Kerridge IH, Sipp D, Porter G, Capps BJ. Ethical and Regulatory Challenges with Autologous Adult Stem Cells: A Comparative Review of International Regulations. *J Bioeth Inq* 2017;14:261–73.
62. Bianchi F, Maioli M, Leonardi E, Olivi E, Pasquinelli G, Valente S, et al. A new nonenzymatic method and device to obtain a fat tissue derivative highly enriched in pericyte-like elements by mild mechanical forces from human lipoaspirates. *Cell Transplant* 2013;22:2063–77.
63. Fu H, Wang C. Micro-fragmented adipose tissue—An innovative therapeutic approach: A narrative review. *Medicine (Baltimore)* 2025;104:e41724.
64. Schipper JAM, van Laarhoven CJHCM, Schepers RH, Tuin AJ, Harmsen MC, Spijkervet FKL, et al. Mechanical Fractionation of Adipose Tissue-A Scoping Review of Procedures to Obtain Stromal Vascular Fraction. *Bioengineering (Basel)* 2023;10:1175.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

65. Tremolada C, Ricordi C, Caplan AI, Ventura C. Mesenchymal Stem Cells in Lipogems, a Reverse Story: from Clinical Practice to Basic Science. *Methods Mol Biol* 2016;1416:109–22.
66. Ragni E, Viganò M, Torretta E, Perucca Orfei C, Colombini A, Tremolada C, et al. Characterization of Microfragmented Adipose Tissue Architecture, Mesenchymal Stromal Cell Content and Release of Paracrine Mediators. *J Clin Med* 2022;11:2231.
67. Greenwood V, Clausen P, Matuska AM. Micro-fragmented adipose tissue cellular composition varies by processing device and analytical method. *Sci Rep* 2022;12:16107.
68. Polancec D, Zenic L, Hudetz D, Boric I, Jelec Z, Rod E, et al. Immunophenotyping of a Stromal Vascular Fraction from Microfragmented Lipoaspirate Used in Osteoarthritis Cartilage Treatment and Its Lipoaspirate Counterpart. *Genes (Basel)* 2019;10:474.
69. Zenić L, Polančec D, Hudetz D, Jeleč Z, Rod E, Vidović D, et al. Medicinal signaling cells niche in stromal vascular fraction from lipoaspirate and microfragmented counterpart. *Croat Med J* 2022;63:265–72.
70. Tremolada C, Colombo V, Ventura C. Adipose Tissue and Mesenchymal Stem Cells: State of the Art and Lipogems® Technology Development. *Curr Stem Cell Rep* 2016;2:304–12.
71. Hudetz D, Borić I, Rod E, Jeleč Ž, Kunovac B, Polašek O, et al. Early results of intra-articular micro-fragmented lipoaspirate treatment in patients with late stages knee osteoarthritis: a prospective study. *Croat Med J* 2019;60:227–36.
72. Borić I, Hudetz D, Rod E, Jeleč Ž, Vrdoljak T, Skelin A, et al. A 24-Month Follow-Up Study of the Effect of Intra-Articular Injection of Autologous Microfragmented Fat Tissue on Proteoglycan Synthesis in Patients with Knee Osteoarthritis. *Genes (Basel)* 2019;10:1051.
73. Molnar V, Pavelić E, Jeleč Ž, Brlek P, Matišić V, Borić I, et al. Results of Treating Mild to Moderate Knee Osteoarthritis with Autologous Conditioned Adipose Tissue and Leukocyte-Poor Platelet-Rich Plasma. *J Pers Med* 2022;13:47.
74. Hudetz D, Borić I, Rod E, Jeleč Ž, Radić A, Vrdoljak T, et al. The Effect of Intra-articular Injection of Autologous Microfragmented Fat Tissue on Proteoglycan Synthesis in Patients with Knee Osteoarthritis. *Genes* 2017;8:270.
75. Hu X, Zhang Z, Zhang W, Wang N, Lv S, Pan C, et al. Efficacy and safety of micro-fragmented adipose tissue combined with knee arthroscopy in the treatment of knee osteoarthritis: a systematic review. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 2025;20:646.
76. Onorato F, Rucci M, Alessio-Mazzola M, Bistolfi A, Castagnoli C, Formica M, et al. Autologous microfragmented adipose tissue treatment of knee osteoarthritis

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

- demonstrates effectiveness in 68% of patients at 4-year follow-up. *Arch Orthop Trauma Surg* 2024;144:3925–35.
77. Screpis D, Natali S, Farinelli L, Piovan G, Iacono V, de Girolamo L, et al. Autologous Microfragmented Adipose Tissue for the Treatment of Knee Osteoarthritis: Real-World Data at Two Years Follow-Up. *J Clin Med* 2022;11:1268.
  78. Hohmann E, Keough N, Frank RM, Rodeo SA. Microfragmented Adipose Tissue Has No Advantage Over Platelet-Rich Plasma and Bone Marrow Aspirate Injections for Symptomatic Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Sports Med* 2025;53:988–98.
  79. Hohmann E, Keough N, Frank RM, Rodeo S. Micro-Fragmented Adipose Tissue Demonstrates Comparable Clinical Efficacy to Other Orthobiologic Injections in Treating Symptomatic Knee Osteoarthritis: A Systematic Review of Level I to IV Clinical Studies. *Arthroscopy* 2025;41:418-441.e14.
  80. Gupta RC, Lall R, Srivastava A, Sinha A. Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. *Front. Vet. Sci.* 2019;6.
  81. Tamer TM. Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdiscip Toxicol* 2013;6:111–25.
  82. Moreland LW. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther* 2003;5:54.
  83. Altman R, Manjoo A, Fierlinger A, Niazi F, Nicholls M. The mechanism of action for hyaluronic acid treatment in the osteoarthritic knee: a systematic review. *BMC Musculoskelet Disord* 2015;16.
  84. Pontes-Quero GM, García-Fernández L, Aguilar MR, San Román J, Pérez Cano J, Vázquez-Lasa B. Active viscosupplements for osteoarthritis treatment. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2019;49:171–83.
  85. Safali S, Ertaş ES, Özdemir A, Catakli D. Evaluation of single and multiple hyaluronic acid injections at different concentrations with high molecular weight in the treatment of knee osteoarthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2024;25:164.
  86. Glinkowski WM, Tomaszewski W. Intra-Articular Hyaluronic Acid for Knee Osteoarthritis: A Systematic Umbrella Review. *JCM* 2025;14:1272.
  87. Sherman SL, Gudeman AS, Kelly JD, Dimeff RJ, Farr J. Mechanisms of Action of Intra-articular Hyaluronic Acid Injections for Knee Osteoarthritis: A Targeted Review of the Literature. *Am J Sports Med* 2025;53:2771–82.
  88. Caires R, Luis E, Taberner FJ, Fernandez-Ballester G, Ferrer-Montiel A, Balazs EA, et al. Hyaluronan modulates TRPV1 channel opening, reducing peripheral nociceptor activity and pain. *Nat Commun* 2015;6:8095.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

89. Zavan B, Ferroni L, Giorgi C, Calò G, Brun P, Cortivo R, et al. Hyaluronic acid induces activation of the  $\kappa$ -opioid receptor. *PLoS One* 2013;8:e55510.
90. Migliorini F, Maffulli N, Simeone F, Jeyaraman N, Ramasubramanian S, Jeyaraman M. Intra-articular Hyaluronic Acid Injections May Be Beneficial in Patients with Less Advanced Knee Osteoarthritis: A Systematic Review of Randomised Controlled Trials. *Sports Med* 2025;55:1953–69.
91. Honvo G, Reginster JY, Rannou F, Rygaert X, Geerinck A, Rabenda V, et al. Safety of Intra-articular Hyaluronic Acid Injections in Osteoarthritis: Outcomes of a Systematic Review and Meta-Analysis. *Drugs Aging* 2019;36:101–27.
92. Cao Y, Cai R, Han S, Li Z, Ma K, Zhou Z, et al. Quantitative analysis of the efficacy and associated factors of intra-articular hyaluronic acid with respect to osteoarthritis symptoms: A systematic review of randomized trials and model-based meta-analysis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2025;33:666–79.
93. Xing D, Wang B, Liu Q, Ke Y, Xu Y, Li Z, et al. Intra-articular Hyaluronic Acid in Treating Knee Osteoarthritis: a PRISMA-Compliant Systematic Review of Overlapping Meta-analysis. *Sci Rep* 2016;6:32790.
94. Bannuru RR, Natov NS, Dasi UR, Schmid CH, McAlindon TE. Therapeutic trajectory following intra-articular hyaluronic acid injection in knee osteoarthritis-meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 2011;19:611–9.
95. Bisicchia S, Tudisco C. Hyaluronic acid vs corticosteroids in symptomatic knee osteoarthritis: a mini-review of the literature. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2017;14:182–5.
96. Askari A, Gholami T, NaghiZadeh MM, Farjam M, Kouhpayeh SA, Shahabfard Z. Hyaluronic acid compared with corticosteroid injections for the treatment of osteoarthritis of the knee: a randomized control trail. *SpringerPlus* 2016;5:442.
97. Babu A, Channaveera C, Gupta A, Mittal MK, Johnson DS. Clinical and radiological efficacy of single-dose intra-articular high-molecular-weight hyaluronic acid in knee osteoarthritis. *J Family Med Prim Care* 2023;12:1692–6.
98. Miller LE, Bhattacharyya S, Parrish WR, Fredericson M, Bisson B, Altman RD. Safety of Intra-Articular Hyaluronic Acid for Knee Osteoarthritis: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials Involving More than 8,000 Patients. *Cartilage* 2021;13:351S-363S.
99. Hong Z, Chen J, Zhang S, et al. Intra-articular Injection of Autologous Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction for Knee Osteoarthritis: A Double-Blind Randomized Clinical Trial. *The American Journal of Sports Medicine* 2019;47:2820–30.
100. Brophy RH, Fillingham YA. AAOS Clinical Practice Guideline Summary: Management of Osteoarthritis of the Knee (Nonarthroplasty), Third Edition.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

JAAOS - Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons 2022;30:e721.

