

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Vladimir J. Cvetković

**ANALIZA EKTOPIČNOG OSTEOGENOG  
POTENCIJALA MEZENHIMSKIH  
MATIČNIH ĆELIJA BELOG MASNOG  
TKIVA KOD MIŠA NA OSNOVU  
RELATIVNE EKSPRESIJE GENA  
MARKERA OSTEOGENEZE**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Vladimir J. Cvetković

**ANALYSIS OF THE ECTOPIC  
OSTEOGENIC POTENTIAL OF  
ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL  
STEM CELLS IN MICE BASED ON THE  
RELATIVE GENE EXPRESSION OF  
OSTEOGENIC MARKERS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016



MENTORI:

**dr Stevo Najman**, redovni profesor

Univerzitet u Nišu - Medicinski fakultet

**dr Marina Stamenković-Radak**, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

**dr Gordana Nikčević**, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_ 2016.

## ***Zahvalnica***

Eksperimentalni deo ove disertacije urađen je u Naučnoistraživačkom centru za biomedicinu (Laboratorija za eksperimentalnu medicinu, Odeljenje za ćelijsko i tkivno inženjerstvo i Laboratorija za funkcionalnu genomiku i proteomiku) Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, na Institutu za biologiju i humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu kao i na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu. Disertacija je urađena u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom "*Virtuelni koštano zglobovi čoveka i njegova primena u pretkliničkoj i kliničkoj praksi*" br. III41017.

*Veliku zahvalnost dugujem:*

Prof. dr Stevi Najmanu na ukazanom poverenju i prilici da učestvujem u naučnoistraživačkom radu u okviru njegovog tima. Na znanju koje mi je preneo, akademskim veštinama kojim me je naučio, na nesebičnoj podršci i strpljenju u radu sa mnom tokom svih godina zajedničkog rada. Hvala na vrednim savetima i pravim smernicama, idejama, izdvojenom vremenu i na velikom angažovanju i stručnoj pomoći prilikom izrade ove disertacije.

Prof. dr Marini Stamenković-Radak na ljubaznosti i podršci od trenutka kada sam upisao doktorske studije. Hvala na strpljenju, efikasnosti, ličnom angažovanju i na korisnim sugestijama što mi je veoma značilo prilikom uobličavanja ove disertacije.

Prof. dr Gordani Nikčević na ljubaznosti i podršci, stručnoj pomoći i vrednim sugestijama što je veoma doprinelo kvalitetu ove disertacije.

Prof. dr Tatjani Mitrović na ukazanom poverenju, razumevanju i nesebičnoj podršci. Hvala na znanju koje mi je prenela i na dobronamernim i prijateljskim savetima.

Kolegicama sa Medicinskog fakulteta u Nišu, Jeleni Najdanović i Sanji Stojanović hvala na velikoj pomoći prilikom naučnoistraživačkog rada, podršci i ohrabrivanju. Dr

Mariji Vukelić-Nikolić hvala na stručnoj pomoći u pojedinim fazama rada i dr Jeleni Živković hvala na prijateljskoj podršci.

Zaposlenima u Naučnoistraživačkom centru za biomedicinu, Medicinskog fakulteta u Nišu, hvala na ljubaznosti i tehničkoj pomoći.

Svim kolegama sa Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, a posebno kolegamicama iz kabineta 403a, veliko hvala na prijateljskoj podršci, pomoći i ohrabivanju u kritičnim trenucima.

Porodici i prijateljima, hvala na podršci, pomoći i razumevanju.

Iznad svega, od srca se zahvaljujem *Milijani* na ogromnom razumevanju, strpljenju, ohrabivanju i podršci tokom svih godina našeg zajedničkog života.

# **Analiza ektopičnog osteogenog potencijala mezenhimskih matičnih ćelija belog masnog tkiva kod miša na osnovu relativne ekspresije gena markera osteogeneze**

## **Rezime**

Osnovni cilj disertacije je da se uporedi i analizira osteogeni potencijal sveže izolovanih mezenhimskih matičnih ćelija belog masnog tkiva (ADSC) i *in vitro* osteoindukovanih ADSC na modelu ektopične implantacije kod Balb/c miševa.

ADSC su nakon izolacije okarakterisane imunocitohemijском analizom. Osteogena diferencijacija ADSC ispitana je analizom relativne ekspresije gena osteriksa (*Sp7*), osteokalcina (*Bglap*), alfa 1 lanca kolagena tipa I (*Colla1*) i alkalne fosfataze (*Alpl*), vizuelizacijom fosfata i analizom ekspresije osteopontina. Miševima su subkutano implantirani implantati sastavljeni od sveže izolovanih ADSC, mineralnog koštanog matriksa (BMM) i plazme obogaćene trombocitima (PRP) (SPN grupa), osteoindukovanih ADSC, BMM i PRP (OPN grupa), PRP i BMM (PN kontrola) i samo od BMM (N kontrola). Osteogeneza u implantatima je ispitana analizom relativne ekspresije *Sp7*, *Bglap*, *Colla1* i *Alpl*, histomorfološkom, histomorfometrijskom i imunohistohemijском analizom.

Nađena je pozitivna CD29 i negativna CD14 ekspresija kod ćelija, što je karakteristika ADSC. Nakon petnaestodnevne osteoindukcije ADSC, zabeležena je najjača ekspresija markera osteogene diferencijacije. Najviša ekspresija gena markera osteogeneze, prisustvo ćelija nalik osteoblastima i osteoklastima, resorpcija BMM, visok procenat infiltriranog tkiva i prisustvo tkiva nalik osteoidu, ukazuju na napredovanje osteogeneze u OPN grupi nakon osme nedelje. U SPN grupi, nađeni su izraženi znaci inicijacije osteogeneze posle druge nedelje, a od četvrte ekspresija gena i ostalih markera opada što ukazuje na slabljenje osteogeneze.

Rezultati doprinose razumevanju osteogenog potencijala različito pripremljenih ADSC što treba imati u vidu pri izboru načina i uslova za njihovu primenu u tretmanu koštanih defekata.

**Ključne reči:** osteogeneza, mezenhimske matične ćelije masnog tkiva, plazma obogaćena trombocitima, subkutana implantacija, miš, ekspresija gena, markeri osteogeneze, histomorfologija, histomorfometrija, imunohistohemija

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Genetika

**UDK broj:** [[576.3:611.018]:591.476]:611.018.4(043.3)

# **Analysis of the ectopic osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal stem cells in mice based on the relative gene expression of osteogenic markers**

## **Abstract**

The main subject of this doctoral dissertation was to compare and evaluate the osteogenic potential of freshly isolated, non-treated adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) and the potential of *in vitro* osteoinduced ADSCs in the ectopic bone-forming model in Balb/c mice.

The ADSCs were characterized after isolation by immunocytochemical analysis. Osteogenic differentiation of ADSCs was evaluated using relative gene expression analysis of osterix (*Sp7*), osteocalcin (*Bglap*), collagen type I alpha 1 chain (*Colla1*) and alkaline phosphatase (*Alpl*), along with an assay for detection of phosphate deposits and an immunoexpression analysis of osteopontin. The implants composed of freshly isolated ADSCs, bone mineral matrix (BMM) and platelet-rich plasma (PRP) (SPN group), osteoinduced ADSCs, BMM and PRP (OPN group), BMM and PRP (PN control) and BMM-only (N control), were implanted subcutaneously in mice. The implants were analyzed using relative gene expression analysis of *Sp7*, *Bglap*, *Colla1* and *Alpl*, histochemical, histomorfometrical and immunohistochemical analyses.

