

OSTEOINDUKTIVNI UČINAK DEKSAMETAZONA NA DIFERENCIJACIJU Ljudskih MEZENHIMSKIH MATIČNIH STANICA U PEPTIDNOM HIDROGELU IN VITRO I IN VIVO

Požgaj, Lidija

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:747640>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Lidija Požgaj

**OSTEOINDUKTIVNI UČINAK
DEKSAMETAZONA NA DIFERENCIJACIJU
LJUDSKIH MEZENHIMSKIH MATIČNIH
STANICA U PEPTIDNOM HIDROGELU *IN*
VITRO I *IN VIVO***

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Lidija Požgaj

**OSTEOINDUCTIVE EFFECT OF
DEXAMETHASONE ON *IN VITRO* AND *IN
VIVO* HUMAN MESENCHYMAL STEM
CELLS DIFFERENTIATION IN PEPTIDE
HYDROGEL**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024.

Ovaj doktorski rad izrađen je na Biološkome odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu i Selviti d.o.o. za istraživanje i razvoj, pod vodstvom prof. dr. sc. Inge Urlič, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Inga Urlić je rođena 26. veljače 1974. godine u Splitu. Diplomirala je na Biološkom odsjeku PMF-a Sveučilišta u Zagrebu 1998. godine s temom "*Optimizacija metode lančane reakcije polimerazom za brzu detekciju sindroma fragilnog X kromosoma u bolesnika s mentalnom retardacijom*" te doktorirala na Biološkom odsjeku PMF-a Sveučilišta u Zagrebu 2005. godine s temom "*Utjecaj transkripcijskih faktora Dlx3, Dlx5 i Dlx6 na diferencijaciju osteoblasta*". Od 1999. do 2002. godine radila je kao istraživač na University of Connecticut Health Centre, Farmington, SAD; od 2004. do 2010. godine je radila kao znanstvena novakinja-asistentica/viša asistentica na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 2010. godine radi kao docentica na Zavodu za molekularnu biologiju, Biološkog odsjeka PMF-a. Od 2019. godine zaposlena je na znanstveno-nastavnom radnom mjestu izvanredne profesorice. Vodila je više kompetitivnih istraživačkih projekata (MZOS, BICRO, HRZZ), 2 istraživačke donacije (HAZU, HEP), 2 stručna projekta (Mobis d.o.o., PMF) te je kao dio većeg konzorcija vodila radne pakete PMF-a unutar 1 projekta Obzor2020. Koautorica je 39 radova citiranih u bazi *Web of Science Core Collection* te 39 radova citiranih u bazi *Scopus*. Sudjelovala je na kongresima s 59 sažetaka u zbornicima i časopisima, a bila je i pozvani predavač na sedam znanstvenih skupova. Područje njenog znanstvenog i stručnog djelovanja je biomedicina s fokusom na biologiju tumora te tkivno inženjerstvo - regeneracija kosti i hrskavice. Od 2004. godine sudjeluje u nastavi koja se izvodi na PMF-u uključujući predavanja, praktikume i seminare. Voditeljica je dva obavezna kolegija - Mutageneza i karcinogeneza i Metode istraživanja u molekularnoj biologiji, te dva izborna kolegija - Biologija matičnih stanica i Uvod u forenzičku biologiju. Na Fakultetu kemijskog inženjerstva i biotehnologije Sveučilišta u Zagrebu je sudjelovala u nastavi kolegija Biologija od 2015. do 2020. godine. Na Fakultetu elektrotehnike i računarstva, od 2022. godine, sudjeluje u izvođenju kolegija Uvod u molekularnu biologiju i genetiku. Mentorirala je 20 diplomskih radova i 5 doktorskih disertacija. Članica je Odbora za bioetiku i dobrobit životinja PMF-a, Gospodarskog savjeta PMF-a te je imenovana koordinatoricom PMF-a za studente s invaliditetom i koordinatoricom PMF-a za ranjive skupine studenata. Članica je sveučilišnog Povjerenstva za studente s invaliditetom, Hrvatskog biološkog društva, Tissue Engineering and Regenerative Medicine Society, International Society of Applied Biological Sciences te Hrvatskoga društva za istraživanje raka koje je dio društva European Association for Cancer Research.

Zahvaljujem dragoj mentorici prof. dr. sc. Ingi Urlič na strpljenju, uloženoj energiji i savjetima tijekom izrade i pisanja doktorskog rada. Počelo je kao poslovna suradnja, a rezultiralo je prijateljstvom za čitav život.

Veliko hvala prof. dr. sc. Vesni Eraković Haber na odvojenom vremenu i za sve vrijedne savjete tijekom pisanja doktorskog rada. Hvala što ste mi prenijeli ljubav prema poslu i što svakodnevno svoje znanje nesebično dijelite samnom. Zbog Vas pomičem vlastite granice. Hvala što vjerujete u mene!

Mnogi kolege doprinijeli su direktno ili indirektno ovome radu i zbog toga im veliko hvala.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji, svojim roditeljima Đurđici i Dragutinu na neizmjerne ljubavi, podršci i odricanju.

Hvala Tomislavu što mi je vratio vjeru u ljude. Hvala ti što si uvijek tu, jer ne znam gdje bih danas bila da mi nije bilo tebe.

Posvećeno mojoj djeci, Ani i Andriji.

Mama

**OSTEOINDUKTIVNI UČINAK DEKSAMETAZONA NA DIFERENCIJACIJU
LJUDSKIH MEZENHIMSKIH MATIČNIH STANICA U PEPTIDNOM HIDROGELU
*IN VITRO I IN VIVO***

Lidija Požgaj

Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zavod za molekularnu biologiju
Selvita d.o.o., za istraživanje i razvoj

Koštana oboljenja postaju veliki socioekonomski problem u kontekstu starenja stanovništva. Stoga postoji sve veća potreba za novim metodama liječenja koštanih oboljenja poput regenerativne ortopedije kojoj je glavni cilj obnova oštećenog koštanog tkiva između ostalog i ugradnjom tzv. bioloških nosača. Ranija istraživanja pokazuju da deksametazon u kulturama stanica potiče diferencijaciju ljudskih mezenhimskih matičnih stanica u osteoblaste. Glavni cilj ovog doktorskog rada bio je ispitati može li se deksametazon koristiti kao biosignalna molekula, ugrađena unutar hidrogel nosača RADA 16-I te posjeduje li osteogeni učinak na diferencijaciju ljudskih mezenhimskih matičnih stanica u dinamičnom sustavu perfuzijskog bioreaktora i modelu *in vivo* (ektopičan rast kosti). Rezultati pokazuju da deksametazon ugrađen unutar hidrogela RADA 16-I posjeduje osteogeni učinak i da ljudske mezenhimske matične stanice diferenciraju u osteoblaste ovisno o koncentraciji deksametazona. Nosač koji kombinira hidrogel RADA 16-I, deksametazon i ljudske mezenhimske matične stanice mogao bi imati veliki potencijal za primjenu u području regenerativne ortopedije i liječenju koštanih oboljenja u budućnosti.

(83 stranice, 23 slike, 5 tablica, 178 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: kost, deksametazon, hidrogel, ljudske mezenhimske matične stanice, osteoblast, bioreaktor

Mentor: prof. dr. sc. Inga Urlić

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Maja Matulić, prof. dr. sc. Petra Korać, nasl. prof. dr. sc. Vesna Eraković Haber, dr. med.

**OSTEOINDUCTIVE EFFECT OF DEXAMETHASONE ON *IN VITRO* AND *IN VIVO*
HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS DIFFERENTIATION IN PEPTIDE
HYDROGEL**

Lidija Požgaj

Faculty of Science, Department of Biology, Division of molecular biology, University of
Zagreb, Selvita d.o.o.

Bone diseases are becoming a major socioeconomic problem due to the aging of the population. Therefore, the need for new methods in the field of regenerative orthopaedics is increasing. The main goal of regenerative orthopaedics is to restore damaged bone tissue using various principles, like biological scaffolds. Prior studies shows that dexamethasone in cell culture promotes the differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts.

The main goal of this doctoral thesis is to demonstrate that dexamethasone can be used as a bioactive molecule, embedded within the RADA 16-I hydrogel carrier, and that it possesses osteogenic potential for the differentiation of human mesenchymal stem cells, both in a dynamic perfusion bioreactor system and an *in vivo* model for ectopic bone growth.

The results show that dexamethasone incorporated within the RADA 16-I hydrogel possesses osteogenic potential and that human mesenchymal stem cells differentiate into osteoblasts depending on the concentration of dexamethasone. A scaffold that combines hydrogel RADA 16-I, dexamethasone and human mesenchymal stem cells could have great potential for application in the field of regenerative orthopaedics and in the treatment of bone diseases in the future.

(83 pages, 23 figures, 5 tables, 178 references, original in Croatian)

Keywords: bone, dexamethasone, hydrogel, human mesenchymal stem cells, osteoblasts, bioreactor

Supervisor: Inga Marijanović, PhD, Professor

Reviewers: Maja Matulić, PhD, Professor, Petra Korać PhD, Professor, Vesna Eraković Haber, MD, PhD, Professor

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. LITERATURNI PREGLED | 3 |
| 2.1. Koštani sustav | 3 |
| 2.1.1. Razvoj i građa kosti | 3 |
| 2.1.2. Koštana pregradnja | 7 |
| 2.1.3. Koštano tkivo | 7 |
| 2.1.3.1. Osteoblasti | 7 |
| 2.1.3.1.1. Signalni putevi u osteogenezi | 9 |
| 2.1.3.1.2. Uloga citokina u osteogenezi | 13 |
| 2.1.3.2. Osteociti | 13 |
| 2.1.3.3. Osteoklasti | 14 |
| 2.1.3.3.1. Uloga osteoklasta | 16 |
| 2.2. Regenerativna medicina koštanog tkiva | 17 |
| 2.2.1. Tkivno inženjerstvo kosti | 18 |
| 2.2.1.1. Nosači | 18 |
| 2.2.1.1.1. Nosači od prirodnih materijala | 19 |
| 2.2.1.1.2. Nosači od sintetskih materijala | 19 |
| 2.2.1.1.3. Nosači od kompozitnih materijala | 20 |
| 2.2.1.1.4. Hidrogelovi | 20 |
| 2.2.1.2. Stanice | 22 |
| 2.2.1.2.1. Mezenhimske matične stanice | 22 |
| 2.2.1.3. Bioreaktori | 23 |
| 2.2.1.4. Signalne (bioaktivne) molekule kao osteoinduktivni signali | 25 |
| 2.2.1.5. Životinjski modeli u tkivnom inženjerstvu kosti | 28 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 31 |
| 3.1. Izolacija i propagacija ljudskih mezenhimskih matičnih stanica | 31 |
| 3.2. Analiza utjecaja deksametazona na morfologiju hidrogel nosača RADA 16-I pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa | 31 |
| 3.3. Otpuštanje deksametazona s hidrogel nosača RADA 16-I | 32 |
| 3.4. Priprema hidrogel nosača RADA 16-I s deksametazonom | 32 |
| 3.5. Trodimenzionalna stanična kultura u perfuzijskom bioreaktoru | 33 |

| | |
|---|----|
| 3.6. Analiza novonastalog tkiva u bioreaktoru pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa | 34 |
| 3.7. Histološke analize novonastalog tkiva u bioreaktoru | 35 |
| 3.8. Imunohistokemijsko bojanje novonastalog tkiva u bioreaktoru | 35 |
| 3.9. Izolacija ukupne RNA i analiza ekspresije gena metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu iz tkiva nastalog u perfuzijskim bioreaktorima | 36 |
| 3.10. Detekcija i kvantifikacija minerala | 37 |
| 3.11. Implantacija Nosača II u imunokompromitirane miševe | 38 |
| 3.12. Izolacija ukupne RNA i analiza ekspresije gena metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu iz tkiva nastalog u imunokompromitiranim miševima..... | 39 |
| 4. REZULTATI..... | 40 |
| 4.1. Izolacija ljudskih mezenhimskih matičnih stanica | 40 |
| 4.2. Karakterizacija hidrogel nosača RADA 16-I s deksametazonom i otpuštanje deksametazona s nosača | 40 |
| 4.3. Određivanje biološkog potencijala hidrogel nosača RADA 16-I i uspješnosti nasađivanja humanih mezenhimalnih matičnih stanica na nosač..... | 43 |
| 4.4. Analiza morfologije novonastalog tkiva u bioreaktoru pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa..... | 44 |
| 4.5. Histološka i imunohistokemijska analiza tkiva nastalog na hidrogel nosaču RADA 16-I s inkorporiranim deksametazonom..... | 45 |
| 4.6. Genska ekspresija koštanih markera u novonastalim tkivima nakon osteogene diferencijacije u perfuzijskom bioreaktoru | 48 |
| 4.7. Utvrđivanje prisustva minerala i njihova kvantifikacija..... | 50 |
| 4.8. Analiza ektopičnog koštanog tkiva nastalog u imunodeficientnim miševima | 51 |
| 5. RASPRAVA..... | 54 |
| 6. ZAKLJUČCI | 63 |
| 7. LITERATURA | 64 |
| 8. POPIS KRATICA | 78 |
| 9. ŽIVOTOPIS | 83 |

1. UVOD

Koštani sustav je specijalizirani oblik vezivnog tkiva koje je potpora cijelome organizmu, ima važnu ulogu u održavanju motorike, posjeduje hematopoetsku ulogu i štiti unutarnje organe (Clarke i sur., 2008.). Koštano tkivo stalno je izloženo mehaničkim podražajima, a regeneracija kosti je normalan proces koji se kontinuirano ponavlja (Masquelet i sur., 2010.). Uz jetru, koštano tkivo je jedino tkivo koje može nakon oštećenja spontano zacijeliti i vratiti svoju funkciju bez ostavljanja ožiljka zahvaljujući biološkim svojstvima poput dobre vaskularizacije i stalne pregradnje kosti. Oštećenja kosti mogu biti posljedica traume, infekcije, tumora ili nekog drugog patološkog procesa. Oštećenje kosti može samostalno zacijeliti i regenerirati se, ali samo ako je ozljeda ispod kritične veličine (približno < 2 cm) ili ako je gubitak obujma kosti manji od 50 % (Keating i sur., 2005.). U suprotnome, veća ozljeda uzrokuje nezarastanje, pogrešno srastanje ili patološku frakturu (Annamalai i sur., 2019.). Kada velika koštana oštećenja ne mogu zarasti spontano liječnici koriste različite strategije kako bi potaknuli i ubrzali cijeljenje. Transplantacija kosti je druga po učestalosti vrsta transplantacije u svijetu, odmah nakon transfuzije krvi, stoga u svijetu postoji velika potreba za koštanim presadcima. Istovremeno, raspoloživost adekvatnih koštanih presađaka je vrlo ograničena što dodatno potiče razvoj tkivnog inženjerstva i novih metoda za uzgoj koštanog tkiva u uvjetima *in vitro*. Glavni cilj tkivnog inženjerstva kosti je potaknuti funkcionalnu regeneraciju kosti koristeći sinergistički učinak biomaterijala, stanica i biosignalnih molekula.

Ovaj doktorski rad doprinosi novim saznanjima u području tkivnog inženjerstva kosti kroz pokušaj odgovora na pitanje da li deksametazon ugrađen na hidrogel nosač RADA 16-I usmjerava diferencijaciju ljudskih mezenhimskih matičnih stanica (hMSCs, prema engl. *human mesenchymal stem cells*) izoliranih iz koštane srži prema osteoblastima u pretkliničkim modelima *in vitro* i *in vivo*. Vođeni pretpostavkom da deksametazon u kulturama stanica *in vitro* regulira diferencijaciju hMSCs u osteoblaste (Song i sur., 2009.), hipoteza doktorske disertacije je da će deksametazon ugrađen na hidrogel nosač RADA 16-I nosač poboljšati osteogenu diferencijaciju hMSCs izoliranih iz koštane srži u modelima *in vitro* i *in vivo*.

Glavni cilj istraživanja bio je utvrditi osteoinduktivni potencijal deksametazona u diferencijaciji ljudskih mezenhimskih matičnih stanica.

U tu svrhu, deksametazon je ugrađen u nosač načinjen od peptidnog hidrogela RADA 16-I, a njegov osteoinduktivni potencijal testiran je u 2 sustava – perfuzijskom bioreaktoru koji predstavlja sustav *in vitro* i modelu ektopičnog rasta kosti na mišu kao sustavu *in vivo*.

Specifični ciljevi istraživanja su:

1. Ugradnja deksametazona u peptidni hidrogel, analiza morfologije nosača na skenirajućem elektronskom mikroskopu te mjerenje kinetike otpuštanja deksametazona mjerenjem apsorbanije.
2. Uzgoj koštanog tkiva u perfuzijskom bioreaktoru i analiza osteoindukcije praćenjem morfologije tkiva histološkim metodama i markera osteogeneze metodom RT-qPCR. Temeljem provedenih analiza, odabrat će se optimalna koncentracija deksametazona u nosaču za indukciju osteogeneze.
3. Uzgoj koštanog tkiva u modelu za ektopično formiranje kosti *in vivo* koristeći peptidni hidrogel RADA 16-I s optimalnom koncentracijom deksametazona. Uspješnost osteoindukcije se utvrđuje praćenjem morfologije tkiva histološkim metodama i markera osteogeneze metodom RT-qPCR.

Diferencijacija hMSCs u osteoblaste u tkivima nastalima u perfuzijskom bioreaktoru analizirana je praćenjem markera osteogeneze metodom kvantitativne polimerazne lančane reakcije u stvarnom vremenu (RT-qPCR, prema engl. *Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*) te imunohistokemijskim bojanjem. Struktura tkiva analizirana je histološkim metodama (bojanje hematoksilin-eozin i azilarin red), a skenirajućim elektronskim mikroskopom promatrane su morfološke karakteristike stanica, prisutnost ekstracelularnog matriksa i minerala- tri najvažnije komponente koštanog tkiva. U svrhu potvrđivanja osteogenog potencijala deksametazona ugrađenog u hidrogel RADA 16-I, nosač s optimalnom koncentracijom deksametazona određen u pokusima *in vitro*, implantiran je subkutano u imunodeficijentne miševе. Analizom koštanog tkiva metodom RT-qPCR nastalog u ektopičnom modelu *in vivo* pokazan je osteogeni potencijal deksametazona inkorporiranog unutar hidrogel nosača RADA 16-I.

Unatoč velikom napretku, u području tkivnog inženjerstva kosti još uvijek postoje brojni limitirajući faktori i nedostaci, stoga bi saznanje da je osteogeneza moguća na hidrogel nosačima RADA 16-I s inkorporiranim deksametazonom moglo imati potencijal za kliničku primjenu.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Koštani sustav

Koštani sustav je specijalizirani oblik vezivnog tkiva koje je potpora cijelom ljudskom organizmu.

Kost, zajedno s hrskavicom, ima tri osnovne funkcije: zaštitnu (štiti vitalne organe i koštanu srž), metaboličku (djeluje kao rezerva iona, osobito kalcija i fosfata, s ciljem održavanja ravnoteže njihove koncentracije u serumu) te mehaničku (služi kao hvatište mišića kod pokretanja). Koštano tkivo građeno je od različitih tipova stanica porijeklom iz mezenhima, kao što su osteoblasti, hondrociti, stromalne stanice koštane srži i adipociti. Svi navedeni tipovi stanica porijeklom su od zajedničkih mezenhimskih progenitora (Grigoriadis i sur., 1988.) koji su kasnije nazvani multipotentnim matičnim mezenhimskim progenitorima (Pittenger i sur., 1999.). Druga komponenta koštanog tkiva je izvanstanični matriks.

Koštani sustav stalno je izložen velikim opterećenjima te se stoga tijekom života koštano tkivo mora pregrađivati i obnavljati. Tu zadaću izvršavaju osteoblasti, osteociti i osteoklasti, tri glavna tipa koštanih stanica, koje razgrađuju stare i oštećene dijelove kosti i izgrađuju novu kost (Kearns i sur., 2008). Proces preoblikovanja kostiju uvjetovan je interakcijom hormona i mehaničkih podražaja i upravo je njihova ravnoteža važna za normalno funkcioniranje kosti (Eriksen 2010.). Proces kojim se dijelovi koštanog tkiva zamjenjuju novoizgrađenim koštanim tkivom naziva se koštanom pregradnjom. Njezin je cilj izmjena starih i dotrajalih dijelova novom, kvalitetnom kosti, a nastaje kao odgovor na tjelesnu aktivnost (Rowe i sur., 2018.). Povećani napori potiču koštanu pregradnju pa se tako koštano tkivo učvršćuje i povećava se otpornost na veća opterećenja (Eriksen 2010.). Koštana pregradnja također osigurava otpuštanje kalcija i ostalih minerala iz kosti u cirkulaciju što je nužno za održavanje optimalne koncentracije kalcija u krvi i odvijanje niza važnih procesa u tijelu (Rowe i sur., 2018.).

2.1.1. Razvoj i građa kosti

Tijekom embrionalnog razvoja, kosti se razvijaju iz embrionalnog vezivnog tkiva. Proces osifikacije odvija se na dva načina: intramembranskom ili endohondralnom osifikacijom te osifikacijom neovisnom o embrionalom porijeklu (St-Jacques i sur., 1999.). Osifikacija se nastavlja i u postnatalnom periodu.

Intramembranska osifikacija započinje zgušnjavanjem mezenhima u dobro prokrvljenim područjima koja se nazivaju centri osifikacije. U procesu intramembranske osifikacije dolazi do diferencijacije kondenziranih mezenhimskih stanica u progenitore osteoblastične loze. Ovim

procesom razvijaju se pločaste kosti krova lubanje, neke kosti visceralnog dijela lubanje i dio ključne kosti.

Kod intramembranske osifikacije iz mezenhimskih stanica u prvoj fazi dolazi do hipertrofije hondrocita koju kontroliraju faktori rasta (St-Jacques i sur., 1999.) čime se formira hrskavica. Koštano tkivo se stvara u drugoj fazi, obilježenoj prodorom krvnih žila u hrskavični model koji zbog toga propada.

Hipertrofični hondrociti okruženi su kalcificiranim izvanstaničnim matriksom bogatim kolagenom X. Takva struktura dovodi do vaskularizacije hrskavice iz koštanog oboda (St-Jacques i sur., 1999), što ima za posljedicu povećanje količine kisika, mineralizaciju hrskavice i propadanje hondrocita. Krvlju u mineralizirani matriks dopijevaju monocitno-makrofagne prekursorske stanice (za osteoklaste i hondroklaste) i prekursori osteoblasta.

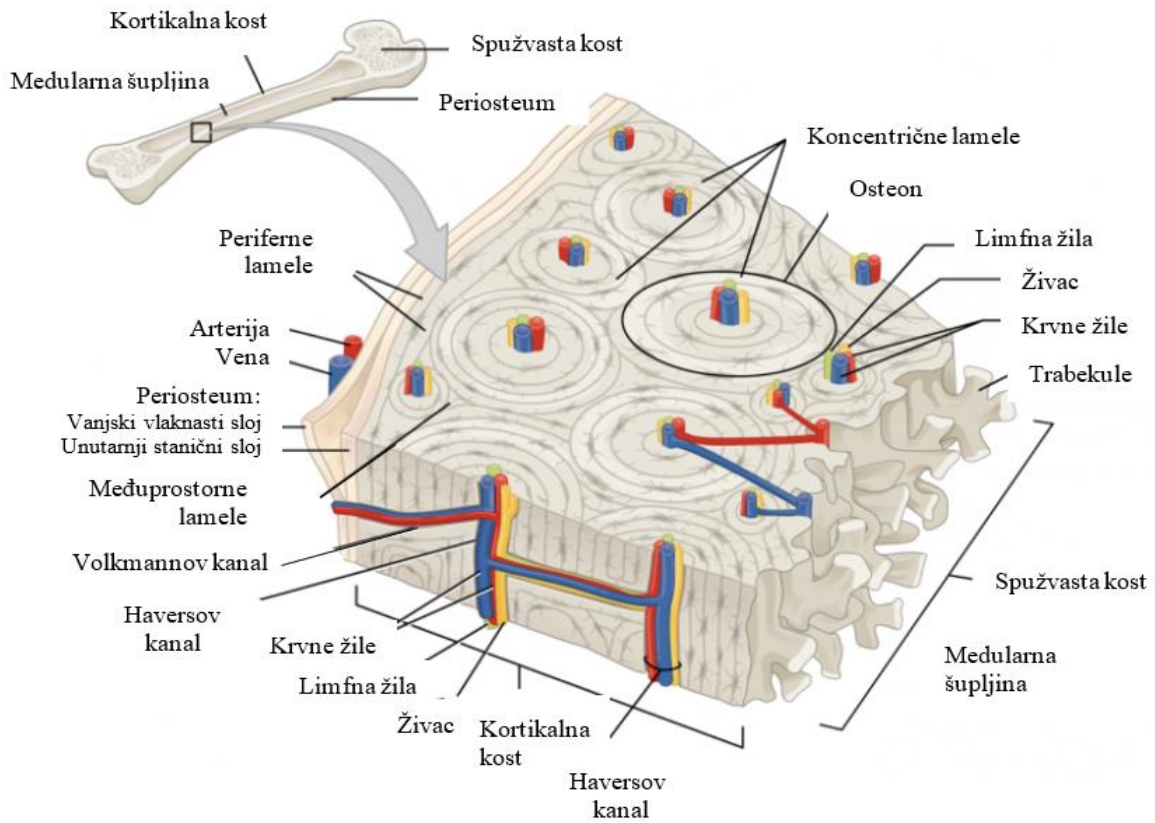
Hondroklasti razaraju mineralizirani hrskavični matriks. Gubitkom hondrocita hrskavica u potpunosti propada i u njoj se pojavljuju šupljine. Povećana količina kisika kao posljedica prodora krvnih žila potiče diferencijaciju kambijskih stanica u osteoblaste (intramembranska osifikacija), a perihondrij postaje periost (Safadi FF i sur., 2009.). Novonastali osteoblasti započinju lučiti kolagen tipa 1 te slijedi proces stvaranja kosti na hrskavičnim epifizalnim pločama rasta. Konačno, hondrociti odumiru apoptozom, a istovremeno dolazi do diferencijacije osteoblasta, njihove proliferacije i stvaranja koštanog matriksa. Konačni rezultat je da se hrskavica u potpunosti zamjenjuje koštanim tkivom. Ovim procesom nastaju gotovo sve osovinske kosti (lat. *skeleton axiale*) i duge kosti (lat. *skeleton appendic ulare*) (Safadi FF i sur., 2009.).

Zrelo ili lamelarno koštano tkivo je najzastupljenije u odraslih organizama. Ono pokazuje pravilnost u rasporedu elemenata međustanične tvari i stanica. Mikroskopskim pregledom lamelnog koštanog tkiva uočava se pravilnost u međusobno paralelnom rasporedu koštanih lamela debljine 5–10 µm. U pojedinoj koštanoj lameli nalaze se šupljine u kojima su trupovi osteocita. Šupljine su međusobno povezane kanalićima (lat. *canaliculi ossei*) koji sadrže citoplazmatske izdanke osteocita (Safadi FF i sur., 2009.). Osteociti su međusobno u kontaktu koji se ostvaruje preko njihovih citoplazmatskih izdanaka. Šupljine u pojedinoj lameli povezane su brojnim kanalićima, dok su šupljine susjednih lamela povezane s manjim brojem kanalića. Dva su oblika koštane tvari koji se međusobno razlikuju u rasporedu lamela. Različita morfologija određuje im specifična biomehanička svojstva i poziciju u pojedinoj kosti. U nazivima tih dviju koštanih tvari, spužvasta (trabekularna) koštana tvar i kompaktna (čvrsta) koštana tvar, istaknute su njihove bitne karakteristike (Safadi FF i sur., 2009.).

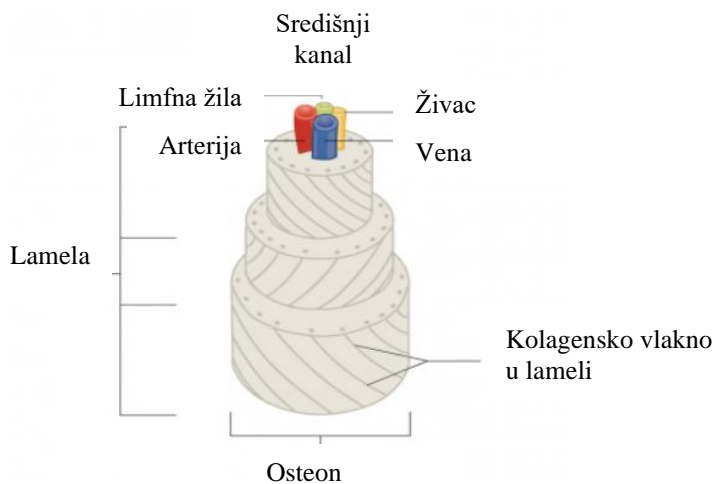
U spužvastoj koštanoj tvari koštano tkivo oblikuje koštane gredice različitih dimenzija. Prostore između gredica spužvaste tvari ispunjava koštana srž kao izvor prekursora hematopoetske loze. Upravo trabekularna kost u metafizi daje unutrašnju stabilnost kosti te je zadužena za metaboličku funkciju kosti (Fridenshtein, 1991.). Čitava medularna šupljina ispunjena je koštanom srži koju čini stroma. U stromi se nalaze mezenhimske matične stanice koje mogu diferencirati u stanice koštanog tkiva i krvnih žila. Osim mezenhimijskih matičnih stanica, koštana srž bogata je i krvotvornim stanicama koje, nakon što dozriju, odlaze u cirkulaciju (Fridenshtein, 1991.).

Kompaktna koštana tvar prekriva površinu svih kostiju, čvrsta je i nema šupljine ispunjene koštanom srži. Kompaktna koštana tvar gradi površinske dijelove svih kostiju i stoga se, u tim područjima, naziva kortikalna kost (Safadi FF i sur., 2009.) (Slika 1).

Kompaktna kost (korteks) sastoji se od osteona (Slika 2) kroz čije središte prolaze longitudinalni kanali u kojima se nalaze krvne žile i živčane stanice, tzv. Haversovi kanali (Slika 1). Svaki od tih kanala okružen je slojevima koštanog matriksa u kojem se nalaze pojedinačni osteociti u šupljinama koštanog matriksa, lakunama (Monier-Faugere i sur., 1999.) (Slika 1 i Slika 2). Lakune su međusobno povezane uskim kanalićima, kanalikulima, u kojima se nalaze citoplazmatski izdanci osteocita te kapilare koje opskrbljuju osteocite kisikom i hranjivim tvarima. Nutritivne žile ulaze u kost poprečnim Volkmannovim kanalima i dalje sve do manjih žila Haversovih kanala (Monier-Faugere i sur., 1999.). Epifize dugih kostiju krajnja su proširenja koja su građena od spužvaste kosti prekrivene tankim slojem kompaktne kosti. Srednji cilindrični dio kosti zove se dijafiza i građen je od kompaktne kosti i spužvaste s unutrašnje strane, oko šupljine koštane srži (Safadi FF i sur., 2009.) (Slika 1).



Slika 1. Poprečni presjek prikaza kompaktne kosti. Preuzeto i prilagođeno s <https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/6-3-bone-structure>.



Slika 2. Prikaz osteona, najmanje strukturne jedinice kosti. Preuzeto i prilagođeno s <https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/6-3-bone-structure>.

2.1.2. Koštana pregradnja

U svrhu održavanja strukture koštanog tkiva i biomehaničke funkcije, prilagodbe prema mehaničkim podražajima i zbog popravaka mikrooštećenja, kosti se kontinuirano pregrađuju (engl. *bone remodeling*). Proces pregradnje uključuje niz precizno reguliranih i povezanih staničnih i molekularnih procesa koji omogućuju koordiniranu aktivnost osteocita, osteoblasta i osteoklasta.