101. Bannuru RR, Osani MC, Vaysbrot EE, Arden NK, Bennell K, Bierma-Zeinstra SMA, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2019;27:1578–89.
102. Bruyère O, Honvo G, Veronese N, Arden NK, Branco J, Curtis EM, et al. An updated algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO). *Semin Arthritis Rheum* 2019;49:337–50.
103. Kolasinski SL, Neogi T, Hochberg MC, Oatis C, Guyatt G, Block J, et al. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2020;72:149–62.
104. Migliorini F, Maffulli N, Nijboer CH, Pappalardo G, Pasurka M, Betsch M, et al. Comparison of Different Molecular Weights of Intra-Articular Hyaluronic Acid Injections for Knee Osteoarthritis: A Level I Bayesian Network Meta-Analysis. *Biomedicines* 2025;13:175.
105. Ciapini G, Simonetti M, Giuntoli M, Varchetta G, De Franco S, Ipponi E, et al. Is the Combination of Platelet-Rich Plasma and Hyaluronic Acid the Best Injective Treatment for Grade II-III Knee Osteoarthritis? A Prospective Study. *Adv Orthop* 2023;2023:1868943.
106. Smith C, Patel R, Vannabouathong C, Sales B, Rabinovich A, McCormack R, et al. Combined intra-articular injection of corticosteroid and hyaluronic acid reduces pain compared to hyaluronic acid alone in the treatment of knee osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2019;27:1974–83.
107. Kim GB, Shon OJ. Current perspectives in stem cell therapies for osteoarthritis of the knee. *JYMS* 2020;37:149–58.
108. Shariatzadeh M, Song J, Wilson SL. The efficacy of different sources of mesenchymal stem cells for the treatment of knee osteoarthritis. *Cell Tissue Res* 2019;378:399–410.
109. Li J, Wu Z, Zhao L, Liu Y, Su Y, Gong X, et al. The heterogeneity of mesenchymal stem cells: an important issue to be addressed in cell therapy. *Stem Cell Research & Therapy* 2023;14:381.
110. Andia I, Maffulli N. Mesenchymal stromal cell products for intra-articular knee injections for conservative management of osteoarthritis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal* 2021;13:1759720X21996953.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

111. Mobasheri A, Thudium CS, Bay-Jensen AC, Maleitzke T, Geissler S, Duda GN, et al. Biomarkers for osteoarthritis: Current status and future prospects. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2023;37:101852.
112. Fuggle NR, Chapurlat R, Laslop A, Al-Daghri N, Alokail M, Thiyagarajan JA, et al. Novel approaches to the stratified management of knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2025;21:684–95.
113. Bijlsma JWJ, Berenbaum F, Lafeber FPJG. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet* 2011;377:2115–26.
114. Mobasheri A, Henrotin Y. Biomarkers of (osteo)arthritis. *Biomarkers* 2015;20:513–8.
115. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 2002;39:237–46.
116. Molnar V, Matišić V, Kodvanj I, Bjelica R, Jeleč Ž, Hudetz D, et al. Cytokines and Chemokines Involved in Osteoarthritis Pathogenesis. *Int J Mol Sci* 2021;22:9208.
117. Mathieu S, Kuhl L, Binivignat M, Conaghan PG, Eijkelkamp N, Henrotin Y, et al. The relationship between circulating and tissue biomarkers and OA-related pain: A systematic literature review. *Osteoarthritis and Cartilage Open* 2025;7:100684.
118. Yang CY, Chanalaris A, Troeberg L. ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis - looking beyond the „usual suspects.“ *Osteoarthritis Cartilage* 2017;25:1000–9.
119. Zhai G, Sun X, Randell E, Liu M, Wang N, Tolstykh I, et al. Phenylalanine is a novel marker for radiographic knee osteoarthritis progression: the MOST study. *J Rheumatol* 2021;48:123–8.
120. Jacques C, Gosset M, Berenbaum F, Gabay C. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. *Vitam Horm* 2006;74:371–403.
121. Miller RE, Miller RJ, Malfait AM. Osteoarthritis joint pain: the cytokine connection. *Cytokine* 2014;70:185–93.
122. Keystone EC, Snow KM, Bombardier C, Chang CH, Nelson DL, Rubin LA. Elevated soluble interleukin-2 receptor levels in the sera and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:844–9.
123. Zangerle PF, De Groote D, Lopez M, Meuleman RJ, Vrindts Y, Fauchet F, et al. Direct stimulation of cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2, IFN- $\gamma$  and GM-CSF) in whole blood: II. Application to rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Cytokine* 1992;4:568–75.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

124. Costantini S, Dolzani P, Panichi V, Borzi RM, Balaji P, Daglia M, et al. Inflaming and Immune-Resolving: The Ambivalent Role of Eosinophils in Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences* 2025;26.
125. Dean NJ, Clifton IJ, Salman R, Bridgwood C, Nam J, Macleod T, et al. Anti-IL-5 biologics and rheumatoid arthritis: a single-centre 500 patient year exposure analysis. *RMD Open* 2023;9:e003583.
126. Pope RM, Shahrara S. Possible roles of IL-12-family cytokines in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9:252–6.
127. Sakkas LI, Johanson NA, Scanzello CR, Platsoucas CD. Interleukin-12 Is Expressed by Infiltrating Macrophages and Synovial Lining Cells in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. *Cellular Immunology* 1998;188:105–10.
128. Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators Inflamm* 2014;2014:561459.
129. Yang CY, Chanalaris A, Bonelli S, McClurg O, Hiles GL, Cates AL, et al. Interleukin 13 (IL-13)-regulated expression of the chondroprotective metalloproteinase ADAM15 is reduced in aging cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage Open* 2020;2:100128.
130. Gilbert SJ, Blain EJ, Mason DJ. Interferon-gamma modulates articular chondrocyte and osteoblast metabolism through protein kinase R-independent and dependent mechanisms. *Biochem Biophys Res* 2022;32:101323.
131. Page CE, Smale S, Carty SM, Amos N, Lauder SN, Goodfellow RM, et al. Interferon- $\gamma$  inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced matrix metalloproteinase production by synovial fibroblasts and protects articular cartilage in early arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R49.
132. Kim JR, Hong BK, Pham THN, Kim WU, Kim HA. Interferon-gamma signaling promotes cartilage regeneration after injury. *Sci Rep* 2024;14:8046.
133. Fang J, Xu L, Li Y, Zhao Z. Roles of TGF-beta 1 signaling in the development of osteoarthritis. *Histol Histopathol* 2016;31:1161–7.
134. Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB. TGF- $\beta$  and osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2007;15:597–604.
135. Shen J, Li S, Chen D. TGF- $\beta$  signaling and the development of osteoarthritis. *Bone Res* 2014;2:14002.
136. Duan M, Wang Q, Liu Y, Xie J. The role of TGF- $\beta$ 2 in cartilage development and diseases. *Bone Joint Res* 2021;10:474–87.
137. Du X, Cai L, Xie J, Zhou X. The role of TGF-beta3 in cartilage development and osteoarthritis. *Bone Res* 2023;11:2.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

138. Mukherjee A, Das B. The role of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases (MMPs) in the progression of osteoarthritis. *Biomaterials and Biosystems* 2024;13:100090.
139. Knight BE, Kozlowski N, Havelin J, King T, Crocker SJ, Young EE, et al. TIMP-1 Attenuates the Development of Inflammatory Pain Through MMP-Dependent and Receptor-Mediated Cell Signaling Mechanisms. *Front. Mol. Neurosci.* 2019;12.
140. Mi M, Shi S, Li T, Holz J, Lee YJ, Sheu T jen, et al. TIMP2 deficient mice develop accelerated osteoarthritis via promotion of angiogenesis upon destabilization of the medial meniscus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012;423:366–72.
141. Lee HJ, Lee GH, Nah S, Lee KH, Yang H, Kim YM, et al. Association of TIMP-4 gene polymorphism with the risk of osteoarthritis in the Korean population. *Rheumatol Int* 2008;28:845–50.
142. Selim AM, Elsabagh YA, El-Sawalhi MM, Ismail NA, Senousy MA. Serum lncRNA ITGB2-AS1 and ICAM-1 as novel biomarkers for rheumatoid arthritis and osteoarthritis diagnosis. *BMC Medical Genomics* 2024;17:247.
143. Lavigne P, Benderdour M, Lajeunesse D, Shi Q, Fernandes JC. Expression of ICAM-1 by osteoblasts in healthy individuals and in patients suffering from osteoarthritis and osteoporosis. *Bone* 2004;35:463–70.
144. Chen WC, Lin CY, Kuo SJ, Liu SC, Lu YC, Chen YL, et al. Resistin Enhances VCAM-1 Expression and Monocyte Adhesion in Human Osteoarthritis Synovial Fibroblasts by Inhibiting MiR-381 Expression through the PKC, p38, and JNK Signaling Pathways. *Cells* 2020;9:1369.
145. Oppl B, Datz C, Huber-Schönauer U, Husar-Memmer E, Brozek W, Zenz P, et al. Vascular cell adhesion molecule 1 in patients with severe osteoarthritis of the hip. *Wien Klin Wochenschr* 2019;131:369–73.
146. Hamilton JL, Nagao M, Levine BR, Chen D, Olsen BR, Im HJ. Targeting VEGF and Its Receptors for the Treatment of Osteoarthritis and Associated Pain. *J Bone Miner Res* 2016;31:911–24.
147. Nagao M, Hamilton JL, Kc R, Berendsen AD, Duan X, Cheong CW, et al. Vascular Endothelial Growth Factor in Cartilage Development and Osteoarthritis. *Sci Rep* 2017;7:13027.
148. Liu Z, Xie W, Li H, Liu X, Lu Y, Lu B, et al. Novel perspectives on leptin in osteoarthritis: Focus on aging. *Genes & Diseases* 2024;11:101159.
149. Yan M, Zhang J, Yang H, Sun Y. The role of leptin in osteoarthritis. *Medicine (Baltimore)* 2018;97:e0257.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

150. Chen J, Shi S, Li X, Gao F, Zhu X, Feng R, et al. CCL7 promotes macrophage polarization and synovitis to exacerbate rheumatoid arthritis. *iScience* 2025;28:112177.
151. Lübbecke A. Research methodology for orthopaedic surgeons, with a focus on outcome. *EFORT Open Rev* 2018;3:160–7.
152. Herrera D, Almhdie-Imjabbar A, Toumi H, Lespessailles E. Magnetic resonance imaging-based biomarkers for knee osteoarthritis outcomes: A narrative review of prediction but not association studies. *European Journal of Radiology* 2024;181:111731.
153. Bekkers JEJ, Bartels LW, Benink RJ, Tsuchida AI, Vincken KL, Dhert WJA, et al. Delayed gadolinium enhanced MRI of cartilage (dGEMRIC) can be effectively applied for longitudinal cohort evaluation of articular cartilage regeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 2013;21:943–9.
154. Tjörnstrand J, Neuman P, Svensson J, Lundin B, Dahlberg LE, Tiderius CJ. Osteoarthritis development related to cartilage quality-the prognostic value of dGEMRIC after anterior cruciate ligament injury. *Osteoarthritis and Cartilage* 2019;27:1647–52.
155. Maheu E, Rannou F, Reginster JY. Efficacy and safety of hyaluronic acid in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2016;45:S28–33.
156. Marušić M, editor. *Uvod u znanstveni rad u medicini*. Zagreb: Medicinska Naklada; 2019.
157. Roos EM, Roos HP, Lohmander LS, Ekdahl C, Beynnon BD. Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS)--development of a self-administered outcome measure. *J Orthop Sports Phys Ther* 1998;28:88–96.
158. KOOS - Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score [Internet]. [cited 2025 Oct 7]; Available from: <https://koos.nu/>
159. Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt LW. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J Rheumatol* 1988;15:1833–40.
160. WOMAC - AUSCAN - Osteoarthritis Global Index [Internet]. [cited 2025 Oct 7]; Available from: <https://www.womac.com/>
161. Roos EM, Lohmander LS. The Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS): from joint injury to osteoarthritis. *Health Qual Life Outcomes* 2003;1:64.
162. Emara AK, Pasqualini I, Jin Y, Klika AK, Orr MN, Rullán PJ, et al. Diagnosis-Specific Thresholds of the Minimal Clinically Important Difference and Patient