Positive immunoexpression of CD29 and negative of CD14 was found in the cells, which is a characteristic of ADSCs. After fifteen days of osteoinduction of ADSCs, the expression of the markers of osteogenic differentiation was the highest. The highest level of the bone-related gene expression, the presence of osteoblast-like and osteoclast-like cells, the resorption of BMM, a high percentage of infiltrated tissue and the presence of osteoid-like tissue, all suggest the progress of the osteogenesis in OPN implants after eight weeks. Strongly expressed signs of the initiation of osteogenesis were found in SPN implants after two weeks, but from the fourth week the expression of bone-related genes, as well as other analyzed markers decreased.

The obtained results represent a contribution to the understanding of differences in the osteogenic potential of differently prepared ADSCs which is very important because of their utilization for the treatment of bone defects.

**Key words:** osteogenesis, adipose-derived mesenchymal stem cells, platelet-rich plasma, subcutaneous implantation, mice, gene expression, osteogenic markers, histochemistry, histomorphometry, immunohistochemistry

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Genetics

**UDC number:** [[576.3:611.018]:591.476]:611.018.4(043.3)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Koštano tkivo</b> .....	1
<b>1.2. Zarastanje koštanog tkiva</b> .....	2
<b>1.3. Strategije u tretmanu koštanih defekata</b> .....	4
<b>1.4. Koštani zamenici - biomaterijali</b> .....	5
<b>1.5. Izvor bioloških faktora za regeneraciju koštanog tkiva - Plazma obogaćena trombocitima</b> .....	6
<b>1.6. Čelije koštanog tkiva</b> .....	8
1.6.1. Matične ćelije za regeneraciju koštanog tkiva .....	11
1.6.2. Mezenhimske matične ćelije belog masnog tkiva .....	13
<b>1.7. Različiti načini pripreme ADSC za tretman koštanih defekata</b> .....	14
1.7.1. Priprema i primena <i>in vitro</i> umnoženih i osteoindukovanih ADSC .....	15
1.7.2. Priprema i primena sveže izolovanih ADSC - Intraoperativni pristup .....	16
1.7.3. Priprema i primena implantata sa ADSC u bioreaktorima .....	17
<b>1.8. Marker diferencijacije osteoprogenitornih ćelija i osteogenog procesa</b> .....	17
1.8.1. Osteriks .....	18
1.8.2. Osteokalcin .....	20
1.8.3. Alfa 1 lanac kolagena tipa I .....	21
1.8.4. Alkalna fosfataza .....	22
1.8.5. Osteopontin .....	23
<b>2. PREDMET I CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	25
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	27
<b>3.1. Materijal i metode <i>in vitro</i> istraživanja</b> .....	27
3.1.1. Izolacija SVF .....	27



3.1.2. Formiranje kulture ADSC.....	29
3.1.3. Karakterizacija ADSC sadržanih u sveže izolovanoj SVF i u uspostavljenoj ćelijskoj kulturi.....	29
3.1.4. Indukcija ADSC ka osteoprogenitornim ćelijama .....	30
3.1.4.1. Metode za procenu stepena osteogene diferencijacije ADSC .....	31
Postupak analize relativne ekspresije gena markera osteogeneze kod osteoindukovanih ADSC.....	31
Postupak imunocitohemijske analize ekspresije osteopontina.....	32
Metoda citohemijske analize .....	32
<b>3.2. Materijal i metode <i>in vivo</i> istraživanja .....</b>	<b>32</b>
3.2.1. Eksperimentalne životinje.....	33
3.2.2. Koštani zamenik.....	33
3.2.3. Priprema plazme obogaćene trombocitima.....	34
3.2.4. Priprema implantata .....	35
3.2.5. Postupak implantacije .....	37
3.2.6. Ekstrakcija implantata.....	38
3.2.7. Metode korišćene za analizu osteogenog procesa u implantatima .....	39
3.2.7.1. Postupak analize relativne ekspresije gena markera osteogeneze u implantatima.....	39
Izolacija RNK.....	39
Merenje koncentracije RNK.....	40
Reverzna transkripcija.....	40
Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu .....	41
Statistička obrada rezultata analize relativne ekspresije gena.....	45
3.2.7.2. Elektroforeza na agaroznom gelu .....	45
3.2.7.3. Metode histomorfološke i histomorfometrijske analize .....	45
Obrada implantata za histomorfološku i histomorfometrijsku analizu .....	46

Trihromno bojenje implantata po Masson-u za histomorfološku analizu.....	46
Hematoksilin-eozin bojenje implantata za histomorfometrijsku analizu.....	47
Histomorfometrijska analiza .....	47
<i>Statistička obrada rezultata histomorfometrijske analize</i> .....	47
3.2.7.4. Metoda imunohistohemijske analize .....	48
<b>4. REZULTATI</b> .....	49
<b>4.1. Rezultati <i>in vitro</i> istraživanja</b> .....	49
4.1.1. Karakterizacija ADSC sadržanih u sveže izolovanoj SVF .....	49
4.1.2. Karakterizacija ADSC u uspostavljenoj ćelijskoj kulturi .....	50
4.1.3. <i>In vitro</i> osteogena indukcija ADSC .....	51
4.1.4. Procena stepena <i>in vitro</i> osteogene diferencijacije ADSC .....	52
4.1.4.1. Analiza ekspresije gena markera osteogeneze.....	52
4.1.4.2. Citohemijska analiza.....	54
4.1.4.3. Analiza imunoekspresije osteopontina .....	55
<b>4.2. Rezultati <i>in vivo</i> istraživanja</b> .....	55
4.2.1. Analiza osteogenog procesa u implantatima.....	55
4.2.1.1. Analiza makroskopskog izgleda implantata .....	56
4.2.1.2. Analiza relativne ekspresije gena markera osteogeneze u implantatima	57
Relativna ekspresija <i>Sp7</i> .....	58
Relativna ekspresija <i>Bglap</i> .....	61
Relativna ekspresija <i>Coll1</i> .....	63
Relativna ekspresija <i>Alpl</i> .....	65
4.2.1.3. Histomorfološka analiza .....	68
4.2.1.4. Histomorfometrijska analiza.....	72
4.2.1.5. Analiza imunoekspresije osteopontina .....	74
<b>5. DISKUSIJA</b> .....	78

<b>5.1. Analiza <i>in vitro</i> istraživanja</b> .....	79
<b>5.2. Analiza <i>in vivo</i> istraživanja</b> .....	83
5.2.1. Komparativna analiza implantata .....	87
5.2.2. Efekti PRP-a u ispitivanim implantatima .....	94
5.2.3. Uloga BMM u ispitivanim implantatima.....	95
5.2.4. Analiza prisustva kolagena i kolagenogeneze u ispitivanim implantatima ...	96
5.2.5. Karakteristike ekspresije markera mineralizacije u implantatima .....	99
5.2.6. Vaskularizovanost ispitivanih implantata.....	102
<b>5.3. Komparativna analiza uticaja sveže izolovanih i osteoindukovanih ADSC na ektopični osteogeni proces</b> .....	104
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	107
<b>7. LITERATURA</b> .....	110
<b>Prilog - Lista skraćenica</b> .....	138
<b>Biografija autora</b> .....	142
<b>Izjava o autorstvu</b> .....	143
<b>Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada</b> .....	144
<b>Izjava o korišćenju</b> .....	145