Prva faza koštane pregradnje je inicijacija i razgradnja (resorpcija) kosti, za koju su odgovorni osteoklasti koji djeluju na površini koštanih gredica. U toj fazi dolazi do malih oštećenja koja osteoklasti osjete što dovodi do otpuštanja parakrinih faktora koji povećavaju lokaliziranu angiogenezu i privlačenje prekursora osteoklasta. Počinje osteoklastogeneza i formira se „sealing“ zona (Eriksen 2010.). Nakon dovršenja resorpcije kosti, osteoklasti odumiru apoptozom. Osteoblasti direktno suprimiraju diferencijaciju osteoklasta lučenjem osteoprotegerina (OPG, prema engl. *osteoprotegerin*) (Kearns i sur., 2008). Sljedeća faza je izgradnja kosti pod utjecajem osteoblasta koji kolagenom ispunjavaju udubine nastale razgradnjom kosti. U mrežu kolagenih vlakana odlažu se minerali te ciklus koštane pregradnje završava mineralizacijom kosti. Potpuna ravnoteža u procesu koštane pregradnje postoji onda kad se razgrađeno koštano tkivo u potpunosti nadomjesti novim. U zdravom organizmu razdoblje resorpcije traje u prosjeku od 30 - 40 dana, a izgradnja kosti odvija se u razdoblju od 150 dana (Eriksen 1984.). U prisustvu bolesti, kao što je na primjer osteoporoza, osteoblasti ne mogu u potpunosti ispuniti „sealing“ zonu što dovodi do gubitka kosti sa svakim događajem remodeliranja (Eriksen 1990.).

2.1.3. Koštano tkivo

2.1.3.1. Osteoblasti

Osteoblasti su stanice mezenhimskog podrijetla odgovorne za stvaranje (sinteza i sekrecija većine proteina izvanstaničnog matriksa) i održavanje koštanog tkiva (ekspimiranje gena potrebnih za mineralizaciju izvanstaničnog matriksa) (Huang i sur., 2007.). Diferencijacija mezenhimskih matičnih stanica u osteoblaste kontrolirana je djelovanjem različitih citokina i transkripcijskih faktora čija se ekspresija mijenja tijekom procesa diferencijacije (Slika 3).

Progenitori loze osteoblasta prolaze kroz tri razvojna stadija: 1. proliferaciju, 2. proizvodnju izvanstaničnog matriksa i dozrijevanje koštanog matriksa, te 3. mineralizaciju matriksa (Amarasekara i sur., 2021.).

Na početku diferencijacije dolazi do povećane ekspresije transkripcijskog faktora 2 ovisnog o Runt (Runx2, prema engl. *runt related transcription factor 2*) na mjestima gdje će se formirati

koštano tkivo (Rutkovskiy i sur., 2016.). Runx2 je poznati rani marker osteogeneze, koji usmjerava mezenhimske matične stanice prema osteoblastičnoj lozi. Ekspimiraju ga hondrociti i osteoblasti te ima važnu ulogu u hondrogenezi i osteogenezi (Rutkovskiy i sur., 2016.) Miševi bez gena *RUNX2* (*Runx2*^{-/-}) pokazuju potpuni nedostatak intramembranske i endohondralne osifikacije zbog nemogućnosti diferencijacije osteoblasta (Komori i sur., 1997.).

U stadiju proliferacije, progenitori loze osteoblasta ekspimiraju kolagen, fibronektin, osteopontin (OPN, prema engl. *osteopontin*) i receptor za transformirajući faktor rasta beta (TGF- β , prema engl. *transforming growth factor- β*) (Rutkovskiy i sur., 2016.). Poznato je da je, osim transkripcijskog faktora Runx2, u proces usmjeravanja diferencijacije prema osteoblastima uključen i osteriks (Osx, prema engl. *osterix*) koji može potaknuti ekspresiju alkalne fosfataze (ALP, prema engl. *alkaline phosphatase*), osteokalcina (OCN, prema engl. *osteocalcin*), OPN, koštanog sijaloproteina (BSP, prema engl. *bone sialoprotein*) i kolagena tip 1 (lanac B1) (Liu i sur., 2020.). Osx- deficijenti miševi pokazuju defekte prilikom formiranja koštanog tkiva zbog potpunog nedostatka osteoblasta (Renn i sur., 2009.).

Po završetku proliferacije, nezreli osteoblasti ulaze u drugi stadij u kojem luče kolagen tip 1 α 1 lanac (COL1A1, prema engl. *collagen1A1*) koji je glavna komponenta izvanstaničnog matriksa i ekspimiraju ALP u cilju sazrijevanja matriksa (Rutkovskiy i sur., 2016.).

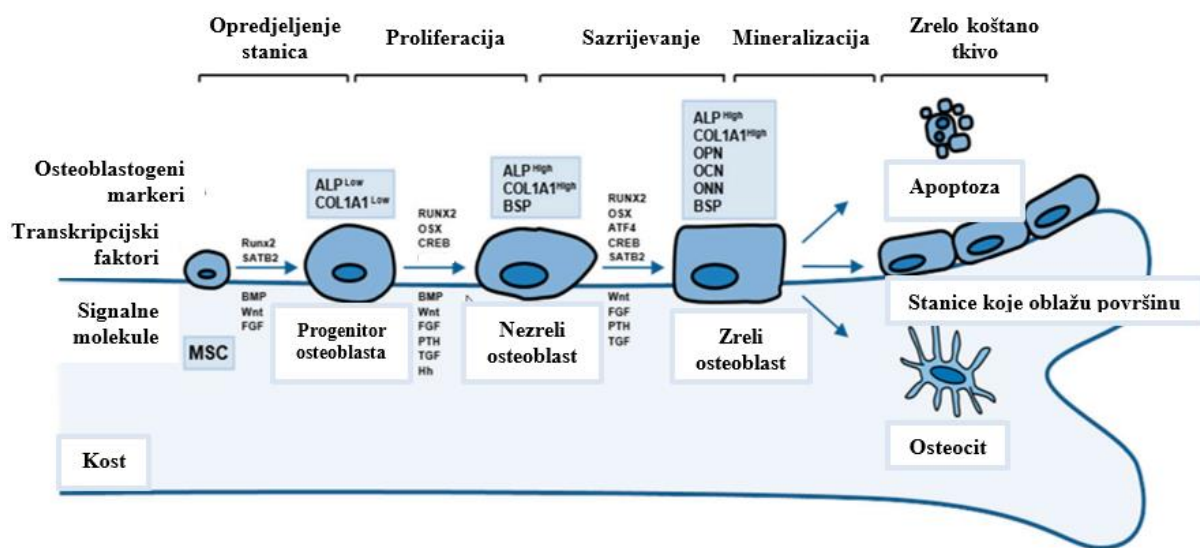
Transkripciju zrelih osteoblasta kontrolira aktivirajući transkripcijski faktor 4 (ATF4, prema engl. *activating transcription factor 4*), koji posttranslacijski regulira sintezu kolagena tipa 1 (Yang i sur., 2004). Sinteza kolagena tipa 1 posljedica je pojačane proliferacije osteoblasta (aktivacija ekspresije gena c-myc, c-fos i c-jun) koja je popraćena pojačanom ekspresijom gena koji kodiraju adhezijske proteine kao što je fibronektin (Stein i sur., 1996.).

Nakon početne proliferacije dolazi do pojačane ekspresije gena koji su uključeni u organizaciju i pripremu za mineralizaciju koštanog izvanstaničnog matriksa, kao što je ALP, nakon čega slijedi mineralizacija i taloženje hidroksiapatita (Stein i sur., 1996.). Mineralizacija matriksa može se pratiti različitim osteoblastogenetskim markerima poput OPN, OCN, BSP te kontinuiranom ekspresijom ALP i COL1A1.

BSP i OPN sudjeluju u staničnoj organizaciji koštanog matriksa jer sadrže vezujući Arg-Gly-Asp slijed kojeg prepoznaju osteoblasti i osteoklasti. Smatra se da je OCN najspecifičniji koštani marker jer je njegova ekspresija kod odraslih organizama ograničena na koštano tkivo, dentin i cementum. U OCN- deficijentnim miševima primjećeno je povećano stvaranje koštane mase što potvrđuje da OCN važan u izradnji kosti (Ducy i sur., 1996.).

Osteoblasti neposredno prije konačnog formiranja kosti, odabiru jedan od tri moguća puta (Slika 3): 1. ostaju uklopljeni u mineraliziranom matriksu i postaju osteociti; 2. preobraze se u

neaktivne osteoblaste i postanu stanice koje oblažu koštanu površinu (engl. *bone-lining cells*);
 3. odumiru programiranim staničnom smrću, apoptozom.



Slika 3. Prikaz transkripcijskih faktora, signalnih molekula i markera osteogeneze kroz različite stadije diferencijacije osteoblasta. Diferencijacija osteoblasta prolazi kroz stadij proliferacije, proizvodnju izvanstaničnog matriksa i dozrijevanje koštanog matriksa te na kraju stadij mineralizacije. Fazu proliferacije karakteriziraju niske razine ALP i COL1A1, a kasnije se njihova ekspresija povećava kako diferencijacija napreduje. Markeri mineralizacije su OPN, OCN, BSP i visoke razine ALP i COL1A1. U diferencijaciji osteoblasta sudjeluju različiti signalni putevi i različite signalne molekule ovisno o stadiju diferencijacije. Na kraju diferencijacije, zreli osteoblasti mogu postati osteociti, stanice koje oblažu koštanu površinu (engl. *lining cells*) ili mogu odumrijeti apoptozom. MSC (mezenhimska matična stanica), ALP (alkalna fosfataza), COL1A1 (kolagen 1A1), BSP (koštani sijaloprotein), OPN (osteopontin), OCN (osteokalcin), ONN (osteonektin), RUNX2 (runt-povezani transkripcijski faktor 2), SATB2 (specijalni AT-bogati vezujući protein), OSX (osteriks), CREB (cAMP-vezujući protein 2), ATF4 (aktivacijski transkripcijski faktor 4), Wnt (signalni put Wnt), FGF (faktor rasta fibroblasta), PTH (paratiroidni hormon), TGF (transformirajući faktor rasta), Hh (faktor rasta hedgehog). Preuzeto i prilagođeno iz Amarasekara i sur. (2021).

2.1.3.1.1. Signalni putevi u osteogenezi

Osteogeneza je strogo reguliran i koordiniran proces koji uključuje interakciju različitih molekula kao što su faktori rasta, BSP i specifični transkripcijski faktori.

U osteogenezu su uključeni brojni signalni putevi uključujući Wnt, paratiroidni hormon (PTH, prema engl. *parathyroid hormone*), BMP, TGF- β , faktor rasta fibroblasta (FGF, prema engl.

fibroblast growth factor) i signalni put Hedgehog (Hh, prema engl. *hedgehog*) (Slika 4) (Hojo i sur., 2015).

Signalni put Wnt ima središnju ulogu u poticanju diferencijacije, proliferacije i dozrijevanja osteoblasta (Baron i sur., 2013.) i ujedno blokira apoptozu. Postoje dva tipa Wnt- signalnog puta, kanonski i ne-kanonski. U osteogenezi, kanonski signalni put Wnt/ β -katenin aktivira se vezanjem faktora Wnt na jedan od receptora Frizzled u prisutnosti proteina niske gustoće povezanog s receptorom za lipoprotein 5 ili 6 (LRP, prema engl. *low density lipoprotein receptor related co-receptor*) što rezultira stabilizacijom β -katenina i njegovom translokacijom u jezgru gdje potiče ekspresiju gena važnih u procesu osteoblastogeneze (Latres i sur., 1999.). U odsutnosti liganda za Wnt, β -katenin se fosforilira, ubikvitinira i degradira.

Ne-kanonski signalni put aktivira se vezanjem Wnt5a ili Wnt11 na kompleks receptora Frizzled i receptor tirozinskoj kinazi slični orfan receptor (ROR, prema engl. *receptor tyrosine kinase-like orphan receptor*) i preko c-Jun N-terminalne kinaze (JNK, prema engl. *c-Jun N-terminal kinase*) aktivira RUNX2 (Slika 4) (Baron i sur., 2013.). Ne-kanonski Wnt-signalni put je ovisan o kalciju i aktivira se kada se razine kalcija unutar stanice povećaju što aktivira kalmodulin-ovisnu kinazu, protein C kinazu i kalcineurin što inducira transkripcijski faktor aktivacijskog proteina 1 (AP-1 prema engl. *activating protein-1*) (Baron i sur., 2013.).

BMPs su skupina od devet, do sada, poznatih proteina koji pripadaju superobitelji TGF- β (Chen G i sur., 2012.). Oni predstavljaju čimbenike rasta i diferencijacije s mogućnošću indukcije i regeneracije mišićnih i koštanih tkiva (kosti, hrskavica, tetiva, ligamenata, parodonta i dentina) (Wozney, 1992). BMP-2, 4, 5, 6, 7, 9, 10 imaju snažna osteoinduktivna svojstva, dok BMP-3 djeluje kao inhibitor stvaranja kosti. Poznato je da BMP-2 povećava razinu OCN i pozitivno utječe na formiranje kosti (Noël i sur., 2004), dok BMP-7 potiče ekspresiju ALP i poboljšava mineralizaciju (Shen i sur., 2010.).

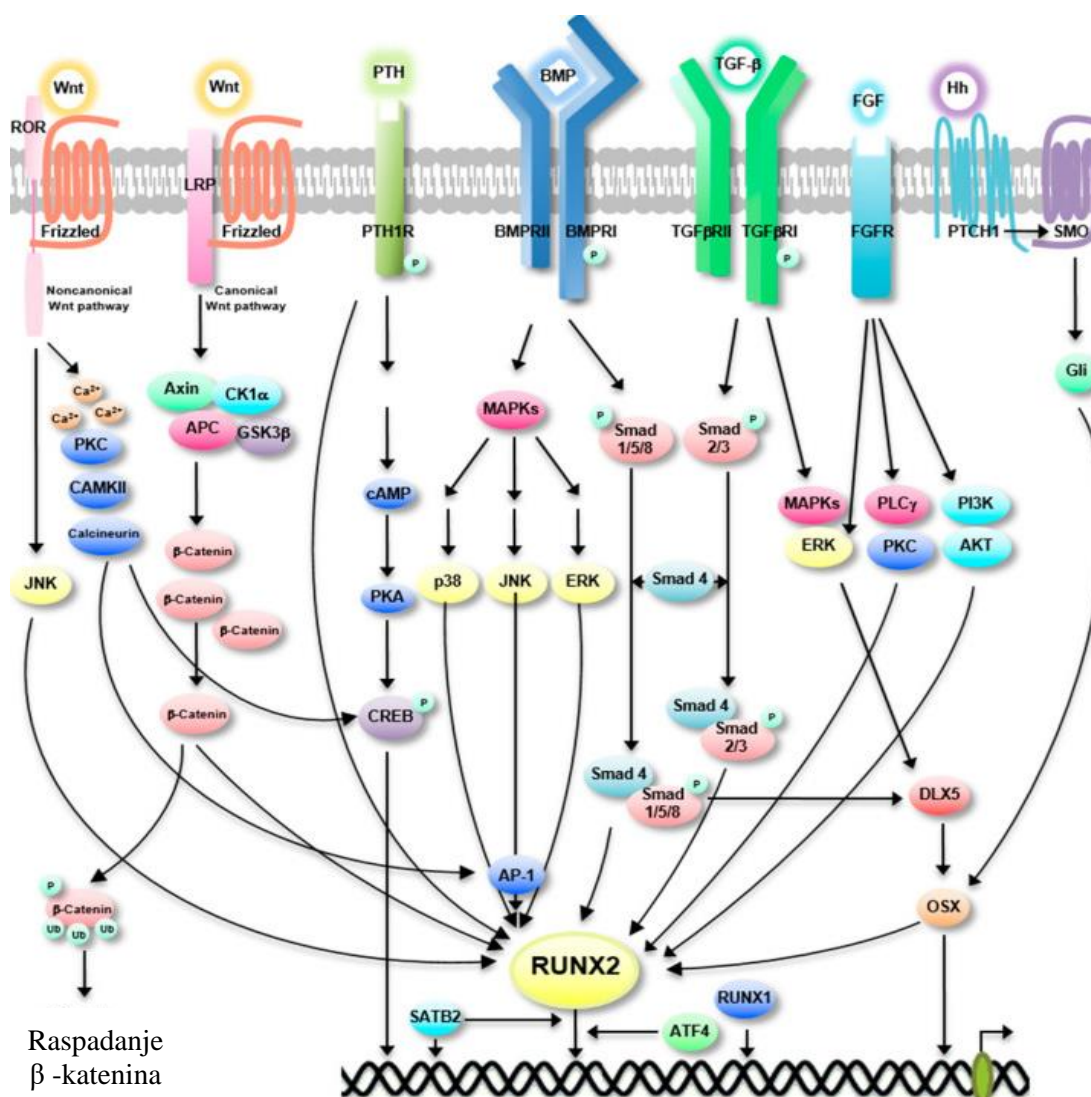
Postoje dva signalna puta koja uključuju BMP: kanonski (reaktori majke protiv dekapentaplegičara (Smad, prema engl. *mothers against decapentaplegic*) -ovisan) i ne-kanonski (Smad-neovisan) (Slika 4). Oba puta aktiviraju se vezanjem BMP na receptore. Kanonski signalni put uključuje fosforilaciju Smad1/5/8 koji potom stvaraju kompleks sa Smad4 koji se translocira u jezgru gdje utječu na ekspresiju osteoblastogenih markera (Phimphilai i sur., 2006.). Ne-kanonski signalni put uključuje i mitogen-aktivirani protein kinazni signalnog puta (MAPK, prema engl. *mitogen-activated protein kinase*). Pokazano je da su oba puta jednako važna u diferencijaciji osteoblasta. BMP2 je jako važan za usmjeravanje diferencijacije mezenhimalnih matičnih stanica u osteoblaste putem Runx2/Cbfa1, a pokazano je da utjecaj na smjer diferencijacije ima količina BMP2 (Phimphilai i sur., 2006.). Visoke

koncentracije BMP2 usmjeravaju diferencijaciju prema osteoblastima, a niske koncentracije prema adipocitima (Wang EA sur., 1993). Oba signalna puta mogu usmjeriti diferencijaciju MSCs i prema adipocitima preko peroksisom proliferacijski aktiviranog receptora gama (PPAR γ , prema engl. *peroxisome proliferator-activated receptor γ*).

TGF- β povećava proliferaciju osteoblasta, privlači prekursore osteoblasta prema mjestu formiranja koštanog tkiva i sudjeluje u stvaranju izvanstaničnog matriksa (Kassem i sur., 2000.). Vezanje na receptore β I i β II za TGF potiče prijenos signala preko Smad2/3 koji stvaraju kompleks sa Smad4, translociraju se u jezgru i preko RUNX2 potiču ekspresiju osteoblastogenetskih gena (Chen G i sur., 2012.). TGF- β i BMP mogu aktivirati RUNX2 preko signalnog puta MAPK (Chen G i sur., 2012.).

Vezanjem FGF na receptor za FGF inducira se aktivacija RUNX2 što dovodi do povećane ekspresije osteoblastogenetskih markera poput *ALP*, *OCN* i *COL1A1* (Marie i sur., 2012.).

Transkripcijski faktor koji ima najvažniju ulogu u diferencijaciji osteoblasta je RUNX2 (Ducy i sur., 1997.). RUNX2 sudjeluje u osteogenezi na način da se veže na promotor *OCN* te pospješuje njegovu transkripciju (Ducy i sur., 1997.). *OCN* je jedan od proteina koji sudjeluju u diferencijaciji osteoblasta. Transkripcijski koaktivator s PDZ-vezujućim motivom (*TAZ*, prema engl. *transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*) povećava ekspresiju gena *RUNX2* te inhibira peroksisom proliferacijski aktivirani receptor delta (PPAR- δ , prema engl. *peroxisome proliferator-activated receptor delta*) transkripcijski faktor adipocita i na taj način usmjerava diferencijaciju prema lozi osteoblasta (Hong JH i sur., 2005.).



Transkripcija osteoblastogenetskih markera

Slika 4 Signalni putevi u osteogenezi. U osteogenezi su uključeni signalni putevi Wnt, PTH, BMP, TGF- β , FGF i Hh koji djeluju na ekspresiju osteogenih gena preko transkripcijskog faktora RUNX2. BMP (koštani morfogenetski protein), BMPR (receptor za BMP), PTH (paratiroidni hormon), PTH1R (receptor 1 za PTH), TGF- β (transformirajući faktor rasta beta), TGF β R (receptor za TGF- β), FGF (faktor rasta fibroblasta), FGFR (receptor za FGF), Hh (signalni put hedgehog), PTCH1 (*patched* homolog 1 protein), SMO (*smoothened*-receptor), RUNX 1/2 (runt- povezani transkripcijski faktor 1/2), OSX (osteriks), ATF4 (aktivirajući transkripcijski faktor 4), SATB2 (specijalni AT-bogati vezujući protein 2), AP-1 (aktivacijski protein 1), ROR (receptor tirozinskoj kinazi slični orfan receptor), JNK (c-Jun N-terminalne kinaze), CAMKII (kalmodulin- ovisna protein kinaza II), PKC (protein kinaza C), LRP (protein niske gustoće povezan s receptorom za lipoprotein), APC (adenomska polipoza coli), CK1 α (kazein kinaze 1 α), GSK3 β (kinaza glikogen sintaze 3 β), cAMP (ciklični adenozin monofosfat),

PKA (protein kinaza A), CREB (cAMP- vezujući protein), DLX5 (*distal-less homeobox 5*), MAPK, (mitogen- aktivirana protein kinaza), ERK (kinaza aktivirana izvanstaničnim receptorom), PLC (fosfolipaza), AKT (protein kinaze B), Gli (onkogen povezan s gliomom), Ub (ubikvitin). Preuzeto i prilagođeno iz Amarasekara i suradnici (2021).

2.1.3.1.2. Uloga citokina u osteogenezi

Osteogeneza je strogo regulirana različitim citokinima (Zheng i sur., 1992.). Osteoblasti su osjetljivi na lokalno eksprimirane citokine u stanjima upale, infekcija i cijeljenja rana. Stanični odgovor na te molekule može biti anabolički i katabolički. Poznato je da su interleukin-10 (IL, prema engl. *interleukin*), IL-11, IL-18, interferon- γ (IFN prema engl. *interferon*), kardiotrofin-1 i onkostatina M citokini koji potiču osteogenezu, dok su tumorski faktor nekroze- α (TNF, prema engl. *tumor necrosis factor*), TNF- β , IL-1 α , IL-4, IL-7, IL-12, IL-13, IL-23, IFN- α , IFN- β , inhibitorni faktor leukemije (LIF, prema engl. *leukemia inhibitory factor*) i cilijarni neurotrofni faktor (CNTF, prema engl. *ciliary neurotrophic factor*) citokini koji suprimiraju osteogenezu (Amarasekara i sur., 2021.).

TNF- α i TNF- β djeluju tako što inhibiraju proliferaciju te smanjuju ekspresiju gena proteina izvanstaničnog matriksa (Mukai i sur., 2007, Constanze i sur., 2020.). Poznato je da IL-1 regulira resorpciju (Lorenzo i sur., 1987.) i stvaranje kosti (Canalis, 1986.), dok IL-6 inhibira proliferaciju osteoblasta i potiče njihovu diferencijaciju (Taguchi i sur., 1998.).

2.1.3.2 Osteociti

Osteociti su zrele koštane stanice koje nastaju iz osteoblasta koji ostanu zarobljeni u koštanoj matrici te promjene svoje morfološke karakteristike, poput smanjenja broja staničnih organela i smanjene metaboličke aktivnosti. Područja u kojima se osteociti nalaze zovu se lakune (Frost, 1960.). Osteociti su najbrojnije stanice u koštanoj tkivu (kod sisavaca čine 95 % stanične mase kosti) raspoređene kroz mineralizirani koštani matriks što im omogućava da osjete okolne podražaje za pregradnju kosti (Safadi i sur., 2009.). Osim uloge u održavanju strukture kosti osteociti su i mehaničko-osjetilni receptori za odgovor na stres i mehaničko opterećenje (Scott A i sur., 2008.). Receptorska uloga posredovana je interakcijom s osteoklastima i osteoblastima preko tijesnih spojeva (engl. *tight junction*) i signaliziranjem pomoću otpuštanja topivih medijatora. Osim toga, osteociti su izvor OPG-a snažnog inhibitora aktivatora receptora NF- κ B liganda (RANKL, prema engl. *receptor activator of NF- κ B ligand*), a ovisno o količini stvaranja OPG i RANKL mogu regulirati resorpciju posredovanu osteoklastima (Xiong i sur., 2011.).

Osim prije spomenutih OPG i RANKL, osteociti na koštanoj pregradnji utječu izlučivanjem malih molekula poput, prostanoida, dušikovog oksida, nukleotida, citokina, faktora rasta poput

inzulinu sličnog faktora rasta- 1 (IGF-1 prema engl. *insulin-like growth factor-1*), vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF, prema engl. *vascular endothelial cell growth factor*) i TGF- β (Goldring, 2015.).

Diferencijacija osteocita povezana je s ekspresijom specifičnih gena, što uključuje smanjenu ekspresiju *COL1A1* i *ALP*, a povećanu ekspresiju za osteocite specifičnih biljega, kao što su protein matriksa dentina (DMP-1, prema engl. *dentin matrix protein-1*), sklerostin, podoplanin, a indukcija gena koji kodira protein sklerostin (SOST, prema engl. *sclerostin*) ukazuje na diferencijaciju zrelog osteocitnog fenotipa, tako da je sklerostin specifični osteocitni biljeg (Dallas i sur., 2013.). Istovremeno, prestaje ekspresija nekih markera osteoblasta poput koštanog sijaloproteina i drugih (Franz-Oodendaal i sur., 2006.). Visoka ekspresija gena za sklerostin i „Dickkopfu“ srodnog proteina 1 (*Dkk1*, prema engl. *Dickkopf-related protein 1*) inhibira signalni put Wnt/ β - katenin te na taj način osteociti kontroliraju količinu novonastale kosti (Baron i sur., 2013.). Sklerostin se veže na receptore LRP5/6 i djeluje kao antagonist nastanku kosti (van Bezooijen i sur., 2004.). Robling i suradnici 2006. godine prvi su pokazali da mehanički podražaj smanjuje ekspresiju sklerostina i *Dkk1* u osteocitima što rezultira aktivacijom signalnog puta β -katenin u osteoblastima i povećanom proizvodnjom koštanog tkiva.

Osteociti zarobljeni u koštanom matriksu kosti kod koje ne dolazi do pregradnje mogu živjeti desetljećima. Životni vijek osteocita je uvijek dulji od života osteoblasta (Parfitt, 1990.). Smanjena količina spolnih hormona ili povećana razina glukokortikoida povećava odumiranje osteocita procesom apoptoze (Tomkinson i sur., 1997.) (Weinstein i sur., 1998.). Danas postoje lijekovi koji inhibiraju proces odumiranja osteoblasta i osteocita, tako npr. primjena bisfosfonata, parathormona i spolnih steroidnih hormona smanjuje brojnost apoptoza osteocita osiguravajući njihovu ulogu mehanoreceptora u regulaciji homeostaze koštanoga tkiva (Plotkin i sur., 1999.).

2.1.3.3 Osteoklasti

Osteoklasti su stanice hematopoetskog porijekla koje potječu iz monocitno-makrofagne linije i imaju više jezgara (prosječan broj je između 10 i 20 jezgara) (Walker, 1975.).

Biološka aktivnost osteoklasta je razgradnja koštanog tkiva stoga je njihova morfologija prilagođena toj funkciji, a kisela fosfataza otporna na tartarat (TRAP, prema engl. *tartarate-resistant acid phosphatase*) koja je potrebna za resorpciju koštanog matriksa glavni je biljeg diferenciranih osteoklasta (Blumer i sur., 2012.).

Fuzijom osteoklastnih progenitora nastaju zreli mnogojezgreni osteoklasti. Osteoklastni progenitori nalaze se u unutar šupljine koštane srži vezani za kolagenska vlakna u blizini krvnih žila. Jednojezgreni prekursori migiraju na mjesta resorpcije na površinu kosti. Smatra se da je kemotaksija odgovorna za migraciju i agregaciju monocita prema mjestu koštane pregradnje (Yahara i sur., 2022.). Molekule uključene u proces migracije, prepoznavanje mjesta resorpcije, unutarstaničnu adheziju i membransku fuziju porijeklom su iz koštanog matriksa ili direktno potječu od osteoblasta, a to su kolagen, OCN i čimbenik stromalnih stanica-1 (SDF-1, prema engl. *stromal cell-derived factor-1*) (Delaissé i sur., 2003.; Malone i sur., 1982.; Yu X i sur., 2003.).

Važnu ulogu u migraciji osteoklasta ima metaloproteinaza matriksa 14 (MMP14, prema engl. *matrix metalloproteinase 14*) koja omogućuje kretanje osteoklasta kroz nemineralizirani koštani matriks tako što uslijed njenog djelovanja dolazi do otpuštanja VEGF (Delaissé i sur., 2003). Integrin $\alpha V\beta 3$ sudjeluje u procesu migracije i formiranju zone cijeljenja na način da pomaže u prihvaćanju osteoklasta na površinu kosti jer prepoznaje Arg-Gly-Asp aminokiselinski slijed prisutan u proteinima, poput OPN i BSP (Nakamura i sur., 1999.).

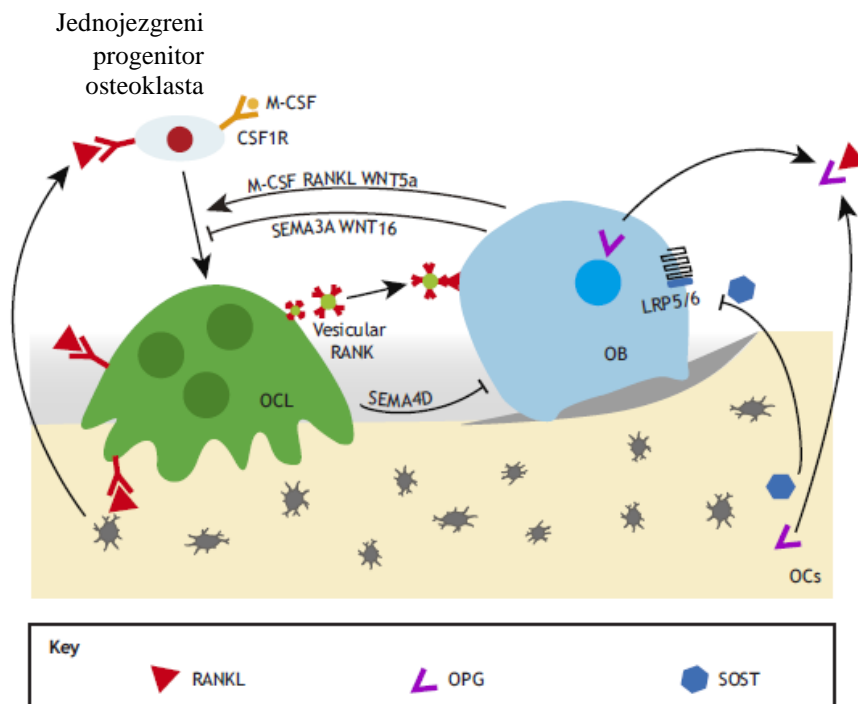
Dokazano je da su brojni proteini poput osteoklast stimulacijskog transmembranskog proteina (OC-STAMP, prema engl. *osteoclast stimulatory transmembrane protein*), klastera diferencijacije 44 (CD, prema engl. *cluster of differentiation*), CD47, peptidil-prolil cis-trans NIMA-interaktivna izomeraze 1 (PIN1, prema engl. *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1*) neophodni za fuziju prekursora osteoklasta tako da fuzija prekursora osteoklasta nije slučajan proces, nego je strogo reguliran heterogenošću osteoklastnih prekursora (Yahara i sur., 2022.).

Glavnu ulogu u diferencijaciji osteoklasta ima RANKL. Aktivacijom RANKL-a uz prisustvo makrofagnog čimbenika rasta kolonija (M-CSF, prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*) i nedostatak granulocitno-makrofagnog čimbenika rasta kolonija (GM-CSF, prema engl. *granulocyte/macrophage colony stimulating factor*), makrofagne kolonije diferenciraju u osteoklastne prekursore (Slika 5).

Unutar kosti osteoblasti, osteociti i osteoklasti komuniciraju ili direktnim interakcijama ili pomoću signalnih molekula. Osteoblasti luče M-CSF, RANKL i WNT5A (prema engl. *Wnt gene family 5A*). U osteoblastima aktivacija RANKL-a putem RANK-a, uz prisustvo M-CSF-a i odsustvo GM-CSF-a dovodi do osteoklastogeneze. (Bar-Shavit i sur., 2007.).