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

- Acceptable Symptom State for KOOS After Total Knee Arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 2024;106:793–800.
163. Boffa A, Andriolo L, Franceschini M, Di Martino A, Asunis E, Grassi A, et al. Minimal Clinically Important Difference and Patient Acceptable Symptom State in Patients With Knee Osteoarthritis Treated With PRP Injection. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine* 2021;9:23259671211026242.
  164. Silva MDC, Perriman DM, Fearon AM, Couldrick JM, Scarvell JM. Minimal important change and difference for knee osteoarthritis outcome measurement tools after non-surgical interventions: a systematic review. *BMJ Open* 2023;13:e063026.
  165. Clement ND, Bardgett M, Weir D, Holland J, Gerrand C, Deehan DJ. What is the Minimum Clinically Important Difference for the WOMAC Index After TKA? *Clin Orthop Relat Res* 2018;476:2005–14.
  166. Escobar A, Quintana JM, Bilbao A, Aróstegui I, Lafuente I, Vidaurreta I. Responsiveness and clinically important differences for the WOMAC and SF-36 after total knee replacement. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:273–80.
  167. Danoff JR, Goel R, Sutton R, Maltenfort MG, Austin MS. How Much Pain Is Significant? Defining the Minimal Clinically Important Difference for the Visual Analog Scale for Pain After Total Joint Arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty* 2018;33:S71-S75.e2.
  168. Tiderius CJ, Hawezi ZK, Olsson LE, Dahlberg LE. Pre-contrast T1 and cartilage thickness as confounding factors in dGEMRIC when evaluating human cartilage adaptation to physical activity. *BMC Med Imaging* 2020;20.
  169. Davis AM, King LK, Stanaitis I, Hawker GA. Fundamentals of osteoarthritis: outcome evaluation with patient-reported measures and functional tests. *Osteoarthritis and Cartilage* 2022;30:775–85.
  170. Mathiessen A, Conaghan PG. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. *Arthritis Research & Therapy* 2017;19:18.
  171. Baria M, Barker T, Durgam S, Pedroza A, Flanigan D, Jia L, et al. Microfragmented Adipose Tissue Is Equivalent to Platelet-Rich Plasma for Knee Osteoarthritis at 12 Months Posttreatment: A Randomized Controlled Trial. *Orthop J Sports Med* 2024;12:23259671241233916.
  172. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell* 2011;9:11–5.
  173. Bloom DA, Kaplan DJ, Mojica E, Strauss EJ, Gonzalez-Lomas G, Campbell KA, et al. The Minimal Clinically Important Difference: A Review of Clinical Significance. *Am J Sports Med* 2023;51:520–4.
  174. Harris JD, Brand JC, Cote M, Waterman B, Dhawan A. Guidelines for Proper Reporting of Clinical Significance, Including Minimal Clinically Important

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

- Difference, Patient Acceptable Symptomatic State, Substantial Clinical Benefit, and Maximal Outcome Improvement. *Arthroscopy* 2023;39:145–50.
175. Migliorini F, Maffulli N, Schäfer L, Simeone F, Bell A, Hofmann UK. Minimal clinically important difference (MCID), substantial clinical benefit (SCB), and patient-acceptable symptom state (PASS) in patients who have undergone total knee arthroplasty: a systematic review. *Knee Surgery & Related Research* 2024;36:3.
  176. Barfod KW, Blønd L, Mikkelsen RK, Bagge J, Hölmich LR, Kallemose T, et al. Treatment of knee osteoarthritis with a single injection of autologous micro-fragmented adipose tissue is not superior to a placebo saline injection: a blinded randomised controlled trial with 2-year follow-up. 2025;
  177. Annaniemi JA, Pere J, Giordano S. The Efficacy of Platelet-Rich Plasma Injection Therapy in Obese versus Non-Obese Patients with Knee Osteoarthritis: A Comparative Study. *J Clin Med* 2024;13:2590.
  178. Tang Y, Xu Z yu, Song S sai, Song Y jue, Yang L jie, Wang L, et al. Obesity hinders the efficacy of adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis by reducing the proportion of DPP4+ stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2025;14:szaf004.
  179. Shumnalieva R, Kotov G, Ermencheva P, Monov S. Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Approaches in Obesity-Related Knee Osteoarthritis. *Biomedicines* 2023;12:9.
  180. Han JH, Jung M, Chung K, Moon HS, Jung SH, Byun J, et al. Intra-articular Stromal Vascular Fraction and Mesenchymal Stem Cell Injections Show Variable Efficacy and Higher Potential Complications Compared to Corticosteroid and Hyaluronic Acid in Treatment of Knee Osteoarthritis: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 2025;S0749806325000684.
  181. Jin W shu, Yin L xu, Sun H qiang, Zhao Z, Yan X feng. Mesenchymal Stem Cells Injection Is More Effective Than Hyaluronic Acid Injection in the Treatment of Knee Osteoarthritis With Similar Safety: A Systematic Review and Meta-analysis. *Arthroscopy* 2025;41:318–32.
  182. Chin S, Collins JE. Analytic challenges in defining structural phenotypes in OA clinical trials: a perspective. *Osteoarthritis Imaging* 2025;100273.
  183. Roemer FW, Collins JE, Neogi T, Crema MD, Guermazi A. Association of knee OA structural phenotypes to risk for progression: a secondary analysis from the Foundation for National Institutes of Health Osteoarthritis Biomarkers study (FNIH). *Osteoarthritis Cartilage* 2020;28:1220–8.
  184. De Groote J, Roten C, Fomenko E, Coorevits P, Harth A, Depaepe Y. Autologous Micro-Fragmented Adipose Tissue (MFAT) Injections May Be an Effective

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

- Treatment for Advanced Knee Osteoarthritis: A Longitudinal Study. *J Clin Med* 2025;14:6571.
185. Bittersohl B, Zilkens C, Kim YJ, Werlen S, Siebenrock KA, Mamisch TC, et al. Delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of hip joint cartilage: pearls and pitfalls. *Orthop Rev (Pavia)* 2011;3:e11.
186. Van Ginckel A, Baelde N, Almqvist KF, Roosen P, McNair P, Witvrouw E. Functional adaptation of knee cartilage in asymptomatic female novice runners compared to sedentary controls. A longitudinal analysis using delayed Gadolinium Enhanced Magnetic Resonance Imaging of Cartilage (dGEMRIC). *Osteoarthritis and Cartilage* 2010;18:1564–9.
187. Van Tiel J, Reijman M, Bos PK, Hermans J, Van Buul GM, Bron EE, et al. Delayed Gadolinium-Enhanced MRI of Cartilage (dGEMRIC) Shows No Change in Cartilage Structural Composition after Viscosupplementation in Patients with Early-Stage Knee Osteoarthritis. *PLoS ONE* 2013;8:e79785.
188. Meng H, Lu V, Khan W. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Potential Restorative Treatment for Cartilage Defects: A PRISMA Review and Meta-Analysis. *Pharmaceuticals* 2021;14:1280.
189. Amann E, Wolff P, Breel E, Van Griensven M, Balmayor ER. Hyaluronic acid facilitates chondrogenesis and matrix deposition of human adipose derived mesenchymal stem cells and human chondrocytes co-cultures. *Acta Biomaterialia* 2017;52:130–44.
190. Zhang H, Felthaus O, Prantl L. Adipose Tissue-Derived Therapies for Osteoarthritis: Multifaceted Mechanisms and Clinical Prospects. *Cells* [Internet] 2025 [cited 2025 Sep 8];14:669. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/14/9/669>
191. Roemer FW, Hunter DJ, Crema MD, Kwok CK, Ochoa-Albiztegui E, Guermazi A. An illustrative overview of semi-quantitative MRI scoring of knee osteoarthritis: lessons learned from longitudinal observational studies. *Osteoarthritis and Cartilage* 2016;24:274–89.
192. Ray A, Brett AD, Dube B, Bowes MA, Rowbotham E, Conaghan PG. A comparison of quantitative and semi-quantitative methods for assessing cartilage status and change over time; data from the osteoarthritis initiative. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2025;26:426.
193. Roemer FW, Jarraya M, Hayashi D, Crema MD, Haugen IK, Hunter DJ, et al. A perspective on the evolution of semi-quantitative MRI assessment of osteoarthritis: Past, present and future. *Osteoarthritis and Cartilage* 2024;32:460–72.
194. Zhao X, Zhao Y, Sun X, Xing Y, Wang X, Yang Q. Immunomodulation of MSCs and MSC-Derived Extracellular Vesicles in Osteoarthritis. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020;8.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

195. Glinkowski W, Śladowski D, Tomaszewski W, Pol-IAHA Study Group. Molecular Mechanisms and Therapeutic Role of Intra-Articular Hyaluronic Acid in Osteoarthritis: A Precision Medicine Perspective. *JCM* 2025;14:2547.
196. Kim YJ, Jaramillo D, Millis MB, Gray ML, Burstein D. Assessment of early osteoarthritis in hip dysplasia with delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85:1987–92.
197. Zhang X, Liu T, Ran C, Wang W, Piao F, Yang J, et al. Immunoregulatory paracrine effect of mesenchymal stem cells and mechanism in the treatment of osteoarthritis. *Front. Cell Dev. Biol.* 2024;12.
198. Altman R, Bedi A, Manjoo A, Niazi F, Shaw P, Mease P. Anti-Inflammatory Effects of Intra-Articular Hyaluronic Acid: A Systematic Review. *Cartilage* 2019;10:43–52.
199. Shegos CJ, Chaudhry AF. A narrative review of mesenchymal stem cells effect on osteoarthritis. *Ann Jt* 2022;7:26.
200. Breen EJ, Tan W, Khan A. The Statistical Value of Raw Fluorescence Signal in Luminex xMAP Based Multiplex Immunoassays. *Sci Rep* 2016;6:26996.
201. Karsdal MA, Rovati LC, Tambiah J, Kubassova O, Ladel C, Berenbaum F, et al. The inflammatory endotype in osteoarthritis: Reflections from the 2024 OARSI clinical trials symposium (CTS) with a special emphasis on feasibility for clinical development. *Osteoarthritis and Cartilage Open* 2025;7:100572.
202. Lv Z, Yang YX, Li J, Fei Y, Guo H, Sun Z, et al. Molecular Classification of Knee Osteoarthritis. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:725568.
203. Ni F, Zhang Y, Peng X, Li J. Correlation between osteoarthritis and monocyte chemoattractant protein-1 expression: a meta-analysis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 2020;15:516.
204. Zhao X, Gu M, Xu X, Wen X, Yang G, Li L, et al. CCL3/CCR1 mediates CD14+CD16- circulating monocyte recruitment in knee osteoarthritis progression. *Osteoarthritis and Cartilage* 2020;28:613–25.
205. van Spil WE, Szilagyí IA. Osteoarthritis year in review 2019: biomarkers (biochemical markers). *Osteoarthritis and Cartilage* 2020;28:296–315.
206. Nedunchezhiyan U, Varughese I, Sun AR, Wu X, Crawford R, Prasad I. Obesity, Inflammation, and Immune System in Osteoarthritis. *Front Immunol* 2022;13:907750.
207. Zhang Y, Liu D, Vithran DTA, Kwabena BR, Xiao W, Li Y. CC chemokines and receptors in osteoarthritis: new insights and potential targets. *Arthritis Research & Therapy* 2023;25:113.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