# 1. UVOD

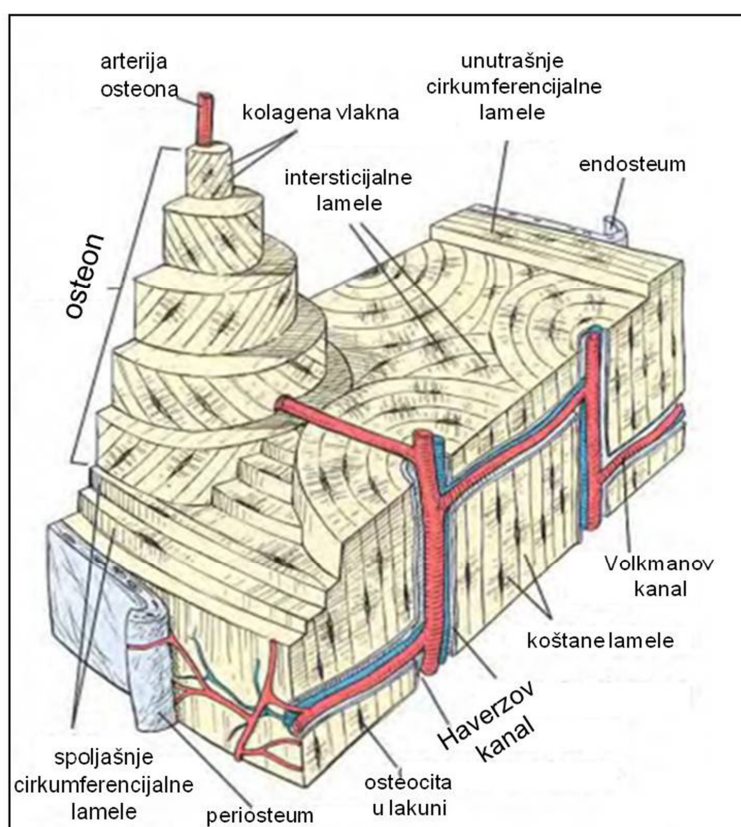
## 1.1. Koštano tkivo

Kost je hijerarhijski organizovano tkivo koje je u strukturnom i funkcionalnom pogledu veoma dinamično. Poznavanje biologije koštanog tkiva je veoma važno za razumevanje funkcionisanja zdravog koštanog tkiva i koštanog tkiva u regeneraciji (Cvetkovic i sar., 2013). Koštano tkivo ima višestruku ulogu u organizmu kao što je mehanička (potporna), ulogu u hematopoezi i homeostazi, a takođe ima ulogu u deponovanju kalcijuma i fosfata (Ross i sar., 1989; Amini i sar., 2012).

Kao i ostala vezivna tkiva u organizmu, koštano tkivo se sastoji od ćelija, koje čine 10% tkiva, i od vanćelijskog matriksa. Vanćelijski matriks koštanog tkiva je mineralizovan, a glavni mineralni konstituent je hidroksiapatit, hemijske formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , koji ima ukupan udeo od približno 60% u tkivu. Organska komponenta vanćelijskog matriksa čini 30% koštanog tkiva čiji je glavni konstituent kolagen tipa I, koji čini gotovo 90% organske komponente. Mnogo manji deo organske komponente koštanog tkiva (oko 10%) čine lipidi, glikozaminoglikani, glikoproteini, koštani sijaloprotein i ostali proteini (Ross i sar., 1989; Feng i McDonald, 2011).

Sve kosti u organizmu izgrađene su od kompaktnog koštanog tkiva koje ima gušću, pravilnu strukturu i sunderastog koštanog tkiva koje ima ređu i manje pravilnu strukturu. (Datta i sar., 2008; Feng i McDonald, 2011). Osnovna jedinica građe koštanog tkiva je osteon ili Haverzov sistem (Hert i sar., 2004; Schneider i sar., 2010) (Slika 1.1.). U sredini osteona nalazi se Haverzov kanal kroz koji prolaze krvni sudovi koji snabdevaju tkivo neophodnim nutritivnim i nervi koji inervišu kost. Haverzovi kanali prate osteon i postavljeni su uglavnom vertikalno duž kosti ili sa određenim stepenom inklinacije, tako da se prostiru longitudinalno u pravcu dejstva sile (Hert i sar., 2004). Ovi uzdužni kanali povezani su poprečnim Volkmanovim kanalima, koji predstavljaju vezu između osteona i omogućavaju njihovu komunikaciju. Svaki osteon sastavljen je iz više kružnih koštanih lamela koje čine zid osteona. Lamelle su izgrađene od mineralizovanog vanćelijskog matriksa u kojem se nalaze lakune gde su smeštene

zrele koštane ćelije - osteociti. Između lakuna nalazi se lakuno-kanalikularna mreža (Schneider i sar., 2010), kroz koju prolaze nastavci osteocita kojima ćelije uspostavljaju međusobnu komunikaciju u rigidnom matriksu zrelog koštanog tkiva. Između osteona nalaze se intersticijalne lamele, a na unutrašnjoj i spoljašnjoj strani koštanog tkiva unutrašnje i spoljašnje cirkumferencijalne lamele (Ross i sar., 1989; Datta i sar., 2008) (Slika 1.1.).