OPG je protein kojeg luče osteoblasti i kompetitivno se veže na RANKL te na taj način inhibira osteoklastogenezu. Osteociti utječu na razvoj i funkciju osteoklasta i osteoblasta, a primarni su

izvor RANKL i SOST koji inhibiraju diferencijaciju preosteoblasta putem signalnog puta WNT/ β -katenin (Yahara i sur., 2022.).



Slika 5. Komunikacija između osteoklasta, osteoblasta i osteocita direktnom interakcijom i putem signalnih molekula. Osteoblasti luče M-CSF, RANKL i WNT5a i na taj način potiču diferencijaciju osteoklasta, dok je inhibiraju lučenjem OPG, semaforina 3A i WNT16. Semaforin 4D suprimira diferencijaciju osteoblasta. Osteociti lučenjem RANKL/OPG reguliraju ravnotežu stvaranja i resorpcije kostiju. SOST kojeg luče osteociti veže se na LRP5/6 i suprimira preosteoblastnu diferencijaciju inhibicijom signalnog puta WNT/ β -katenin. OCL (osteoklast), OB (osteoblast), osteocit (OC), M-CSF (makrofagni čimbenik rasta kolonija), RANKL (aktivator receptora NF- κ B liganda), WNT5a (član obitelji Wnt 5A), OPG (osteoprotegerin), SEMA3A (semaforin 3A), WNT16 (član obitelji Wnt 16), SEMA4D (semaforin 4D), SOST (sklerostin), LRP5/6 (protein niske gustoće povezan s receptorom za lipoprotein 5/6). Preuzeto i prilagođeno iz Yahara i suradnici (2022).

2.1.3.3.1. Uloga osteoklasta

Osteoklasti imaju brojne uloge poput razvoja kosti, uspostavljanja koštane šupljine, održavanja kosti, popravka lomova te imunološke uloge (Yahara i sur., 2022.).

Oštećenja kosti su vrlo česta stoga je dobar popravak važan za preživljavanje. U vrijeme popravka oštećenja dolazi do upalnog odgovora koji je popraćen dolaskom imunoloških i mezenhimskih stanica na mjesto oštećenja. U početnoj fazi, krvarenje iz oštećenog mjesta

uzrokuje hematome koji dalje vaskulariziraju i prelaze u granulacijsko tkivo (Loi i sur., 2016.). U području hematoma je hipoksija i nizak pH što omogućuje invaziju hematopoetskih stanica poput neutrofila, limfocita i makrofaga, te potiče akutnu upalu (Claes i sur., 2012.). Naknadno, mezenhimske stanice dolaze na mjesto oštećenja zbog lučenja faktora poput trombocitnog faktora rasta (PDGF, engl. *platelet-derived growth factor*), TGF- β , kemokinskog liganda 12 s C-X-C motivom (CXCL12, prema engl. *C-X-C motif chemokine 12*) (Dimitriou i sur., 2005.), dok BMP-4, VEGF, IL17A, IL6, TNF- α i kemokinski ligand 2 s C-C motivom (CCL2, prema engl. *C-C motif chemokine ligand 2*) utječe na diferencijaciju mezenhimijskih stanica (Ono i sur., 2016; Peng i sur., 2002; Ono i sur., 2017; Ishikawa i sur., 2014). Na periferiji kalusa i unutar kortikalnog područja gdje se kost popravljiva intramembranskom ostifikacijom, mezenhimske matične stanice mogu diferencirati u osteoblaste, dok u okolnome području oko oštećenja, diferenciraju u fibroblaste, osteoblaste te uglavnom u hondroblaste kroz endohondralnu osifikaciju (Granero-Moltó i sur., 2009.). Te stanice u endohondralnoj osifikaciji sintetiziraju hrskavicu i tvore meki kalus koji se naknadno transformira u tvrdi kalus koji potom biva preoblikovan uz pomoć osteoklasta i osteoblasta kako bi mu se vratio izvorni oblik i funkcija. Ovaj proces remodeliranja ključan je za učinkovit i odgovarajući popravak kosti, a poremećaji u resorpciji kosti i hrskavici posredovanoj osteoklastima mogu negativno utjecati na popravak prijeloma (Lin i sur., 2017; Flick i sur., 2003; Vi i sur., 2015; Yahara i sur., 2021).

2.2. Regenerativna medicina koštanog tkiva

Za razliku od drugih tkiva, koštano tkivo se može regenerirati, nakon oštećenja spontano zacijeliti i vratiti svoju funkciju bez ostavljanja ožiljka zahvaljujući biološkim svojstvima poput dobre vaskularizacije i stalne pregradnje kosti. Zbog produljenog životnog vijeka ljudi, vidljiv je značajan porast različitih oboljenja i poremećaja koštanog sustava poput lomova, osteoartritisa, osteoporoze što u konačnici postaje veliki društveno- ekonomski problem. Oštećenja kostiju jedan su od vodećih uzroka morbiditeta i invaliditeta u starijih osoba, te dovode do smanjene kvalitete života. U skladu s time postoji velika potreba za učinkovitijim metodama za rekonstrukciju kosti (Chindamo i sur., 2020.). Koštano tkivo može spontano zacijeliti jedino ako je veličina ozljede ispod maksimalne. Kada velika koštana oštećenja, iznad kritične veličine od 2 cm (Keating i sur., 2005.), ne mogu zarasti, potrebno je kombinirati različite metode liječenja kako bi se potaknuo i ubrzao proces cijeljenja.

U slučaju teških lomova i defekata, regeneracija može biti otežana zbog različitih faktora poput nedovoljne opskrbe krvlju, infekcije tkiva oko samog oštećenja ili sistemskih bolesti. U tim

slučajevima se koriste koštani presatci koji potiču cijeljenje koštanog tkiva djelujući na osteogenezu.

Odabir koštanog presatka ovisi o brojnim faktorima poput vijabilnosti tkiva, veličine oštećenja, te veličine, oblika, volumena, biomehaničkih i bioloških karakteristika presatka, kao i etičkih i brojnih drugih pitanja. Obzirom na odnos davatelja - primatelja koštani presatci dijele se u tri kategorije: autografti, alografti i ksenografti (Oryan i sur., 2014.). Kako sve tri prethodno navedene opcije imaju svoje prednosti, ali i nedostatke, počeli su se koristiti koštani presatci od različitih vrsta biomaterijala dobiveni tkivnim inženjerstvom.

2.2.1. Tkivno inženjerstvo kosti

Tkivno inženjerstvo kosti je novija metoda koja se koristi za liječenje velikih koštanih oštećenja, a uključuje stvaranje trodimenzionalnog koštanog presatka uporabom odgovarajućeg nosača, faktora rasta i stanica, a u zadnje vrijeme i matičnih stanica (Moshiri i Oryan, 2012.). Raznim tehnikama tkivnog inženjerstva dizajniraju se novi tipovi nosača i koštanih presadaka koji pokušavaju prevladati nedostatke tradicionalnih presadaka i poboljšati im svojstva osteoinduktivnosti, osteokonduktivnosti i osteogeničnosti (Moshiri i Oryan, 2012.). Unatoč brojnim prednostima, metode tkivnog inženjerstva imaju i nedostatke, na primjer, brojni sintetizirani nosači izazivaju imunološki odgovor u domaćinu (Vandevord i sur., 2005.).

2.2.1.1. Nosači

Nosači imaju centralnu ulogu u tkivnom inženjerstvu kosti. Idealan nosač treba objedinjavati nekoliko glavnih karakteristika što uključuje:

- a) biokompatibilnost- treba biti pogodan za adheziju, proliferaciju, migraciju i diferencijaciju stanica te omogućiti neometan transport nutrijenata, kisika, signalnih molekula, proteina i otpada izvan i unutar nosača,
- b) svojstvo bioresorpcije- treba se moći zamijeniti s novonastalim tkivom, a pritom nusprodukti razgradnje ne smiju biti toksični te je idealno kada je brzina razgradnje jednaka brzini nastanka novog tkiva, i
- c) biofunktionalnost- treba biti sličnih mehaničkih i strukturnih svojstava tkivu koje zamjenjuje) (Chen Y i sur., 2011.),
- d) nosač treba biti jednostavan za korištenje i isplativ.

Obzirom na vrstu materijala od kojih su građeni, nosači se mogu podijeliti u dvije glavne skupine: prirodni (biološki) materijali (npr. kolagen tip 1, fibrin, hijaluronska kiselina i hidroksiapatit) i sintetski materijali (npr. tri kalcij fosfat, polilaktična kiselina) (Keating i sur., 2001.), a u zadnje vrijeme kombiniraju se te dvije vrste materijala (kompozitni nosači) (Wang

M, 2006.). Nosači novije generacije nisu više samo nosači za stanice, već se na njih vežu i bioaktivne molekule (npr. BMP-2, BMP-7, TGF- β 1) koje potiču osteogenezu (Yilgor i sur., 2009; Tong i sur., 2016.) .

Nove tehnologije omogućavaju korištenje različitih vrsta materijala i dobivanje potrebnih karakteristika poput poroznosti, veličine pora, rasporeda, orijentacije i gustoće vlakana, vanjske i unutarnje arhitekture, hidrofilnosti i hidrofobnosti, resorptivnosti te vezanja različitih molekula (Oryan i sur., 2014.). Zbog svoje jedinstvene biokompatibilnosti, u tkivnome inženjerstvu počeli su se koristiti hidrogelovi koji oponašaju topografiju izvanstaničnog matriksa i mogu otpuštati bioaktivne molekule koje potiču regeneraciju kosti (Lee i Mooney, 2001.). Novu generaciju hidrogelova predstavljaju samo- sastavljajući peptidi, koji su potpuno biokompatibilni i biorazgradivi (Amini i sur., 2012.).

2.2.1.1.1. Nosači od prirodnih materijala

Sam naziv govori da je ova vrsta nosača građena od prirodnih materijala, a glavna prednost pred nosačima od sintetskih materijala je veća biokompatibilnost, bioresorpcija i bolje regenerativne karakteristike. Unatoč brojnim prednostima, prirodni nosači često imaju loša mehanička svojstva što se nastoji riješiti kombinacijom prirodnih i sintetskih materijala. Najčešće korišteni prirodni materijal je kolagen (kolagen tip 1) koji je glavna komponenta izvanstaničnog matriksa u kosti (Oryan i sur., 2014.). Pokazano je da kolagenska vlakna u nosačima doprinose boljoj staničnoj proliferaciji i diferencijaciji osteoblasta (Pastorino i sur., 2014.), a također mogu poslužiti kao nosači za BMP i promovirati formiranje koštanog tkiva *in vivo* (Hamilton i sur., 2013.). Istovremeno je kolagenski nosač skup, brzo se raspada, ima loša mehanička svojstva i može uzrokovati nuspojave poput nastanka spužvaste encefalopatije (Oryan i sur., 2014.). Zbog sličnosti s izvanstaničnim matriksom (ECM, prema engl. *extracellular matrix*), često se koriste kitozan, alginat, elastin, celuloza, fibrin, hidrokisapatit (Keating i sur., 2001.). Dosadašnje pretkliničke studije na nosačima od hidroksiapatita u kombinaciji s BMP-2 pokazuju da taj nosač posjeduje potencijal za korištenje u klinici u svrhu tretiranja koštanih oštećenja iznad kritične veličine u dugim kostima (Dilgo i sur., 2021.).

2.2.1.1.2. Nosači od sintetskih materijala

Nosači od sintetskih materijala mogu se modificirati različitim tehnikama kako bi bili što biokompatibilniji i korisni u regenerativnoj medicini. U skladu s time, kombiniraju se različite vrste materijala, modificiraju se površine polimera i njihova mehanička svojstva (Chim i sur., 2006.; Wang M i sur., 2014). Danas se u području tkivnog inženjerstva kosti najviše istražuju

sintetski biorazgradivi polimeri, poput poli(glikolne) kiseline (PGA, prema engl. *poly(glycolic acid)*), poli(laktične kiseline) (PLA, prema engl. *poly(lactic acid)*), kopolimer mliječne i glikolne kiseline (PLGA, prema engl. *poly(lactic-co-glycolic acid)*), koji su linearni polimeri sastavljeni od mliječne i/ili glikolne kiseline (Wong i sur., 2023.). Glavne prednosti sintetskih nosača su njihova mehanička svojstva, sposobnost vezanja različitih biomolekula te mogućnost kontrolirane degradacije čime se omogućava kontinuirano i sporo otpuštanje biomolekula na mjestu oštećenja (Wong i sur., 2023.). Unatoč prednostima, biokompatibilnost, bioresorpcija i regenerativna svojstva još su uvijek lošija u usporedbi s nosačima prirodnog porijekla (Amini i sur., 2012.).

2.2.1.1.3. Nosači od kompozitnih materijala

Kako prirodni i sintetski nosači imaju svojih prednosti i nedostataka, u svrhu poboljšanja svojstava kombiniraju se te dvije vrste materijala. Na taj način pokušavaju se objediniti prednosti obje vrste nosača, poput biokompatibilnosti prirodnih nosača i fizikalno-kemijskih svojstava sintetskih nosača.

Kolagen- hidroksiapatitni nosač (Col-HA, prema engl. *collagen-hidroxyapatite*) se često koristi u regeneraciji koštanog tkiva u studijama *in vitro* i studijama *in vivo* u miševima (Ning i sur., 2015.), a dosadašnje prekliničke studije pokazuju dobre rezultate u regeneraciji kosti (Kon i sur., 2011.). Nosač građen od hidroksiapatita u kombinaciji s kitozonom (Cht-HA, prema engl. *chitosan- hidroxyapatite*) je pogodan za osteogenu diferencijaciju hMSCs (Wang M i sur., 2014.), a udio hidroksiapatita u nosaču Cht-HA utječe na osteogenezu (Rogina i sur., 2017). Najbolji učinak pokazan je na nosaču koji ima 30 %- tni udio hidroksiapatita (Rogina i sur., 2017). Trenutno se provodi nekoliko kliničkih studija na kompozitnim nosačima (Dilgo i sur., 2021.), a u kliničkoj primjeni je nosač *SmartBone*® sastavljen od kolagena i polilaktičnog polikaprolaktona (Pertici i sur., 2014.).

2.2.1.1.4. Hidrogelovi

Hidrogelovi se zbog svoje biokompatibilnosti i fizioloških karakteristika dugo koriste u tkivnome inženjerstvu i to ne samo kao inertni nosači već oponašaju topografiju izvanstaničnog matriksa i mogu sudjelovati u transportu bioaktivnih molekula koje promoviraju regeneraciju tkiva (Lee i Mooney, 2001.).

U tkivnom inženjerstvu kosti koriste se gelovi napravljeni od prirodnih materijala poput kolagena i gelatina te, od sintetskih materijala, na bazi polietilen glikola i polivinil alkohola.

Najnoviju generaciju hidrogelova predstavljaju samo- sastavljajući peptidi koji tvore nosače, a koji su potpuno prirodni, biokompatibilni i biorazgradivi (Amini i sur., 2012.). Samo- sastavljajući sustav oponaša strukturu prirodnog izvanstaničnog matriksa, a peptidi koji se mogu sintetizirati kemijski ili izolirati iz prirodnih izvora su dobar početni materijal.

Obzirom na veličine pora, hidrogel se klasificira u tri skupine, makroporozni (pore od 10-200 μm), mikroporozni (od 1-10 μm) i neporozni (manje od 1 μm) (Foudazi i sur., 2023.). Poroznost je od velike važnosti za tkivno inženjerstvo jer se materijali s visokom poroznosti smatraju pogodnima iz razloga što imaju veći broj odjeljaka koje stanice mogu naseliti. Osim poroznosti, hidrogelove karakterizira zakrivljenost i difuzija (koeficijent širenja preko gela) (Foudazi i sur., 2023.). Zakrivljenost je put koji stanice moraju prijeći kako bi ušle u gel. Poroznost i zakrivljenost utječu na brzinu difuzije preko gela koja je glavni transportni mehanizam hranjivih tvari i kisika u stanice i zaslužna je za izbacivanje metaboličkog otpada iz gela kao i otpuštanje signalnih (terapijskih) molekula koje se mogu zarobiti unutar gela (Amini i sur., 2012.).

Samo- sastavljajuća smjesa peptida RADA 16-I (Corning®PuraMatrix) formira hidrogel nakon implantacije u životinje, odnosno peptidi nakon doticaja s tjelesnim tekućinama postaju gel i poprimaju oblik mjesta oštećenja. Primarna sekvenca hidrogela RADA 16-I je [COCH3]-RADARADARADARADA-[CONH2], a sastoji se od 8-16 aminokiselinskih ostataka (Yokoi i sur., 2005.). Monomer RADA 16-I dug je 5 nm, širok 1.3 nm i debljine 0.8 nm (Yokoi i sur., 2005.). Hidrogel RADA 16-I sadržava hidrofobne i hidrofilne ostatke. Hidrofilni ostatci gela sastoje se od negativnih i pozitivnih naboja i 99 % vode.

Pokazano je da hidrogel RADA 16-I potiče osteogenezu u sustavima *in vitro* i *in vivo* (Lee i sur., 2001; Kirkham i sur., 2007.). Misawa i suradnici 2006. godine, uočili su da se implantiranjem hidrogela RADA16-I u mali koštani defekt (3mm) kod miša stvara koštani most. Isto tako je poznato da su nosači od samo-sastavljajućih biomaterijala ne-imunogenični i biodegradibilni, a ostatci razgradnje (aminokiseline) se brzo i lako „očiste“ u sustavima *in vivo* (Xue i sur., 2021.). Dosadašnji radovi pokazuju da je hidrogel RADA 16-I pogodan za vezanje i migraciju različitih tipova stanica, uključujući osteoblaste i MSCs (Bokhari i sur., 2005.), te omogućuje efikasan transport malih molekula i njihovo postepeno otpuštanje (Nagai i sur., 2006.). Upravo iz tih razloga, ovakvi tipovi hidrogelova vjerojatno će naći važnu ulogu u tkivnom inženjerstvu kosti.

2.2.1.2. Stanice

Za uspješnu regeneraciju koštanog tkiva izazov je izabrati najbolje stanice koje će se implantirati na mjesto oštećenja (same ili na nosaču), a potom diferencirati u osteoblaste i formirati novu vaskularnu mrežu (Amini i sur., 2012.). Stanice koje se mogu koristiti u tkivnom inženjerstvu kosti, vezano uz njihovu sposobnost poticanja cijeljenja koštanog oštećenja i regeneracije su mezenhimske matične stanice (MSCs, prema engl. *mesenchymal stem cells*) (Kraus i sur., 2006.), embrionske matične stanice (ECSs, prema engl. *embryonic stem cells*) (Jukes i sur., 2008.), inducirane pluripotentne matične stanice (iPSCs, prema engl. *induced pluripotent stem cells*) (Teng i sur. 2014.), adipozne matične stanice (ADSCs, prema engl. *adipose stem cells*) (Mende i sur., 2021.).

2.2.1.2.1. Mezenhimske matične stanice

MSCs se najčešće koriste u tkivnom inženjerstvu kosti zbog sposobnosti samoobnavljanja i diferencijacije u različite stanične linije poput osteoblasta, adipocita i hondrocita (Hoffman i sur., 2005.).

MSCs se mogu izolirati iz različitih tkiva, poput koštane srži, periferne krvi, pupčane vrpce, sinovijalne membrane, mliječnih zubi, zubne pulpe, adipoznog tkiva, mozga, kože, srca, bubrega i jetre (Amini i sur., 2012.), jednostavnim metodama izolacije koje se temelje na svojstvu njihove sposobnosti da se pričvrste na plastične površine (Prockop, 1997.) i lako se održavaju u staničnoj kulturi. Uz sve to imaju veliki proliferacijski potencijal i dobro podnose cikluse smrzavanja i odmrzavanja pa je moguće dobiti dovoljno veliki broj stanica za kliničku primjenu (Prockop, 1997.) .

U tkivnom inženjerstvu kosti najviše se koriste MSCs izolirane iz koštane srži (BM-MSCs, prema engl. *bone marrow-derived mesenchymal stromal cells*). Koštana srž se može aspirirati iz tibije, femura ili zdjelice. Učestalost MSCs u koštanoj srži je između 0.001 i 0.1% (Prockop, 1997.). Bez obzira što BM-MSCs ima malo u koštanoj srži, lako se odvoje od hematopoetskih matičnih stanica (Prockop, 1997.), a obzirom na brzu proliferaciju u kratkome periodu dobije se potreban broj stanica.

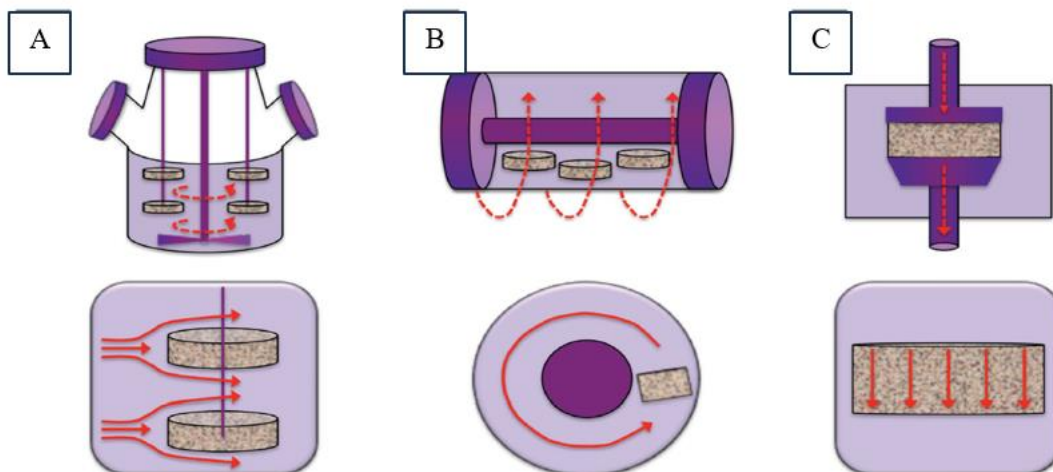
Najraširenija metoda korištenja hMSCs u tkivnom inženjerstvu kosti je inkorporacija hMSCs unutar nosača u kombinaciji s osteoinduktivnim signalima (Bianco i sur., 2001.).

Unatoč svim prednostima, u obzir valja uzeti i nekoliko nedostataka hMSCs, a to je da se proliferativni potencijal hMSCs smanjuje između 24-50 pasaže, dok se osteogeni diferencijacijski potencijal smanjuje s donorovom dobi i prisustvom sistemskih bolesti (Prockop, 1997.).

2.2.1.3. Bioreaktori

Trodimenzionalne stanične (3D) kulture imaju prednosti naspram običnih staničnih kultura jer oponašaju prirodno okruženje u kojem se stanice nalaze. Unatoč brojnim prednostima, 3D stanične kulture imaju i nedostatke poput nedovoljne opskrbe nutrijentima i kisikom, sporog uklanjanja staničnog otpada te neravnomjerne preraspodjele stanica (Wu i sur., 2021.). Kako bi se prevladali ti nedostaci, u tkivnom inženjerstvu koriste se bioreaktori koji oponašaju uvjete koji se nalaze u ljudskom organizmu gdje postoji transport nutrijenata do stanica i izbacivanje staničnog otpada (Dahlin i sur., 2012.).

Danas je dostupno nekoliko vrsta bioreaktora (Slika 6), bioreaktori s rotirajućim stijenjkama, bioreaktori s rotirajućom tikvicom, perfuzijski bioreaktor, kompresijski bioreaktori, a međusobno se razlikuju po protoku medija kroz nosač (Amini i sur., 2012.).



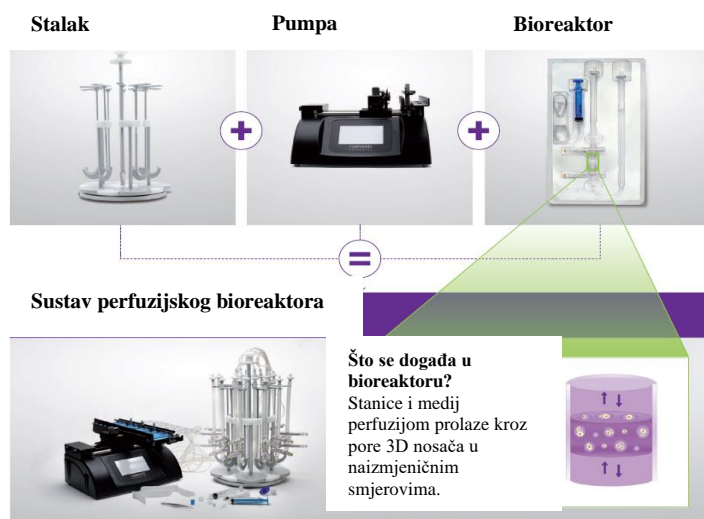
Slika 6. Shematski prikaz bioreaktora koji se koriste u tkivnom inženjerstvu kosti. (A) Bioreaktor s rotirajućom tikvicom (crvene strelice pokazuju smjer kretanja šipke za miješanje), (B) bioreaktor s rotirajućim stijenjkama (crvene strelice prikazuju smjer kretanja nosača), (C) perfuzijski bioreaktor (crvene strelice prikazuju smjer kretanja medija kroz nosač) je najčešće korišteni bioreaktor u tkivnome inženjerstvu. Bioreaktori potiču povećanu perfuziju nutrijenata unutar nosača, a time i poboljšavaju formiranje koštanog tkiva *in vitro*. Preuzeto iz Amini i suradnici (2012).

Rotirajući bioreaktori su najjednostavniji i najjeftiniji. U bioreaktoru s rotirajućom tikvicom nosač sa stanicama je smješten u sredini bioreaktora, a medij protječe oko nosača (Botchwey i sur., 2004.). Ako usporedimo statični sustav s rotirajućim bioreaktorom vidljiva je poboljšana proliferacija stanica, osteogeneza i mineralizacija u bioreaktoru (Meinel i sur., 2004.).

Nedostatak rotirajućeg bioreaktora je što se na površini nosača formira gusti stanični sloj koji sprečava protok kisika i hranjivih tvari u samo središte nosača (Stiehler i sur., 2009.). U bioreaktoru s rotirajućim stijenkama postoji laminarni protok medija kako se cilindri rotiraju horizontalno. Studije s ovim tipom bioreaktora također pokazuju poboljšanje osteogeneze i mineralizaciju (Yu X i sur., 2004.). Nedostatak ovih bioreaktora je što nosači moraju imati jednaku gustoću kao medij i biti određenih dimenzija kako bi se kontinuirano mogli rotirati zajedno s medijem bez da padnu u središte bioreaktora (Botchwey i sur., 2004.). Često se događa da se nosači sudare sa stijenkama bioreaktora što može oštetiti nosač i stanice pričvršćene na njegovu površinu (Botchwey i sur., 2004.).

Za razliku od prethodno opisanih bioreaktora, perfuzijski bioreaktori (Slika 7) omogućavaju transport nutrijenata i kisika kroz nosač jer postoji protok (perfuzija) medija kroz cijeli nosač (Gaspar i sur., 2012.). U perfuzijskom sustavu, nosač s nasadenim stanicama nalazi se u komori, a pumpa omogućava protok medija unutar bioreaktora (Gaspar i sur., 2012.). Perfuzija (protok) medija značajno utječe na ravnomjernu preraspodjelu stanica, osteogenu diferencijaciju i mineralizaciju izvanstaničnog matriksa kroz cijeli nosač u sustavu *in vitro*, a pokazano je da poboljšava i regeneraciju koštanog tkiva u sustavima *in vivo*, u usporedbi s normalnim („statičnim“) staničnim kulturama (Wang Y i sur., 2003.).

Perfuzija medija u bioreaktoru oponaša mehaničku silu, odnosno opterećenje kosti koje se događa u živom organizmu i stimulira stanice koje se nalaze unutar nosača (Dahlin i sur., 2012.). Upravo je zbog toga protok (perfuzija) medija jedan od važnijih faktora koji potiče diferencijaciju stanica, a ovisi o svojstvima nosača (poroznosti, kompoziciji i geometriji). Dosadašnjim istraživanjima pokazano je da kultivacija nosača i stanica unutar bioreaktora koji ima prisutnost mehaničke sile ima povećanu ekspresiju alkalne fosfataze, poboljšanu mineralizaciju i ekspresiju gena osteogeneze (Mauney i sur., 2004.).



Slika 7. Prikaz dijelova sustava perfuzijskog bioreaktora (Cellec Biotek, Basel, Switzerland). Sustav perfuzijskog bioreaktora sastoji se od stalka za bioreaktor, pumpe koja je sustavom šprica spojena na pojedinačni bioreaktor i bioreaktora. Pumpa potiskuje medij kroz bioreaktor u naizmjeničnim smjerovima. Unutar bioreaktora je adapter koji drži (fiksira) nosač na jednome mjestu te na taj način omogućava direktni prolaz stanica i medija kroz 3D nosač. Preuzeto i prilagođeno s <http://www.cellecbiotek.com>.

Efikasno i uniformno nasadivanje stanica na nosač izrazito je važno za stvaranje presatka koji bi se mogao koristiti u klinici jer utječe na brzinu širenja stanica, a brzina mineralizacije i formiranja kostiju je izravno povezana s gustoćom nasadenih stanica (Holy i sur., 2000.). Pokazano je da je nasadivanje stanica u dinamičnom okruženju puno bolje nego u statičnom (Dahlin i sur., 2012), a perfuzijski bioreaktori omogućavaju najveću efikasnost i uniformnost nasadivanja stanica na nosače jer stanične suspenzije mogu direktno prolaziti kroz pore unutar nosača i na taj način se vežu kroz cijeli nosač (Bancroft i sur., 2002.).

Valja spomenuti još kompresijske bioreaktore koji su dizajnirani da oponašaju fiziološki okoliš kosti *in vitro* u kojem postoji stalna mehanička stimulacija (sila) koja poboljšava regeneraciju koštanog tkiva. U ovim sustavima kompresijska sila se prenosi kroz ravnine (ploče) i nosač ima stalno jednaku stimulaciju (Sladkova i sur., 2014.).

2.2.1.4. Signalne (bioaktivne) molekule kao osteoinduktivni signali

Bioaktivne molekule uključene u regeneraciju tkiva imaju važnu ulogu u mikrokolišu svakog organizma. Kemotaksijski signali koji dolaze od bioaktivnih molekula odgovorni su za migraciju i mobilizaciju stanica na mjesto oštećenja (Claes i sur., 2012.), reguliraju proliferaciju i diferencijaciju (Khojasteh i sur., 2013.), te vezanje stanica na specifične receptore u njihovom

mikrookolišu (Safari i sur., 2021.). Upravo je iz tih razloga važno unutar nosača inkorporirati pogodnu bioaktivnu molekulu koja će poboljšati regeneraciju tkiva stimulirajući stanice koje se nalaze unutar nosača ili stanice domaćina (Oliveira i sur., 2021.). Bioaktivne molekule mogu direktno stimulirati matične stanice ili kontrolirati tkivno-specifičnu diferencijaciju *in vitro*, a isto tako mogu inducirati diferencijaciju specifičnih stanica *in vivo* (Khojasteh i sur., 2013.). Diferencijacija matičnih stanica u osteoblaste aktivno se istražuje. Poznato je da se u tu svrhu koristi kombinacija deksametazona (DEX, prema engl. *dexamethasone*), askorbinske kiseline (Asc, prema engl. *ascorbic acid*) i beta-glicerofosfata (β -GP, prema engl. *β -glycerophosphate*) kroz tri tjedna u staničnoj kulturi *in vitro* (Langenbach i sur., 2013.). Kombinacija ta tri osteogena induktora poznata je i pod nazivom DAG koji stimulira osteogenezu putem Runx2, koji je jedan od glavnih transkripcijskih faktora uključen u osteogenezu (Langenbach i sur., 2013.).