208. Park J, Park H, Lee YL, Weon S, Kim YG, Yang JH, et al. Blocking TNF $\alpha$  attenuates progressive cartilage matrix degradation in inflammatory arthritis. *Exp Ther Med* 2021;22:808.
209. Lozito TP, Tuan RS. Mesenchymal stem cells inhibit both endogenous and exogenous MMPs via secreted TIMPs. *J Cell Physiol* 2011;226:385–96.
210. Suteja RC, Harianto JE, Hendrawan G, Angelina V, Wijaya Putra IGNP. In Vitro and In Vivo Potential of Human Stem Cell-Derived Conditioned Medium (Secretome) and Exosomes as a Novel Treatment for Osteoarthritis: A Systematic Review of Experimental Studies. *Clin Orthop Surg* 2025;17:797–814.
211. Ji JB, Li XF, Liu L, Wang GZ, Yan XF. Effect of low intensity pulsed ultrasound on expression of TIMP-2 in serum and expression of mmp-13 in articular cartilage of rabbits with knee osteoarthritis. *Asian Pac J Trop Med* 2015;8:1043–8.
212. Shen W, Chen J, Zhu T, Chen L, Zhang W, Fang Z, et al. Intra-articular injection of human meniscus stem/progenitor cells promotes meniscus regeneration and ameliorates osteoarthritis through stromal cell-derived factor-1/CXCR4-mediated homing. *Stem Cells Transl Med* 2014;3:387–94.
213. Li J, Chen H, Zhang D, Xie J, Zhou X. The role of stromal cell-derived factor 1 on cartilage development and disease. *Osteoarthritis and Cartilage* 2021;29:313–22.
214. Li C, He Y, Li Y, Wang G, Liu D, Cai G, et al. A novel method to establish the rabbit model of knee osteoarthritis: intra-articular injection of SDF-1 induces OA. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2021;22:329.
215. Simopoulou T, Malizos KN, Iliopoulos D, Stefanou N, Papatheodorou L, Ioannou M, et al. Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism. *Osteoarthritis and Cartilage* 2007;15:872–83.
216. Ait Eldjoudi D, Cordero Barreal A, Gonzalez-Rodríguez M, Ruiz-Fernández C, Farrag Y, Farrag M, et al. Leptin in Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis: Player or Bystander? *Int J Mol Sci* 2022;23:2859.
217. Pallu S, Francin PJ, Guillaume C, Gegout-Pottie P, Netter P, Mainard D, et al. Obesity affects the chondrocyte responsiveness to leptin in patients with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R112.
218. Yuan C, Song W, Jiang X, Wang Y, Li C, Yu W, et al. Adipose-derived stem cell-based optimization strategies for musculoskeletal regeneration: recent advances and perspectives. *Stem Cell Res Ther* 2024;15:91.
219. Huang L, Yi L, Zhang C, He Y, Zhou L, Liu Y, et al. Synergistic Effects of FGF-18 and TGF- $\beta$ 3 on the Chondrogenesis of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Pellet Culture. *Stem Cells Int* 2018;2018:7139485.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

220. Mobasheri A, Fonseca JE, Gualillo O, Henrotin Y, Largo R, Herrero-Beaumont G, et al. Editorial: Inflammation and Biomarkers in Osteoarthritis. *Front. Med.* 2021;8.
221. Mobasheri A, Loeser R. Clinical phenotypes, molecular endotypes and theratypes in OA therapeutic development. *Nat Rev Rheumatol* 2024;20:525–6.
222. Kalogera S, Jansen MP, Bay-Jensen AC, Frederiksen P, Karsdal MA, Thudium CS, et al. Relevance of Biomarkers in Serum vs. Synovial Fluid in Patients with Knee Osteoarthritis. *Int J Mol Sci* 2023;24:9483.
223. Boffa A, Merli G, Andriolo L, Lattermann C, Salzmann GM, Filardo G. Synovial Fluid Biomarkers in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Quantitative Evaluation Using BIPEDs Criteria. *CARTILAGE* 2021;13:82S-103S.
224. Lineham B, Altaie A, Harwood P, McGonagle D, Pandit H, Jones E. A systematic review on the potential value of synovial fluid biomarkers to predict clinical outcomes in cartilage repair treatments. *Osteoarthritis and Cartilage* 2022;30:1035–49.
225. Lindbergh CA, Asken BM, Casaletto KB, Elahi FM, Goldberger LA, Fonseca C, et al. Interbatch Reliability of Blood-Based Cytokine and Chemokine Measurements in Community-Dwelling Older Adults: A Cross-Sectional Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2021;76:1954–61.
226. Douglas RJ. Aspiration and Injection of the Knee Joint: Approach Portal. *Knee Surg Relat Res [Internet]* 2014 [cited 2025 Nov 3];26:1–6. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3953519/>
227. Elsayy NA, Ibrahim AH, Younis GA, Meheissen MA, Abdel-Fattah YH. Clinical examination, ultrasound assessment and aspiration of knee effusion in primary knee osteoarthritis patients. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 2023;18:422.
228. Koh SM, Chan CK, Teo SH, Singh S, Merican A, Ng WM, et al. Elevated plasma and synovial fluid interleukin-8 and interleukin-18 may be associated with the pathogenesis of knee osteoarthritis. *The Knee* 2020;27:26–35.
229. Ku JH, Lee CK, Joo BS, An BM, Choi SH, Wang TH, et al. Correlation of synovial fluid leptin concentrations with the severity of osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 2009;28:1431–5.
230. van der Kraan PM. Differential Role of Transforming Growth Factor-beta in an Osteoarthritic or a Healthy Joint. *J Bone Metab* 2018;25:65–72.
231. Ishiguro N, Ito T, Ito H, Iwata H, Jugessur H, Ionescu M, et al. Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover: analyses of synovial fluid from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:129–36.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

232. Zhai G, Sun X, Randell E, Liu M, Wang N, Tolstykh I, et al. Phenylalanine is a potential novel marker for radiographic knee osteoarthritis progression: the most study. *Osteoarthritis and Cartilage* 2019;27:S104.
233. Ge M, Sun W, Xu T, Yang R, Zhang K, Li J, et al. Multi-omics analysis of synovial tissue and fluid reveals differentially expressed proteins and metabolites in osteoarthritis. *J Transl Med* 2025;23:285.
234. Veronesi F, Giavaresi G, Maglio M, Scotto d'Abusco A, Politi L, Scandurra R, et al. Chondroprotective activity of N-acetyl phenylalanine glucosamine derivative on knee joint structure and inflammation in a murine model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2017;25:589–99.
235. Heo JS, Choi Y, Kim HO. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote M2 Macrophage Phenotype through Exosomes. *Stem Cells Int* 2019;2019:7921760.
236. Cho DI, Kim MR, Jeong H yun, Jeong HC, Jeong MH, Yoon SH, et al. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Exp Mol Med* 2014;46:e70–e70.
237. van Helvoort EM, van der Heijden E, van Roon JAG, Eijkelkamp N, Mastbergen SC. The Role of Interleukin-4 and Interleukin-10 in Osteoarthritic Joint Disease: A Systematic Narrative Review. *Cartilage* 2022;13:19476035221098167.
238. Uebelhoer M, Lambert C, Grisart J, Guse K, Plutizki S, Henrotin Y. Interleukins, growth factors, and transcription factors are key targets for gene therapy in osteoarthritis: A scoping review. *Front. Med.* 2023;10.
239. Torrero JI, Martínez C. New developments in the treatment of osteoarthritis &ndash; focus on biologic agents. *OARRR* 2015;7:33–43.
240. Viganò M, Lugano G, Perucca Orfei C, Menon A, Ragni E, Colombini A, et al. Autologous Microfragmented Adipose Tissue Reduces the Catabolic and Fibrosis Response in an In Vitro Model of Tendon Cell Inflammation. *Stem Cells Int* 2019;2019:5620286.
241. Guo B, Sawkulycz X, Heidari N, Rogers R, Liu D, Slevin M. Characterisation of Novel Angiogenic and Potent Anti-Inflammatory Effects of Micro-Fragmented Adipose Tissue. *IJMS* 2021;22:3271.
242. Cavallo C, Boffa A, Salerno M, Merli G, Grigolo B, Filardo G. Adipose Tissue-Derived Products May Present Inflammatory Properties That Affect Chondrocytes and Synoviocytes from Patients with Knee Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences* 2023;24:12401.
243. Molière S, Jaulin A, Tomasetto CL, Dali-Youcef N. Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Natural Inhibitors in Metabolism: Insights into Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 2023;24:10649.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

244. Bouloumié A, Sengenès C, Portolan G, Galitzky J, Lafontan M. Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes* 2001;50:2080–6.
245. Zenic L, Polancec D, Hudetz D, Jelec Z, Rod E, Vidovic D, et al. Polychromatic Flow Cytometric Analysis of Stromal Vascular Fraction from Lipoaspirate and Microfragmented Counterparts Reveals Sex-Related Immunophenotype Differences. *Genes* 2021;12:1999.
246. Suga H, Matsumoto D, Eto H, Inoue K, Aoi N, Kato H, et al. Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev* 2009;18:1201–10.
247. Borrelli MR, Patel RA, Blackshear C, Vistnes S, Diaz Deleon NM, Adem S, et al. CD34+CD146+ adipose-derived stromal cells enhance engraftment of transplanted fat. *Stem Cells Transl Med* 2020;9:1389–400.
248. Rautiainen S, Laaksonen T, Koivuniemi R. Angiogenic Effects and Crosstalk of Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles with Endothelial Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2021;22:10890.
249. Desando G, Bartolotti I, Cattini L, Tschon M, Martini L, Fini M, et al. Prospects on the Potential In Vitro Regenerative Features of Mechanically Treated-Adipose Tissue for Osteoarthritis Care. *Stem Cell Rev and Rep* 2021;17:1362–73.
250. Marędziak M, Marycz K, Tomaszewski KA, Kornicka K, Henry BM. The Influence of Aging on the Regenerative Potential of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International* 2016;2016:2152435.
251. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *Journal of Translational Medicine* 2014;12:8.
252. Platas J, Guillén MI, del Caz MDP, Gomar F, Castejón MA, Mirabet V, et al. Paracrine effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells in inflammatory stress-induced senescence features of osteoarthritic chondrocytes. *Aging (Albany NY)* 2016;8:1703–17.
253. Bannuru RR, Osani MC, Vaysbrot EE, Arden NK, Bennell K, Bierma-Zeinstra SMA, et al. Comparative effectiveness of pharmacologic interventions for knee osteoarthritis: A systematic review and network meta-analysis. *Annals of Internal Medicine* 2019;171:479–91.
254. Fu Q, Zhu J, Van Eyk JE. Comparison of multiplex immunoassay platforms. *Clin Chem* 2010;56:314–8.
255. Beylerli O, Gareev I, Zhao B, Musaev E. Donor variability in adipose tissue-derived stem cells: implications for the clinical efficacy of autologous fat grafting. *Explor Med.* 2024;5:601–14.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. LITERATURA**

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. ŽIVOTOPIS**

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. ŽIVOTOPIS**

## **11. ŽIVOTOPIS**

### **Zaposlenje**

- prosinac 2020. – danas; Specijalna bolnica Sv. Katarina, specijalizant ortopedije i traumatologije
- siječanj 2020. – prosinac 2020.; Specijalna bolnica Sv. Katarina, doktor medicine na odjelu ortopedije
- 2019. – 2020.; Dom zdravlja Zagreb – Centar, doktor medicine na radu pod nadzorom

### **Školovanje**

- 2019 – danas; Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku
- 2013. – 2019.; Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- 2009. – 2013.; XV. gimnazija, Zagreb
- 2001. – 2009.; Osnovna škola Ivana Gorana Kovačića, Zagreb

### **Akademski naslovi**

- Doktor medicine (od 2019.)
- Specijalizant ortopedije i traumatologije (od 2020.)
- Doktorand Poslijediplomskog dokorskog studija Biomedicina i zdravstvo, Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku (od 2019.)