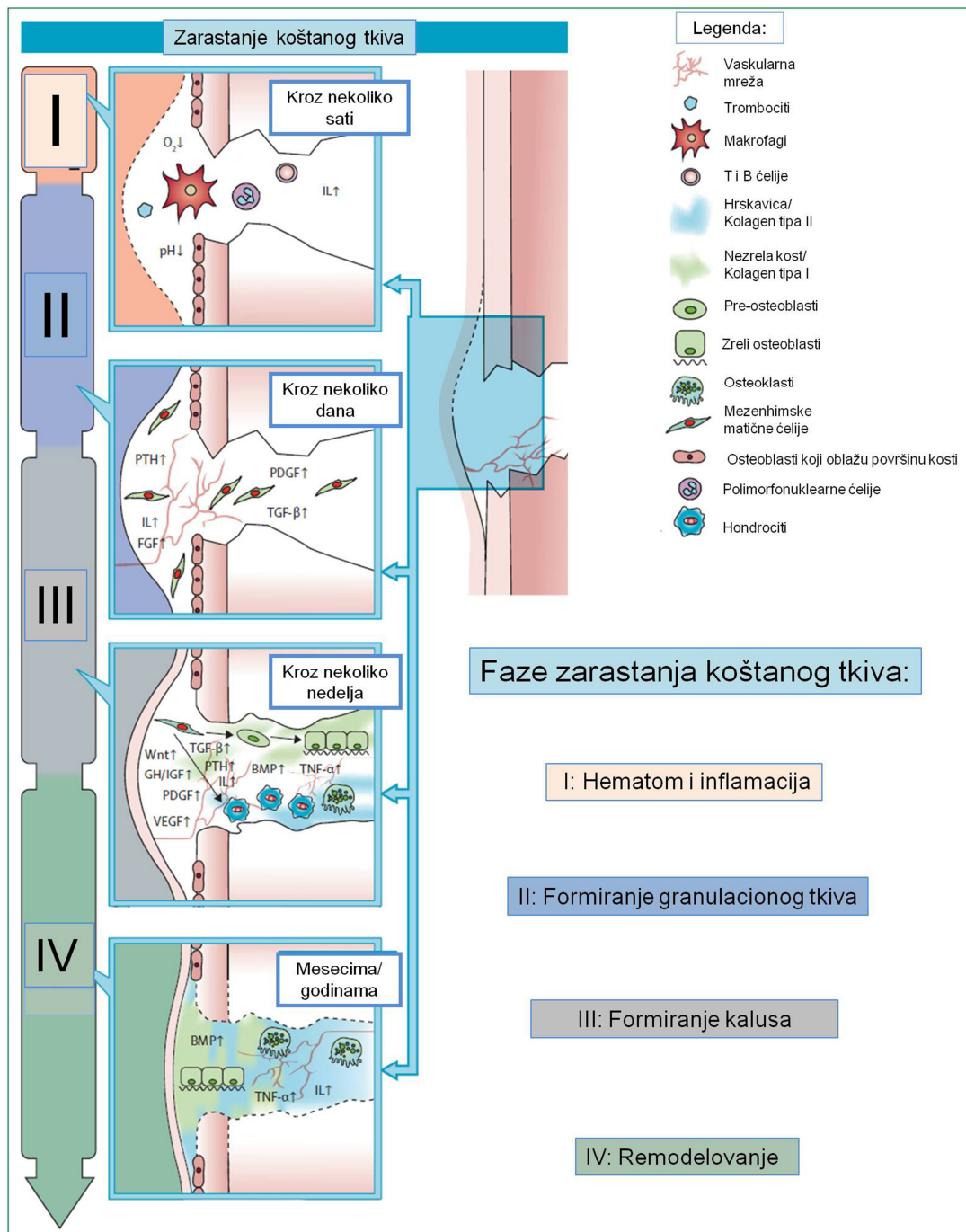


**Slika 1.1.** Građa koštanog tkiva (Adaptirano iz Ross i sar., 1989).

## 1.2. Zarastanje koštanog tkiva

Zarastanje koštanog tkiva se odvija kroz četiri faze koje se preklapaju (Slika 1.2.). Prva faza kreće ubrzo nakon nastanka traume tako što se formira hematoma, a zatim dolazi do inflamacije (Balogh i sar., 2012). Formiranjem krvnog ugruška nastaje pogodna sredina za migraciju inflamatornih ćelija, prvenstveno makrofaga, zatim

neutrofila, limfocita, fibroblasta i endotelnih ćelija. Za fazu inflamacije karakteristična je hipoksija, niska pH i prisustvo ćelija karakterističnih za inflamaciju. Nakon ove faze nastaje granulaciono tkivo, koje predstavlja osnovu za narednu fazu reparacije u kojoj se formira kalus (Cho i sar., 2002; Balogh i sar., 2012; Oryan i sar., 2013).



Slika 1.2. Zarastanje koštanog tkiva (Adaptirano i modifikovano iz Balogh i sar., 2012).

Privučeni na mesto defekta, makrofagi zajedno sa trombocitima i ostalim ćelijama koštanog tkiva izlučuju sledeće faktore: interleukini (*Interleukin-IL*, eng.), faktori rasta fibroblasta (*Fibroblast growth factor-FGF*, eng.), faktor rasta iz trombocita (*Platelet-derived growth factor-PDGF*, eng.), transformišući faktor rasta  $\beta$  (*Transforming growth factor- $\beta$ -TGF- $\beta$* , eng.), insulinu-slični faktori rasta (*Insuline-like growth factor-IGF*, eng.), faktor nekroze tumora  $\alpha$  (*Tumour necrosis factor- $\alpha$ -TNF- $\alpha$* , eng.), vaskularni endotelni faktori rasta (*Vascular endothelial growth factor-VEGF*, eng.), protein morfogeneze kosti (*Bone morphogenetic protein-BMP*, eng.) koji imaju važnu ulogu u procesu zarastanja koštanog tkiva (Schindeler i sar., 2008; Moshiri i Oryan, 2013). Takođe se pod uticajem ovih faktora regrutuju mezenhimske matične ćelije iz okolnog tkiva. Tokom reparacije, mezenhimske matične ćelije se diferenciraju u osteoblaste, koji najpre izgrađuju nezrelu kost (*Woven bone*, eng.) i hondroblaste koji izgrađuju hrskavičavo tkivo, angioblaste i fibroblaste, koji su takođe neophodni za regeneraciju koštanog tkiva (Oryan i sar., 2013). U daljoj fazi reparacije formira se kalus koji je u početku izgrađen od hrskavičavog tkiva, a zatim se u procesu mineralizacije zamenjuje nezrelim koštanim tkivom i postaje čvršći od prethodnog mekog hrskavičavog kalusa (Doblaré i sar., 2004). U poslednjoj fazi remodelovanja, resorbuje se tkivo tvrdog kalusa i formira se lamelarna, zrela kost. Tada se posebno ekspimiraju interleukini, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  i BMP-ovi koji podstiču razgradnju i izgradnju postojećeg koštanog tkiva (Balogh i sar., 2012; Oryan i sar., 2013).

### 1.3. Strategije u tretmanu koštanih defekata

Koštano tkivo ima sposobnost spontane regeneracije i zarastanja, ali samo u slučaju kada nastanu manji defekti (Nandi i sar., 2010; Oryan i sar., 2014). Međutim, veći koštani defekti nemaju mogućnost spontane regeneracije, pa je u tom slučaju neophodna intervencija. Najčešće se za tretman većih koštanih defekata upotrebljavaju koštani kalemovi ili graftovi (*Graft*, eng.) (Nandi i sar., 2010). Razlikuju se autograftovi, alograftovi i ksenograftovi (Jakob i sar. 2012; Amini i sar., 2012). Transplantacija autograftova predstavlja zlatni standard u tretmanu koštanih defekata, ali ovaj pristup ima više nedostataka. Najveća mana jeste velika invazivnost po

pacijenta na mestu odakle se uzima kalem (na primer ilijačna kresta), tako da intervencija izaziva krvarenje, inflamaciju, hronični bol, a takođe postoji opasnost od infekcije (Amini i sar., 2012). Ako je potrebno tretirati veće koštane defekte, onda je prikupljanje dovoljne količine koštanog tkiva sa donorskog mesta nemoguće, jer u tom slučaju kost na donorskom mestu može izgubiti svoju funkcionalnost (Janicki i Schmidmaier, 2011). S druge strane, prednost tretmana autograftovima jeste u odsustvu imunog odgovora, jer se ovaj tip graftova implantira sa jednog na drugo mesto u istom organizmu. Alograftova i ksenograftova najčešće ima u dovoljnim količinama tako da se problem nedostatka materijala ne može javiti. Smanjena osteoinduktivnost, imuna nekompatibilnost, kao i povećan rizik od infekcije nakon presađivanja predstavljaju neke od problema u slučaju primene alograftova i ksenograftova (Bauer i Muschler, 2000; Jakob i sar., 2012; Oryan i sar., 2014).