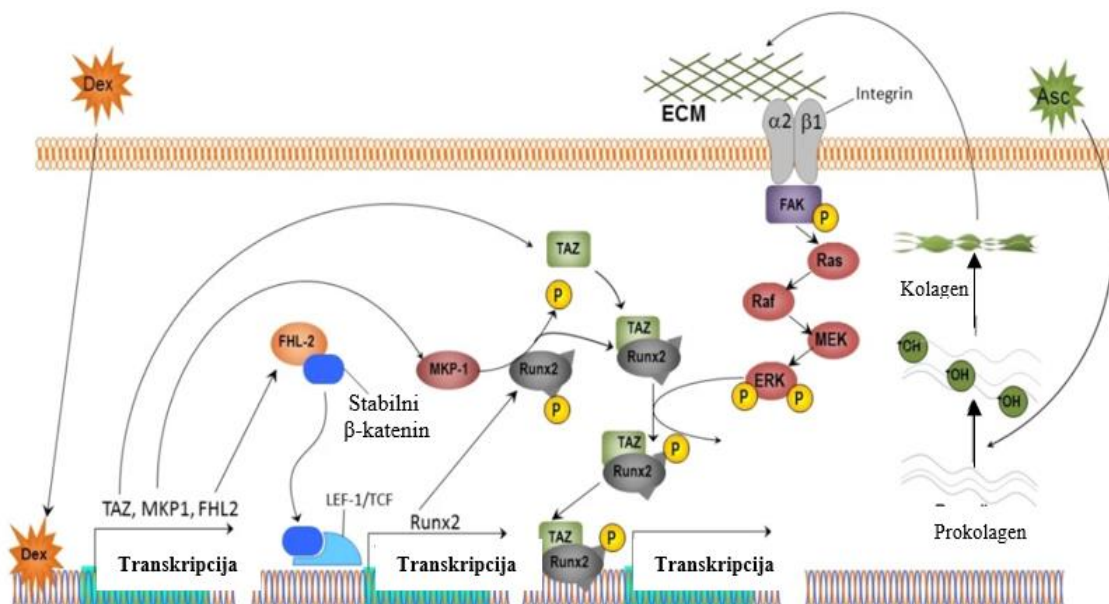
Deksametazon je mala steroidna molekula koja regulira ekspresiju gena uključenih u diferencijaciju osteoblasta, djeluje na aktivnost alkalne fosfataze i mineralizaciju kosti. Uobičajene koncentracije deksametazona koje se koriste u eksperimentima *in vitro* za osteogenu diferencijaciju su $1 \times 10^{-7} \text{ M} - 1 \times 10^{-8} \text{ M}$ kroz 21 dan (Song i sur., 2009.).

Točan mehanizam djelovanja deksametazona na osteogenu diferencijaciju pokazali su Hamidouche i suradnici 2008. godine, na način da deksametazon aktivira ekspresiju *Runx2* putem WNT/ β -katenina. U prisutnosti Wnt3a, koji je aktivator kanonskog WNT- signalnog puta, vezanje proteina 2 s četiri i pol LIM-domene (FHL-2, prema engl. *four and a half LIM domain protein 2*) na β -katenin potencira transport β -katenina u jezgru gdje se veže na kompleks T-staničnog čimbenika i limfoidnog pojačavajućeg proteina (TCF/LEF-1, prema engl. *T-cell factor/lymphoid enhancer factor 1*) i utječe na transkripciju *Runx2* (Slika 8). Osim povećane ekspresije *Runx2* povećana je i ekspresija kolagena 1. Osim prethodno opisane uloge deksametazona, poznato je da deksametazon regulira aktivaciju transkripcije *Runx2* putem molekule TAZ (Hong D i sur., 2009.) (Slika 8), a inducira osteogenezu utječući i na fosforilaciju *Runx2* putem mitogen-aktivirane protein kinaze-1 (MKP-1, prema engl. *mitogen-activated protein kinase 1*).

Askorbinska kiselina je važna za razvoj osteoblasta, služi kao kofaktor u sintezi kolagena i potiče razvoj izvanstaničnog matriksa, proliferaciju i diferencijaciju stanica. U njenom odsustvu kolagenski lanci se ne hidrosiliraju i ne mogu formirati odgovarajuću helikalnu strukturu (Franceschi i Iyer, 1992.). U skladu s time, uloga askorbinske kiseline u osteogenoj diferencijaciji je sekrecija kolagena 1 u izvanstanični matriks (Franceschi i Iyer, 1992.).

Xiao i suradnici 2002., predložili su model u kojem su objasnili ulogu ECM u osteogenoj diferencijaciji. Prema tom modelu, osteoblasti prije diferencijacije moraju biti u kontaktu s kolagenom u ECM. Osteoblasti se vežu na ECM putem kolagena 1 i integrina $\alpha 2\beta 1$. Vežanje liganada na $\alpha 2\beta 1$ integrin aktivira signalni put MAPK i prijenos signala do jezgre. MAPK fosforilira i aktivira Runx2 koji potiče osteogenu diferencijaciju povećavajući transkripciju gena važnih za osteogenezu poput *OCN* (Slika 8).

β -GP služi kao izvor fosfata za formiranje kalcijeva fosfata u uvjetima *in vitro*, a uključen je i u formiranje 3D koštanih čvorova (nodula) između stanica što je dokaz fenotipa osteoblasta. Osim toga, β -GP inducira ekspresiju osteogenih gena (osteopontina) aktivacijom signalnog puta kinaze aktivirane izvanstaničnim receptorom (ERK, prema engl. *extracellular signal-regulated kinases*) (Fatherazi i sur., 2009.).



Slika 8. Uloga deksametazona i askorbinske kiseline u osteogenoj diferencijaciji ljudskih matičnih stanica. Deksametazon potiče osteogenu diferencijaciju povećavajući transkripciju gena *RUNX2*, preko FHL-2 koji se veže na β -katenin koji potom ulazi u jezgru gdje se veže na TCF/LEF-1 što aktivira transkripciju *RUNX2*. Deksametazon doprinosi osteogenezi povećavajući ekspresiju ko-aktivatora TAZ za Runx2 koji sudjeluje u signalnom putu MAPK. Dodatak askorbinske kiseline povećava izlučivanje kolagena tip 1, a potom vežanje integrina $\alpha 2\beta 1$ na kolagen 1 što utječe na fosforilaciju ERK1/2 u signalnom putu MAPK. Na kraju signalnog puta MAPK fosforilirani ERK1/2 translocira se u jezgru gdje aktivira Runx2 fosforilacijom. Fosforilirani kompleks Runx2/TAZ potiče transkripciju osteogenih gena.

Dex (desametazon), TAZ (transkripcijski ko-aktivator s PDZ-vezujućim motivom), MKP1 (mitogen-aktivirana protein kinaza-1), FHL-2 (protein 2 s četiri i pol LIM-domene), LEF-1/TCF (kompleks T-staničnog čimbenika i limfoidnog pojačavajućeg proteina), Runx2 (transkripcijski faktor 2 ovisan o Runt), P (fosfatna skupina), ECM (izvanstanični matriks), FAK (fokusna adhezijska kinaza), RAS (prema engl. *rat sarcoma virus*), Raf (prema engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*), MEK (proteinska kinaza aktivirana mitogenom), ERK (kinaza regulirana izvanstaničnim signalom), OH (hidroksilna skupina), Asc (askorbinska kiselina). Preuzeto i prilagođeno iz Langenbach i Handschel (2013).

Osteoinduktivni faktori rasta poput PDGF, BMP, IGF, TGF- β i VEGF imaju veliki potencijal za korištenje u tkivnome inženjerstvu kosti (Oliveira i sur., 2021.) jer sudjeluju u cijeljenju koštanih oštećenja i osteogenezi tako što utječu na migraciju, adheziju, proliferaciju i diferencijaciju stanica (Chen G i sur., 2012.). Upravo se iz tih razloga vrlo često koriste kao osteoinduktivni signali unutar nosača za diferencijaciju matičnih stanica u uvjetima *in vivo*. Proteini poput rekombinatnog humanog BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 i BMP-9 trenutno su dio kliničkih studija u kojima se očekuje da će stimulirati lokalno cijeljenje koštanog tkiva tako što potiču diferencijaciju MSCs u osteoblaste (Katagiri i Watabe, 2016.). Najveći fokus je na BMP-2 i BMP-7, koji su odobreni od strane Američke agencije za hranu i lijekove (FDA, prema engl. *Food and Drug Administration*) za korištenje u regeneraciji koštanog tkiva (Oliveira i sur. 2021.). Shah i suradnici 2014. godine, pokazali su da kombinacija više faktora rasta (BMP, VEGF, PDFG) ima sinergistički učinak i bolju stopu regeneracije koštanog tkiva nego korištenje pojedinačnog faktora rasta.

Unatoč brojnim prednostima korištenja signalnih molekula unutar nosača, još uvijek je potrebno optimirati njihovo kontrolirano otpuštanje s nosača te odrediti optimalnu dozu koja će se inkorporirati na nosač (Oliveira i sur., 2021.). Razvojem različitih biomaterijala i načinom vezanja na nosač (kovalentno i nekovalentno vezanje, korištenje mikro- i nano-čestica, zarobljenost unutar nosača) pokušavaju se riješiti ovi problemi.

2.2.1.5 Životinjski modeli u tkivnom inženjerstvu kosti

Prvi korak u procesu razvoja bioaktivnog nosača je optimiziranje u sustavima *in vitro* kada se istražuje dizajn nosača, ponašanje stanica na nosaču, osteogeni potencijal nosača i kinetika otpuštanja bioaktivnih molekula vezanih na nosače. Nakon neophodnog ispitivanja *in vitro*, i zato jer je krajnji cilj rekonstrukcija funkcionalnog tkiva unutar sustava *in vivo*, korištenje životinjskih modela predstavlja sljedeći korak u procesu razvoja bioaktivnog nosača prije

eventualnih kliničkih ispitivanja na ljudima. Istraživanja na životinjskim modelima su dugotrajna zbog velikog broja bioloških i biomehaničkih varijabli koje imaju utjecaj na nosače što treba uzeti u obzir.

Odabir životinjskog modela od izuzetne je važnosti i ovisi o tome što želimo promatrati. Zbog kompleksnosti, u tkivnome inženjerstvu često se koristi i nekoliko životinjskih modela kako bi se odgovorilo na različita pitanja (Einhorn 1999.). Ukoliko se žele promatrati biološka svojstva nosača, mogu se koristiti mali jednostavni životinjski modeli. Eksperimenti u kojima se nosač implantira ektopično (subkutano ili unutar mišića) u male životinje koriste se za određivanje biokompatibilnosti, biorazgradivosti, osteointegracije, osteokonduktivnosti, osteoinduktivnosti i osteogenog potencijala koštanog nosača *in vivo*. U tu svrhu najčešće se koriste miševi ozbiljne kombinirane imunodeficijencije (SCID, prema engl. *severe combined immunodeficiency disease*) kako bi se izbjeglo odbacivanje kontrukta (Krebsbach 1997.). Za studije u kojima se istražuju biomehanička svojstva nosača koriste se veći i skuplji životinjski modeli jer točnije oponašaju veličinu i strukturu ljudske kosti (Einhorn 1999.).

Ektopični rast kosti odnosi se na okoštavanje tkiva izvan uobičajenog mjesta. Osim indukcije ektopičnog rasta kosti u istraživačke svrhe, takav rast postoji u kongenitalnim ili naslijeđenim malformacijama (Edmonds 1948.), ili nastaje kao posljedica određenih stanja poput paraplegije (Roche i Jostes 1948.), ozljede te nakon artoplastike kuka (Potter i sur., 2010.). Eksperimentalna indukcija ektopičnog rasta kosti postoji dulji niz godina. Prvo su razvijene metode ektopičnog rasta subkutano i unutar mišića (Wlodarski i Reddi 1986; Heinen i sur., 1949.), a najnoviji model je model ektopičnog rasta u bubrezima (Gurevich i sur., 2002.). Ektopični modeli u velikoj mjeri omogućavaju kontrolirane uvjete za rast kosti. Zbog nedostatka stimulacije od strane koštanotvornih i matičnih stanica koje formiraju kost te koštanih citokina moguće je istraživati osteoinduktivni kapacitet samo ispitivanog materijala. Ovakvi modeli su relativno izolirani i od mehaničkog utjecaja na novostvorenu kost, odnosno mehanotransdukcije (Scott MA i sur., 2012.). S druge strane, na malim glodavcima provode se i ortotopični modeli poput koštanih defekata kalvarije i dugih kostiju u cilju ispitivanja osteointegracije novih osteoinduktivnih sustava, ali i njihov kapacitet za promicanje popravka diskontinuiranih prijeloma i prijeloma koji nose težinu (Scott MA i sur., 2012.). Glavni nedostatak ovih modela je mogućnost dobivanja relativno male veličine defekta u usporedbi s klinički relevantnim proporcijama. Osim toga, teško je postići potpunu stabilizaciju prijeloma, što može rezultirati povećanim stvaranjem koštanog kalusa. U cilju napredne evaluacije i translacijskih istraživanja osteoinduktivnih sustava koriste se modeli koji uključuju veće vrste poput kunića, ovaca, pasa i majmuna (Peric i sur., 2105.). Na spomenutim vrstama primjenjuju se modeli posterolateralne

spinalne fuzije (PLF, prema engl. *posterolateral spinal fusion*) i modeli koštanih defekata koji uključuju defekte femura, ulne, radiusa ili tibije (Stokovic i sur., 2021.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Izolacija i propagacija ljudskih mezenhimskih matičnih stanica

Etičko povjerenstvo nekadašnje Klinike za traumatologiju (danas Klinički bolnički centar Sestre Milosrdnice) u Zagrebu odobrilo je studiju (šifra 583/001, datum odobrenja 27.04.2010.) unutar koje su prikupljeni uzorci koštane srži. Uzorci koštane srži prikupljeni su za vrijeme medicinski indicirane operacije, artoplastike kuka. Za prikupljanje te obradu uzoraka i rezultata dobiveni su pisani informirani pristanci pacijenata.

Za korištenje hMSCs, u svrhu izrade ove doktorske disertacije dobiveno je odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur. Broj: 380-59-10106-22-111/45; Klasa: 641-01/22-02/01, datum odobrenja: 29. ožujka 2022.).

hMSCs izolirane su iz koštane srži od prije poznatom metodom (Matić i sur., 2016.) opisanom u nastavku: 20 ml aspirata koštane srži dodano je u 200 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium with 1000 mg/L glucose (DMEM)-low glucose) (Lonza, Basel, Switzerland), obogaćen s 10 % fetalnim goveđim serumom (FBS, prema engl. *fetal bovine serum*) (Gibco Laboratories, Gaithersburg, MD, USA), 1 % penicilin/streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Suspenzija stanica centrifugirana je na 300× g kroz 10 min. Talog stanica ispran je dva puta u fiziološkoj otopini s fosfatnim puferom (PBS, prema engl. *phosphate-buffered saline*) (Gibco Laboratories, Gaithersburg, MD, USA). Resuspendirane stanice provučene su kroz stanično sito (100 μm) (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) kako bi se maknuli komadići kosti, a potom centrifugirane na 300× g kroz 10 min. 1×10^8 stanica nasađeno je na Petrijeve posude promjera 100 mm (Sarstedt, Germany) u proliferacijskom DMEM-low glucose mediju obogaćenom s 10 % FBS-a, 1 % penicilina/streptomicina, 1 % L-glutamina (Gibco) i 10 ng/mL FGF2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) na 37 °C u atmosferi koja sadrži 5 % CO₂. Nakon 24 sata promijenjen je medij i maknute su nepričvršćene stanice. hMSCs pričvršćene za podlogu rasle su u jednome sloju na 37 °C u atmosferi koja sadrži 5 % CO₂, uz promjenu proliferacijskog medija svaka 2-3 dana. Pri konfluentnosti od 80 %, hMSC su odvojene od podloge koristeći 0.25 % otopinu tripsin/EDTA (Sigma-Aldrich), a potom rasađene za daljnju ekspanziju.

3.2. Analiza utjecaja deksametazona na morfologiju hidrogel nosača RADA 16-I pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa

Hidrogel RADA 16-I (Corning®PuraMatrix™) sastoji se od 1 % peptida i 99 % vode, a prije upotrebe potrebno ga je vorteksirati 15 minuta. U fiziološkim uvjetima i doticaju sa solima,

peptidna komponenta hidrogela RADA 16-I spontano sastavlja vlaknastu 3D strukturu. Kako ugrađivanje molekula unutar nosača može promijeniti stabilnost i strukturu nosača, promatrano je da li ugrađivanje deksametazona (Sigma-Aldrich) (otopljenog u etanolu) mijenja strukturu hidrogela RADA 16-I pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM, prema engl. *Scanning Electron Microscope*). Uspoređen je hidrogel nosač RADA 16-I sa i bez inkorporiranog deksametazona pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (JEOL USA Inc., Peabody, MA, USA). Nosač s deksametazonom napravljen je s najvišom planiranom testnom koncentracijom deksametazona miješanjem 1 % hidrogel RADA 16-I s deksametazonom koncentracije 0.5×10^{-3} M (u volumnom omjeru 1:1). Nosač bez deksametazona napravljen je miješanjem 1 % hidrogela RADA 16-I s kalcij kloridom (50 mM) (u volumnom omjeru 1:1).

3.3. Otpuštanje deksametazona s hidrogel nosača RADA 16-I

Kontinuirano i kontrolirano otpuštanje inkorporiranih molekula s nosača važno je za poticanje osteogeneze. Prevelike koncentracije deksametazona mogu naštetiti stanicama, a premale neće biti dovoljne za indukciju osteogeneze. U skladu s time je važno procijeniti brzinu otpuštanja deksametazona s nosača u medij i njegovu koncentraciju.

U svrhu određivanja kinetike otpuštanja deksametazona s hidrogel nosača RADA 16-I, postavljen je paralelni sustav nosača s najvišom testnom i mjerljivom koncentracijom deksametazona i s PBS-om umjesto medija kako bi se mogao detektirati deksametazon. Korišten je hidrogel nosač RADA 16-I s deksametazonom u koncentraciji od 4×10^{-3} M, u bioreaktoru s 6 ml PBS- a i perfuzijom medija od 0.1 mL/min. PBS je uzorkovan svaka 24 sata kroz 15 dana, a apsorbancija je određena pomoću ultraljubičaste-vidljive spektroskopije (10^{-5} do 10^{-4}), pri valnoj duljini od 242 nm koristeći NanoVue (Thermo Fisher Scientific). Koncentracija deksametazona određena je pomoću formule: $c(\text{DEX}) = A_{242}/\varepsilon(\text{DEX}) \times l$.

3.4. Priprema hidrogel nosača RADA 16-I s deksametazonom

Nosači s osteoinduktivnim signalom pripremljeni su miješanjem hidrogela RADA 16-I (Corning® PuraMatrix) i deksametazona (Sigma-Aldrich) u volumnom omjeru 9:1. Prije miješanja s hidrogel nosačem RADA 16-I deksametazon je otopljen u 100 % etanolu (Merck) u koncentraciji 4×10^{-2} M (radna otopina). Pripremljeni su nosači s tri konačne koncentracije deksametazona kako slijedi 4×10^{-3} , 4×10^{-4} , 4×10^{-5} M (Tablica 1). Nadalje, u eksperiment su uključene dvije kontrole, nosač od 1%- tnog hidrogela RADA 16-I i nosač Cht-HA (30 % hidroksiapatita), obje s dodatkom deksametazona u mediju u koncentraciji od 10^{-7} M što je

optimalna koncentracija za poticanje osteogeneze u staničnoj kulturi (Tablica 2). Priprema svih nosača odrađena je u sterilnim uvjetima. Nosači pripremljeni na prethodno opisani način korišteni su u uspostavi trodimenzionalne stanične kulture u perfuzijskim bioreaktorima.

Tablica 1. Priprema hidrogel nosača RADA 16-I s inkorporiranim deksametazonom u tri različite koncentracije

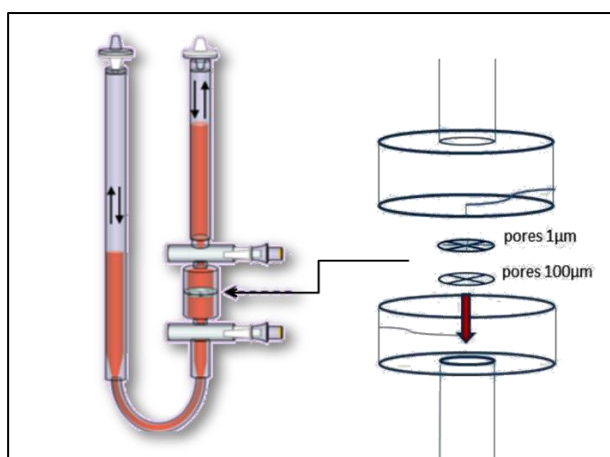
| Nosači | Volumen hidrogela (μl) | Volumen deksametazona (μl) | Početna koncentracija deksametazona (M) | Konačna koncentracija deksametazona (M) |
|-----------|------------------------|----------------------------|---|---|
| Nosač I | 135 | 15 | 4×10^{-2} | 4×10^{-3} |
| Nosač II | 135 | 15 | 4×10^{-3} | 4×10^{-4} |
| Nosač III | 135 | 15 | 4×10^{-4} | 4×10^{-5} |

Tablica 2. Nosači korišteni kao kontrole uz dodatak deksametazona u medij

| Nosači | Volumen nosača | Konačna koncentracija deksametazona u mediju (M) |
|--------------|----------------|--|
| RADA 16-I | 150 μl | 10^{-7} M |
| Nosač Cht-HA | 100 μl | 10^{-7} M |

3.5. Trodimenzionalna stanična kultura u perfuzijskom bioreктору

Perfuzijski bioreaktor (Cellec Biotek, Basel, Switzerland) prilagođen je za korištenje hidrogel nosača RADA 16-I dodavanjem dvije mrežice staničnog sita (veličine pora 100 i 1 μm) (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) unutar adaptera (Slika 9).



Slika 9. Prilagodba perfuzijskog bioreaktora. Perfuzijski bioreaktor nije predviđen za korištenje nosača od hidrogela jer je nakon polimerizacije hidrogel premekan za perfuziju medija. Stavljanjem dvije mrežice staničnog sita (veličine pora 100 i 1 μm) osigurana je dovoljna potpora da hidrogel ostane unutar adaptera tijekom perfuzije medija.

U adapter je prvo stavljen hidrogel nosač RADA 16-I, a potom je dodano 100 μL PBS-a. Nosač u PBS-u ostavljen je da polimerizira kroz 24 sata na 37 °C i 5 % CO_2 .

Nakon polimerizacije hidrogela RADA 16-I, na nosače je nasađeno 2×10^6 hMSCs resuspendiranih u diferencijacijskom mediju ukupnog volumena 10 mL. Komponente diferencijacijskog medija bile su: Minimum Essential Medium Eagle-Alpha Modification (α -MEM) (Lonza), 10 % FBS (Gibco Laboratories, Gaithersburg, MD, USA), 1 % penicilina/streptomocina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 mM natrij piruvata (Sigma-Aldrich), te induktori osteogene diferencijacije: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Asc (Sigma-Aldrich) i 10 mM β -GP (Sigma-Aldrich). Brzina perfuzije medija unutar bioreaktora bila je 0.1 mL/min. Kontrole, hidrogel nosač RADA 16-I i nosač Cht-HA s 30 % hidroksiapatita, smješteni su u diferencijacijski medij koji uz Asc i β -GP ima deksametazon u koncentraciji od 10^{-7} M. Bioreaktori su stavljeni u inkubator na 37 °C u atmosferi koja sadrži 5 % CO_2 i spojeni s pumpom koja upuhujući zrak kroz filtere na vrhu bioreaktora tjera medij kroz nosač. Medij je mijenjan svaka 2 do 3 dana kroz 21 dan u sterilnim uvjetima.

24 sata nakon nasađivanja hMSCs na nosače, medij je uzorkovan u svrhu određivanja broja stanica koje se nisu vezale na nosač pomoću hemocitometra. Na taj način određena je uspješnost vezanja stanica na nosač. Nakon procjene uspješnosti vezanja stanica, nosači su korišteni u bioreaktorima u svrhu ispitivanja uspješnosti diferencijacije hMSCs u osteoblaste.

3.6. Analiza novonastalog tkiva u bioreaktoru pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa

Nakon 21 dan u perfuzijskom bioreaktoru, uz izmjenu diferencijacijskog medija svaka 2-3 dana, novonastalo tkivo analizirano je pomoću SEM (JOEL JSM-7000 F USA Inc., Peabody, MA, USA). Skeniranje površine se ostvaruje prelaženjem snopa elektrona preko uzorka, nakon čega dolazi do stvaranja signala koji se detektira i mapira na video ekranu.

Nakon vađenja iz bioreaktora, tkivo je fiksirano 4 %- tnim paraformaldehidom (Electron Microscopy sciences, USA) kroz tri dana, isprano u PBS-u (Sigma-Aldrich) i vodi, a potom dehidrirano u otopinama etanola (Sigma-Aldrich) različitih koncentracija (25 %, 50 %, 70 %) i na kraju osušeno na zraku. Tako pripremljeni uzorak položen je na grafitnu foliju zalijepljenu na nosač, a potom je sve zajedno učvršćeno i analizirano na SEM.

3.7. Histološke analize novonastalog tkiva u bioreaktoru

Tkivo je fiksirano u 4 %-tnom paraformaldehidu (Electron Microscopy sciences, USA) kroz tri dana na + 4 °C. Nakon fiksacije, tkivo je isprano u vodovodnoj vodi i 3x u PBS-u po 30 minuta te pohranjeno u PBS-u preko noći na +4 °C. Uzorak je ispiran pod običnom tekućom vodom kroz 4 sata i dehidriran uranjenjem u rastuće koncentracije etanola (Sigma-Aldrich) počevši od 25 %-tnog, 50 %, 70 %, a zatim slijedi 96 %-tni i na kraju 99 %-tni. U svakoj koncentraciji etanola tkivo je stajalo sat vremena, a uranjanje u apsolutni alkohol ponovljeno je tri puta. Prije uklapanja u parafin uzorci su očišćeni uranjanjem u ksilen (Zorka Pharma-Hemija) na 15 minuta, a nakon tog uklopljeni u parafin Biowax blue (BioGnost, Zagreb, Croatia) dva puta po 60 minuta na 58°C. Ova dva koraka služe kako bi parafin ušao u tkivo. U zadnjem koraku tkivo je stavljeno u novi parafin, inkubirano 30 minuta na 58 °C i prebačeno na dno metalne kadice (Isolab) u koju se ulije parafin i s gornje strane se umetne plastična podloga za parafin (Isolab). Tako pripremljeni parafinski blok ostavljen je na sobnoj temperaturi kroz 24 sata da se parafin stvrdne.

Koristeći rotacijski mikrotom (Esselite Leitz 1512, Stuttgart, Germany), tkivo je izrezano na 4 do 5 µm debele presjeke koji su deparafinizirani ksilenom (Bioclear, Biognost) kroz 15 minuta, rehidrirani otopinama etanola različitih koncentracija (100 % 2 x, 96 % i 70 %) po 5 minuta u svakoj koncentraciji i na kraju stavljeni u destiliranu vodu kroz 5 minuta. Preparati su obojani hematoksilin-eozin i alizarin red otopinom (2 %, pH 4.4), u svakoj otopini po 2 min, a između isprani vodom. Rezovi su dehidrirani uranjenjem u rastuće koncentracije etanola (Sigma-Aldrich) počevši od 70 %-tne koncentracije, a zatim slijedi 85 %-tni, 90 %-tni i na kraju 99 %-tni (apsolutni alkohol) i na kraju uronjeni u ksilen (Sigma-Aldrich) dva puta po 5 minuta. Nakon 24 satnog sušenja, preparati su pregledani pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan). Hematoksilin boji jezgre plavom bojom, a eozin crvenom bojom boji citoplazmu i vezivno tkivo (kolagen). Bojanje alizarin- red korišteno je za detekciju kalcijevih minerala.

3.8. Imunohistokemijsko bojanje novonastalog tkiva u bioreaktoru

Tkivo je deparafinizirano ksilenom (Sigma-Aldrich), a potom rehidrirano otopinama etanola različitih koncentracija (počevši od 100 %-tne, 90 %, 85 %, 70 %). Razotkrivanje antigena napravljeno je pomoću proteinaze K (Agilent, Santa Clara, CA, USA) kroz 12 min na sobnoj temperaturi. Aktivnost endogene peroksidaze blokirana je uranjanjem u 3 %-tnu otopinu hidrogen peroksida (H₂O₂) u PBS-u kroz 3 - 6 minuta. Nespecifična vezna mjesta blokirana su inkubacijom u 10 %-tnom *goat* serumu (Agilent, Santa Clara, CA, USA) u PBS -u kroz sat

vremena na sobnoj temperaturi. Presjeci su inkubirani s primarnim antitijelom anti - kolagen 1 (Abcam, Cambridge, UK) razrijeđenim 1: 400 u 1 % -tnom *goat* serumu u PBS, preko noći na 4 °C. Nakon ispiranja, signal je vizualiziran na Real EnVision Detection System (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Histološki preparati dodatno su bojani hematoksilinom i promatrani pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX51). Kao pozitivna kontrola korišteni su histološki preparati ljudske kosti.

3.9. Izolacija ukupne RNA i analiza ekspresije gena metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu iz tkiva nastalog u perfuzijskim bioreaktorima

Ukupna stanična ribonukleinska kiselina (RNA, prema engl. *ribonucleic acid*) novonastalog tkiva iz bioreaktora nakon 21 dan, izolirana je pomoću TRIzol reagensa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) prema uputama proizvođača. Ukratko, tkivo je isprano u hladnome PBS-u i homogenizirano u 1 ml trizola. Nakon homogenizacije dodano je 200 µL kloroforma (Sigma-Aldrich), a uzorci su centrifugirani 5 minuta na 12000 g pri 4 °C. Gornja vodena faza prenesena je u novu tubicu te je dodan isti volumen izopropanola. RNA je precipitirana preko noći na -20 °C nakon čega su uzorci centrifugirani 15 minuta na 12000 g. Precipitat je opran u 70 % -tnom etanolu, centrifugiran 5 minuta na 12000 g te otopljen u destiliranoj vodi tretiranoj s dietil-pirokarbonatom.

Koncentracija RNA određena je spektrofotometrijskom metodom koristeći NanoVue (Thermo Fisher Scientific). Mjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 260 nm.

Ukupna stanična RNA tretirana je DNazom I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) u svrhu micanja genomske deoksiribonukleinske kiseline (DNA, prema engl. *deoxyribonucleic acid*), a 2 µg ukupne stanične RNA obrnuto je prepisano u komplementarnu DNA (cDNA, prema engl. *complementary DNA*) postupkom reverznog prepisivanja (RT, prema engl. *reverse transcription*) prema uputi proizvođača za GeneAmp RNA PCR kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reverzna transkripcija napravljena je koristeći termomješalicu (Eppendorf, Hamburg, Germany) pod sljedećim uvjetima: 10 min na 20 °C, 1 h na 42 °C, 5 min na 99 °C i 5 min na 5 °C.

Relativna ekspresija *COL1A1*, *OCN* i *ALP* određena je metodom RT-qPCR na 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) koristeći SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems) i komercijalno dostupne probe za *COL1A1* (Sigma-Aldrich), *OCN* (Sigma-Aldrich) i *ALP* (Sigma-Aldrich) prikazane u Tablici 3. Svaka reakcija napravljena je u triplikatu u pločicama s 96 zdenaca (ABI PRISM Optical 96-Well Plate, Applied

Biosystems) pod sljedećim uvjetima: 10 min na 95 °C za 1 ciklus, 15 s na 95 °C, 1 min na 60 °C za 40 ciklusa.

Relativna ekspresija gena izračunata je iz Ct vrijednosti promatranih gena i Ct vrijednosti β -aktin gena uporabom standardne krivulje (RQ manager 1.2, Applied Biosystems), $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodom. Ekspresija svakog gena standardizirana je u odnosu na unutarnju kontrolu β -aktin za svaki uzorak. Kao negativna kontrola korištene su nediferencirane hMSC, a kao pozitivna kontrola korištena je ljudska kost. Ekspresija osteogenih gena (*ALP*, *COL1A1*, *OCN*) normalizirana je u odnosu na negativnu kontrolu, nediferencirane hMSC.

Tablica 3. Sekvence proba korištenih za određivanje relativne genske ekspresije metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

| Geni | Sekvenca 5' - 3' | Temperatura vezanja proba (°C) |
|--------|-------------------------------|--------------------------------|
| COL1A1 | Forward GCTATGATGAGAAATCAACCG | 61.1 |
| | Reverse TCATCTCCATTTCCAGG | 61.6 |
| OCN | Forward TTCTTTCCTCTTCCCCTTG | 60.8 |
| | Reverse CCTCTTCTGGAGTTTATTGG | 59.3 |
| ALP | Forward CTGTTTACATTTGGATAC | 57.4 |
| | Reverse ATGGAGACATTCTCGTTC | 61.6 |
| BSP | Forward GGAGACTTCAAATGAAGGAG | 57.9 |
| | Reverse CAGAAAGTGTGGTATTCTCAG | 56.4 |

Za statističku obradu podatka korištena je analiza varijance s jednim promjenjivim faktorom (engl. *One-Way ANOVA*) i Tukey test u GraphPad Prism 9 Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Rezultati će se prikazati sa \pm standardnom devijacijom (SD) sa statističkom značajnošću $p < 0.001$.