### **Priznanja i nagrade**

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. ŽIVOTOPIS**

- Rektorova nagrada za individualni znanstveni i umjetnički rad u akademskoj godini 2018./2019. Naziv rada: Izrada algoritma za definiranje etiologije primarnog aldosteronizma u slučajevima neuspjele kateterizacije adrenalnih vena.
- 2024 Moses Schanfield Young Investigator Award, 13th ISABS Conference on Applied Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine, Split, Hrvatska, 17. – 20. lipnja 2024.
- Stanford University/Elsevier World's Top 2% Scientists list
  - 2024. - na listi najutjecajnijih znanstvenika u svijetu za 2023. godinu
  - 2025. - na listi najutjecajnijih znanstvenika u svijetu za 2024. godinu
- Najdoktor
  - 2023. - na popisu najboljih liječnika za 2023. godinu prema portalu najdoktor.com
  - 2024. - na popisu najboljih liječnika za 2024. godinu prema portalu najdoktor.com

## Članstva

- Hrvatsko ortopedsko društvo - tajnik društva od 2025. godine
- Sekcija mladih liječnika Hrvatskog ortopedskog društva - predsjednik od 2022. godine
- The International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine (ISAKOS)
- Hrvatsko društvo za personaliziranu medicinu
- Hrvatski liječnički zbor
- Hrvatska liječnička komora

## Stručne aktivnosti

- Predavanja na domaćim i međunarodnim skupovima
  1. **Molnar V.** Comparative Effects of Microfragmented Adipose Tissue and Hyaluronic Acid on Clinical Outcomes and Cartilage Glycosaminoglycan

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. ŽIVOTOPIS**

- Content in Knee Osteoarthritis. 5<sup>th</sup> South East European Forum on Orthopaedics and Traumatology, Dubrovnik, Hrvatska, 7. – 10. svibnja 2025.
2. **Molnar V.** Impact of osteotomies to knee anatomy and biomechanics. Orthopaedics à la Carte Symposium: Knee Joint Preservation, Zagreb, Hrvatska, 18. siječnja 2025.
  3. **Molnar V.** Reconstruction of the Deep Medial Collateral Ligament's Femoral Insertion: A Minimally Invasive Arthroscopic Approach. 4<sup>th</sup> South East European Forum on Orthopaedics and Traumatology, Dubrovnik, Hrvatska, 4. – 6. svibnja, 2023.
  4. **Molnar V.** Knee anatomy & biomechanics update. Knee À la Carte. Zagreb, Hrvatska, 26. studeni 2022.
  5. **Molnar V.** IRI 2 Workshop: Osteoarthritis: A personalized approach to diagnosis and treatment. 12th ISABS Conference of Forensic and Anthropological Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, Dubrovnik, Hrvatska, 22. – 27. lipnja 2022.
  6. **Molnar V.** Regenerativna medicina. Druga fizijatrijska škola Split, Split, Hrvatska, 6. – 7. svibnja 2022.
  7. **Molnar V.** Biomehanika koljena. Tečaj 1. kategorije stalne medicinske izobrazbe „Oslikavanje koljena“. Zagreb, Hrvatska, 12. – 13. studeni 2022.
  8. **Molnar V.** Sports injuries. 9th INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE ON KINESIOLOGY; Satellite Symposium Prevention and Rehabilitation of Sport injuries - Presentation of University Postgraduate Specialist Study Programme, Opatija, Hrvatska, 12. – 15. rujna 2021.
  9. **Molnar V.** Regenerative medicine in the treatment of sports injuries. 9th INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE ON KINESIOLOGY; Satellite Symposium Prevention and Rehabilitation of Sport injuries - Presentation of University Postgraduate Specialist Study Programme, Opatija, Croatia, September 12-15, 2021.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. ŽIVOTOPIS**

10. **Molnar V.** Prilog procjene funkcionalnosti pokreta u studentskoj populaciji. 13. godišnja međunarodna konferencija KONDICIJSKA PRIPREMA SPORTAŠA, Zagreb, Croatia, February 27-28, 2015.

- Položeni tečajevi i međunarodne edukacije
  1. 20th International Course of Arthroscopic Techniques on Anatomical Specimens, Ljubljana, Slovenia, 04/2025
  2. Edukacija o endoprotetici kuka direktnim prednjim pristupom pod mentorstvom prof. Cortena u Oost-Limburg Hospital, Genk, Belgija, 09/2024
  3. Edukacija o ortobiološkim metodama i artroskopiji ramena – ArthroLab, Arthrex Regional Head Office, Munich, Njemačka, 08/2024
  4. AO Recon Course—Complex Total Hip and Knee Arthroplasty, Zagreb, Hrvatska, 07/2024
  5. AO Trauma Course—Basic Principles of Fracture Management, Zagreb, Hrvatska, 11/2023
  6. Edukacija o krioprezervaciji masnog tkiva u Lipobank – prvoj europskoj banci tkiva za krioprezervaciju masnog tkiva, Cesena, Italija, 07/2022
  7. Primary Knee Instructional Cadaver Course, Zagreb, Hrvatska, 08/2022
  8. AO Recon Course—Principles of Total Hip and Knee Arthroplasty, Zagreb, Hrvatska, 10/2021
  9. Ljetna škola otočne medicine, Šolta, Hrvatska, 09/2018

## Publikacije

- Objavljeni znanstveni radovi
  1. **Molnar V**, Jeleč Ž, Rod E, Hudetz D, Brlek P, Borić I, Matišić V, Mešić J, Pavelić ES, Vidović D, Blažević D, Čukelj F, Sabalić S, Štivičić J, Dujmović T, Starešinić M, Čemerin M, Weinberger DG, Molnar I, Smolić M, Primorac D. Clinical and dGEMRIC Evaluation of Microfragmented Adipose Tissue

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. ŽIVOTOPIS**

- Versus Hyaluronic Acid in Inflammatory Phenotype of Knee Osteoarthritis: A Randomized Controlled Trial. *Biomedicines*. 2025;13:2301. doi: 10.3390/biomedicines13092301.
2. Jeleč Ž, Primorac D, **Molnar V**, Antičević D. Addressing surgical challenges in patients with severe form of osteogenesis imperfecta and with prolonged bisphosphonate treatment: intramedullary sclerosis and technical solutions. *Int Orthop*. 2025. doi: 10.1007/s00264-025-06645-7. Epub ahead of print.
  3. Zekušić M, Brlek P, Zenić L, **Molnar V**, Ledinski M, Bujjić Mihica M, Štimac A, Halassy B, Ramić S, Puljić D, Vučemilo T, Tremolada C, Sabalić S, Karli DC, Tsoukas D, Primorac D. Cryopreservation and Validation of Microfragmented Adipose Tissue for Autologous Use in Knee Osteoarthritis Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025;26:6969. doi: 10.3390/ijms26146969.
  4. Primorac D, **Molnar V**, Tsoukas D, Uzieliene I, Tremolada C, Brlek P, Klarić E, Vidović D, Zekušić M, Pachaleva J, Bernotiene E, Wilson A, Mobasheri A. Tissue engineering and future directions in regenerative medicine for knee cartilage repair: a comprehensive review. *Croat Med J*. 2024;65:268-287. doi: 10.3325/cmj.2024.65.268.
  5. Karadjole T, Butković I, Dimova A, **Molnar V**, Šavorić J, Bačić G, Primorac D. Stone-induced urethral fistula treatment with microfragmented adipose tissue containing mesenchymal stem cells: a case report from veterinary medicine with potential application in humans. *Croat Med J*. 2024;65:288-292. doi: 10.3325/cmj.2024.65.288.
  6. Hudetz D, **Molnar V**, Mudrovčić Y, Sava MP. The „Candy-Stripe“ Graft for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *Arthroscopy Techniques*. 2023. Article in Press. doi: 10.1016/j.eats.2023.07.027.
  7. Primorac D, Brlek P, Pavelić ES, Mešić J, Glavaš Weinberger D, Matišić V, **Molnar V**, Srića S, Zadro R. Importance of Cellular Immunity and IFN- $\gamma$

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. ŽIVOTOPIS**

Concentration in Preventing SARS-CoV-2 Infection and Reinfection: A Cohort Study. *Viruses*. 2023;15:792. doi: 10.3390/v15030792.

8. Matišić V, Brlek P, Bulić L, **Molnar V**, Dasović M, Primorac D. Population Pharmacogenomics in Croatia: Evaluating the PGx Allele Frequency and the Impact of Treatment Efficiency. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24:13498. doi: 10.3390/ijms241713498.
9. Matišić V, Brlek P, **Molnar V**, Pavelić E, Čemerin M, Vrdoljak K, Skelin A, Erceg D, Moravek D, Ivkošić IE, Primorac D. Experience with comprehensive pharmacogenomic multi-gene panel in clinical practice: A retrospective single-center study. *Croat Med J*. 2022;63(3):257–64. doi:10.3325/cmj.2022.63.257.
10. Zenić L, Polančec D, Hudetz D, Jeleč Z, Rod E, Vidović D, Starešinić M, Sabalić S, Vrdoljak T, Petrović T, Čukelj F, **Molnar V**, Čemerin M, Matišić V, Brlek P, Koroljević ZD, Borić I, Lauc G, Primorac D. Medicinal signaling cells niche in stromal vascular fraction from lipoaspirate and microfragmented counterpart. *Croat Med J*. 2022;63:265–72. doi: 10.3325/cmj.2022.63.265.
11. **Molnar V**, Pavelić E, Vrdoljak K, Čemerin M, Klarić E, Matišić V, Bjelica R, Brlek P, Kovačić I, Tremolada C, Primorac D. Mesenchymal Stem Cell Mechanisms of Action and Clinical Effects in Osteoarthritis: A Narrative Review. *Genes*. 2022;13:949. doi: 10.3390/genes13060949.
12. Pavelić E, Matišić V, **Molnar V**, Brlek P, Pavlović T, Strbad M, Girandon L, Knežević M, Primorac D. Treatment of Pulmonary Sarcoidosis Using Allogenic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Therapy is Safe: A Case Report. *Int J Med Sci Clin Res Stud*. 2022;02:512–5. doi: 10.47191/ijmscrs/v2-i6-12.
13. Zibar Tomsic K, Dusek T, Alduk A, Knezevic N, **Molnar V**, Kraljevic I, Skoric Polovina T, Balasko A, Solak M, Matas N, Popovac H, Kralik-Oguic S, Kastelan D. Subtyping primary aldosteronism by inconclusive adrenal vein