Tkivno inženjerstvo (*Tissue engineering*, eng.) podrazumeva skup metoda kojima se usavršavaju i razvijaju biološki supstituenti za regeneraciju, poboljšanje ili održanje funkcije nekog tkiva (Langer i Vacanti, 1993). Iz tog koncepta proizašlo je tkivno inženjerstvo kosti (TIK) (*Bone tissue engineering*, eng.), koje je utemeljeno pre 30 godina sa ciljem da se prevaziđu postojeći problemi koji postoje prilikom transplantacije koštanih graftova i poboljša način za tretman koštanih defekata (O'Keefe i Mao, 2011; Amini i sar., 2012). Ovaj pristup je alternativa transplantaciji koštanih graftova i podrazumeva kombinaciju koštanih zamenika, koji se koriste kao nosači osteoprogenitornih ćelija i izvora osteogenih faktora za tretman koštanih defekata (Buma i sar., 2004; Liu i sar. 2008a; Amini i sar., 2012Im, 2013; Oryan i sar., 2014).

#### **1.4. Koštani zamenici - biomaterijali**

Koštani zamenici su jedna od osnovnih komponenti u TIK i predstavljaju supstrat odnosno 3D (trodimenzionalnu) mikrosredinu, koja je neophodna osteoprogenitornim ćelijama (Schäffler i Büchler, 2007). Najčešće se koriste biomaterijali koji imitiraju mikrostrukturu koštanog tkiva omogućavajući osteoprogenitornim ćelijama da što efikasnije adheriraju, proliferišu i da se diferenciraju



(Beni i sar., 2013). Takođe, koštani zamenici bi trebalo da poseduju sposobnost da zadrže biohemijske faktore, koji su neophodni za proces osteogeneze (Dawson i sar., 2008) i da poseduju osteokonduktivna, osteoinduktivna i osteointegrativna svojstva (Barbeck i sar., 2014). U takve koštane zamenike spadaju materijali na bazi hidroksiapatita i kalcijum fosfata, minerala koji čine najveći deo neorganske komponente prirodne kosti, pa samim tim najvernije imitiraju mikrosredinu koštanog tkiva (Storgard-Jensen i sar., 1996; Hattori i sar., 2006). Pored njih postoje i druge vrste koštanih zamenika, na primer polimernih materijala, hidrogelova, imunomodulatornih materijala, biorazgradivih materijala, biokeramike i nanomaterijala (Amini i sar., 2012; Barba i sar., 2013; Oryan i sar., 2014).

### **1.5. Izvor bioloških faktora za regeneraciju koštanog tkiva - Plazma obogaćena trombocitima**

Dodavanjem regulatornih faktora, kao što su faktori rasta i diferencijacije, može se podstaći diferencijacija, proliferacija i migracija progenitornih ćelija, što može značajno da poboljša i ubrza regeneraciju koštanog tkiva (Amini i sar., 2012).

Plazma obogaćena trombocitima (*Platelet-rich plasma - PRP*, eng.) je autologni preparat koji se priprema iz pune krvi (Intini i sar., 2007) i koji se koristi za tretman koštanih defekata od kraja devedesetih godina prošlog veka (Intini, 2009; Choi i sar., 2004). PRP predstavlja koncentrat trombocita u manjoj zapremini plazme, najčešće sa 4-10 puta više trombocita od normalne fiziološke vrednosti, sa manjim primesama ostalih krvnih elemenata. Sastav PRP-a može blago da varira zbog načina pripreme koji se zasniva na centrifugiranju krvi i odvajanju frakcije trombocita od ostalih krvnih elemenata i na koncentrovanju trombocita u plazmi.

Poznato je da aktivirani trombociti oslobađaju više različitih bioloških faktora, koji imaju bitnu ulogu u reparaciji i regeneraciji koštanog tkiva (Tabela 1.1).

**Tabela 1.1.** Faktori koje oslobađaju aktivirani trombociti i njihova biološka aktivnost u regeneraciji i reparaciji koštanog tkiva (Adaptirano iz Intini, 2009; Rodriguez i sar., 2014).

<b>Biološki faktori</b>	<b>Biološka aktivnost u regeneraciji i reparaciji koštanog tkiva</b>
ADP ( <i>Adenosine diphosphate</i> , eng.); ATP ( <i>Adenosine triphosphate</i> , eng.)	Utiče na remodelovanje i proliferaciju koštanog tkiva: podiže nivo $Ca^{2+}$ u osteoblastima. Deluje sinergistički sa hormonima u indukciji regeneracije koštanog tkiva
Faktori V, XI, XIII ( <i>Factor V, XI, XIII</i> , eng.); Fibrinogen ( <i>Fibrinogen</i> , eng.); Fon Vilebrandov faktor ( <i>von Willebrand factor - vWF</i> , eng.)	Koagulacija
Angiopoetin 2 ( <i>Angiopoietin 2 - Ang-2</i> , eng.)	Remodelovanje krvnih sudova i angiogeneza
Epidermalni faktor rasta ( <i>Epidermal growth factor - EGF</i> , eng.)	Stimuliše periostealno formiranje koštanog tkiva. Nedostatak EGF-a odlaže primarnu osifikaciju hrskavice
Faktor rasta fibroblasta 2 ( <i>Fibroblast growth factor 2 - FGF2</i> , eng.)	Indukuje i podržava regeneraciju koštanog tkiva indukujući proliferaciju i diferencijaciju preosteoblasta i osteoblasta
Fibronektin ( <i>Fibronectin</i> , eng.)	Fibronektin je neophodan za opstanak, proliferaciju, migraciju i ekspresiju gena karakterističnih za osteoblaste i mineralizaciju
Insulinu-sličan faktor rasta 1 ( <i>Insuline-like growth factor 1 - IGF-1</i> , eng.)	Stimuliše proliferaciju osteoprogenitornih ćelija, sintezu proteina koštanog matriksa, ekspresiju alkalne fosfataze, osteopontina i osteokalcina u stromi koštane srži, formiranje koštanog tkiva, proliferaciju i diferencijaciju progenitornih ćelija
Trombocitni faktor rasta endotelnih ćelija ( <i>Platelet-derived endothelial cell growth factor - PDECGF</i> , eng.)	Angiogeneza
Trombocitni faktor rasta (PDGF)	Utiče na regrutaciju mezenhimskih matičnih i progenitornih ćelija, proliferaciju, migraciju i osteogenu diferencijaciju. Podstiče proliferaciju osteoblasta i mineralizaciju vanćelijskog matriksa
Serotonin	Stimuliše proliferaciju osteoprogenitornih ćelija
Transformišući faktor rasta $\beta 1$ ( <i>Transforming growth factor beta 1 - TGF-<math>\beta 1</math></i> , eng.)	Utiče na regrutaciju i proliferaciju mezenhimskih matičnih ćelija, proliferaciju preosteoblasta i fibroblasta
Trombospondin-1 ( <i>Thrombospondin 1 - TSP-1</i> , eng.)	Učestvuje u regulaciji regeneracije koštanog tkiva
Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF)	Pojačava neovaskulogenezu u koštanim defektima i enhondralno okoštavanje

Pokazano je da faktori navedeni u Tabeli 1.1. utiču na progenitorne ćelije, tako što mogu da ih regrutuju iz okolnih tkiva (Veillette i McKee, 2007), ubrzaju i poboljšaju njihovo prijanjanje (adheziju) za supstrat na mesto defekta i podstiču njihovu proliferaciju (Cervelli i sar., 2009), diferencijaciju i angiogenezu (Vogel i sar., 2006; Intini i sar., 2007; Kasten i sar., 2008b; Intini, 2009; Man i sar., 2012; Rodriguez i sar., 2014). Svi pomenuti efekti su od velikog značaja za regeneraciju koštanog tkiva.