3.10. Detekcija i kvantifikacija minerala

Detekcija mineralizacije koštanog matriksa, nastala prilikom skladištenja kalcija tijekom osteogeneze, određena je metodom bojanja *von Kossa*. Metoda prikazuje prisutnost kalcijevih soli, a bazira se na vezanju iona srebra za anione kalcijevih soli i redukciji srebrovih soli prilikom čega nastaju crno-srebrna obojenja (Wang YH i sur., 2006.). Ukratko, uzorak je posušen u petrijevcu, tretiran 5 % -tnom otopinom srebro - nitrata (Sigma-Aldrich), izložen UV

zračenju (Bio-Link Blx, VilberLourmat, Francuska), ispran destiliranom vodom i posušen na zraku. Smeđe do crno obojenje uzorka dokazuje prisustvo minerala.

Taloženje minerala u mediju potaknuto je povećanjem perfuzije medija unutar bioreaktora na 0.3 mL/min. Medij je prikupljan od desetog dana kada je u mediju primjećena pojava taloga, centrifugiran, talog minerala je liofiliziran kroz 2.5 sata na liofilizatoru (Micro Modulyo). Masa svakog taloga određena je analitičkom vagom (Bosch, Stuttgart, Germany), uzimajući u obzir masu prazne epruvete.

3.11. Implantacija Nosača II u imunokompromitirane miševe

Povjerenstvo za bioetiku i dobrobit životinja Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta odobrilo je pokuse na životinjama u svrhu izrade ove doktorske disertacije, 24. svibnja 2021. godine (Klasa:643-02/21-01/1, Ur. broj: 251-58-10617-21-370).

Za implantaciju nosača korištena su 3 muška miša SCID (Strain code: 236, Charles River, Njemačka) u starosti od 6 tjedana. Pokus je napravljen u Selviti d.o.o. (prije Fidelta d.o.o., Prilaz baruna Filipovića 29, Zagreb) unutar jedinice *In Vivo* farmakologije i toksikologije na odjelu Toksikologije i istraživanja na životinjama. Pokus je proveden u skladu s važećim zakonima (Pravilnik o uvjetima držanja pokusnih životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa, Narodne novine br. 19/1999; Zakon o zaštiti životinja, Narodne novine br. 12/2017.).

U životinje su implantirane sljedeće kombinacije nosača:

1. Nosač sastavljen od hidrogela RADA 16-I, deksametazona u konačnoj koncentraciji 4×10^{-4} M i 1.6×10^6 hMSCs (Nosač II)
2. Nosač sastavljen od hidrogela RADA 16-I i 1.6×10^6 hMSCs (kontrola).

Volumen svakog implantiranog nosača iznosio je 150 ul. Ukupno su injicirana 2 nosača, subkutano na leđnu stranu svakog miša.

Nakon implantiranja nosača, životinje su držane u kavezima s 3-4 cm slojem „ALPHA-dri dust free bedding“ (LBS Serving Biotechnology) od celuloznih vlakana s veličinom čestica 5 mm, a u kavezu se nalazilo i jedno pamučno gnijezdo te „Des Res“ papirnato sklonište (LBS Serving Biotechnology), pri temperaturi od $22 \text{ °C} \pm 2$, relativnoj vlažnosti $55 \% \pm 10$, cirkulaciji zraka: 15 – 20 upuha na sat, 12 sati svjetlosti (7:00 do 19:00)/12 sati tame (19:00 do 7:00), hranjene peletiranom hranom za miševe SDS VRF 1 (P), UK; ad libitum, uz dostupnu vodovodnu vodu (boce TECNIPLAST S.p.A. Italija); *ad libitum*. Osam tjedana nakon implantacije nosača životinje su eutanizirane, leđna strana miša je obrijana i sterilizirana 70 % -tnom otopinom etanola, a uzorci su izrezani sterilnim priborom i pohranjeni u RNA *later* stabilizacijskoj otopini (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

3.12. Izolacija ukupne RNA i analiza ekspresije gena metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu iz tkiva naraslog u imunokompromitiranim miševima

Ukupna stanična RNA određena je iz novonastalog tkiva u miševima, 8 tjedana nakon implantacije nosača u miševe. Ukratko, tkivo je prvo homogenizirano pomoću Precellys uređaja koristeći Precellys tubice s 350 μ L RLT pufera (Qiagen) i 1 % β -Merkaptoetanol (Sigma), na 10 °C, 6800 rpm, 3 ciklusa po 20 sekundi s 30 sekundi pauze između svakog ciklusa. Nakon homogenizacije, slijedilo je kratko centrifugiranje (1 min, 8000 x g), potom je u svaku tubu dodano 350 μ L 70 % -tnog etanola. 700 μ L homogenata prebačeno je u kolonice, a RNA je izolirana pomoću RNeasy Mini Kit (Qiagen) prema uputama proizvođača. Koncentracija RNA analizirana je koristeći Agilent RNA 6000 Eukaryotic Nano Kit (Agilent Technologie) i Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologie) prema uputama proizvođača.

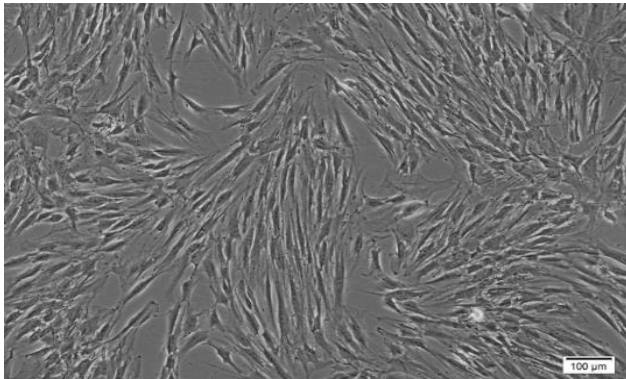
Ukupna stanična RNA tretirana je DNazom I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) u svrhu micanja genomske DNA, a 2 μ g ukupne stanične RNA obrnuto je prepisano u cDNA postupkom reverznog prepisivanja (RT, prema engl. *reverse transcription*) prema uputi proizvođača za GeneAmp RNA PCR kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reverzna transkripcija napravljena je na termomješalici (Eppendorf, Hamburg, Germany) pod sljedećim uvjetima: 10 min na 20 °C, 1 h na 42 °C, 5 min na 99 °C i 5 min na 5 °C.

Relativna ekspresija gena *COL1A1*, *ALP*, *BSP* i *OCN* određena je metodom RT- qPCR na 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) koristeći SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems) i komercijalno dostupne probe za *COL1A1* (Sigma-Aldrich), *ALP* (Sigma-Aldrich), *BSP* (Sigma-Aldrich) i *OCN* (Sigma-Aldrich) prikazane u Tablici 3. Svaka reakcija napravljena je u duplikatu u pločicama s 96 zdenaca (ABI PRISM Optical 96-Well Plate; Applied Biosystems) pod sljedećim uvjetima: 10 min na 95° C za 1 ciklus, 15 s na 95° C, 1 min na 60 °C za 40 ciklusa. Relativna ekspresija gena izračunata je iz Ct vrijednosti promatranih gena i Ct vrijednosti β -aktin gena uporabom standardne krivulje (RQ manager 1.2, Applied Biosystems), $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodom. Ekspresija svakog gena standardizirana je u odnosu na unutarnju kontrolu β -aktin za svaki uzorak. Ekspresija osteogenih gena (*ALP*, *COL1A1*, *BSP*, *OC*) normalizirana je u odnosu na nosač RADA 16-I bez deksametazona. Za statističku obradu podatka korištena je analiza varijance s jednim promjenjivim faktorom (engl. *One-Way ANOVA*) i t-test u GraphPad Prism 9 Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Rezultati će se prikazati sa \pm standardnom devijacijom (SD), a smatrat će se statistički značajni ako je $p < 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. Izolacija ljudskih mezenhimskih matičnih stanica

Iz aspirata koštane srži uspješno su izolirane hMSCs koje su potom propagirane u staničnoj kulturi. hMSCs specifičnog su vretenastog oblika, rastu adherirane na plastičnu podlogu i morfologijom podsjećaju na fibroblaste (Slika 10).

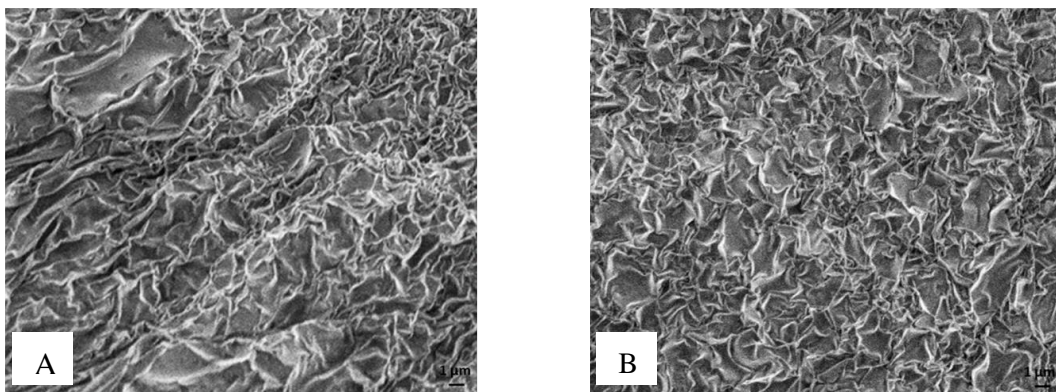


Slika 10. Morfologija hMSCs pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus). Mjerilo prikazuje 100 μm.

4.2. Karakterizacija hidrogel nosača RADA 16-I s deksametazonom i otpuštanje deksametazona s nosača

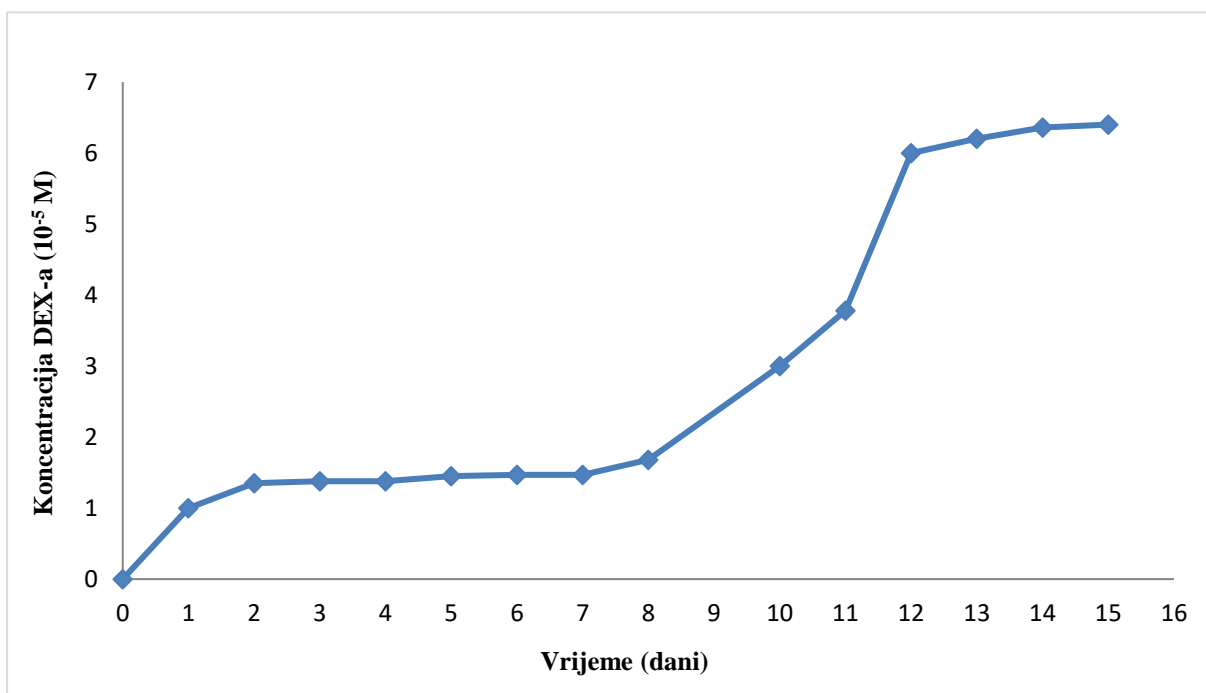
Za dobru regeneraciju tkiva potrebno je koristiti pogodan nosač koji na sebe ima vezane biosignalne molekule koje ne utječu na svojstva nosača i koje se kontinuirano otpuštaju u okolinu, a istovremeno poboljšavaju regeneraciju okolnog tkiva. U skladu s time, određeno je utječe li inkorporacija deksametazona, koji je u radu korišten kao biosignalna molekula, na polimerizaciju i strukturu hidrogel nosača RADA 16-I te kinetiku otpuštanja deksametazona s nosača. Kako bismo utvrdili utječe li deksametazon na polimerizaciju (formiranje mrežaste strukture i pora) i stabilnost hidrogela RADA 16-I uspoređena su dva tipa nosača, 0.5 %- tni hidrogel RADA 16-I s inkorporiranim deksametazonom i 0.5 %- tni hidrogel RADA 16-I bez deksametazona.

Skenirajućom elektronskom mikroskopijom pokazano je da je trodimenzionalna struktura hidrogel nosača RADA 16-I narušena uslijed dehidracije, te da peptidne niti stvaraju mrežu s porama koje variraju od 100 nm do 5 μm u oba nosača. Inkorporacija deksametazona unutar hidrogel nosača RADA 16-I ne utječe na polimerizaciju i stabilnost nosača (Slika 11).



Slika 11. Slike skenirajućeg elektronskog mikroskopa 0.5 %- tnog hidrogela RADA 16-I 24 sata nakon polimerizacije pri povećanju 3000 x, (A) bez deksametazona i (B) s deksametazonom (0.5×10^{-3} M). Mjerilo prikazuje 1 μ m.

Deksametazon je zarobljen unutar gela tijekom procesa polimerizacije. Pod utjecajem perfuzije medija i razgradnjom gela dolazi do otpuštanja deksametazona. Rezultati pokazuju da kinetika otpuštanja deksametazona prati kinetiku razgradnje hidrogel nosača RADA 16-I (Slika 12). U skladu s time koncentracija deksametazona raste kroz prva dva dana u bioreaktoru, zbog otpuštanja deksametazona koji je vezan pri površini nosača. U prva dva dana otpusti se 10 % deksametazona. Nakon promjene medija trećeg i sedmog dana otpusti se 10 - 20 % deksametazona. Između osmog i jedanaestog dana otpusti se oko 40 % deksametazona. Poslije jedanaestog dana dolazi do potpune razgradnje hidrogela i otpuštanja preostalog deksametazona (Slika 12). Ova mjerenja sugeriraju da su stanice u ovom testnom sustavu većinu vremena bile izložene koncentraciji deksametazona od 10^{-5} M.



Slika 12. Prikaz koncentracije otpuštenog deksametazona s hidrogel nosača RADA 16-I u PBS-u. Početna koncentracija deksametazona na nosaču iznosila je 4×10^{-3} M, a koncentracije deksametazona u PBS-u mjerene su UV-Vis spektrofotometrijom svaki dan kroz petnaest dana.

Kako perfuzijski testni sustav za ispitivanje biološkog potencijala hidrogel nosača RADA 16-I ima veći volumen (10 mL) od sustava korištenog za testiranje otpuštanja deksametazona (6 ml), te je koncentracija deksametazona koja se pokazala učinkovita za osteogenezu 10^{-7} M, napravljeni su izračuni očekivanih koncentracija deksametazona u mediju ako se koristi testni nosač s nižom koncentracijom deksametazona.

Iz dobivenih rezultata, izračunate su približne vrijednosti koncentracije deksametazona kojima su stanice bile izložene u nosaču gdje je početna koncentracija bila 4×10^{-4} M, uzimajući u obzir da je ukupni volumen medija u bioreaktoru bio 10 mL i da je medij mijenjan svaka 3-4 dana. Shodno tome, procijenjeno je da su stanice kroz 15 dana bile najčešće izložene približnoj koncentraciji deksametazona između 10^{-7} i 10^{-6} M, što je u području koncentracija deksametazona koje su se pokazale aktivne u staničnoj kulturi.

4.3 Određivanje biološkog potencijala hidrogel nosača RADA 16-I i uspješnosti nasađivanja humanih mezenhimalnih matičnih stanica na nosač

Po završetku analize utjecaja inkorporiranog deksametazona na polimerizaciju i strukturu hidrogel nosača RADA 16-I, te određivanje kinetike otpuštanja deksametazona, hidrogel nosači RADA 16-I s inkorporiranim deksametazonom (4×10^{-3} , 4×10^{-4} , 4×10^{-5} M) i nosači korišteni kao kontrole stavljeni su i testirani u bioreaktorima kroz 21 dan. U bioreaktore s kontrolnim nosačima dodan je deksametazon u koncentraciji 10^{-7} M u medij.

Na svaki nosač nasađeno je 2×10^6 hMSCs. 24 sata nakon nasađivanja, u mediju je određen broj stanica koje se nisu vezale na nosač i određeni su postoci uspješnosti nasađivanja stanica na nosače prikazani u Tablici 4.

Tablica 4. Postotak vezanih hMSCs na nosače 24 sata nakon nasađivanja u perfuzijskim bioreaktorima

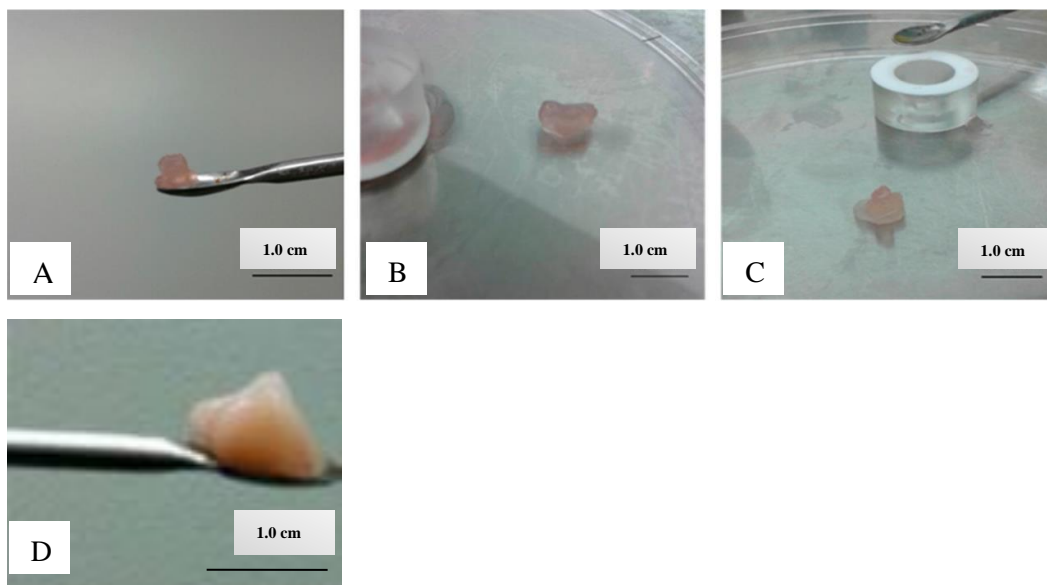
| Nosači | Nasađene stanice na nosač (%) |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| Nosač I (4×10^{-3} M) | 70 |
| Nosač II (4×10^{-4} M) | 88 |
| Nosač III (4×10^{-5} M) | 85 |
| RADA 16-I bez DEX-a | 98 |
| Nosač Cht-HA (30 %) | 92 |

Na kontrolni nosač Cht-HA (30% hidroksiapatita) uspješno je vezano 92 % stanica što je u skladu s očekivanjima (Rogina i sur., 2017), dok je na RADA 16-I bez deksametazona vezano 98 % nasađenih stanica.

Nosači s inkorporiranim deksametazonom zadržavaju veliku uspješnost vezanja stanica, no postoje međusobne razlike, nosač s najvećom početnom koncentracijom deksametazona (4×10^{-3} M) ima najmanji postotak vezanih stanica (70 %). Rezultati ukazuju da koncentracija deksametazona u nosaču ima utjecaj na prihvaćanje stanica na hidrogel nosač RADA 16-I.

Nakon 21 dan diferencijacije, novoformirana tkiva (Slika 13) prisutna su u svim bioreaktorima u koje je ugrađen hidrogel nosač RADA 16-I s inkorporiranim deksametazonom što nam pokazuje da prisutnost deksametazona u hidrogel nosaču RADA 16-I pridonosi diferencijaciji tkiva. Hidrogel nosač RADA 16-I bez ugrađenog deksametazona u nosač bio je degradiran, a ostatci novonastalog tkiva nisu bili dovoljno čvrsti za daljnju histološku analizu. Prostim okom

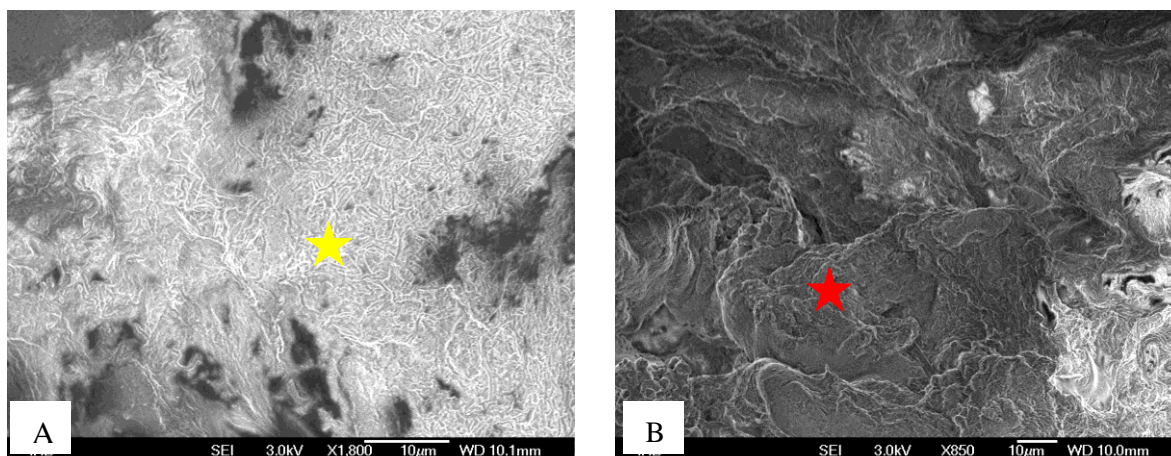
je utvrđeno da najveći volumen i najbolju čvrstoću ima tkivo uzgojeno na Nosaču II (Slika 13 B). Kontrolni nosač Cht-HA (30 % hidroksiapatita) ponaša se u skladu s očekivanjem (Rogina i sur., 2017).



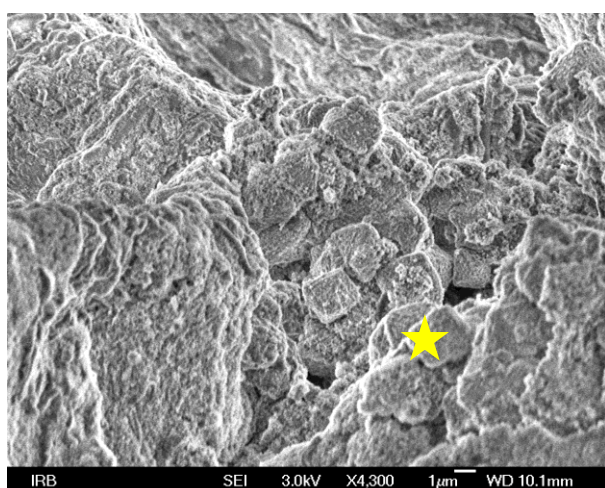
Slika 13. Makroskopski prikaz novoformiranog tkiva u bioreaktorima, tri tjedna nakon osteogene diferencijacije. (A) Tkivo nastalo na Nosaču I, (B) Tkivo nastalo na Nosaču II, (C) Tkivo nastalo na Nosaču III, (D) Tkivo nastalo na Nosaču Cht-HA (30 % hidroksiapatita). Mjerilo prikazuje 1 cm.

4.4. Analiza morfologije novonastalog tkiva u bioreaktoru pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa

Tkivo je izvađeno iz bioreaktora nakon tri tjedna i analizirano skenirajućim elektronskim mikroskopom. Pokazano je da tkivo nastalo na hidrogel nosaču RADA 16-I koji na sebe ima inkorporirani deksametazon, sadrži sve tri komponente koštanog tkiva: stanice (Slika 14A), izvanstanični matriks/vezivno tkivo (Slika 14B) i minerale (Slika 15).



Slika 14. Tkivo nastalo na Nosaču III u bioreaktoru nakon 3 tjedna kultiviranja u osteogenom mediju promatrano pod SEM. (A) Stanice- bijelo obojenje (označeno žutom oznakom), (B) vezivno tkivo- tamno obojenje (označeno crvenom oznakom). Mjerilo prikazuje 10 µm.



Slika 15. Prikaz minerala nastalih na Nosaču III u bioreaktoru nakon 3 tjedna kultiviranja u osteogenom mediju promatrano pod SEM. Minerali označeni žutom oznakom. Mjerilo prikazuje 1 µm.

4.5. Histološka i imunohistokemijska analiza tkiva nastalog na hidrogel nosaču RADA 16-I s inkorporiranim deksametazonom

Tkiva uzgojena na hidrogel nosačima RADA 16-I koji imaju inkorporirani deksametazon te tkivo nastalo na Nosaču Cht-HA (30 % hidroksiapatita) analizirani su nakon tri tjedna osteogene diferencijacije histološkim metodama (bojanje hematoksilin/eozin) (Slika 16), imunohistokemijom (ekspresija kolagena 1) (Slika 17) i alizarin red bojanjem (Slika 18).

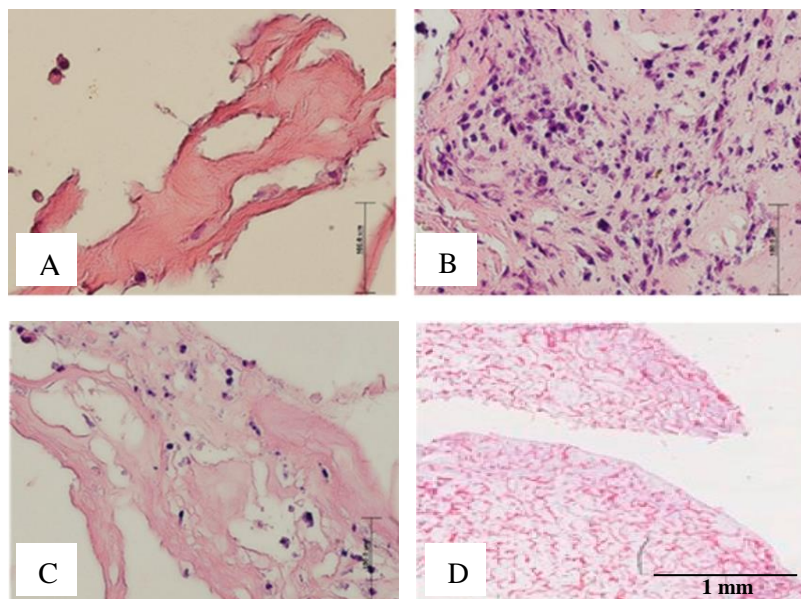
Analize su bile usmjerene prema utvrđivanju prisutnosti komponenata koštanog tkiva (stanica, izvanstaničnog matriksa, minerala).

U svim novonastalim tkivima uočene su sve komponente koštanog tkiva, u različitim količinama ovisno o vrsti nosača.

Tkivo nastalo na Nosaču I (Slika 16 A) sadrži najmanji broj stanica u usporedbi s Nosačem II i III. Stanice se nalaze na rubovima, sa značajnom količinom vezivnog tkiva unutar nosača.

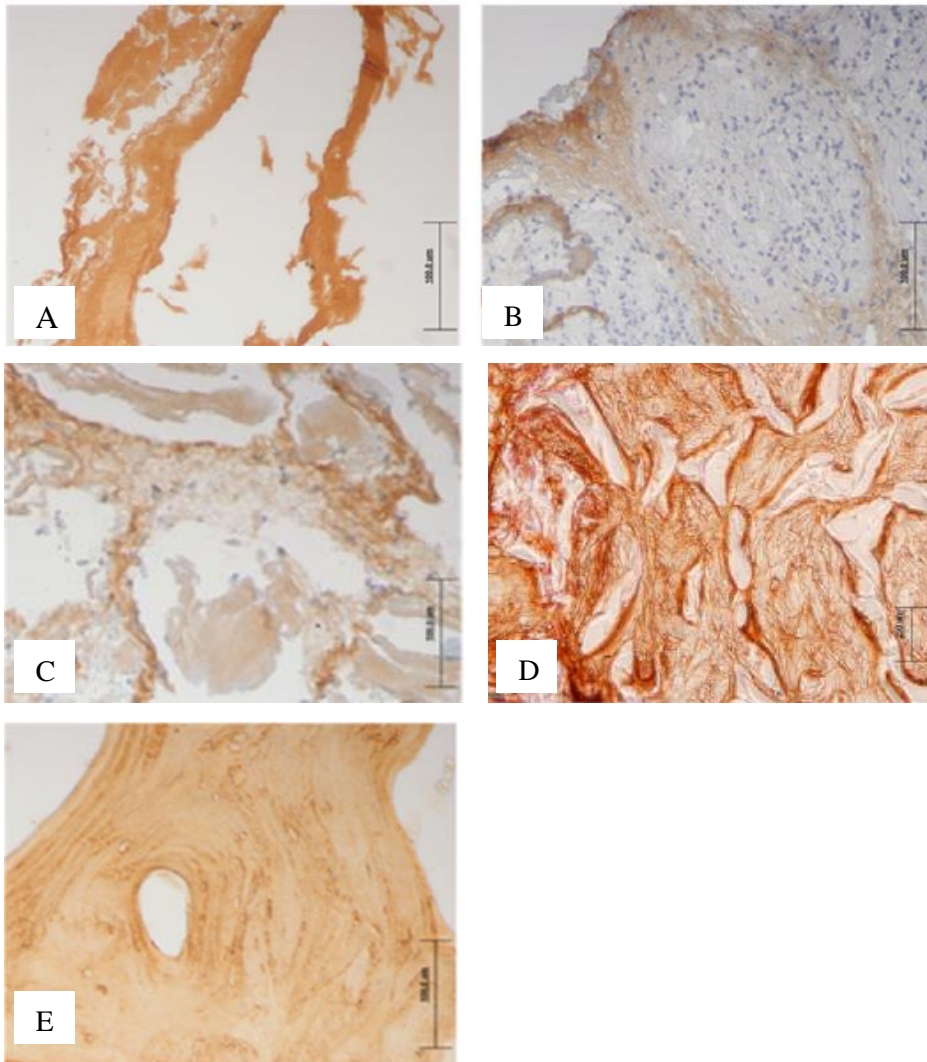
Tkivo nastalo na Nosaču II (Slika 16 B) pokazuje veliki broj gustih stanica koje okružuju homogeno vezivno tkivo (izvanstaničnog matriks) unutar njega. Tkivo izgledom podsjeća na osteoid, tjelešce organskog podrijetla bez minerala čiji rub čine stanice i okružuju vezivno tkivo koje proizvode.

Tkivo nastalo na Nosaču III (Slika 16 C) pokazuje stanice na rubovima kojih ima manje u odnosu na Nosač II a više nego u Nosaču I i isprekidani rub. Unutrašnjost je ispunjena vezivnim tkivom, također umjerene količine. Kontrola (Cht-HA nosač s 30 % hidroksiapatita) (Slika 16 D) pokazuje veliki broj stanica uniformno raspoređenih kroz cijeli volumen nosača zajedno s vezivnim tkivom.



Slika 16. Hematoksilin/eozin analiza novotvorenih tkiva u bioreaktorima, tri tjedna nakon osteogene diferencijacije, pod svjetlosnim mikroskopom. Hematoksilin boja jezgre plavom bojom, a eozin boja crvenom bojom citoplazmu i vezivno tkivo (kolagen). (A) Tkivo nastalo na Nosaču I, (B) Tkivo nastalo na Nosaču II, (C) Tkivo nastalo na Nosaču III. Mjerilo prikazuje 100 µm. (D) Tkivo nastalo na Cht-HA nosaču (30 % hidroksiapatita). Mjerilo prikazuje 1 mm.