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. ŽIVOTOPIS**

- sampling: A derivation and validation study in a tertiary centre. *Clin Endocrinol.* 2022;97:849–59. doi:10.1111/cen.14794.
14. **Molnar V**, Pavelić E, Jeleč Ž, Brlek P, Matišić V, Borić I, Hudetz D, Rod E, Vidović D, Starčević N, Čemerin M, Karli DC, Primorac D. Results of Treating Mild to Moderate Knee Osteoarthritis with Autologous Conditioned Adipose Tissue and Leukocyte-Poor Platelet-Rich Plasma. *J Pers Med.* 2022;13:47. doi: 10.3390/jpm13010047.
15. Primorac D, Vrdoljak K, Brlek P, Pavelić E, **Molnar V**, Matišić V, Erceg Ivkošić I, Parčina M, Adaptive Immune Responses and Immunity to SARS-CoV-2. *Front. Immunol.* 2022;13:848582. doi: 10.3389/fimmu.2022.848582.
16. Smojver I, Katalinić I, Bjelica R, Gabrić D, Matišić V, **Molnar V**, Primorac D. Mesenchymal Stem Cells Based Treatment in Dental Medicine: A Narrative Review. *International Journal of Molecular Sciences.* 2022; 23:1662. <https://doi.org/10.3390/ijms23031662>.
17. Primorac D, Brlek P, Matišić V, **Molnar V**, Vrdoljak K, Zadro R, Parčina M. Cellular Immunity—The Key to Long-Term Protection in Individuals Recovered from SARS-CoV-2 and after Vaccination. *Vaccines.* 2022;10:442. doi: 10.3390/vaccines10030442.
18. Primorac D, **Molnar V**, Matišić V, Hudetz D, Jeleč Ž, Rod E, et al. Comprehensive Review of Knee Osteoarthritis Pharmacological Treatment and the Latest Professional Societies' Guidelines. *Pharmaceuticals.* 2021;14:205. doi: 10.3390/ph14030205.
19. **Molnar V**, Matišić V, Kodvanj I, Bjelica R, Jeleč Ž, Hudetz D, Rod E, Čukelj F, Vrdoljak T, Vidović D, Starešinić M, Sabalić S, Dobričić B, Petrović T, Antičević D, Borić I, Košir R, Zmrzljak UP, Primorac D. Cytokines and Chemokines Involved in Osteoarthritis Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021;22:9208. doi: 10.3390/ijms22179208.
20. Primorac D, Odak L, Perić V, Čatić J, Šikić J, Radeljić V, Manola Š, Nussbaum R, Vatta M, Aradhya S, Sofrenović T, Matišić V, **Molnar V**, Skelin

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. ŽIVOTOPIS**

A, Mirat J, Brachmann J. Sudden Cardiac Death—A New Insight Into Potentially Fatal Genetic Markers. *Front Med.* 2021;8:325.

21. **Molnar V**, Zekan P, Dušek T, Ivković A. Multiple Metatarsal Fractures: The First Manifestation of Cushing's Disease-A Case Report. *Journal of the American Podiatric Medical Association.* 2021;111(3). doi: 10.7547/19-024 .
22. Primorac D, Stojanović Stipić S, Strbad M, Girandon L, Barlič A, Frankić M, Ivić I, Marasović Krstulović D, Jukić I, Halassy B, Hećimović A, Matišić V, **Molnar V**. Compassionate mesenchymal stem cell treatment in a severe COVID-19 patient: a case report. *Croat Med J.* 2021;62:288-296. doi: 10.3325/cmj.2021.62.288.
23. Primorac D, Perić V, Matišić V, **Molnar V**, Zadro R, Vince A, Lauc G, Polašek O. Rapid COVID-19 Antigen Testing in Croatia: Risk Perception Plays an Important Role in the Epidemic Control. *Front Public Health.* 2021 Jul 27;9:708907. doi: 10.3389/fpubh.2021.708907.
24. Primorac D, Čemerin M, Matišić V, **Molnar V**, Strbad M, Girandon L, Zenić L, Knežević M, Minger S, Polančec D. Mesenchymal Stromal Cells: Potential Option for COVID-19 Treatment. *Pharmaceutics.* 2021;13:1481. doi: 10.3390/pharmaceutics13091481.
25. Hudetz D, **Molnar V**, Jelec Ž, Rod E, Matišić V, Borić I, Primorac D. Anterior cruciate ligament reconstruction with anterolateral stabilization by a modified Lemaire technique in adolescent professional football player: a case report. *Acta Chirurgica Croatica.* 2021;18:15-20. doi: .5281/zenodo.5501491.
26. Vrdoljak T, **Molnar V**, Jelec Ž, Matišić V, Dobričić B, Borić I, Primorac D. One-stage bilateral total hip replacement using direct anterior approach via „bikini“ incision: a case report. *Acta Chirurgica Croatica.* 2021;18:21-24. doi: 10.5281/zenodo.5501489.
27. Šikić J, Planinić Z, Matišić V, Friščić T, **Molnar V**, Jagačić D, Vujičić L, Tudorić N, Postružin Gršić L, Ljubičić Đ, Primorac D. COVID-19: The Impact

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. ŽIVOTOPIS**

on Cardiovascular System. *Biomedicines*. 2021;9:1691. doi: 10.3390/biomedicines9111691.

28. Brlek P, Antičević D, **Molnar V**, Matišić V, Robinson K, Aradhya S, Krpan D, Primorac D. X-Linked Osteogenesis Imperfecta Possibly Caused by a Novel Variant in PLS3. *Genes*. 2021;12:1851. doi: 10.3390/genes12121851.
29. Zenic L, Polancec D, Hudetz D, Jelec Z, Rod E, Vidovic D, Staresinic M, Sabalic S, Vrdoljak T, Petrovic T, Cukelj F, **Molnar V**, Cemerin M, Maticic V, Brlek P, Djukic Koroljevic Z, Boric I, Lauc G, Primorac D. Polychromatic Flow Cytometric Analysis of Stromal Vascular Fraction from Lipoaspirate and Microfragmented Counterparts Reveals Sex-Related Immunophenotype Differences. *Genes*. 2021;12:1999. doi: 10.3390/genes12121999.
30. Primorac D, Bach-Rojecky L, Vađunec D, Juginović A, Žunić K, Matišić V, Skelin A, Arsov B, Boban L, Erceg D, Erceg Ivkošić I, **Molnar V**, Čatić J, Mikula I, Boban Lj, Primorac L, Esquivel B, Donaldson M. Pharmacogenomics at the center of precision medicine: challenges and perspective in an era of Big Data. *Pharmacogenomics*. 2020;21:141-156. doi: 10.2217/pgs-2019-0134.
31. Primorac D, Matišić V, **Molnar V**, Bahtijarević Z, Polašek O. Pre-season football preparation in the era of COVID-19 : Croatian Football Association Model. *J. Glob. Health*. 2020;10:10–13. doi:10.7189/jogh.10.010352.
32. Primorac D, **Molnar V**, Rod E, Jeleč Ž, Čukelj F, Matišić V, et al. Knee Osteoarthritis: A Review of Pathogenesis and State-Of-The-Art Non-Operative Therapeutic Considerations. *Genes (Basel)*. 2020;11:854. doi: 10.3390/genes11080854.
33. Peric V, Kottek T, **Molnar V**, Matišić V, Čukelj F, Primorac D. Mesenchymal Stem Cells In The Treatment Of Knee Osteoarthritis. *J Stem Cells Res Dev Ther*. 2020;6:1–6. doi: 10.24966/SRDT-2060/100050.
34. Vince A, Zadro R, Šostar Z, Sternak SL, Vraneš J, Škaro V, Projić P, **Molnar V**, Matišić V, Baršić B, Lauc G, Lovrić-Makarić Z, Bahtijarević, Vlahović T,

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. ŽIVOTOPIS**

- Šikić S, Polašek O, Primorac D. SARS-CoV-2 Seroprevalence in a Cohort of Asymptomatic, RT-PCR Negative Croatian First League Football Players. medRxiv. 2020;2020.10.30.20223230.
35. Marjanović D, Primorac D, Matišić V, Perić V, **Molnar V**, Zadro R. Laboratory testing and screening for SARS-CoV-2: A review of current methods. Genet Appl. 2020;4:1.
36. Leksic G, Alduk AM, **Molnar V**, Haxhiu A, Haxhiu A, Balasko A, Knezevic N, Dusek T, Kastelan D. Computed tomography scan can be misleading in the lateralisation of aldosterone excess. Endocrinol Diabetes Metab Case Rep. 2019;19-0018. doi: 10.1530/EDM-19-0018.
37. Mandac Rogulj I, Matišić V, Arsov B, Boban L, Juginović A, **Molnar V**, Primorac D. Dasatinib-induced nephrotic syndrome: a case of phenoconversion. Croat Med J. 2019;60(3):250–254. doi:10.3325/cmj.2019.60.250.
38. **Molnar V**, Zekan P, Dušek T, Ivković A. Multiple Metatarsal Fractures: The First Manifestation of Cushing's Disease-A Case Report. J Am Podiatr Med Assoc. 2021;111:Article\_2. doi: 10.7547/19-024.
39. Pavlović T, Štefančić K, Rožanković M, Boban L, Borić I, **Molnar V**, Zekan P, Primorac D. Ventrolateral disc herniation causes psoas muscle compression: A case report. Radiol Case Rep. 2019 27;15:136-140. doi: 10.1016/j.radcr.2019.10.031.
40. Zibar Tomšić K, **Molnar V**, Dušek T, Kraljević I, Škorić Polovina T, Balaško A, Solak M, Kaštelan D. Partially successful adrenal vein sampling can in some cases reveal the etiology of primary aldosteronism. Endocrine Abstracts. 2019;67:O19. doi: 10.1530/endoabs.67.O19.
41. Čatić J, Skelin A, Boban L, **Molnar V**, Matišić V, Zekan P, Arson B, Juginović A, Mikula I, Bach-Rojecky L, Erceg-Ivkošić I, Erceg D, Primorac D. Multimodalni koncept farmakogenomskog testiranja u kliničkoj praksi: Model

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. ŽIVOTOPIS**

Specijalne bolnice Sv. Katarina i OneOme. Paediatr Croat. 2018;62:167-185.

42. **Molnar V**, Kaštelan D, Dušek T. Use of adrenal venous sampling in the diagnostic work-up of primary aldosteronism. Diabetologia Croatica 2016;45:11-28.

43. **Molnar V**. Prilog procjene funkcionalnosti pokreta u studentskoj populaciji. 13. godišnja međunarodna konferencija KONDICIJSKA PRIPREMA SPORTAŠA, Zbornik radova 2015.