Trombociti su glavni prirodni regulatori inflamatorne faze i faze proliferacije mezenhimskih ćelija na mestima povrede i samim tim predstavljaju odličan prirodni i u fiziološkom smislu kompatibilan izvor aktivnih bioloških faktora za osteoregenerativne svrhe (Intini, 2009). Više puta je demonstrirano da PRP u kombinaciji sa multipotentnim mezenhimskim matičnim ćelijama (*Mesenchymal stem cells - MSC*, eng.) ima dobar potencijal da indukuje i podrži osteoregenerativne procese (Vogel i sar., 2006; Liu i sar., 2008b; Kasten i sar., 2008b; Cervelli i sar., 2010). Pored toga, aktivirana PRP formira fibrinska vlakna koja deluju kao "biološki lepak", koji može da poboljša vezivanje koštanih zamenika i ćelija koje se pri tom kombinuju sa njima (Freymiller i Aghaloo, 2004; Liu i sar., 2008b; Muller i sar., 2010).

## 1.6. Ćelije koštanog tkiva

Sem osteoklasta, sve ostale ćelije koštanog tkiva, osteoprogenitorne ćelije (ili osteogene ćelije - OĆ), osteoblasti i osteociti potiču od istog tipa ishodnih ćelija - mezenhimskih matičnih ćelija (Ros i sar., 1989; Santos i sar., 2009; Feng i McDonald, 2011). Od osteoprogenitornih ćelija diferenciraju se osteoblasti, a od osteoblasta nastaju zrele koštane ćelije, osteociti. Faze diferencijacije ćelija osteoblastne linije odvijaju se sinhronizovano sa razvojem koštanog tkiva.

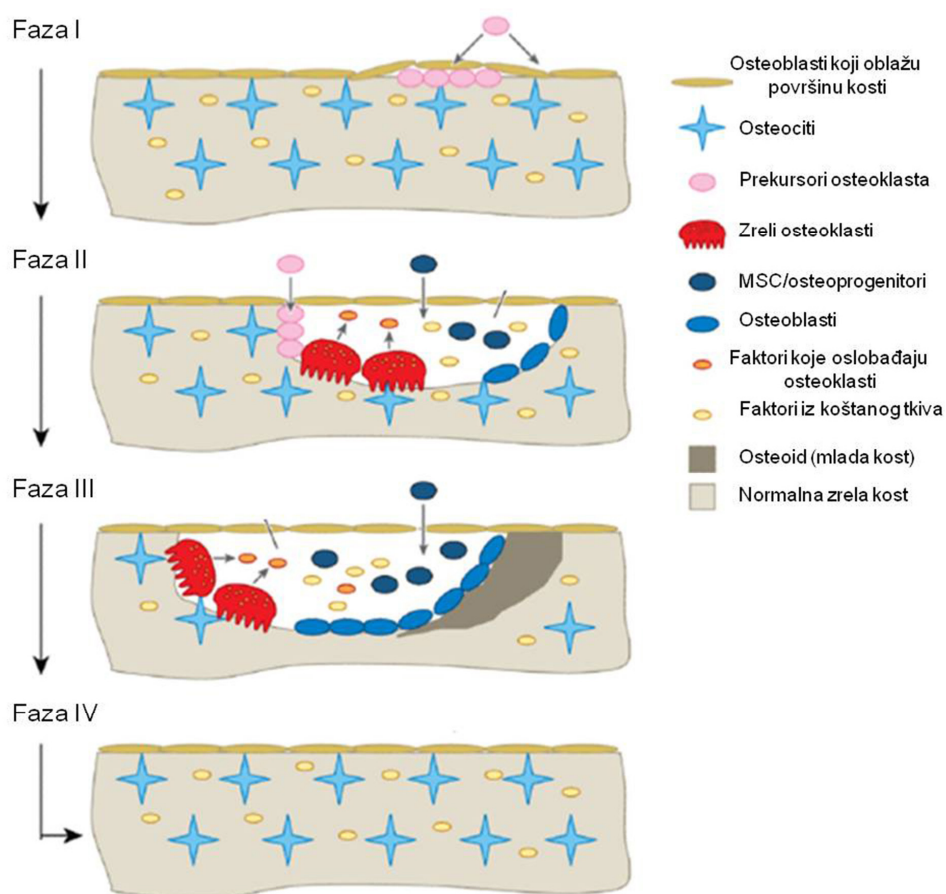
Osteoprogenitorne ćelije proliferišu i diferenciraju se u sledeći stupanj mnogo aktivnijih ćelija, u osteoblaste. Osteoblasti imaju sposobnost proliferacije i prolaze kroz nekoliko stadijuma diferencijacije sve do stadijuma zrelih osteoblasta (Ducy i sar., 2000; Feng i McDonald, 2011). Zreli osteoblasti izgrađuju koštani matriks koji je sastavljen prvenstveno od kolagena, ali i drugih organskih komponenti (Raggatt i

Partridge, 2010). Takođe, smatra se da osteoblasti imaju ulogu u inicijaciji mineralizacije, tako što luče vezikule koje sadrže enzim alkalnu fosfatazu. Pored alkalne fosfataze i kolagena, za osteoblaste je karakteristično da eksprimiraju osteokalcin, traskripcioni faktor osteriks, osteopontin, koštani sijaloprotein i druge (Fisher i sar., 1987; Mark i sar., 1988; Nakashima i sar., 2002). Zreli osteoblasti imaju kuboidalni ili poligonalni oblik sa krupnim jedrom i zauzimaju jednoslojnu formaciju na mestima izgradnje koštanog tkiva. Kada osteoid okruži osteoblaste u potpunosti, onda se ove ćelije diferenciraju u osteocite (Jilka i sar., 1998) koje imaju ulogu u održavanju koštanog matriksa. Usled smrti osteocita u određenom delu koštanog tkiva, pokreće se remodelovanje ili reparacija (Ross i sar., 1989). Pored toga što imaju ulogu u sintezi organskog i neorganskog dela koštanog matriksa, ima podataka da osteoblasti regulišu i aktivnost osteoklasta (Gay i sar., 2000).

Osteoklasti nastaju od monojedarnih hematopoetskih progenitornih ćelija pod uticajem dva esencijalna faktora, M-CSF (*Monocyte/macrophage colony-stimulating factor*, eng.) i RANKL (*Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ligand*, eng.) (Santos i sar., 2009; Feng i McDonald, 2011), tako da su po poreklu i funkciji veoma slični makrofagima (Menea i sar., 2000; Hadjidakis i Androulakis, 2006). Osteoklasti su velike višejedarne ćelije i imaju veoma važnu ulogu u resorpciji koštanog matriksa na mestima remodelovanja koštanog tkiva. Osteoklasti ostvaruju svoju ulogu sekrecijom kiselih i proteolitičkih enzima koji razlažu koštani matriks (Ross i sar., 1989; Hadjidakis i Androulakis, 2006). Zreli višejedarni osteoklasti nastaju spajanjem više monojedarnih osteoklasta, koji predhodno bivaju regrutovani iz koštane srži ili iz cirkulacije na mesto remodelovanja koštanog tkiva (Vaananen i sar., 2000; Feng i McDonald, 2011). Zreli osteoklasti prvo razgrađuju neorgansku komponentu koštanog matriksa, a zatim razgrađuju i organsku komponentu (Väänänen i sar., 1990).