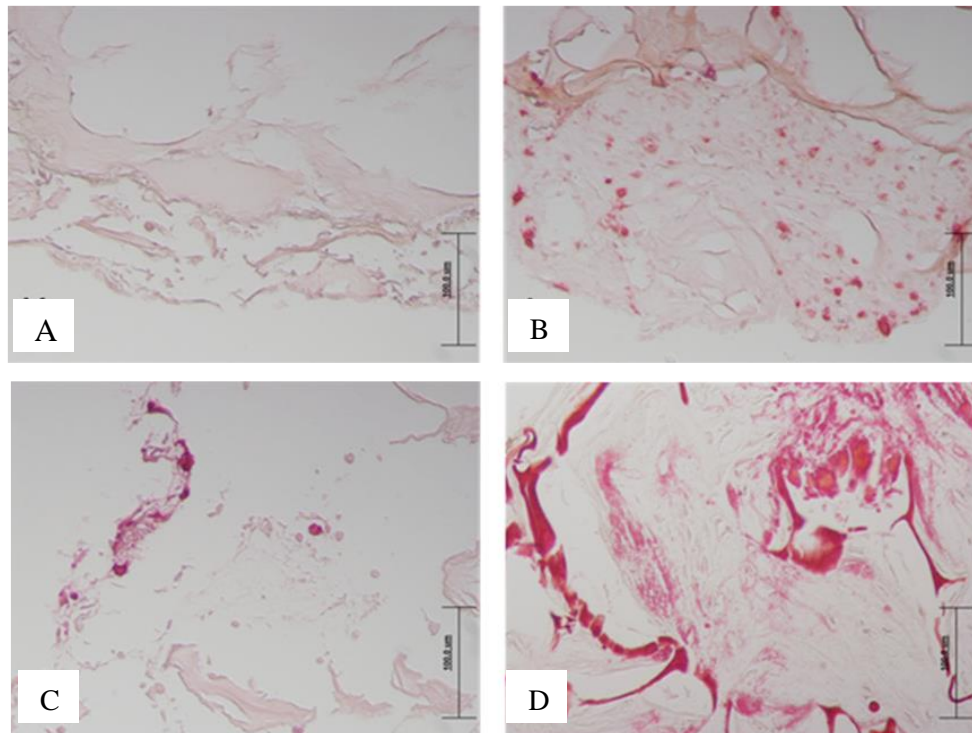
U svim novonastalim tkivima utvrđena je ekspresija kolagena 1 (Slika 17 A-D). Uz Nosač Cht-HA nosač (30 % hidroksiapatita), koji je u skladu s očekivanjem i pokazuje značajnu ekspresiju kolagena, kao pozitivna kontrola korištena je i ljudska kost (Slika 17 E). Sva tri hidrogel nosača RADA 16-I s ugrađenim deksametazonom pokazuju ekspresiju kolagena 1, koja se po lokaciji na uzorku poklapaju s vezivom vidljivim HE bojanjima, tj. u Nosaču I i III u području tračaka veziva, a u Nosaču II u vezivnom prstenu koji okružuje skupine stanica.



Slika 17. Imunohistokemijska analiza novonastalih tkiva u bioreaktorima, tri tjedna nakon osteogene diferencijacije, pod svjetlosnim mikroskopom. Ekspresija kolagena 1 prisutna je u svim tkivima. A) Nosač I, (B) Nosač II, (C) Nosač III, (D) Cht-HA nosač (30 % hidroksiapatita), (E) Ljudska kost korištena kao pozitivna kontrola. Mjerilo prikazuje 100 µm.

Bojanje bojom alizarin- red dokazuje prisustvo depozita kalcija u svim tkivima (Slika 18 A-D). Uspoređujući međusobno hidrogel nosače RADA 16-I s ugrađenim deksametazonom, tkivo nastalo na Nosaču II pokazuje najbolju mineralizaciju (Slika 18 B). Pozitivna kontrola za

alizarin-red bojanje je tkivo nastalo diferenciranjem hMSCs nasađenih na 30 %- tni hidroksiapatitni nosač u perfuzijskom bioreaktoru.



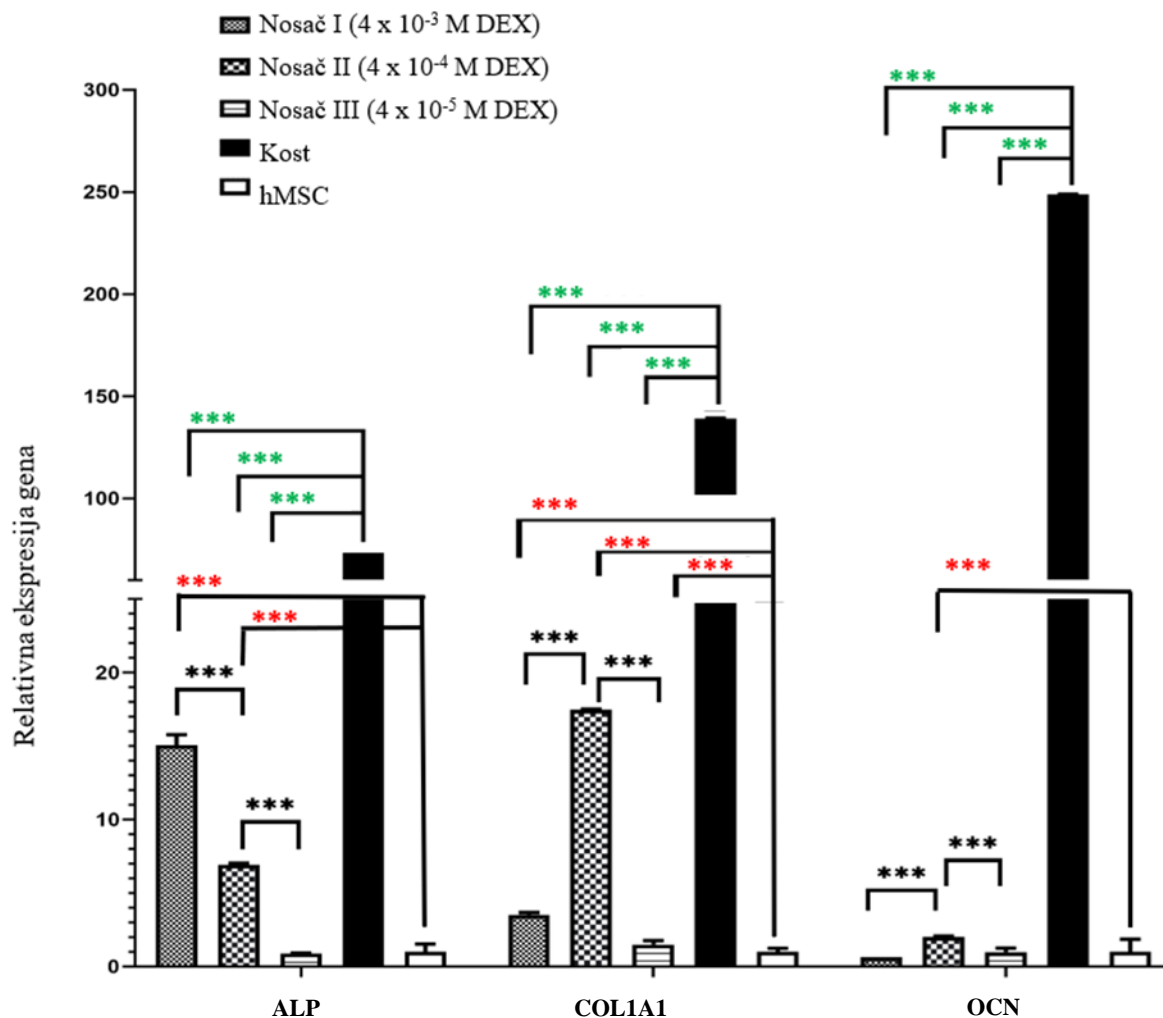
Slika 18. Alizarin-red bojanje novoformiranih tkiva u bioreaktorima, tri tjedna nakon osteogene diferencijacije, pod svjetlosnim mikroskopom. Alizarin-red veže se za depozite kalcija. (A) Tkivo nastalo na Nosaču I, (B) Tkivo nastalo na Nosaču II, (C) Tkivo nastalo na Nosaču III, (D) Tkivo nastalo Cht-HA nosaču (30 % hidroksiapatita). Mjerilo prikazuje 100 μm .

4.6. Genska ekspresija koštanih markera u novonastalim tkivima nakon osteogene diferencijacije u perfuzijskom bioreaktoru

Metodom RT-qPCR analizirana je ekspresija glasničke RNA (mRNA, prema engl. *messenger RNA*) alkalne fosfataze (*ALP*), kolagena 1 (*COL1A1*) i osteokalcina (*OCN*) u novonastalom tkivu iz bioreaktora, ljudskoj kosti (pozitivna kontrola) i nediferenciranim hMSCs (negativna kontrola).

Kada se uspoređuje ekspresija *COL1A* i *OCN* u tkivima iz bioreaktora, najbolja diferencijacija je uočena na Nosaču II. Na Nosaču III koji ima najmanju koncentraciju deksametazona, razine mRNA analiziranih gena su najniže (Slika 19). Na Nosaču I s najvećom razinom deksametazona jedino *ALP* ima veću ekspresiju. Iz svega navedenoga, zaključeno je da je od

tri testirane koncentracije deksametazona (4×10^{-3} , 4×10^{-4} i 4×10^{-5} M), za osteogenu diferencijaciju i regeneraciju koštanog tkiva optimalna koncentracija deksametazona ugrađenog na hidrogel nosač RADA 16-I iznosi 4×10^{-4} M.



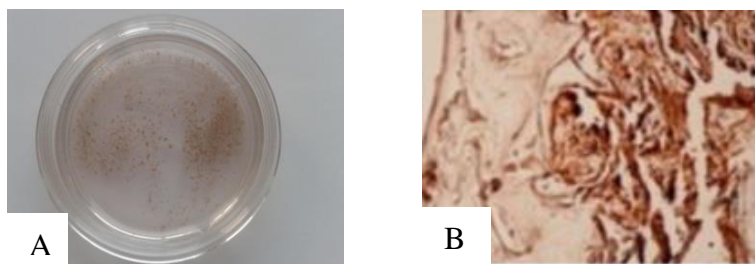
Slika 19. Relativna ekspresija gena osteogenih markera u tkivima nastalima nakon 21 dan diferencijacije u perfuzijskim bioreaktorima. hMSCs nasadiivane na hidrogel nosače RADA 16-I s različitim koncentracijama deksametazona (4×10^{-3} , 4×10^{-4} i 4×10^{-5} M). Analizirana je ekspresija alkalne fosfataze (ALP), kolagena tipa 1 (COL1A1) i osteokalcina (OCN), sve je normalizirano obzirom na negativnu kontrolu (nediferencirane hMSC). β - aktin je korišten kao endogena kontrola, a relativna ekspresija je određena metodom $\Delta\Delta$ Ct. Rezultati su prikazani kao prosjek \pm SD (n=3). *** p < 0.001 pokazuje značajnu razliku genske ekspresije između uzoraka novonastalih tkiva (označeno crnom zvjezdicom), hMSC (označeno crvenom zvjezdicom) i uzoraka ljudske kosti (označeno zelenom zvjezdicom).

4.7. Utvrđivanje prisustva minerala i njihova kvantifikacija

Mineralizacija je marker kasne osteogene diferencijacije, a osteoblasti su odgovorni za stvaranje minerala i mineralizaciju koštanog matriksa. Minerali se stvaraju i odlažu u izvanstaničnom matriksu, a u trodimenzionalnoj kulturi *in vitro* nosač služi kao predložak za taloženje minerala.

Minerali kalcija se nisu zadržali unutar hidrogel nosača RADA 16-I nego je njihovo taloženje primijećeno deseti dan nakon uspostave trodimenzionalne kulture, na dnu bioreaktora. U svrhu dokazivanja minerala kalcija unutar prikupljenog medija, talog je obojan metodom *Von Kossa* i pokazano je njihovo prisustvo (Slika 20 A). Medij je uzorkovan prilikom svake izmjene medija u bioreaktoru, 10., 14., 17., i 21. dan diferencijacije.

U bioreaktoru s Nosačem Cht-HA (30 % hidroksiapatita) taloženje minerala kalcija nije primijećeno u mediju, ali su dokazani unutar nosača bojanjem metodom *Von Kossa* (Slika 20 B), što je sukladno očekivanjima baziranim na drugačijoj strukturi nosača.

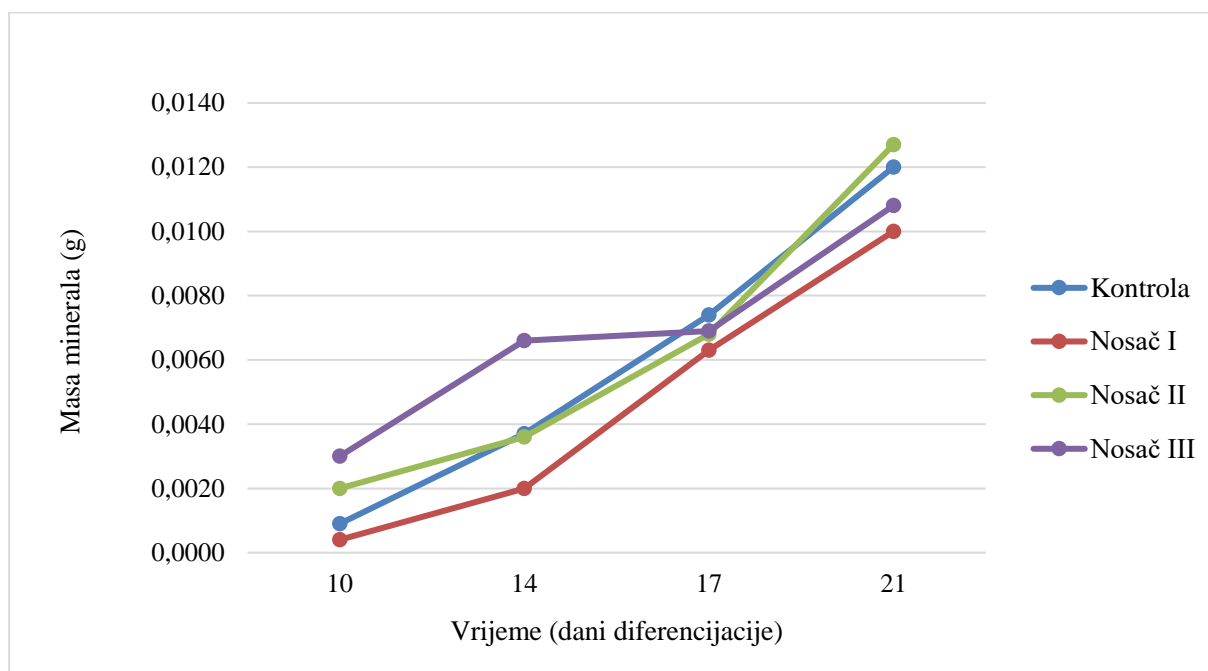


Slika 20. Minerali dokazani metodom *Von Kossa*. (A) Talog minerala prikupljen u mediju bioreaktora s Nosačem II, (B) Cht-HA nosač (30 % hidroksiapatita) nakon 21 dan diferencijacije u perfuzijskom bioreaktoru. Skala prikazuje 100 µm.

U svrhu kvantifikacije minerala, određene su mase minerala prikazane u Tablici 5. Rezultati pokazuju da je u Nosačima II i III mineralizacija počela ranije, već oko 10- tog dana (Slika 21). Nakon 21 dan u trodimenzionalnoj staničnoj kuturi perfuzijskog bioreaktora na Nosaču II i Nosaču III proizvedeno je najviše minerala, na Nosaču I i kontroli pokazan je slabiji prinos (Slika 21) što je u skladu s rezultatima dobivenima bojanjem alizarin-red bojom.

Tablica 5. Masa taloga minerala nastala u perfuzijskim bioreaktorima s Nosačem I (4×10^{-3} M DEX), Nosačem II (4×10^{-4} M DEX), Nosačem III (4×10^{-5} M DEX), Kontrola (hidrogel RADA 16-I nosač bez deksametazona, uz dodatak deksametazona u medij).

| Dani diferencijacije | Kontrola Masa (g) | Nosač I Masa (g) | Nosač II Masa (g) | Nosač III Masa (g) |
|----------------------|-------------------|------------------|-------------------|--------------------|
| 10. | 0,0009 | 0,0004 | 0,0020 | 0,0030 |
| 14. | 0,0037 | 0,0020 | 0,0036 | 0,0066 |
| 17. | 0,0074 | 0,0063 | 0,0068 | 0,0069 |
| 21. | 0,0120 | 0,0100 | 0,0127 | 0,0108 |

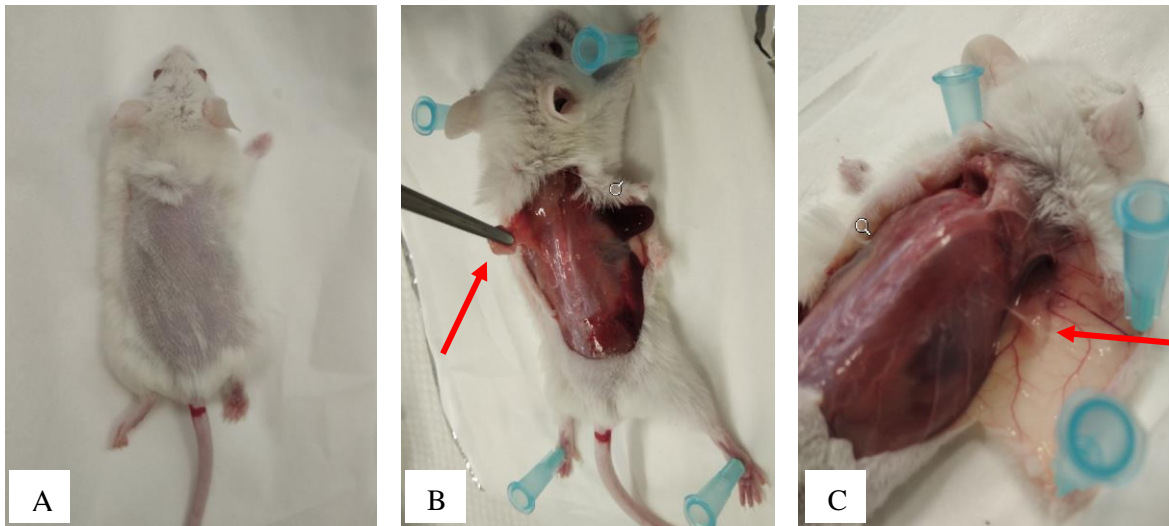


Slika 21. Prikaz prinosa mase minerala u različitim danima diferencijacije na Nosaču I, Nosaču II, Nosaču III i kontroli. Nakon tri tjedna diferencijacije najveća ukupna masa minerala detektirana je u mediju s Nosačem II. Kontrola (hidrogel nosač RADA 16-I bez inkorporiranog deksametazona uz dodatak deksametazona u medij; označeno plavom bojom), Nosač I (4×10^{-3} M DEX; označeno crvenom bojom), Nosač II (4×10^{-4} M DEX; označeno zelenom bojom), Nosač III (4×10^{-5} M DEX; označeno ljubičastom bojom).

4.8. Analiza ektopičnog koštanog tkiva naraslog u imunodeficientnim miševima

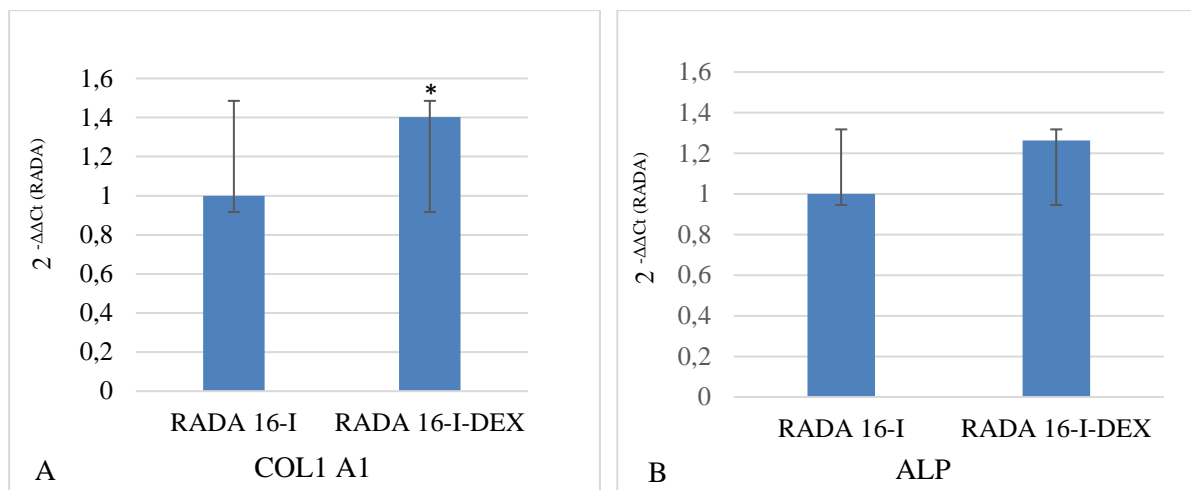
U svrhu potvrđivanja rezultata dobivenih u sustavu *in vitro* gdje je Nosač II pokazao optimalan osteogeni potencijal, Nosači II implantirani su potkožno u miševima SCID. U svakog miša implantirana su ukupno dva nosača, Nosač II i nosač bez deksametazona koji je služio kao kontrola.

Osam tjedana nakon implantacije, novonastalo ektopično tkivo je izvađeno (Slika 22) i analizirano metodom RT-qPCR. U svim miševima na mjestima implantiranja Nosača II naraslo je ektopično tkivo (Slika 22 B), dok su se na mjestima implantiranja hidrogel nosača RADA 16-I bez deksametazona nalazili ostaci hidrogela teško vidljivi prostim okom (Slika 22 C).



Slika 22. Vadenje novonaraslog ektopičnog tkiva 8 tjedana nakon implantacije nosača u miševu SCID. (A) Priprema miša prije vadenja novonastalog tkiva brijanjem i sterilizacijom, (B) tkivo nastalo na mjestu implantacije Nosača II, (C) ostaci hidrogel nosača RADA 16-I. Crvene strelice pokazuju mjesto lokalizacije tkiva (B) i ostataka hidrogela RADA 16-I (C).

Metodom RT-qPCR analizirana je ekspresija mRNA *ALP*, *COL1A1*, *BSP* i *OCN* u tkivima nastalima 8 tjedana nakon implantiranja nosača u miševu. Kada se uspoređi ekspresija osteogenih gena u tkivima nastalima na nosačima koji su imali inkorporirani deksametazon s tkivom nastalim na nosačima bez deksametazona vidljivo je da je ekspresija markera rane osteogeneze *COL1A1* i *ALP* veća na hidrogel nosaču RADA 16-I s inkorporiranim deksametazonom (Slika 23). Markeri uznapredovale osteogeneze, *BSP* i *OCN*, nisu detektirani 8 tjedana nakon implantacije.



Slika 23. Ekspresija gena osteogenih markera u ektopičnim tkivima nastalima 8 tjedana nakon implantacije nosača u miševe SCID. RADA 16 I-DEX (hidrogel nosač RADA 16-I s hMSC i deksametazonom u koncentraciji 4×10^{-4} M) i RADA 16-I (hidrogel nosač RADA 16-I s hMSC bez deksametazona) nosači implantirani su potkožno na leđnu stranu miševa SCID. Metodom RT-qPCR analizirana je ekspresija: (A) kolagena tipa I (Col1A1), (B) alkalne fosfataze (ALP). β - aktin je korišten kao endogena kontrola, a ekspresija gena određena je metodom $\Delta\Delta C_t$. Rezultati su prikazani kao prosjek \pm SD (n=3). * $p < 0.05$ pokazuje značajnu razliku genske ekspresije između uzoraka novonastalih tkiva i kontrole tj. samog nosača RADA 16-I.

5. RASPRAVA

U ovome istraživanju ispitano je da li deksametazon, koji je korišten kao osteoinduktivni signal, potiče osteogenu diferencijaciju ako je ugrađen u hidrogel nosač RADA 16-I.

Nosači su testirani u sustavima *in vitro* (perfuzijski bioreaktor) i *in vivo* (model ektopičnog formiranja kosti). Perfuzijski bioreaktori korišteni su za određivanje optimalne koncentracije deksametazona za osteogenezu i analizu strukture nosača nakon ugradnje deksametazona, a sve u svrhu uspješnog ektopičnog stvaranja kosti u imunodeficijentnim miševima.

Pogodan nosač za tkivni inženjering kosti trebao bi biti biokompatibilan, bioresorbilan, osteokonduktivan, osteoinduktivan, osteogeni, slične strukture koštanom tkivu, jednostavan za korištenje i isplativ. U ovome istraživanju korišten je hidrogel nosač RADA 16-I na bazi peptida koji pripada novoj vrsti biokompatibilnih i biorazgradivih nosača koji se koriste u tkivnom inženjerstvu kosti (Kirkham i sur., 2007., Chen J i sur., 2013.), hrskavice (Florine i sur., 2013.) i mekih tkiva (Maude i sur., 2013.). Hidrogelovi na bazi peptida sastoje se od aminokiselinskih ostataka koji u prisutnosti soli polimeriziraju i formiraju vlakna nanometarskih veličina i spajaju se u trodimenzionalnu strukturu (Lee i sur., 2001.).

Za razliku od drugih tipova nosača, peptidni hidrogelovi ne izazivaju imunološki odgovor u organizmu domaćina, u njih se mogu ugraditi stanice, signalne molekule i lijekovi (Lee i sur., 2001.) što ih čini idealnima za korištenje u tkivnom inženjerstvu. Dosadašnja istraživanja pokazuju da su hidrogelovi na bazi peptida dobar sustav za kontrolirano otpuštanje lijekova (Yu Z i sur., 2015.), a u usporedbi s kemijski sintetiziranim polimernim materijalima, bolje reagiraju na vanjske podražaje. Kako sadrže veliki udio vode (do 99,5 %) mogu se koristiti za difuziju širokog spektra molekula (Nagai i sur., 2006.). Ovisno o kliničkoj namjeni i potrebama, struktura hidrogelova može se prilagoditi na razne načine, kao npr. može se mijenjati struktura peptida, veličina pora, vezati na njih različite kemijske skupine i sl. (Lee i sur., 2001.). Za razliku od čvrstog koštanog tkiva te nekih već postojećih nosača, poput Cht-HA, hidrogel nosač RADA 16-I je mekane konzistencije, pa veličina samog presatka i slaba mehanička svojstva predstavljaju ograničavajući faktori koje treba prevladati (Chen J i sur., 2013.).

Nastavno na istraživanje Hamada i sur. (2008). koji su pokazali da hidrogel RADA 16-I u staničnoj kulturi može služiti kao nosač za formiranje koštanog tkiva koristeći štakorske MSCs uz dodatak Asc, β -GP i deksametazona u hranjivom mediju, rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da hidrogel RADA 16-I može biti dobra potpora za diferencijaciju hMSCs u pravcu osteoblasta i proizvodnji koštanog tkiva ne samo *in vitro* u perfuzijskom bioreaktoru nego i *in vivo* u tijelu imunosuprimiranih eksperimentalnih životinja. Nadalje, rezultati ove doktorske

disertacije, u skladu s dosadašnjim istraživanjima, ukazuju na potrebu daljne optimizacije čvrstoće hidrogela u cilju postizanja optimalne konzistencije za aplikaciju *in vivo* i moguću buduću kliničku praksu.

U tkivnome inženjerstvu kosti važno je koristiti i biosignalne molekule koje će usmjeriti stanice u željenu diferencijaciju i koje pritom neće poremetiti strukturu nosača i naštetiti domaćinu. Nakon implantacije, koštani presadak može utjecati na domaćina otpuštajući različite faktore rasta, vaskularizacije ili unoseći stanice koje mogu otpuštati faktore rasta ili biti genetski modificirane (Mauney i sur., 2005.). Danas se najčešće kao biosignalne molekule koriste rekombinantni BMP proteini (Friess i sur., 1999.), a najviše korišteni nosač u klinici je kolagenski nosač koji na sebe ima vezani BMP-2 (Friess i sur., 1990.) čije je korištenje za regeneraciju koštanog tkiva odobreno od strane FDA (Oliveira i sur. 2021.).

Deksametazon usmjerava hMSC u osteogenezu aktivacijom Runt-a, najvažnijeg transkripcijskog faktora osteogeneze (Langenbach i sur., 2013.), a u medicini se često koristi kao protuupalni lijek (Chan i sur., 2020.). Dosadašnja istraživanja pokazuju da nosači na bazi hidrogela koji na sebi imaju kitozan i hijaluronsku kiselinu uz dodatak deksametazona poboljšavaju proces osteogeneze u uvjetima *in vitro* (Sun i sur., 2013.) u usporedbi s nosačima bez deksametazona. Potencijal deksametazona da inducira osteogenezu *in vivo*, pokazan je na primjeru nosača od gelatina koji na sebi imaju vezan BMP-2 i deksametazon (Gan i sur., 2022.). U spomenutom istraživanju, kontrolni nosači koji nisu imali vezani deksametazon pokazivali su slabiju mineralizaciju i ekspresiju osteogenih gena *RUNX2*, *ALP* i *OCN*.

Obzirom na poznate karakteristike peptidnog hidrogela RADA 16-I i deksametazona, pretpostavka je da bi se hidrogel nosač RADA 16-I koji ima ugrađeni deksametazon mogao koristiti u oštećenjima *in vivo* u kojima bi potaknuo diferencijaciju endogenih matičnih stanica. Polimerizacija hidrogela RADA 16-I zarobljava deksametazon unutar svojih pora što ga čini idealnim nosačem za deksametazon jer se zbog steroidine strukture deksametazon ne može kovalentno vezati za nosače. Analiza hidrogel nosača RADA 16-I-DEX pod skenirajućim elektronskim mikroskopom pokazala je da inkorporacija deksametazona ne narušava vlaknastu strukturu hidrogela RADA 16-I i da se niti hidrogela RADA 16-I slažu u trodimenzionalnu strukturu isto kao i kod hidrogela RADA 16-I bez deksametazona.

Unatoč očekivanim prednostima vezanja signalnih molekula unutar nosača, poseban izazov predstavlja određivanje idealne koncentracije signalnih molekula koja će se inkorporirati na nosač te njihovo kontrolirano otpuštanje s nosača (Oliveira i sur., 2021.). Poznato je da prevelike koncentracije deksametazona u staničnim kulturama mogu izazvati apoptozu stanica (Hamidouche i sur., 2008.), stoga je bilo potrebno pronaći optimalnu koncentraciju

deksametazona koja će se ugraditi na nosač te ispitati kinetiku otpuštanja deksametazona s nosača hidrogel RADA 16-I.

Rezultati dobiveni u ovoj studiji pokazuju da hidrogel nosači RADA 16-I s inkorporiranim deksametazonom zadržavaju veliku sposobnost vezanja stanica, ali je moguće da koncentracija deksametazona utječe na broj hMSC vezanih na hidrogel RADA 16-I. Na Nosač II s koncentracijom deksametazona od 4×10^{-4} M, koji se pokazao najboljim nosačem za osteogenezu, bilo je vezano 88 % nasađenih stanica što se pokazalo dovoljnom količinom za uspješno stvaranje novog tkiva. Najmanji postotak vezanih stanica od 70 % bio je pri najvećoj koncentraciji deksametazona od 4×10^{-3} M na Nosaču I što je moguće posljedica visoke koncentracije deksametazona koju stanice ne toleriraju. Naši rezultati sugeriraju da su stanice u sustavu s Nosačem I bile izložene koncentraciji deksametazona od 10^{-5} M, a dosadašnja istraživanja pokazuju da je optimalna koncentracija deksametazona u uvjetima *in vitro* 10^{-7} M, a pri koncentracijama deksametazona od 10^{-6} M može doći do povećane apoptoze stanica i smanjene proliferacije što se u staničnim kulturama primjećuje nakon petog dana inkubacije (Song i sur., 2009.).