- Kongresni sažetci

1. **Molnar V**, Čemerin M. Comparative Effects of Microfragmented Adipose Tissue and Hyaluronic Acid on Clinical Outcomes and Cartilage Glycosaminoglycan Content in Knee Osteoarthritis. 5<sup>th</sup> South East European Forum on Orthopaedics and Traumatology, Dubrovnik, Croatia, May 7-10, 2025.
2. Jeleč Ž, Rod E, Vrdoljak T, **Molnar V**, Pavelić ES, Mešić J. Spinopelvic Mobility – Myth or Serious Obstacle. 5<sup>th</sup> South East European Forum on Orthopaedics and Traumatology, Dubrovnik, Croatia, May 7-10, 2025.
3. Mešić J, Jeleč Ž, **Molnar V**. Collared vs. Collarless Stems in Total Hip Arthroplasty: Impact on Stability, Fracture Risk and Long-Term Outcomes. 5<sup>th</sup> South East European Forum on Orthopaedics and Traumatology, Dubrovnik, Croatia, May 7-10, 2025.
4. **Molnar V**, Jeleč Ž, Rod E, Hudetz D, Vidović D, Starešinić M, Glavaš Weinberger D, Čemerin M, Čukelj F, Blažević D, Štivičić J, Dujmović T, Bobek D, Brlek P, Pavelić E, Primorac D. Effects of treating knee osteoarthritis with autologous microfragmented adipose tissue containing mesenchymal stem cells compared to hyaluronic acid – clinical results from IRI2 project. 13<sup>th</sup> ISABS Conference on Applied Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine, Split, Croatia, June 17-20, 2024.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. ŽIVOTOPIS**

5. **Molnar V**, Matišić V, Borić I, Jeleč Ž, Rod E, Hudetz D, Vidović D, Štefančić K, Brlek P, Pavelić E, Primorac D. Effects of treating knee osteoarthritis with autologous microfragmented adipose tissue containing mesenchymal stem cells compared to hyaluronic acid – radiological results from IRI2 project. 13<sup>th</sup> ISABS Conference on Applied Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine, Split, Croatia, June 17-20, 2024.
6. **Molnar V**, Polančec D, Zenić L, Brlek P, Primorac D. Cellular composition and viability of microfragmented adipose tissue in osteoarthritis treatment – insights from the IRI2 project. 13<sup>th</sup> ISABS Conference on Applied Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine, Split, Croatia, June 17-20, 2024.
7. Matišić V, Brlek P, Bulić L, **Molnar V**, Dasović M, Primorac D. Pharmacogenomic testing in Croatia: allele and genotype frequencies of drug-metabolizing enzymes, receptors, and other associated proteins. 13<sup>th</sup> ISABS Conference on Applied Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine, Split, Croatia, June 17-20, 2024.
8. Prosenc Zmrzljak U, **Molnar V**, Štalekar M, Stančić B, Zekušić M, Puljić D, Šterpin S, Jenko Bizjan B, Sabolić I, Atanasoski R, Jeleč Ž, Primorac D. miRNA as a personalized medicine tool for treatment of knee osteoarthritis. 13<sup>th</sup> ISABS Conference on Applied Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine, Split, Croatia, June 17-20, 2024.
9. Sironić L, Klarić TS, Trbojević Akmačić I, Vučković F, Wójcik Borošak I, Razdorov G, Lalić D, Skelin A, **Molnar V**, Glavaš Weinberger D, Čemerin M, Primorac D, Lauc G. Autologous microfragmented adipose tissue injection for treatment of knee osteoarthritis: towards a precision therapy approach using adipose tissue N-glycomics data. 13<sup>th</sup> ISABS Conference on Applied Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine, Split, Croatia, June 17-20, 2024.
10. Pavelić E, **Molnar V**, Škaro V, Karli D, Primorac D. Revolutionizing orthobiologics: application of leukocyte-rich and leukocyte-poor platelet-rich plasma for knee osteoarthritis – a personalized approach. 13<sup>th</sup> ISABS

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. ŽIVOTOPIS**

Conference on Applied Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine, Split, Croatia, June 17-20, 2024.

11. Karadjole T, Butković I, Dimova A, **Molnar V**, Šavorić J, Bačić G, Primorac D. Stone induced uretral rupture: treatment with microfragmented adipose tissue containing mesenchymal stem cells. 13<sup>th</sup> ISABS Conference on Applied Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine, Split, Croatia, June 17-20, 2024.
12. Rod E, Hudetz D, **Molnar V**, Jeleč Ž, Starčević N, Pavelić E, Matišić V. Early Results of Minced Cartilage Implantation (MCI) for Symptomatic Full-thickness Cartilage Defect of the Knee. 4<sup>th</sup> South East European Forum on Orthopaedics and Traumatology, Dubrovnik, Croatia, May 4-6, 2023.
13. **Molnar V**, Mudrovčić Y, Sava MP, Hudetz D. The „Candy-Stripe“ Graft for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. 4<sup>th</sup> South East European Forum on Orthopaedics and Traumatology, Dubrovnik, Croatia, May 4-6, 2023.
14. Jeleč Ž, Rod E, Hudetz D, Vrdoljak T, Starčević N, **Molnar V**, Pavelić E. Treatment of a solitary osteochondroma of the ventral scapula – a case report. 4<sup>th</sup> South East European Forum on Orthopaedics and Traumatology, Dubrovnik, Croatia, May 4-6, 2023.
15. **Molnar V**, Pavelić E, Hudetz D. Reconstruction of the Deep Medial Collateral Ligament's Femoral Insertion: A Minimally Invasive Arthroscopic Approach. 4<sup>th</sup> South East European Forum on Orthopaedics and Traumatology, Dubrovnik, Croatia, May 4-6, 2023.
16. Pavelić E, Matišić V, **Molnar V**, Brlek P, Pavlović T, Strbad M, Girandon L, Primorac D. Treatment of pulmonary sarcoidosis using allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy is safe: a case report. 12<sup>th</sup> ISABS Conference of Forensic and Anthropological Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, Dubrovnik, Croatia, June 22-27, 2022.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. ŽIVOTOPIS**

17. Matišić V, Brlek P, **Molnar V**, Pavelić E, Čemerin M, Vrdoljak K, Skelin A, Erceg D, Moravek D, Erceg Ivkošić I, Primorac D. A comprehensive pharmacogenomic multi-gene panel analysis in clinical practice, experience from St. Catherine Hospital. 12th ISABS Conference of Forensic and Anthropological Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, Dubrovnik, Croatia, June 22-27, 2022.
18. Pavelić E, Brlek P, **Molnar V**, Antičević D, Hudetz D, Bilić V, Barić I, Primorac D. Case report: A multidisciplinary approach to the management of ricket disease caused by de nove mutation in the PHEX gene. 12th ISABS Conference of Forensic and Anthropological Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, Dubrovnik, Croatia, June 22-27, 2022.
19. Čemerin M, Brlek P, Matišić V, **Molnar V**, Erceg Ivkošić I, Primorac D. Incomplete penetrance of pathogenic GREBL1 variant caused a different clinical presentation in 3 generations of one family. 12th ISABS Conference of Forensic and Anthropological Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, Dubrovnik, Croatia, June 22-27, 2022.
20. Djukić Koroljević Z, Brlek , **Molnar V**, Hudetz D, Jeleč Ž, Rod E, Vidović D, Vrdoljak T, Borić I, Petrović T, Čukelj F, Matišić V, Pavelić E, Karli D, Primorac D. Are biological treatments for knee osteoarthritis effective? KOOS, WOMAC and VAS score analysis. 12th ISABS Conference of Forensic and Anthropological Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, Dubrovnik, Croatia, June 22-27, 2022.
21. Polančec D, Zenić L, Hudetz D, Jeleč Ž, Rod E, Vidović D, Starešinić M, Sabalić S, Vrdoljak T, Petrović T, Čukelj F, **Molnar V**, Čemerin M, Matišić V, Brlek P, Djukić Koroljević Z, Borić I, Lauc G, Primorac D. Sex-related immunophenotype differences in human stromal vascular fraction from lipoaspirate and microfragmented lipoaspirate revealed by polychromatic flow cytometry. 12th ISABS Conference of Forensic and Anthropological Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, Dubrovnik, Croatia, June 22-27, 2022.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. ŽIVOTOPIS**

22. Boban L, Hajsok H, **Molnar V**, Zekan P, Ivković A. ORTHObasics. 15th International Croatian Student Summit of Biomedical Students and Young Scientists (CROSS 15), Zagreb, April, 2019.
23. Boban L, Hajsok H, **Molnar V**, Zekan P, Ivković A. Educational concept for teaching proper clinical assessment of the musculoskeletal system: ORTHObasics by Student Society for Orthopaedics and Traumatology. 3rd South European Forum on Orthopaedics and Traumatology, Dubrovnik, Croatia, April 24-26, 2019.
24. Štefančić K, Borić I, Rožanković M, Boban L, **Molnar V**, Zekan P, Pavlović T, Primorac D. Ventrolateral disc herniation causes psoas muscle compression: A case report. 3rd South European Forum on Orthopaedics and Traumatology, Dubrovnik, Croatia, April 24-26, 2019.
25. Vađunec D, Juginović A, Žunić K, Matišić V, Arsov B, **Molnar V**, Boban L, Bach-Rojecky L, Skelin A, Erceg D, Erceg Ivkošić I, Esquivel B, Donaldson M, Primorac D. Pharmacogenomics at the center of personalized medicine - Challenges and perspective in the developing world of artificial intelligence. 11th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, Split, Croatia, June 17-22, 2019.
26. Arsov B, Juginović A, Matišić V, Mandac Rogulj I, **Molnar V**, Boban L, Primorac D. Dasatinib induced nephrotic syndrome: A case of phenoconversion or?. 11th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, Split, Croatia, June 17-22, 2019.
27. Juginović A, Erceg D, Boban L, Matišić V, **Molnar V**, Arsov B, Primorac D. Life-saving potential of pharmacogenomics. 11th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, Split, Croatia, June 17-22, 2019.
28. Zibar Tomšić K, **Molnar V**, Dušek T, Kraljević I, Škorić Polovina T, Balaško A, Solak M, Kaštelan D. Partially successful adrenal vein sampling can in

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. ŽIVOTOPIS**

some cases reveal the etiology of primary aldosteronism. 7th ESE Young Endocrinologists and Scientists (EYES) Meeting, Athens (Greece), September 13-15, 2019.

29. Ćatić J, Skelin A, Boban L, **Molnar V**, Matišić V, Zekan P, Arson B, Juginović A, Mikula I, Bach-Rojecky L, Erceg-Ivkošić I, Erceg D, Primorac D. Multimodalni koncept farmakogenomskog testiranja u kliničkoj praksi: Model Specijalne bolnice Sv. Katarina i OneOme. Dani humane genetike prof. dr. sc. Ljiljana Zergollern-Čupak, Zagreb, Croatia, December 8, 2018.
30. **Molnar V**, Kaštelan D, Dušek T. Use of adrenal venous sampling in the diagnostic work-up of primary aldosteronism. Godišnji sastanak Hrvatskog društva za endokrinologiju i dijabetologiju HLZ, Brijuni, Croatia, October, 2017.

**Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.. PRILOZI**

## **12. PRILOZI**

Popis priloga:

Prilog 1. KOOS (*Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score*) upitnik za procjenu subjektivnog kliničkog stanja bolesnika s osteoartritisom koljena

Prilog 2. WOMAC (*Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index*) upitnik za procjenu subjektivnog kliničkog stanja bolesnika s osteoartritisom koljena

Prilog 3. Vizualno analogna skala (VAS) za procjenu boli u mirovanju i kretanju kod ispitanika u istraživanju

**Prilog 1. KOOS (Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score) upitnik za procjenu subjektivnog kliničkog stanja bolesnika s osteoartritisom koljena.**

Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS), Croatian version LK1.0

**UPITNIK O PROBLEMIMA S KOLJENOM  
(KOOS)**

Današnji datum: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Datum rođenja: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Ime i prezime: \_\_\_\_\_

**UPUTE:** Ovim se upitnikom ispituje Vaše mišljenje o problemima koje imate s koljenom. Te će nam informacije pomoći da saznamo što osjećate u vezi s koljenom i koliko ste u stanju obavljati svoje svakodnevne aktivnosti. Odgovorite na svako pitanje tako da križićem označite odgovarajuću kućicu, ali samo jednu kućicu za svako pitanje. Ako niste sigurni kako odgovoriti na neko pitanje, molimo Vas da odgovorite najbolje što možete.

**Simptomi**

Na ova pitanja treba odgovoriti vodeći računa o simptomima koje ste osjećali vezano za Vaše koljeno tijekom **prošlog tjedna**.