Osteoblasti i osteoklasti učestvuju u remodelovanju koštanog tkiva, fino koordinisanom fiziološkom procesu kojim se uklanja oštećeno ili "staro" koštano tkivo, a izgrađuje zdravo (Feng i McDonald, 2011; Zanetti i sar., 2013). Drugim rečima, ove ćelije imaju važnu ulogu u procesima regeneracije i reparacije koštanog tkiva, jer je remodelovanje jedna od faza regeneracije koštanog tkiva (Balogh i sar., 2012).

Pored osteoblasta i osteoklasta, važnu ulogu u regulaciji remodelovanja igraju i osteociti kao mehanosenzorne ćelije (Datta i sar., 2008; Feng i McDonald, 2011). Proces remodelovanja se odigrava u četiri faze (Slika 1.3.) koje se preklapaju: 1) inicijacija na specifičnom mestu; 2) resorpcija koštanog tkiva i regrutacija MSC i osteoprogenitora; 3) diferencijacija osteoblasta i sinteza osteoida i 4) mineralizacija osteoida i završetak remodelovanja (Parfitt, 2008; Feng i McDonald, 2011). Inicijacija podrazumeva regrutaciju prekursora osteoklasta privučenim faktorima iz koštanog tkiva i početak njihove diferencijacije u zrele osteoklaste. Nakon toga, sledi druga faza gde intenzivna resorpcija predstavlja glavni događaj, ali takođe u ovoj fazi dolazi do regrutacije MSC i/ili osteoprogenitora. Tokom ove faze dešava se diferencijacija preosteoblasta, a nakon toga i osteoblasta.



**Slika 1.3.** Remodelovanje koštanog tkiva (Adaptirano iz Feng i McDonald, 2011).

U trećoj fazi, zreli osteoblasti sintetišu osteoid (mladu kost) i taj proces polako kreće da nadjačava resorpciju. U četvrtoj fazi dešava se intenzivna mineralizacija čime se završava proces remodelovanja i nastaje normalna (lamelarna) zrela kost (Feng i McDonald, 2011).

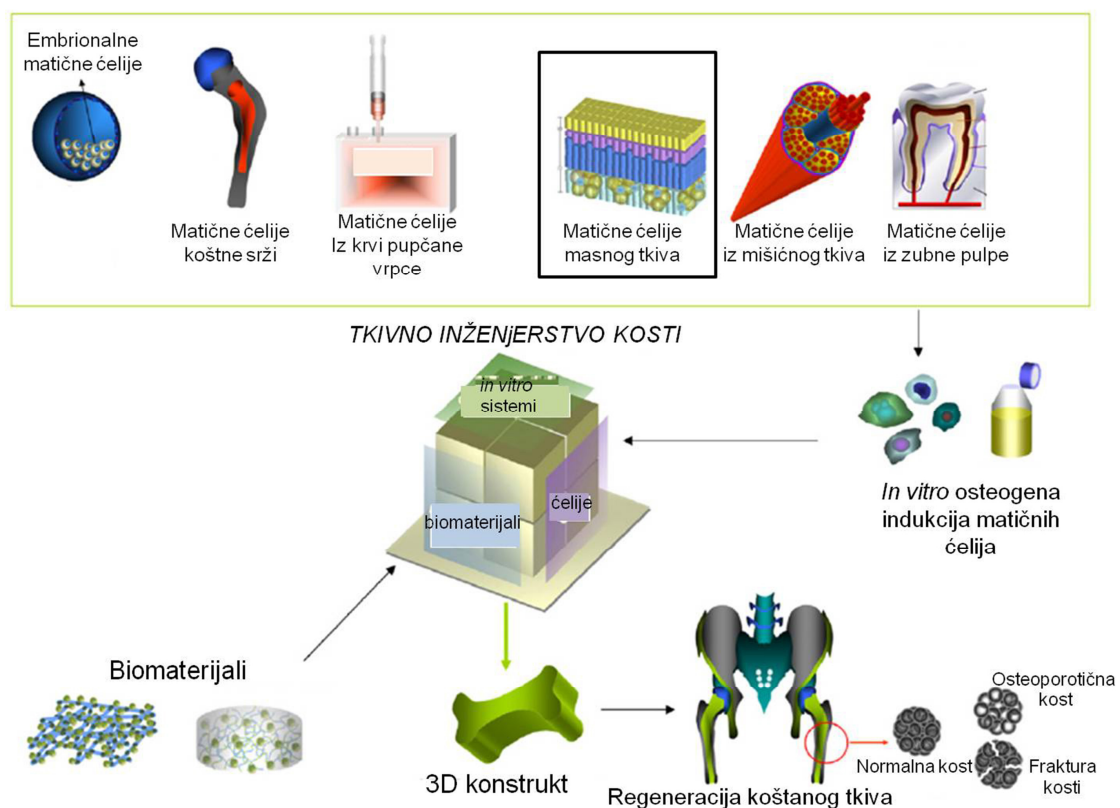
Osteoprogenitorne ćelije se u kostima prirodno nalaze na unutrašnjim i spoljašnjim površinama kostiju - endosteumu i periosteumu (Ross i sar., 1989; Datta i sar., 2008) i nastaju od mezenhimskih matičnih ćelija, kojih ima u koštanoj srži i u cirkulaciji (Feng i McDonald, 2011; Kuznetsov i sar., 2001). Pošto one imaju ključnu ulogu u reparaciji i regeneraciji koštanog tkiva, jedna od strategija u TIK zasniva se na dodavanju osteoprogenitornih ili mezenhimskih matičnih ćelija na mestima koštanih defekata, kako bi se podstakao, pojačao i podržao proces osteogeneze.

### **1.6.1. Matične ćelije za regeneraciju koštanog tkiva**

Za tretman koštanih defekata mogu da se koriste embrionalne matične ćelije i adultne mezenhimske matične ćelije (Tuan i sar., 2003; Hoffman i Carpenter, 2005). Embrionalne matične ćelije (*Embryonic stem cells - ESCs*, eng.) su pluripotentne ćelije, koje se danas najčešće dobijaju iz viška embriona dobijenih metodom *in vitro* oplodnje (Slika 1.4.). Karakteriše ih veliki potencijal za proliferaciju i diferencijaciju u različite tipove ćelija uključujući i osteoprogenitorne ćelije (Hoffman i Carpenter, 2005). Međutim, zbog načina na koji se dobijaju nedostupne su mnogim istraživačima, a treba uzeti u obzir i etičke probleme i pitanja u vezi njihove upotrebe. Takođe, imunološka inkompatibilnost i česta pojava spontanih hromozomskih aberacija u ovim ćelijama predstavlja dodatni rizik za njihovu upotrebu u tkivnom inženjerstvu kosti (Amini i sar., 2012).