Najčešći način ugrađivanja signalne molekule u hidrogel je njihovo miješanje kada nakon polimerizacije hidrogela signalne molekule ostaju fizički zarobljene unutar mreže hidrogela. Prije miješanja s deksametazonom, hidrogel RADA 16-I je u tekućem obliku, a u prisustvu medija ili PBS-a polimerizira te na taj način deksametazon ostaje zarobljen unutar pora hidrogela. Rezultati u ovoj studiji sugeriraju da otpuštanje deksametazona prati kinetiku razgradnje hidrogel nosača RADA 16-I i u skladu su s istraživanjem Briuglia i sur. 2014 koje je pokazalo da je hidrogel RADA 16-I nosač koji omogućava postepeno i kontrolirano otpuštanje bioaktivnih tvari, a da kinetika otpuštanja lijekova ovisi o strukturi i kemijskim svojstvima zarobljenih lijekova te o razgrađivanju samog hidrogela. Krivulja otpuštanja deksametazona potvrđuje da se otpuštanje deksametazona s hidrogel nosača RADA 16-I odvija u tri faze. Prvu fazu karakterizira oslobađanje deksametazona zbog ispiranja nezarobljenih molekula na površini gela. Druga faza je faza sporijeg oslobađanja deksametazona zbog sporije stope razgradnje hidrogela. Tijekom posljednje faze, hidrogel se brzo razgrađuje i otpušta preostali deksametazon.

Istraživanja koja proučavaju oslobađanje bioaktivnih molekula iz hidrogelova u sustavima *in vitro* pokazuju da hidrogelovi poput RADA 16-I s višim koncentracijama peptida imaju dulji period razgradnje i duže zadržavaju zarobljene molekule pa su bolji sustavi za prijenos bioaktivnih molekula (Zhang i sur., 2011.). U situacijama kada su pore hidrogela veće od signalnih molekula, hidrogel oslobađa većinu molekula unutar prvih nekoliko dana (Zhang i

sur., 2011.). Za razliku od toga, hidrogel RADA 16-I sadrži nanopore i tako osigurava bolje zadržavanje molekula unutar svojih pora pa se pokazalo da otpuštanje inkorporiranih molekula ovisi samo o brzini razgradnje peptida [COCH₃]-RADARADARADARADA-[CONH₂] (Hayashi i sur., 2009.). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je hidrogel nosač RADA 16-I-DEX, nosač s kojeg se deksametazon otpušta kontinuirano stvarajući mikro-okoliš za stanice u kojem je koncentracija deksametazona u rasponu od 1×10^{-7} M do 1×10^{-6} M ukoliko početna koncentracija inkorporiranog deksametazona na nosaču iznosi 4×10^{-4} M. Takve koncentracije slične su fiziološkim koncentracijama glukokortikoida prisutnima u procesu koštane pregradnje (Delany i sur., 1994.) stoga pogoduju diferencijaciji hMSCs unutar perfuzijskog bioreaktora. Rezultati ove studije pokazuju da je otpuštanje deksametazona s hidrogel nosača RADA 16-I sporije u usporedbi s otpuštanjem BMP-2 s kolagenskog nosača gdje se BMP u početnoj fazi razgradnje nosača otpušta vrlo brzo i koncentracija mu je daleko iznad normalnih fizioloških uvjeta (Friess i sur., 1990.). Zbog kratkog vijeka BMP-a potrebno je na nosač vezati veću koncentraciju BMP-a da bi se što duže zadržao unutar ciljanog mjesta. Taj tehnički nedostatak povećava troškove terapije i stvara komplikacije povezane s visokom dozom lijeka (Carragee i sur., 2011). Zato je potrebno razviti sustave u koje se može ugraditi željena koncentracija signalnih molekula, s kontroliranim otpuštanjem kroz duže vrijeme u manjim koncentracijama. Prilikom odabira stanica za stvaranje koštanog presadka, potrebno je voditi računa o njihovim svojstvima. hMSCs u živome organizmu diferenciraju i stvaraju koštano tkivo, jednostavno se izoliraju i održavaju u staničnoj kulturi te brzo propagiraju stoga su najčešći odabir za tkivni inženjering kosti. Dosadašnja pretklinička istraživanja na konstruktima s hMSCs pokazuju ubrzano koštano cijeljenje različitih oštećenja (oštećenja femura kritične veličine, kranio-maksilofacijalnih deformiteta, spinalne fuzije) (Mauney i sur., 2005.). Uz sve navedeno, hMSCs imaju slab imunogenetski fenotip i imunosupresivne su (ne potiču proliferaciju limfocita) pa su sigurna alternativa za autologne koštane presatke. Mauney i sur. 2005. pokazali su da prisutnost različitih bioaktivnih molekula na različitim vrstama nosača poboljšava osteogenu diferencijaciju hMSCs. U izradi ove doktorske disertacije hMSC su izolirane iz koštane srži i nasađene na hidrogel nosač RADA 16-I-DEX uz medij koji sadrži induktore osteogeneze, β -GP i Asc.

Poznato je da se hMSCs mogu uzgajati na trodimenzionalnim nosačima i mogu služiti kao predložak za formiranje kosti u dinamičnom sustavu perfuzijskog bioreaktora (Fröhlich i sur., 2008.), te da im je u takvim sustavima povećana proliferacija i poboljšan osteogenetski potencijal (Yeatts i sur., 2013.). Za utvrđivanje osteogenog potencijala hidrogel RADA 16-I-DEX nosača i odabir optimalne koncentracije deksametazona, u ovome istraživanju korišteni

su perfuzijski bioreaktori. Postoje brojne prednosti perfuzijskih bioreaktora u odnosu na stacionarne stanične kulture poput migracije stanica kroz unutrašnjost nosača, homogeno formiranje izvanstaničnog matriksa, efikasne izmjene hranjivih tvari i nutrijenata između nosača i medija te prisutstvo mehaničkog podražaja od perfuzije koja tjera medij kroz cijeli volumen nosača (Gaspar i sur., 2012.). U perfuzijskim bioreaktorima dobiveni su bolji rezultati u indukciji osteogene diferencijacije i formiranju kosti *de novo* u uvjetima *in vitro* (Gaspar i sur., 2012.) u usporedbi s ostalim vrstama bioreaktora. Tako npr., pokusi na bioreaktorima s rotirajućom stjenkom pokazuju da je diferencijacija hMSCs prema osteoblastima poboljšana u odnosu na statične stanične kulture, no glavni im je nedostatak što se većina stanica pričvrsti na površini nosača gdje se formira gusti sloj stanica koji sprečava neometani protok kisika i hranjivih tvari kroz čitav nosač (Stiehler i sur., 2009.) što u konačnici rezultira slabijom osteogenezom za razliku od perfuzijskog bioreaktora.

Perfuzijski bioreaktori namijenjeni su čvrstim nosačima stoga je u ovome istraživanju bioreaktor prilagođen za hidrogel RADA 16-I dodavanjem mrežica staničnog sita unutar bioreaktora te smanjenjem perfuzije na 0.1 mL/min. Brzina perfuzije je jedan od glavnih parametara koji utječe na osteogenezu jer perfuzija stimulira koštane stanice da ispolje veće razine koštanih markera i istovremeno ih potiče na veću proizvodnju minerala (Kasper i sur., 2008.). Optimalan raspon perfuzije za osteogenezu je od 0.2 do 1 mL/min (Gaspar i sur., 2012.). Unatoč tome što je perfuzija medija u ovom istraživanju bila manja od preporučenih vrijednosti koštano tkivo je formirano na svim hidrogel nosačima RADA 16-I s deksametazonom. .

U perfuzijskim bioreaktorima testirane su tri koncentracije deksametazona inkorporiranog unutar hidrogel nosača RADA 16-I (4×10^{-3} , 4×10^{-4} i 4×10^{-5} M). Kao kontrole korišteni su nosač Cht-HA (30 % hidroksiapatita) i hidrogel nosač RADA 16-I, oba bez inkorporiranog deksametazona, ali uz prisutstvo 10^{-7} M deksametazona u mediju. Prijašnja istraživanja pokazuju da hMSCs diferenciraju prema osteoblastima na Nosaču Cht-HA s 30 % hidroksiapatita (Rogina i sur., 2017.), što je potvrđeno i u ovome radu. Nosač Cht-HA je tvrdi od nosača hidrogel RADA 16-I stoga je hidrogel jednostavnije aplicirati na mjesto ozljede i oporavak je puno brži. Isto tako, nosač Cht-HA nije pogodan za vezanje deksametazona zbog stvaranja kovalentnih veza. Kako u uvjetima *in vivo* postoji potreba za stalnim koncentracijama deksametazona u mikrookolišu kosti koja cijeli, nosač hidrogel RADA16-I primjenjiviji je za uporabu *in vivo* jer polimerizacijom zarobi deksametazon unutar svojih pora i postupno otpušta deksametazon u okolinu.

Tri tjedna nakon osteogene diferencijacije tkiva su izvađena iz bioreaktora i analizirana na markere osteogeneze. Metodom RT- qPCR analizirana je genska ekspresija alkalne fosfataze

(ALP), kolagena 1 (*COL1A1*) i osteokalcina (*OCN*) u usporedbi s ljudskom kosti i nediferenciranim hMSCs. Analizom je pokazano da su ispitivani geni eksprimirani u svim tkivima, što je dokaz da su hMSCs diferencirale u osteoblaste i proizvele koštano tkivo. Ekspresije spomenutih gena nisu iste u svim analiziranim uzorcima što ukazuje da različita koncentracija deksametazona različito utječe na stupanj diferencijacije. Najveća razina ekspresije ALP je u Nosaču I (4×10^{-3} M) no morfologija tkiva u tome nosaču nije adekvatna vjerojatno zbog citotoksičnosti deksametazona i/ili manjeg broja vezanih hMSCs na početku. Kako je ALP marker rane faze osteogene diferencijacije, najveća razina ALP nakon tri tjedna osteogeneze sugerira da u Nosaču I osteogeneza nije napredovala kao u Nosaču II. Kako bi utvrdili dinamiku ekspresije markera osteogene diferencijacije kroz vrijeme u perfuzijskom testnom sustavu potrebno je daljnja istraživanja usmjeriti u tom pravcu.

Visoke razine *COL1A1* i *OCN* markeri su mineralizacije, zadnjeg stadija u procesu osteogeneze (Amarasekara i sur., 2021.). Rezultati ekspresije *COL1A1* i *OCN* pokazuju da je za osteogenu diferencijaciju i regeneraciju koštanog tkiva najbolja koncentracija deksametazona unutar Nosača II. U Nosaču III koncentracija deksametazona nije dovoljna za adekvatnu osteogenu diferencijaciju.

U svim novonastalim tkivima uočene su sve komponente koštanog tkiva: stanice, izvanstanični matriks i minerali, ali u različitim omjerima ovisno o nosaču. Tkivo nastalo na Nosaču II pokazalo je koštanu morfologiju najbližnju koštanom tkivu čovjeka s velikim brojem gustih stanica koje okružuju homogeno vezivno tkivo (izvanstaničnog matriks) unutar njega što izgledom podsjeća na osteoid, tjelešce organskog podrijetla bez minerala čiji rub čine stanice i okružuju vezivno tkivo koje proizvode. Zaključku da je Nosač II najbolji za osteogenezu doprinose i histološki rezultati dobiveni bojanjem alizarin-redom i imunohistokemijom, koji pokazuju prisustvo kalcija i ekspresiju kolagena 1 zajedno s najvećim brojem stanica u nosaču. Svi rezultati ukazuju da je na Nosaču II, s koncentracijom deksametazona 4×10^{-4} M, nastalo tkivo koje je po strukturi i sastavu najbližnje koštanom tkivu čovjeka. Uspješno formiranje koštanih tkiva unutar perfuzijskih bioreaktora, posljedica je produljenog oslobađanja deksametazona u primjerenj koncentraciji s hidrogel nosača RADA 16-I što utječe pozitivno na diferencijaciju hMSCs u osteoblaste.

Uz ekspresiju gena mineralizacije (*COL1A1* i *OCN*), određena je količina nastalih minerala na hidrogel nosačima RADA 16-I s deksametazonom. Mineralizacija karakterizira kasnu osteogenu diferencijaciju koja obično počinje oko 14 -og dana osteogeneze u kulturama stanica, a stanice odgovorne za stvaranje minerala i mineralizaciju koštanog matriksa su diferencirani osteoblasti. Minerali se odlažu u izvanstaničnom matriksu, a u trodimenzionalnoj kulturi *in*

in vitro nosač služi kao sustav za praćenje taloženja minerala. Nosač Cht-HA kemijski veže minerale zbog svoje strukture i zadržava ih unutar nosača (Rogina i sur., 2017), za razliku od hidrogela RADA 16-I gdje je taloženje minerala primjećeno na dnu biorektora. Uz sve to, perfuzija dodatno ispire minerale s nosača. Ovaj nedostatak hidrogela pokušava se prevladati uvođenjem anorganske faze u hidrogel što će služiti kao predložak za mineralizaciju i stvaranje kemijskih veza između hidrogela i minerala (Gkioni i sur., 2010.). Ovisno o količini nastalih minerala u svakom pojedinom bioreaktoru određeno je u kojem je nosaču osteogeneza najviše uznapredovala. U Nosačima II i III mineralizacija je počela oko 10-og dana što je ranije nego inače u staničnoj kulturi, u odnosu na Nosač I i kontrolu (hidrogel RADA 16-I bez inkorporiranog deksametazona, uz prisustvo deksametazona u mediju) gdje je taloženje minerala uočeno 14- tog dana nakon uspostave kulture kako se i inače događa u kulturi stanica. Nakon tri tjedna osteogene diferencijacije najviše minerala u mediju detektirano je u perfuzijskim bioreaktorima koji su imali Nosač II i Nosač III. Kombinacija bojanja alizarin redom i *von Kossa* sugeriraju da je unutar Nosača II proizvedeno i vezano najviše minerala u usporedbi s ostalim nosačima. Spomenuti rezultati potvrđuju da koncentracija deksametazona u Nosaču II potiče formiranje koštanog tkiva najbližije koštanom tkivu čovjeka te da bi na takvom nosaču koštanom presatku bilo dovoljno kraće vrijeme uzgoja *in vitro* prije implantacije *in vivo*. Isto tako, koncentracija deksametazona između 10^{-6} M i 10^{-7} M kojoj su stanice izložene većinu vremena unutar perfuzijskog sustava s Nosačem II pogodna je za bržu proliferaciju stanica što u konačnici utječe na količinu proizvedenih minerala kalcija.

Ukratko, rezultati dobiveni eksperimentima *in vitro* pokazuju da je najbolja utvrđena koncentracija deksametazona unutar hidrogel nosača RADA 16-I 4×10^{-4} M (Nosač II). Na Nosaču II ljudske mezenhimske matične stanice pokazuju najvišu ekspresiju markera mineralizacije (*OC*, *COL1A1*), izlučuju najviše vezivnog tkiva i minerala. Rezultati su u skladu s dosadašnjim istraživanjima koja pokazuju da izloženost matičnih stanica, izoliranih iz ljudskih periodontalnih ligamenata, različitim koncentracijama deksametazona utječe na osteogenu diferencijaciju. Poznato je da koncentracija deksametazona od 10^{-7} M potiče najsnažniju diferencijaciju i mineralizaciju (Kim i sur., 2013.).

Korištenje trodimenzionalnih staničnih kultura u perfuzijskim bioreaktorima ima brojne prednosti pred stacionarnim staničnim kulturama i dobar je alat za početni probir optimalnog nosača što u konačnici smanjuje potreban broj životinjskih modela. Ovim istraživanjem pokazano je da perfuzijski bioreaktor može poslužiti za ispitivanje nosača na bazi hidrogela uz modifikacije unutar bioreaktora i smanjenje perfuzije medija.

U svrhu potvrđivanja osteogenog potencijala hidrogel nosača RADA 16-I-DEX, Nosači II implantirani su subkutano na leđnu stranu miševa s ciljem ektopičnog stvaranja kosti. Subkutana implantacija je najjednostavnija metoda ektopičnog stvaranja kosti, a koristi se za istraživanja u kojima se istražuje osteoinduktivnost samog nosača bez utjecaja dodatnih faktora iz okolnog tkiva (Wlodarski i sur., 1986; Scott i sur. 2012.) jer u subkutanome dijelu nema matičnih stanica koje u normalnim uvjetima stvaraju kost. Najčešće korišteni tip stanica u ovoj metodi je BMSCs, a velika dostupnost imunodeficientnih glodavaca ovu metodu čini klinički pristupačnom. Stanice se mogu implantirati u životinje odmah po izolaciji, nakon propagacije u kulturi stanica ili nakon prediferencijacije (Viateau i sur., 2008.). U našem istraživanju stanice su nasađivane na hidrogel nosač RADA 16-I nakon propagacije u kulturi stanica. Na mjestima na kojima je implantiran Nosač II naraslo je koštano tkivo u subkutanome dijelu što je u skladu s dosadašnjim studijama koje pokazuju da mezenhimalne matične stanice proizvode kost u subkutanome dijelu miševa uz dodatak signalnih molekula poput BMP-2 i nosača na bazi kolagena (Dragoo i sur., 2005.).

U blizini mjesta gdje je implantiran nosač bez deksametazona pronađeni su ostaci hidrogela koje je bilo teško locirati zbog boje slične okolnom tkivu. Naime, poznato je da je jedan od glavnih nedostataka subkutane implantacije teška identifikacija novoformirane kosti koja može biti slične boje kao okolno tkivo kao i migracija implantata zbog labave kože (Viateau i sur., 2008.).

Narasli uzorci nisu bili očekivane veličine što je moguće zbog niske pH vrijednosti hidrogela RADA 16-I (pH = 3). Prije implantiranja u imunodeficientne miševe, hMSCs su direktno pomiješane s hidrogel RADA 16-I, za razliku od perfuzijskog sustava gdje se hMSCs zajedno s medijem stavljaju u bioreaktor što pomaže uravnotežiti pH- vrijednost (prema engl. *potential of hydrogen*) u bioreaktoru u kojem je pH vrijednost 7.4. Poznato je da u staničnim kulturama male promjene izvanstaničnog pH izazvane raspadanjem nosača mijenjaju sposobnost hMSCs da diferenciraju u osteoblaste (Kohn i sur., 2002). Iz tog razloga, smatram da korišteni ektopični model nije najbolji model za ispitivanje osteoinduktivnog potencijala hidrogel nosača RADA 16-I-DEX. Zbog nedovoljne količine tkiva, u uzorcima je analizirana ekspresija osteogenih markera *COL1A1*, *ALP*, *BSP* i *OCN* metodom RT- qPCR, a histokemijske analize nije bilo moguće provesti. Poznato je da je ekspresija *COL1A1* i *ALP* vidljiva već u ranim stadijima osteogeneze, dok je ekspresija *BSP* i *OCN* vidljiva u kasnijim stadijima osteogeneze (Amarasekara i sur., 2021). U uzorcima nastalima na mjestu implantacije Nosača II, vidljiva je veća ekspresija ranih markera osteogeneze, *COL1A1* i *ALP* u odnosu na hidrogel nosač RADA 16-I bez deksametazona. U uzorcima nema ekspresije *BSP* i *OCN*, kasnijih markera

osteogeneze. Ovi rezultati ukazuju da hidrogel nosač RADA 16-I s inkorporiranim deksametazonom u koncentraciji od 4×10^{-4} M moguće ima osteogeni potencijal u modelima *in vivo*.

Usavršavanje protokola za cijeljenje težih koštanih oštećenja i razvoj pogodnog nosača za primjenu u klinici glavni je cilj tkivnog inženjerstva kosti. Unatoč velikom napretku, postoje još brojne prepreke koje treba prevladati prije nego tkivno inženjerstvo postane rutina u kliničkoj primjeni. Prema rezultatima dobivenima u ovom istraživanju, peptidni hidrogel nosač RADA 16-I s inkorporiranim deksametazonom u koncentraciji od 4×10^{-4} M mogao bi poslužiti kao dobar sustav za dopremu lijeka do oštećenog mjesta *in vivo*, u koncentraciji koja bi inducirala endogenu diferencijaciju mezenhimskih matičnih stanica i naposljetku formiranje koštanog tkiva. Zbog specifičnih mehaničkih svojstava ovakav pristup ima veliki potencijal za cijeljenje kosti u specifičnim situacijama poput punjenja rupa nastalih od cista, tumora, karijesa u zubima ili u bilo kojoj drugoj situaciji u kojoj se mjesto ozljede može zaštititi od mehaničkog opterećenja tijekom procesa cijeljenja.

6. ZAKLJUČCI

Ovo istraživanje potvrdilo je da deksametazon ugrađen na hidrogel nosač RADA 16-I ima osteoinduktivni potencijal na diferencijaciju ljudskih mezenhimskih matičnih stanica izoliranih iz koštane srži, u modelima *in vitro* i *in vivo*.

- Koncentracija deksametazona utječe na vezanje hMSC na hidrogel nosač RADA 16-I
- Vezanje deksametazona na hidrogel nosač RADA 16-I ne narušava njegovu strukturu, a kinetika otpuštanja deksametazona s nosača prati kinetiku raspadanja RADA 16-I nosača
- Tkivo uzgojeno u perfuzijskom bioreaktoru na hidrogel nosaču RADA 16-I s koncentracijom deksametazona 4×10^{-4} M pokazuje strukturu najbližnju koštanoj tkivu čovjeka te ekspresiju markera osteogeneze
- Ekspresija markera rane faze osteogeneze u tkivu koje je uzgojeno u modelu *in vivo* za ektopično formiranje kosti, koristeći hidrogel nosač RADA 16-I s koncentracijom deksametazona 4×10^{-4} M ukazuje na mogući osteoinduktivni potencijal korištenog nosača
- Obzirom na karakteristike peptidnog hidrogela RADA 16-I i deksametazona, postoji potencijal da se hidrogel nosač RADA 16-I- DEX koristi *in vivo*, pri oštećenjima kosti u kojima bi potaknuo diferencijaciju endogenih matičnih stanica

7. LITERATURA

- Amarasekara, DS, Kim S, Rho J (2021) Regulation of osteoblast differentiation by cytokine networks. *International journal of molecular sciences* 22(6): 2851.
- Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP (2012) Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, 40(5).
- Annamalai RT, Hong X, Schott NG, Tiruchinapally G, Levi B, Stegemann JP (2019) Injectable osteogenic microtissues containing mesenchymal stromal cells conformally fill and repair critical-size defects. *Biomaterials* 208: 32-44.
- Bancroft GN, Sikavitsas VI, Van Den Dolder J, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, Mikos AG (2002) Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(20): 12600-12605.
- Baron R, Kneissel M (2013) WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nature medicine* 19(2): 179-192.
- Bar-Shavit Z (2007) The osteoclast: A multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *Journal of cellular biochemistry* 102(5): 1130-1139.
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG (2001) Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19(3): 180–192.
- Blumer MJ, Hausott B, Schwarzer C, Hayman AR, Stempel J, Fritsch H (2012) Role of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in long bone development. *Mech Dev.* 29(5-8): 162-176.
- Bokhari MA, Akay G, Zhang S, Birch MA (2005) The enhancement of osteoblast growth and differentiation in vitro on a peptide hydrogel—polyHIPE polymer hybrid material. *Biomaterials* 26(25): 5198-5208.
- Botchwey EA, Pollack SR, Levine EM, Johnston ED, Laurencin CT (2004) Quantitative analysis of three-dimensional fluid flow in rotating bioreactors for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 69(2): 205-215.
- Briuglia ML, Urquhart AJ, Lamprou DA (2014) Sustained and controlled release of lipophilic drugs from a self-assembling amphiphilic peptide hydrogel. *International journal of pharmaceutics* 474(1-2): 103-111.
- Canalis E (1986) Interleukin-1 has independent effects on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in cultures of rat calvariae. *Endocrinology* 118(1): 74-81.
- Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK (2011) A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *The spine journal* 11(6): 471-491.

- Chan ED, Chan MM, Chan MM, Marik PE (2020) Use of glucocorticoids in the critical care setting: science and clinical evidence. *Pharmacology & therapeutics* 206: 107428.
- Chen G, Deng C, Li YP (2012) TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International journal of biological sciences* 8(2): 272.
- Chen J, Shi ZD, Ji X, Morales J, Zhang J, Kaur N, Wang S (2013) Enhanced osteogenesis of human mesenchymal stem cells by periodic heat shock in self-assembling peptide hydrogel. *Tissue Engineering Part A* 19(5-6): 716-728.
- Chen Y, Zhou S, Li Q (2011) Microstructure design of biodegradable scaffold and its effect on tissue regeneration. *Biomaterials* 32(22): 5003-5014.
- Chim H, Hutmacher DW, Chou AM, Oliveira AL, Reis RL, Lim TC, Schantz JT (2006) A comparative analysis of scaffold material modifications for load-bearing applications in bone tissue engineering. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 35(10): 928-934.
- Chindamo G, Sapino S, Peira E, Chirio D, Gonzalez MC, Gallarate M (2020) Bone diseases: Current approach and future perspectives in drug delivery systems for bone targeted therapeutics. *Nanomaterials* 10(5): 875.
- Claes L, Recknagel S, Ignatius A (2012) Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nature Reviews Rheumatology* 8(3): 133-143.
- Clarke B (2008) Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 3(3): 131.
- Constanze B, Popper B, Aggarwal BB, Shakibaei M (2020) Evidence that TNF- β suppresses osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells and resveratrol reverses it through modulation of NF- κ B, Sirt1 and Runx2. *Cell and tissue research* 381: 83-98.
- Dahlin RL, Meretoja VV, Ni M, Kasper FK, Mikos AG (2012) Design of a high-throughput flow perfusion bioreactor system for tissue engineering. *Tissue Engineering Part C: Methods* 18(10): 817-820.
- Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF (2013) The osteocyte: an endocrine cell... and more. *Endocrine reviews* 34(5): 658-690.
- Delaissé JM, Andersen TL, Engsig, MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L (2003) Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microscopy research and technique* 61(6): 504-513.
- Delany AM, Dong Y, Canalis E (1994) Mechanisms of glucocorticoid action in bone cells. *Journal of cellular biochemistry* 56(3): 295-302.
- Dilogo IH, Rahmatika D, Pawitan JA, Liem IK, Kurniawati T, Kiswa T, Mujadid F (2021) Allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for treating critical-sized bone defects: a translational study. *European Journal of Orthopaedic Surgery and Traumatology* 31: 265-273.

- Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV (2005) Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36: 1392-1404.
- Dragoo JL, Lieberman JR, Lee RS, Deugarte DA, Lee Y, Zuk PA, Hedrick MH, Benhaim P (2005) Tissue-engineered bone from BMP-2-transduced stem cells derived from human fat. *Plastic Reconstructive Surgery* 115(6): 1665–1673.
- Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan, Karsenty G (1996) Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382(6590): 448-452.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997) *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89(5): 747-754.
- Edmonds HW, Coe HE, Tabrah FL (1948) Bone formation in skin and muscle: a localized tissue malformation or heterotopia. *The Journal of Pediatrics* 33(5): 618-623.
- Einhorn TA (1999) Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 367: 59-67.
- Eriksen EF, Gundersen HJ, Melsen F, Mosekilde L (1984) Reconstruction of the formative site in iliac trabecular bone in 20 normal individuals employing a kinetic model for matrix and mineral apposition. *Metabolic Bone Disease and Related Research* 5(5): 243-252.
- Eriksen EF et al. (1990) Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels. *Journal of Bone and Mineral Research* 5(4): 311-319.
- Eriksen EF (2010) Cellular mechanisms of bone remodeling. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 11: 219-227.
- Fatherazi S, Matsa-Dunn D, Foster BL, Rutherford RB, Somerman MJ, Presland RB (2009) Phosphate regulates osteopontin gene transcription. *Journal of dental research* 88(1): 39-44.
- Flick LM, Weaver JM, Ulrich-Vinther M, Abuzzahab F, Zhang X, Dougall WC, Schwarz EM (2003) Effects of receptor activator of NF κ B (RANK) signaling blockade on fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research* 21(4): 676-684.
- Florine EM, Miller RE, Porter RM, Evans CH, Kurz B, Grodzinsky AJ (2013) Effects of dexamethasone on mesenchymal stromal cell chondrogenesis and aggrecanase activity: comparison of agarose and self-assembling peptide scaffolds. *Cartilage* 4: 63–74.
- Foudazi R, Zowada R, Manas-Zloczower I, Fekete DL (2023) Porous Hydrogels: Present Challenges and Future Opportunities. *Langmuir* 39(6): 2092-2111.
- Franceschi RT, Iyer BS (1992) Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 7(2): 235-246.

- Franz-Odendaal TA, Hall BK, Witten PE (2006) Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 235(1): 176-190.
- Fridenshtein A (1991) Osteogenic stem cells of the bone marrow. *Ontogenez* 22(2): 189-197.
- Frost HM (1960) In vivo osteocyte death. *J Bone Joint Surg Am* 42: 138-143.
- Friess W, Uludag H, Foskett S, Biron R, Sargeant C (1999) Characterization of absorbable collagen sponges as rhBMP- 2 carriers. *International Journal of Pharmaceutics* 187: 91-99.
- Frohlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobic M, Vunjak-Novakovic G (2008) Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Current stem cell research & therapy* 3(4): 254-264.
- Gan, Q, Pan H, Zhang W, Yuan Y, Qian J, Liu C (2022) Fabrication and evaluation of a BMP-2/dexamethasone co-loaded gelatin sponge scaffold for rapid bone regeneration. *Regenerative Biomaterials* 9: 008.
- Gaspar DA, Gomide V, Monteiro FJ (2012) The role of perfusion bioreactors in bone tissue engineering. *Biomatter* 2(4): 167-175.
- Gkioni K, Leeuwenburgh SC, Douglas TE, Mikos AG, Jansen JA (2010) Mineralization of hydrogels for bone regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 16(6): 577-585.
- Granero-Moltó F, Weis JA, Miga MI, Landis B, Myers TJ, O'rear L, Longobardi L, Jansen ED, Mortlock DP, Spagnoli A (2009) Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells* 27: 1887-1898.
- Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE (1988) Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol* 106(6): 2139-51.
- Goldring SR (2015) The osteocyte: key player in regulating bone turnover. *RMD open* 1(Suppl 1): e000049.
- Gurevich O, Vexler A, Marx G, Prigozhina T, Levdansky L, Slavin S, Gorodetsky R (2002) Fibrin microbeads for isolating and growing bone marrow-derived progenitor cells capable of forming bone tissue. *Tissue engineering* 8(4): 661-672.
- Hamada K, Hirose M, Yamashita T, Ohgushi (2008) Spatial distribution of mineralized bone matrix produced by marrow mesenchymal stem cells in self-assembling peptide hydrogel scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 84(1): 128-136.
- Hamidouche Z, Hay E, Vaudin P, Charbord P, Schule R, Marie PJ, Fromiguet O (2008) FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/beta-catenin signaling-dependent Runx2 expression. *Faseb Journal* 22: 3813-3822.

- Hamilton PT, Jansen MS, Ganesan S, Benson RE, Hyde-DeRuyscher R, Beyer WF, Grøn H (2013) Improved bone morphogenetic protein-2 retention in an injectable collagen matrix using bifunctional peptides. *PLoS One* 8(8): e70715.
- Han Y, You X, Xing W, Zhang Z, Zou W (2018) Paracrine and endocrine actions of bone—the functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. *Bone research* 6(1): 16.
- Hayashi C, Hasegawa U, Saita Y (2009) Osteoblastic bone formation is induced by using nanogel-crosslinking hydrogel as novel scaffold for bone growth factor. *Journal of Cellular Physiology* 220: 1-7.
- Heinen Jr JH, Dabbs GH, Mason HA (1949) The experimental production of ectopic cartilage and bone in the muscles of rabbits. *JBJS* 31(4): 765-775.
- Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, Kanis JA (2013) Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden: a report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Archives of osteoporosis* 8: 1-115.
- Hoffman LM, Carpenter KM (2005) Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 23(6): 699-708.
- Hojo H, Ohba S, Chung UI (2015) Signaling pathways regulating the specification and differentiation of the osteoblast lineage. *Regenerative Therapy* 1: 57-62.
- Holy CE, Shoichet MS, Davies JE (2000) Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period. *Journal of Biomedical Materials Research* 51(3): 376–382.
- Hong JH., et al. (2005) TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 309(5737): 1074-1078.
- Hong D, Chen HX, Xue Y, Li DM, Wan XC, Ge R, Li JC (2009) Osteoblastogenic effects of dexamethasone through upregulation of TAZ expression in rat mesenchymal stem cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 116: 86-92.
- Huang W, Yang S, Shao J, Li YP (2007) Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* 12: 3068-3092.
- Ishikawa M, Ito H, Kitaori T, Murata K, Shibuya H, Furu M, Yoshitomi H, Fujii T, Yamamoto K, Matsuda S (2014) MCP/CCR2 signaling is essential for recruitment of mesenchymal progenitor cells during the early phase of fracture healing. *PLoS ONE* 9(8): e104954.
- Jukes JM, Both SK, Van Blitterswijk CA, De Boer J (2008) Potential of embryonic stem cells for *in vivo* bone regeneration: 783-785.