S1. Da li Vam koljeno otiče?

nikada  rijetko  ponekad  često  stalno

S2. Da li Vam koljeno škripi, pucketa ili proizvodi bilo koji drugi zvuk kad ga pomičete?

nikada  rijetko  ponekad  često  stalno

S3. Da li Vam koljeno zapinje ili se zakoči kod pomicanja?

nikada  rijetko  ponekad  često  stalno

S4. Možete li potpuno izravnati koljeno?

stalno  često  ponekad  rijetko  nikada

S5. Možete li potpuno saviti koljeno?

stalno  često  ponekad  rijetko  nikada

**Ukočenost**

Sljedeća pitanja se odnose na jačinu ukočenosti zglobova koju ste osjećali u koljenu tijekom **prošlog tjedna**. Ukočenost je osjećaj ograničenosti ili usporenosti u lakoći pokretanja zglobova koljena.

S6. Koliko Vam je jaka ukočenost zglobova koljena nakon što se ujutro probudite?

nimalo  blaga  umjerena  jaka  izrazito jaka

S7. Koliko Vam je jaka ukočenost zglobova koljena nakon sjedenja, ležanja ili odmaranja **kasnije tijekom dana**?

nimalo  blaga  umjerena  jaka  izrazito jaka

**Bolovi**

P1. Koliko često osjećate bolove u koljenu?

nikada	bar jednom mjesečno	bar jednom tjedno	bar jednom dnevno	stalno
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Koliko ste jake bolove u koljenu osjećali **prošlog tjedna** dok ste činili sljedeće?

P2. okretali se u koljenu

nimalo	blage	umjerene	jake	izrazito jake
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

P3. potpuno izravnavali koljeno

nimalo	blage	umjerene	jake	izrazito jake
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

P4. potpuno savijali koljeno

nimalo	blage	umjerene	jake	izrazito jake
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

P5. hodali po ravnoj površini

nimalo	blage	umjerene	jake	izrazito jake
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

P6. spuštali se ili uspinjali stepenicama

nimalo	blage	umjerene	jake	izrazito jake
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

P7. noću u krevetu

nimalo	blage	umjerene	jake	izrazito jake
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

P8. sjedili ili ležali

nimalo	blage	umjerene	jake	izrazito jake
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

P9. uspravno stajali

nimalo	blage	umjerene	jake	izrazito jake
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Funkcioniranje u svakodnevnom životu**Sljedeća pitanja se odnose na Vaše fizičko funkcioniranje. Pod time mislimo na Vašu pokretljivost i brigu o sebi. Molimo Vas da navedete koliko ste velike poteškoće imali **prošlog tjedna** zbog svojih problema s koljenom dok ste činili sljedeće:

A1. silazili niz stepenice

nimalo	blage	umjerene	jake	izrazito jake
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

A2. uspinjali se stepenicama

nimalo	blage	umjerene	jake	izrazito jake
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Molimo Vas da navedete koliko ste velike poteškoće imali **prošlog tjedna** zbog svojih problema s koljenom dok ste činili sljedeće:

- A3. ustajali iz sjedećeg položaja  
 nimalo                      blage                      umjerene                      jake                      izrazito jake
- A4. stajali  
 nimalo                      blage                      umjerene                      jake                      izrazito jake
- A5. saginjali se do poda ili podizali neki predmet  
 nimalo                      blage                      umjerene                      jake                      izrazito jake
- A6. hodali po ravnoj površini  
 nimalo                      blage                      umjerene                      jake                      izrazito jake
- A7. ulazili ili izlazili iz auta  
 nimalo                      blage                      umjerene                      jake                      izrazito jake
- A8. odlazili u kupovinu  
 nimalo                      blage                      umjerene                      jake                      izrazito jake
- A9. oblačili čarape  
 nimalo                      blage                      umjerene                      jake                      izrazito jake
- A10. ustajali iz kreveta  
 nimalo                      blage                      umjerene                      jake                      izrazito jake
- A11. svlačili čarape  
 nimalo                      blage                      umjerene                      jake                      izrazito jake
- A12. ležali u krevetu (okretali se s koljenima u istom položaju)  
 nimalo                      blage                      umjerene                      jake                      izrazito jake
- A13. ulazili ili izlazili iz kade ili ispod tuša  
 nimalo                      blage                      umjerene                      jake                      izrazito jake
- A14. sjedili  
 nimalo                      blage                      umjerene                      jake                      izrazito jake
- A15. sjedali ili ustajali sa WC školjke  
 nimalo                      blage                      umjerene                      jake                      izrazito jake

Molimo Vas da navedete koliko ste velike poteškoće imali **prošlog tjedna** zbog svojih problema s koljenom dok ste činili sljedeće:

A16. teške kućanske poslove (pomicanje teških kutija, ribanje podova, itd.)

nimalo                      blage                      umjerene                      jake                      izrazito jake  
                                                                                       

A17. lakše kućanske poslove (kuhanje, brisanje prašine, itd.)

nimalo                      blage                      umjerene                      jake                      izrazito jake  
                                                                                       

### Funkcioniranje u sportskim i slobodnim aktivnostima

Sljedeća pitanja se odnose na Vaše fizičko funkcioniranje kada ste aktivni na višoj razini. Na pitanja treba odgovoriti u smislu koliko ste velike poteškoće imali **prošlog tjedna** zbog svojih problema s koljenom dok ste činili sljedeće:

SP1. čučali

nimalo                      blage                      umjerene                      jake                      izrazito jake  
                                                                                       

SP2. trčali

nimalo                      blage                      umjerene                      jake                      izrazito jake  
                                                                                       

SP3. skakali

nimalo                      blage                      umjerene                      jake                      izrazito jake  
                                                                                       

SP4. okretali se u povrijeđenom koljenu

nimalo                      blage                      umjerene                      jake                      izrazito jake  
                                                                                       

SP5. klečali

nimalo                      blage                      umjerene                      jake                      izrazito jake  
                                                                                       

### Kvaliteta života

Q1. Koliko često mislite na svoje probleme s koljenom?

nikada                      bar jednom mjesečno                      bar jednom tjedno                      bar jednom dnevno                      stalno  
                                                                                       

Q2. Da li ste promijenili svoj način života kako biste izbjegli aktivnosti koje bi mogle štetiti Vašem koljenu?

nimalo                      malo                      umjereno                      puno                      potpuno  
                                                                                       

Q3. Koliko Vas smeta što se ne možete pouzdati u svoje koljeno?

nimalo                      malo                      umjereno                      jako                      izrazito jako  
                                                                                       

Q4. Općenito, koliko imate problema s koljenom?

nimalo                      malo                      umjereno                      puno                      izrazito puno  
                                                                                       

**Puno Vam hvala što ste odgovorili na sva pitanja ovog upitnika.**

**Prilog 2. WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index)**  
 upitnik za procjenu subjektivnog kliničkog stanja bolesnika s osteoartritisom koljena

Ime i prezime: \_\_\_\_\_

Datum: \_\_\_\_\_

**WOMAC OSTEOARTHRITIS INDEX**

1. Sljedeća pitanja odnose se na količinu boli koju trenutno osjećate u koljenima. Za svaku od navedenih situacija, molimo Vas da unesete stupanj boli koji ste osjetili u posljednjih 48 sati.

		nikakva	blaga	umjerena	snažna	izrazito snažna
A. Hodanje po ravnoj površini	A.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
B. Uspon ili silazak po stepenicama	B.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C. Tijekom noći u krevetu	C.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
D. Sjedeći ili ležeći	D.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
E. Stojeći uspravno	E.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

2. Opišite stupanj boli koji ste osjetili u posljednjih 48 sati u svakome koljenu pojedinačno.

		nikakva	blaga	umjerena	snažna	izrazito snažna
A. Desno koljeno	A.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
B. Lijevo koljeno	B.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

3. Koliko je snažna ukočenost ujutro tik nakon što se probudite?

nikakva	blaga	umjerena	snažna	izrazito snažna
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

4. Koliko je snažna ukočenost nakon sjedenja, ležanja ili odmaranja kasnije tijekom dana?

nikakva	blaga	umjerena	snažna	izrazito snažna
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

5. Sljedeća pitanja odnose se na Vaše mogućnosti za izvođenje fizičke aktivnosti. Pritom se misli na mogućnosti kretanja i brige za sebe. Za svaku od sljedećih aktivnosti upišite u kojem stupnju Vam je navedena aktivnost bila otežana za izvršiti u posljednjih 48 sati, a da je uzrok poteškoće bilo Vaše koljen-o/-a.

U kojem stupnju Vam je bilo otežano izvršiti:

		bez poteškoća	blago	umjereno	jako	iznimno jako
A. Silazak niz stepenice	A.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
B. Uspon po stepenicama	B.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C. Ustanjanje iz sjedećeg položaja	C.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
D. Uspravno stajanje	D.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
E. Saginjanje do poda	E.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
F. Hodanje po ravnoj površini	F.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
G. Ulazak/izlazak u/iz auta	G.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
H. Odlazak u kupovinu	H.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
I. Oblačenje čarapa	I.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
J. Ustajanje iz kreveta	J.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
K. Svlačenje čarapa	K.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
L. Ležanje u krevetu	L.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
M. Ulazak/izlazak u/iz kade	M.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
N. Sjedenje	N.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
O. Sjedenje ili ustajanje na WC školjku	O.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
P. Teški kućanski poslovi kao npr. košenje trave, nošenje teških vrećica)	P.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Q. Lakši kućanski poslovi kao npr. čišćenje sobe, brisanje prašine, kuhanje	Q.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Prilog 3.** Vizualno analogna skala (VAS) za procjenu boli u mirovanju i kretanju kod ispitanika u istraživanju



Ime i prezime: \_\_\_\_\_ Datum rođenja: \_\_\_\_\_

Identifikacijska oznaka: \_\_\_\_\_

Datum ispunjavanja: \_\_\_\_\_

**Vizualno analogna skala (VAS) intenziteta boli**

**LJEVO koljeno**

	bez boli		blaga bol		umjerena bol			jaka bol		neizdrživa bol	
VAS u mirovanju	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
VAS u kretanju	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

**DESNO koljeno**

	bez boli		blaga bol		umjerena bol			jaka bol		neizdrživa bol	
VAS u mirovanju	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
VAS u kretanju	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Ime i prezime liječnika: \_\_\_\_\_

Potpis liječnika: \_\_\_\_\_

Sv. Katarina, specijalna bolnica za ortopediju, kirurgiju, internu medicinu, neurologiju, fizikalnu medicinu i rehabilitaciju, ginekologiju i opstetriciju, dentalnu medicinu i medicinsku biokemiju

Bračak 8, 49210 Zabok, Hrvatska, T +385 49 296 600, F +385 49 296 699, OIB: 41170172944, MB: 2683016  
Poslovna jedinica Zagreb - Branimirova 71 E, 10000 Zagreb, Hrvatska, T +385 1 286 7400, F +385 1 286 7499  
Sv. Katarina Dental Centar - Radnička cesta 48, 10000 Zagreb, Hrvatska, T +385 1 286 74 74

Žiro računi: Privredna banka d.d., IBAN: HR25 2340 0091 1106 1660 5, SWIFT: PBZGHR2X  
Zagrebačka banka d.d., IBAN: HR12 2360 0001 1025 5259 4, SWIFT: ZABHR2X

info@svkatarina.hr  
[www.svkatarina.hr](http://www.svkatarina.hr)