- Kasper FK, Liao J, Kretlow JD, Sikavitsas VI, Mikos AG (2008) Flow perfusion culture of mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Japanese journal of nursing* 31(9): 149.
- Kassem M, Kveiborg M, Eriksen EF (2000) Production and action of transforming growth factor-beta in human osteoblast cultures: dependence on cell differentiation and modulation by calcitriol. *European journal of clinical investigation* 30(5): 429-437.
- Katagiri T, Watabe T (2016) Bone morphogenetic proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8(6): a021899.
- Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ (2008) Receptor activator of nuclear factor κ B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocrine reviews* 29(2): 155-192.
- Keating JF, McQueen MM (2001) Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *The Journal of bone and joint surgery* 83(1): 3-8.
- Keating JF, Simpson AHRW, Robinson CM (2005) The management of fractures with bone loss. *The Journal of Bone & Joint Surgery British Volume* 87(2): 142-150.
- Khojasteh A, Behnia H, Naghdi N, Esmaeelinejad M, Alikhassy Z, Stevens M (2013) Effects of different growth factors and carriers on bone regeneration: a systematic review. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* 116(6): 405-423.
- Kim SM, Kim YG, Park JW, Lee JM, Suh JY (2013) The effects of dexamethasone on the apoptosis and osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells. *Journal of periodontal & implant science* 43(4): 168-176.
- Kirkham J, Firth A, Vernals D, Boden N, Robinson C, Shore RC, Aggeli A (2007) Self-assembling peptide scaffolds promote enamel remineralization. *Journal of dental research* 86(5): 426-430.
- Kohn DH, Sarmadi M, Helman JI, Krebsbach PH (2002) Effects of pH on human bone marrow stromal cells in vitro: implications for tissue engineering of bone. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* 60(2): 292-299.
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Kishimoto T (1997) Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89(5): 755-764.
- Kon E, Delcogliano M, Filardo G, Busacca M, Di Martino A, Marcacci M (2011) Novel nano-composite multilayered biomaterial for osteochondral regeneration: a pilot clinical trial. *The American journal of sports medicine* 39(6): 1180-1190.
- Kraus KH, Kirker-Head C (2006) Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Veterinary surgery* 35(3): 232-242.

- Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Satomura K, Emmons RV, Rowe DW, Robey P G (1997) Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation* 63(8): 1059-1069.
- Langenbach F, Handschel J (2013) Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem cell research & therapy* 4(5): 1-7.
- Latres E, Chiaur DS, Pagano M (1999) The human F box protein β -Trcp associates with the Cull1/Skp1 complex and regulates the stability of β -catenin. *Oncogene* 18(4): 849-854.
- Lee KY, Mooney DJ (2001) Hydrogels for tissue engineering. *Chemical reviews* 101(7): 1869-1880.
- Lin HN, O'Connor JP (2017) Osteoclast depletion with clodronate liposomes delays fracture healing in mice. *Journal of Orthopaedic Research* 35(8): 1699-1706.
- Liu Q, Li M, Wang S, Xiao Z, Xiong, Y, Wang, G (2020) Recent advances of osterix transcription factor in osteoblast differentiation and bone formation. *Frontiers in cell and developmental biology* 8: 601224.
- Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin TH, Yao Z, Goodman SB (2016) Inflammation, fracture and bone repair. *Bone* 86: 119-130.
- Lorenzo JA, Sousa SL, Alander C, Raisz LG, Dinarello CA (1987) Comparison of the bone-resorbing activity in the supernatants from phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood mononuclear cells with that of cytokines through the use of an antiserum to inter leukin 1. *Endocrinology* 121(3): 1164-1170.
- Malone JD, Teitelbaum SL, Griffin GL, Senior RM, Kahn AJ (1982) Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents. *The Journal of cell biology* 92(1): 227-230.
- Marie PJ, Miraoui H, Sévère N (2012) FGF/FGFR signaling in bone formation: progress and perspectives. *Growth Factors* 30(2): 117-123.
- Masquelet, A. C., & Begue, T. (2010). The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. *Orthopedic Clinics* 41(1): 27-37.
- Matic I, Antunovic M, Brkic, S, Josipovic P, Mihalic KC, Karlak I, Ivkovic A, Marijanovic I (2016) Expression of OCT-4 and SOX-2 in bone marrow-derived human mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation. *Macedonian journal of medical sciences* 4: 9-16.
- Maude S, Ingham E, Aggeli A (2013) Biomimetic self-assembling peptides as scaffolds for soft tissue engineering. *Nanomedicine* 8: 823–847.
- Mauney JR, Blumberg J, Horan R, O'leary JP, Vunjak-Novakovic G, Volloch V, Kaplan DL (2004) Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone

- marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds in vitro. *Calcified tissue international* 74: 458-468.
- Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL (2005) Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. *Tissue Engineering* 11(5–6): 787-802.
- Meinel L, Karageorgiou, V, Fajardo R, Snyder B, Shinde-Patil V, Zichner L, Vunjak-Novakovic G (2004) Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. *Annals of biomedical engineering* 32: 112-122.
- Mende W, Götzl R, Kubo Y, Pufe T, Ruhl T, Beier JP (2021) The role of adipose stem cells in bone regeneration and bone tissue engineering. *Cells* 10(5): 975.
- Misawa H, Kobayashi N, Soto-Gutierrez A, Chen Y, Yoshida A, Rivas-Carrillo JD, Ozaki T (2006) PuraMatrix™ facilitates bone regeneration in bone defects of calvaria in mice. *Cell transplantation* 15(10): 903-910.
- Monier-Faugere MC, Langub MC, Malluche HH (1999) Bone Biopsies: A Modern Approach. U: Avioli LV, Krane SM (ed.), *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders (Third Edition)*, 237-280
- Moshiri A, Oryan A (2012) Role of tissue engineering in tendon reconstructive surgery and regenerative medicine: current concepts, approaches and concerns. *Hard Tissue* 1(2): 11.
- Mukai T, Otsuka, F, Otani H, Yamashita M, Takasugi K, Inagaki K, Makino H (2007) TNF- α inhibits BMP-induced osteoblast differentiation through activating SAPK/JNK signaling. *Biochemical and biophysical research communications* 356(4): 1004-1010.
- Nagai Y, Unsworth LD, Koutsopoulos S, Zhang S (2006) Slow release of molecules in self-assembling peptide nanofiber scaffold. *Journal of controlled release* 115(1): 18-25.
- Nakamura I, Pilkington MF, Lakkakorpi PT, Lipfert L, Sims SM, Dixon SJ, Duong LT (1999) Role of alpha (v) beta (3) integrin in osteoclast migration and formation of the sealing zone. *Journal of cell science* 112(22): 3985-3993.
- Ning L, Malmström H, Ren YF (2015) Porous collagen-hydroxyapatite scaffolds with mesenchymal stem cells for bone regeneration. *Journal of Oral Implantology* 41(1): 45-49.
- Noël D, Gazit D, Bouquet C, Apparailly F, Bony C, Plence P, Jorgensen C (2004) Short-term BMP-2 expression is sufficient for *in vivo* osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem cells* 22(1): 74-85.
- Oliveira ÉR, Nie L, Podstawczyk D, Allahbakhsh A, Ratnayake J, Brasil DL Shavandi A (2021) Advances in growth factor delivery for bone tissue engineering. *International journal of molecular sciences* 22(2): 903.

- Ono T, Okamoto K, Nakashima T, Nitta T, Hori S, Iwakura Y, Takayanagi H (2016) IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells enhance bone regeneration. *Nature Communications* 7(1): 10928.
- Ono T, Takayanagi H (2017) Osteoimmunology in bone fracture healing. *Current osteoporosis reports* 15: 367-375.
- Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N (2014) Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of orthopaedic surgery and research* 9(1): 1-27.
- Parfitt AM (1990) Bone-forming cells in clinical conditions. *The Osteoblast and Osteocyte. Bone* 1: 351-429.
- Pastorino L, Dellacasa E, Scaglione S, Giulianelli M, Sbrana F, Vassalli M, Ruggiero C (2014) Oriented collagen nanocoatings for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 114: 372-378.
- Peng H, Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen HC, Cummins J, Huard J (2002) Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *The Journal of clinical investigation* 110(6): 751-759.
- Peric M, Dumic-Cule I, Grcevic D, Matijasic M, Verbanac D, Paul R (2015) The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. *Bone* 70: 73-86.
- Pertici G, Rossi F, Casalini T, Perale G (2014) Composite polymer-coated mineral grafts for bone regeneration: material characterisation and model study. *Annals of Oral and Maxillofacial Surgery*: 2(1).
- Phimphilai M, Zhao Z, Boules H, Roca H, Franceschi RT (2006) BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. *Journal of Bone and Mineral Research* 21(4): 637-646.
- Pittenger MF et al (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411): 143-147.
- Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T (1999) Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *The Journal of clinical investigation* 104(10): 1363-1374.
- Potter BK, Forsberg JA, Davis TA, Evans KN, Hawksworth JS, Tadaki D, Brown TS, Crane NJ, Burns TC, O'Brien FP, Elster EA (2010) Heterotopic ossification following combat-related trauma. *JBJS* 92(2): 74-89.
- Prockop DJ (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276(5309): 71-74.
- Renn J, Winkler C (2009) Osterix-mCherry transgenic medaka for *in vivo* imaging of bone formation. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 238(1): 241-248.

- Robling AG, Bellido T, Turner CH (2006) Mechanical stimulation in vivo reduces osteocyte expression of sclerostin. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions* 6(4): 354.
- Roche MB, Jostes FA (1948) Ectopic bone deposits: A paraplegic complication. *The American Journal of Surgery* 75(4): 633-636.
- Rogina A, Antunović M, Pribolšan L, Caput Mihalić K., Vukasović A, Ivković A, Ivanković H (2017) Human mesenchymal stem cells differentiation regulated by hydroxyapatite content within chitosan-based scaffolds under perfusion conditions. *Polymers* 9(9): 387.
- Rowe P, Koller A, Sharma S (2018). *Physiology, bone remodeling*.
- Rutkovskiy A, Stensløykken KO, Vaage I J (2016) Osteoblast differentiation at a glance. *Medical science monitor basic research* 22: 95.
- Safadi FF, Barbe MF, Abdelmagid SM, Rico MC, Aswad RA, Litvin J, Popoff SN (2009) *Bone Structure, Development and Bone Biology*. U: Khurana JS (ed.) *Bone Pathology*, 1-50.
- Safari B, Aghanejad A, Roshangar L, Davaran S (2021) Osteogenic effects of the bioactive small molecules and minerals in the scaffold-based bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 198: 111462
- Scott A, Khan KM, Duronio V, Hart DA (2008) Mechanotransduction in human bone: in vitro cellular physiology that underpins bone changes with exercise. *Sports Medicine* 38: 139-160.
- Scott MA, Levi B, Askarinam A, Nguyen A, Rackohn T, Ting K (2012) Brief review of models of ectopic bone formation. *Stem Cells Dev* 21: 655-667.
- Shah NJ, Hyder MN, Quadir MA, Dorval Courchesne NM, Seeherman HJ, Nevins M, Hammond PT (2014) Adaptive growth factor delivery from a polyelectrolyte coating promotes synergistic bone tissue repair and reconstruction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(35): 12847-12852.
- Shen B, Wei A, Whittaker S, Williams LA, Tao H, Ma DD, Diwan AD (2010) The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. *Journal of cellular biochemistry* 109(2): 406-416.
- Sladkova M, De Peppo GM (2014) Bioreactor systems for human bone tissue engineering. *Processes* 2(2): 494-525.
- Song, IH, Caplan, AI, Dennis JE (2009) In vitro dexamethasone pretreatment enhances bone formation of human mesenchymal stem cells in vivo. *Journal of orthopaedic research* 27(7): 916-921.
- Stiehler M, Bünger C, Baatrup A, Lind M, Kassem M, Mygind T (2009) Effect of dynamic 3-D culture on proliferation, distribution, and osteogenic differentiation of human

- mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 89(1): 96-107.
- Stein GS, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Montecino M (1996) Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiological reviews* 76(2): 593-629.
- St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP (1999) Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & development* 13(16): 2072-2086.
- Stokovic N, Ivanjko N, Maticic D, Luyten FP, Vukicevic S (2021) Bone Morphogenetic Proteins, Carriers, and Animal Models in the Development of Novel Bone Regenerative Therapies. *Materials* 14: 3513.
- Sun J, Xiao C, Tan H, Hu X (2013) Covalently crosslinked hyaluronic acid-chitosan hydrogel containing dexamethasone as an injectable scaffold for soft tissue engineering. *Journal of applied polymer science* 129(2): 682-688.
- Taguchi Y, Yamamoto M, Yamate T, Lin SC, Mocharla H, DeTogni P, Manolagas SC (1998) Interleukin-6-type cytokines stimulate mesenchymal progenitor differentiation toward the osteoblastic lineage. *Proceedings of the Association of American Physicians* 110(6): 59-574.
- Teng S, Liu C, Krettek C, Jagodzinski M (2014) The application of induced pluripotent stem cells for bone regeneration: current progress and prospects. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 20(4): 328-339.
- Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS (1997) The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82(9): 3128-3135.
- Tong S, Xu, DP, Liu ZM, Du Y, Wang XK (2016) Synthesis of and in vitro and in vivo evaluation of a novel TGF- β 1-SF-CS three-dimensional scaffold for bone tissue engineering. *International journal of molecular medicine* 38(2): 367-380.
- Van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, Van Der Wee-pals L, De Wilt E, Karperien M, Löwik CW (2004) Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *The Journal of experimental medicine* 199(6): 805-814.
- VandeVord PJ, Nasser S, Wooley PH (2005) Immunological responses to bone soluble proteins in recipients of bone allografts. *Journal of Orthopaedic Research* 23(5): 1059-1064.
- Vi L, Baht GS, Whetstone H, Ng A, Wei Q, Poon R, Alman BA (2015) Macrophages promote osteoblastic differentiation in vivo: implications in fracture repair and bone homeostasis. *Journal of Bone and Mineral Research* 30(6): 1090-1102.
- Viateau V, Logeart-Avramoglou D, Guillemain G, Petite H (2008) Animal models for bone tissue engineering purposes. *Sourcebook of models for biomedical research*, 725-736.

- Walker DG (1975) Bone resorption restored in osteopetrotic mice by transplants of normal bone marrow and spleen cells. *Science* 190(4216): 784-5.
- Wang EA, Israel DI, Kelly S, Luxenberg DP (1993) Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth factors* 9(1): 57-71.
- Wang M (2006) Composite scaffolds for bone tissue engineering. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*.
- Wang M, Cheng X, Zhu W, Holmes B, Keidar M, Zhang LG (2014) Design of biomimetic and bioactive cold plasma-modified nanostructured scaffolds for enhanced osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering Part A* 20(5-6): 1060-1071.
- Wang Y, Uemura T, Dong J, Kojima H, Tanaka J, Tateishi T (2003) Application of perfusion culture system improves *in vitro* and *in vivo* osteogenesis of bone marrow-derived osteoblastic cells in porous ceramic materials. *Tissue Engineering* 9(6): 1205–1214.
- Wang YH, Liu Y, Maye P, Rowe DW (2006) Examination of mineralized nodule formation in living osteoblastic cultures using fluorescent dyes. *Biotechnology progress* 22(6):1697-1701.
- Watson SL, Weeks BK, Weis LJ, Harding AT, Horan SA, Beck BR (2018) High intensity resistance and impact training improves bone mineral density and physical function in postmenopausal women with osteopenia and osteoporosis: the LIFTMOR randomized controlled trial. *Journal of Bone and Mineral Research* 33(2): 211-220.
- Weinstein RS, Jilka, RL, Parfitt AM, Manolagas SC (1998) Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *The Journal of clinical investigation* 102(2): 274-282.
- Wlodarski KH, Reddi AH (1986) Importance of skeletal muscle environment for ectopic bone induction in mice. *Folia Biol (Krakow)* 34: 425–434.
- Wong, SK, Yee MMF, Chin KY, Ima-Nirwana S (2023) A review of the application of natural and synthetic scaffolds in bone regeneration. *Journal of Functional Biomaterials* 14(5): 286.
- Wu X, Su J, Wei J, Jiang N, Ge X (2021) Recent advances in three-dimensional stem cell culture systems and applications. *Stem cells international* 2021.
- Xiao G, Gopalakrishnan R, Jiang D, Reith E, Benson MD, Franceschi RT (2002) Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. *Journal of bone and mineral research* 17(1): 101-110.

- Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'brien CA (2011) Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nature medicine* 17(10): 1235-1241.
- Wozney JM (1992) The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev.* 32(2):160-167
- Xue X, Hu Y, Deng Y, Su J (2021) Recent advances in design of functional biocompatible hydrogels for bone tissue engineering. *Advanced Functional Materials* 31(19): 2009432.
- Yahara Y, Ma X, Gracia L, Alman BA (2021) Monocyte/macrophage lineage cells from fetal erythromyeloid progenitors orchestrate bone remodeling and repair. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9: 622035.
- Yahara Y, Nguyen T, Ishikawa K, Kamei K, Alman BA (2022) The origins and roles of osteoclasts in bone development, homeostasis and repair. *Development* 149(8): dev199908.
- Yang X, Matsuda K, Bialek P, Jacquot S, Masuoka HC, Schinke T, Karsenty G (2004) ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology: implication for Coffin-Lowry syndrome. *Cell* 117(3): 387-398.
- Yeatts AB, Choquette DT, Fisher JP (2013) Bioreactors to influence stem cell fate: augmentation of mesenchymal stem cell signaling pathways via dynamic culture systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1830(2): 2470-2480.
- Yilgor P, Tuzlakoglu K, Reis RL, Hasirci N, Hasirci V (2009) Incorporation of a sequential BMP-2/BMP-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 30(21): 3551-3559.
- Yokoi H, Kinoshita T, Zhang S (2005) Dynamic reassembly of peptide RADA16 nanofiber scaffold. *PNAS* 102: 8414-8419.
- Yu X, Botchwey EA, Levine EM, Pollack SR, Laurencin CT (2004) Bioreactor-based bone tissue engineering: the influence of dynamic flow on osteoblast phenotypic expression and matrix mineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(31): 11203-11208.
- Yu X, Collin-Osdoby P, Osdoby P (2003) SDF-1 increases recruitment of osteoclast precursors by upregulation of matrix metalloproteinase-9 activity. *Connective Tissue Research* 44(1): 79-84.
- Yu Z, Xu Q, Dong C, Lee SS, Gao L, Li Y, Wu J (2015) Self-assembling peptide nanofibrous hydrogel as a versatile drug delivery platform. *Current pharmaceutical design* 21(29): 4342-4354.
- Zhang W, Wang, X Wang S, Zhao J, Xu L, Zhu C, Zeng D, Chen J, Zhang Z, Kaplan DL (2011) The use of injectable sonication-induced silk hydrogel for VEGF165 and BMP-2 delivery for elevation of the maxillary sinus floor. *Biomaterials* 32: 9415-9424.

Zheng MH, Wood DJ, Papadimitriou JM (1992) What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation? Pathology-Research and Practice 188(8): 1104-1121.

<http://www.cellecbiotek.com/>

<https://open.oregonstate.education/aandp/chapter/6-3-bone-structure/>

8. POPIS KRATICA

| | |
|---------------|--|
| 3D | trodimenzionalno |
| α -MEM | prema engl. <i>Minimum Essential Medium Eagle-Alpha Modification</i> |
| ADSCs | adipozne matične stanice (prema engl. <i>adipose stem cells</i>) |
| ALP | alkalna fosfataza (prema engl. <i>alkaline phosphatase</i>) |
| AKT | protein kinaza B (prema engl. <i>protein kinase B</i>) |
| AP-1 | aktivacijski protein 1 (prema engl. <i>activating protein 1</i>) |
| APC | adenomska polipoza coli (prema engl. <i>adenomatosis polyposis coli</i>) |
| Asc | askorbinska kiselina (prema engl. <i>ascorbic acid</i>) |
| ATF4 | aktivirajući transkripcijski faktor (prema engl. <i>activating transcription factor 4</i>) |
| β -GP | beta-glicerofosfat (prema engl. <i>β- glycerophosphate</i>) |
| BM-MSCs | MSCs izolirane iz koštane srži (prema engl. <i>bone marrow-derived mesenchymal stromal cells</i>) |
| BMP | koštani morfogenetski protein (prema engl. <i>bone morphogenic protein</i>) |
| BMPR | receptor za BMP (prema engl. <i>bone morphogenic protein receptor</i>) |
| BSP | koštani sijaloprotein (prema engl. <i>bone sialoprotein</i>) |
| CAMKII | kalmodulin- ovisna protein kinaza II (prema engl. <i>calmodulin-dependent kinase II</i>) |
| cAMP | ciklički adenzin monofosfat (prema engl. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>) |
| CCL2 | kemokinski ligand 2 s C-C motivom (prema engl. <i>C-C motif chemokine ligand 2</i>) |
| cDNA | komplementarna DNA (prema engl. <i>complementary DNA</i>) |
| CK1 α | kazein kinaza 1 α (prema engl. <i>casein kinase 1α</i>) |
| CNTF | cilijarni neurotrofni faktor (prema engl. <i>ciliary neurotrophic factor</i>) |
| COL1A1 | kolagen 1A1 (prema engl. <i>collagen 1A1</i>) |
| Col-HA | kolagen-hidroksiapatit (prema engl. <i>collagen-hidroxyapatite</i>) |
| CREB | cAMP- vezujući protein (prema engl. <i>cAMP-responsive element-binding</i>) |
| CXCL12 | kemokinski ligand 12 s C-X-C motivom (prema engl. <i>C-X-C motif chemokine 12</i>) |
| DAG | kombinacija deksametazona, askorbinske kiseline i beta-glicerofosfata |

| | |
|---------------|--|
| DEX | deksametazon (prema engl. <i>dexamethasone</i>) |
| Dkk1 | „Dickkopf“ srodni protein 1 (prema engl. <i>Dickkopf-related protein 1</i>) |
| DLX5 | prema engl. <i>distal-less homeobox 5</i> |
| DMEM | prema engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMP-1 | dentin-matriks proteina-1 (prema engl. <i>dentin matrix protein-1</i>) |
| ECM | izvanstanični matriks (prema engl. <i>extracellular matrix</i>) |
| ECSs | embrionske matične stanice (prema engl. <i>embryonic stem cells</i>) |
| FAK | fokusna adhezijska kinaza (prema engl. <i>focal adhesion kinase</i>) |
| FBS | fetalni goveđi serum (prema engl. <i>fetal bovine serum</i>) |
| FGF | faktor rasta fibroblasta (prema engl. <i>fibroblast growth factor</i>) |
| FGFR | receptor za FGF (prema engl. <i>fibroblast growth factor receptor</i>) |
| ERK | kinaza aktivirana izvanstaničnim signalom (prema engl. <i>extracellular signal-regulated kinases</i>) |
| FDA | Američka agencija za hranu i lijekove (prema engl. <i>Food and Drug Administration</i>) |
| FHL-2 | protein 2 s četiri i pol LIM-domene (prema engl. <i>four and a half LIM domain protein 2</i>) |
| Gli | onkogen povezan s gliomom (prema engl. <i>glioma-associated oncogene</i>) |
| GM-CSF | granulocitno-makrofazni čimbenik rasta kolonija (prema engl. <i>granulocyte/macrophage colony stimulating factor</i>) |
| GSK3 β | kinaza glikogen sintaze 3 β (prema engl. <i>glycogen synthase kinase 3β</i>) |
| HH | prema engl. <i>hedgehog</i> |
| hMSCs | ljudske mezenhimske matične stanice (prema engl. <i>human mesenchymal stem cells</i>) |
| IGF-1 | inzulinu sličan faktor rasta- 1 (prema engl. <i>insulin-like growth factor-1</i>) |
| IL | interleukin (prema engl. <i>interleukin</i>) |
| IFN- α | prema engl. <i>interferon-alpha</i> |
| iPSCs | inducirane pluripotentne matične stanice (prema engl. <i>induced pluripotent stem cells</i>) |
| JNK | c-Jun N-terminalna kinaza (prema engl. <i>c-jun N-terminal kinase</i>) |
| LIF | inhibitorni faktor leukemije (prema engl. <i>leukemia inhibitory factor</i>) |
| LRP | protein niske gustoće povezan s receptorom za lipoprotein (prema engl. <i>low density lipoprotein receptor related co-receptor</i>) |

| | |
|------------|--|
| MAPK | mitogen-aktivirana protein kinaza (prema engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>) |
| M-CSF | makrofazni čimbenik rasta kolonija (prema engl. <i>macrophage colony-stimulating factor</i>) |
| MEK | proteinska kinaza aktivirana mitogenom (prema engl. <i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>) |
| MKP-1 | mitogen-aktivirane protein kinazne fosfataze (prema engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>) |
| MMP14 mRNA | metaloproteinaza matriksa 14 (prema engl. <i>matrix metalloproteinase 14</i>) glasnička RNK (prema engl. <i>messenger RNA</i>) |
| Nosač I | Nosač sastavljen od hidrogela RADA 16-I i deksametazona u koncentraciji 4×10^{-3} M |
| Nosač II | Nosač sastavljen od hidrogela RADA 16-I i deksametazona u koncentraciji 4×10^{-4} M |
| Nosač III | Nosač sastavljen od hidrogela RADA 16-I i deksametazona u koncentraciji 4×10^{-5} M |
| OB | osteoblast (prema engl. <i>osteoblast</i>) |
| OCL | osteoklast ((prema engl. <i>osteoclast</i>) |
| OCN | osteokalcin (prema engl. <i>osteocalcin</i>) |
| OC-STAMP | osteoklast stimulacijskog transmembranskog proteina (prema engl. <i>osteoclast stimulatory transmembrane protein</i>) |
| ONN | osteonektin (prema engl. <i>osteonectin</i>) |
| OPG | osteoprotegerina (prema engl. <i>osteoprotegerin</i>) |
| OPN | osteopontin (prema engl. <i>osteopontin</i>) |
| Osx | osteriks (prema engl. <i>osterix</i>) |
| PBS | fiziološka otopina s fosfatnim puferom (prema engl. <i>phosphate-buffered saline</i>) |
| PDGF | trombocitni faktora rasta (prema engl. <i>platelet-derived growth factor</i>) |
| pH | prema engl. <i>potential of hydrogen</i> |
| PIN1 | peptidil-proлил cis-trans NIMA-interaktivna izomeraze 1 (prema engl. <i>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1</i>) |
| PKC | protein kinaza C (prema engl. <i>protein kinase C</i>) |
| PLC | fosfolipaza (prema engl. <i>phospholipase</i>) |

| | |
|----------------|--|
| PLF | posterotalna spinalna fuzija (prema engl. <i>posterolateral spinal fusion</i>) |
| PPAR- δ | peroksisom proliferacijski aktivirani receptor delta (prema engl. <i>peroxisome proliferator-activated receptor delta</i>) |
| PPAR γ | peroksisom proliferacijski aktivirani receptor gama (prema engl. <i>peroxisome proliferator-activated receptor gama</i>) |
| PTCH1 | prema engl. <i>protein patched homolog 1</i> |
| PTH | prema engl. <i>parathyroid hormone</i> |
| PTH1R | receptor 1 za PTH (prema engl. <i>parathyroid hormone receptor 1</i>) |
| RANKL | ligand poticatelja receptora NF- κ B (prema engl. <i>receptor activator of NF-κB ligand</i>) |
| Raf | prema engl. <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> |
| RAS | prema engl. <i>rat sarcoma virus</i> |
| RNA | ribonukleinska kiselina (prema engl. <i>ribonucleic acid</i>) |
| ROR | receptor tirozinskoj kinazi slični orfan receptor (prema engl. <i>receptor tyrosine kinase-like orphan receptor</i>) |
| RT | reverzno prepisivanje (prema engl. <i>reverse transcription</i>) |
| RT-qPCR | kvantitativna polimerazna lančana reakcija u stvarnom vremenu (prema engl. <i>Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>) |
| Runx2 | transkripcijski faktora 2 ovisan o Runt-u (prema engl. <i>runt related transcription factor 2</i>) |
| SATB2 | specijalni AT-bogati vezujući protein (prema engl. <i>special AT-rich sequence-binding protein 2</i>) |
| SCID | ozbiljna kombinirana imunodeficijencija (prema engl. <i>severe combined immunodeficiency disease</i>) |
| SEM | skenirajući elektronski mikroskop (prema engl. <i>Scanning Electron Microscope</i>) |
| SEMA | semaforin (prema engl. <i>semaphorin</i>) |
| SD | standardna devijacija (prema engl. <i>standard deviation</i>) |
| SDF-1 | čimbenik stromalnih stanica-1 (prema engl. <i>stromal cell-derived factor-1</i>) |
| Smad | reaktori majke protiv dekapentaplegičara (prema engl. <i>mothers against decapentaplegic</i>) |
| SMO | prema engl. <i>smoothened receptor</i> |
| SOST | sklerostin (prema engl. <i>sclerostin</i>) |

| | |
|---------------|---|
| TAZ | transkripcijski koaktivator s PDZ-vezujućim motivom (prema engl. <i>transcriptional coactivator with PDZ-binding motif</i>) |
| TCF/LEF-1 | kompleks T-staničnog čimbenika i limfoidnog pojačavajućeg proteina (prema engl. <i>T-cell factor/lymphoid enhancer factor</i>) |
| TGF- β | transformirajući faktor rasta (prema engl. <i>transforming growth factor-β</i>) |
| TGF β R | receptor za TGF- β (prema engl. <i>transforming growth factor-β receptor</i>) |
| TNF | tumorski faktor nekroze (prema engl. <i>tumor necrosis factor</i>) |
| TRAP | kisela fosfataza otporna na tartarat (prema engl. <i>tartarate-resistant acid phosphatase</i>) |
| VEGF | vaskularni endotelni faktor rasta (prema engl. <i>vascular endothelial cell growth factor</i>) |
| Ub | ubikvitin (prema engl. <i>ubiquitin</i>) |
| WNT5A | prema engl. <i>Wnt gene family 5A</i> |

9. ŽIVOTOPIS

Lidija Požgaj rođena je 3. rujna 1986. godine u Zagrebu. Osnovnu školu i Opću gimnaziju završava u Zlataru. Nakon završetka srednjoškolskog obrazovanja, 2005. godine upisuje Sveučilišni prijediplomski studij Prirodoslovno matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, smjer molekularna biologija. Prijediplomski rad izradila je na Botaničkom zavodu Prirodoslovno matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Mirte Tkalec na temi „Uspostavljanje i uloga mikorize u biljaka“. 2009. godine upisuje Sveučilišni diplomski studij Prirodoslovno matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, smjer molekularna biologija. Diplomski rad izradila je na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Maje Matulić te 2011. diplomirala na temi „Regulacija aktivnosti urokinaznog sustava u ljudskim stanicama glioblastoma“.

Od 2012. do 2014. radi kao voditelj Pedološkog laboratorija u Poljoprivrednom učilištu u Bedekovčini i kao nastavnik biologije u Općoj gimnaziji Zlatar. Od 2015. godine radi na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Zavodu za molekularnu biologiju na BICRO projektu „Tkivni inženjering koštanih presađaka upotrebom matičnih stanica i bioaktivnog nosača“. Iste godine upisuje doktorski studij na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 2015. godine do danas radi u Selvita d.o.o., za istraživanje i razvoj u Zagrebu. Trenutno je na poziciji Vodećeg znanstvenika i Voditelja tima Translacijske grupe koja se bavi istraživanjima na ljudskim biološkim uzorcima.

Lidija Požgaj članica je TERMIS-a (prema engl. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society*), Hrvatskog društva za istraživanje raka, Hrvatskog torakalnog društva i Hrvatskog društva za imunologiju sluznice. Sudjelovala je na više međunarodnih i domaćih znanstvenih skupova te je objavila 6 radova citiranih u Current Contents-u.