Adultne mezenhimske matične ćelije mogu da se usmere na diferencijaciju ka ćelijama osteoblastne linije i kao takve iskoriste za tretman koštanih defekata (Robey, 2011; Amini i sar., 2012). Adultne MSC su mezodermalnog porekla i prvi put su opisane 1961. godine kao ćelije koje nalikuju fibroblastima i imaju osteogena svojstva (Friedenstein, 1961). MSC mogu da se izoluju iz amnijske tečnosti, zubne pulpe,

periferne krvi, koštane srži, masnog tkiva i drugih tkiva odraslog organizma (Slika 1.4.) (Seong i sar., 2010). Karakteristika ovih ćelija jeste da dobro adheriraju na plastičnoj podlozi, brzo proliferišu, da imaju sposobnost diferencijacije ka nekim tipovima ćelija i da eksprimiraju karakteristične CD markere (*Cluster of differentiation - CD*, eng.) kao što su CD29, CD44, CD73, CD90 i druge (Mitchell i sar., 2006; Lopez i Daigle, 2013; Secunda i sar., 2015). Pored toga što adultne MSC mogu uspešno da se diferenciraju u ćelije osteoblastne linije, na mestu implantacije one mogu svojom parakrinom aktivnošću da stimulišu migraciju i diferencijaciju osteoprogenitornih ćelija samog domaćina (Amini i sar., 2012).



**Slika 1.4.** Matične ćelije za tretman koštanih defekata (Adaptirano iz Seong i sar., 2010).

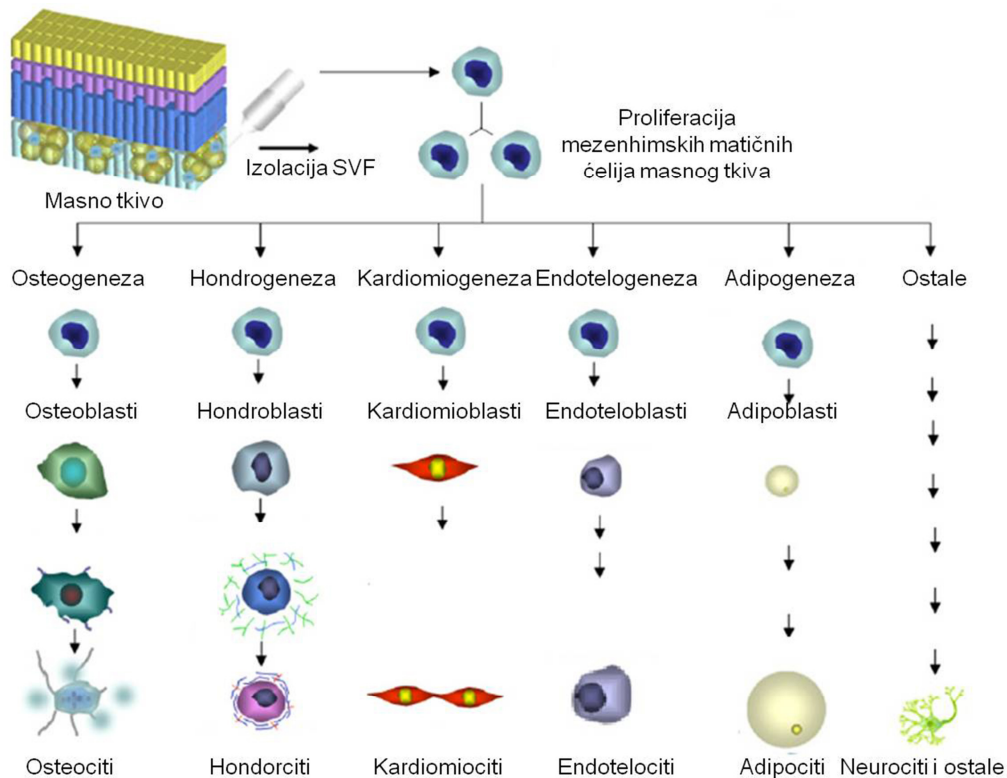
### 1.6.2. Mezenhimske matične ćelije belog masnog tkiva

Skraćenica MSC odnosi se na mezenhimske matične (stem) ćelije ili prema predlogu *The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*, reč *stem* koja se odnosi na ovaj tip ćelija se može zameniti sa *stromal* (Horwitz i sar., 2005). Po toj analogiji mezenhimske matične ćelije belog masnog tkiva (*Adipose-derived mesenchymal stem cells - ADSC*, eng.), mogu da se označe i kao mezenhimske stromalne ćelije belog masnog tkiva (*Adipose-derived mesenchymal stromal cells*, eng.) (Zanetti i sar., 2013). U ovoj disertaciji koristiće se termin mezenhimske matične ćelije belog masnog tkiva (ADSC), pošto je on zastupljeniji u literaturi.

ADSC se lako izoluju iz dostupnog potkožnog ili viscelarnog belog masnog tkiva (Amini i sar., 2012) i imaju sve karakteristike MSC. Prva ćelijska frakcija, koja se dobija u postupku izolacije iz masnog tkiva jeste stromalna vaskularna frakcija (*Stromal vascular fraction - SVF*, eng.). Sveže izolovana SVF iz masnog tkiva je heterogena populacija ćelija koja pored ADSC sadrži makrofage, limfocite, pericite, fibroblaste, endotelijalne ćelije, glatke mišićne ćelije i druge (Scherberich i sar., 2007; Schäffler i Büchler, 2007; Scherberich i sar., 2010; Bourin i sar., 2013). SVF sadrži oko 500 puta više klonogenih osteoprogenitornih ćelija po 1 ml tkivnog volumena od aspirata koštane srži, što daje ogromnu prednost u startu ovom izvoru mezenhimskih matičnih ćelija u odnosu na druge izvore (Scherberich i sar., 2007; Scherberich i sar., 2010). To pruža mogućnost da se autologne ADSC izoluju u dovoljnom broju iz organizma, u kome mogu biti aplikovane bez bojazni od imunske reakcije. Takođe, ADSC imaju prednost nad drugim izvorima MSC zahvaljujući osobini da se duže održavaju u *in vitro* uslovima (Barba i sar., 2013) i sposobnosti da brzo proliferišu (Cowan i sar., 2004). Zahvaljujući ovim karakteristikama, ADSC se jednostavnom *in vitro* kultivacijom mogu lako odvojiti iz heterogene SVF. Takođe, njihova prepoznatljiva vretenasta morfologija, koja podseća na fibroblaste, čini ih lako uočljivim u kulturi (Barba i sar., 2013; Bourin i sar., 2013). Pored ostalih, ekspresija CD29, CD44, CD73, CD90 (Sung i sar., 2008; Liu i sar., 2012; Secunda i sar., 2015) i odsustvo ekspresije CD14 markera (Planat-Benard i sar., 2004; Cai i sar., 2012) karakteristični su za ADSC. Pokazano je da ADSC imaju



potencijal da se diferenciraju u ćelije hrskavičavog, koštanog, mišićnog, srčanog tkiva, zatim u ćelije jetre, nervne i epitelne ćelije (Slika 1.5.) što ih čini veoma dobrim kandidatima za regenerativnu biologiju i medicinu baziranu na upotrebi matičnih ćelija (Fraser i sar., 2006; Gimble i sar., 2007; Mizuno i sar., 2012; Barba i sar., 2013; Bourin i sar., 2013).



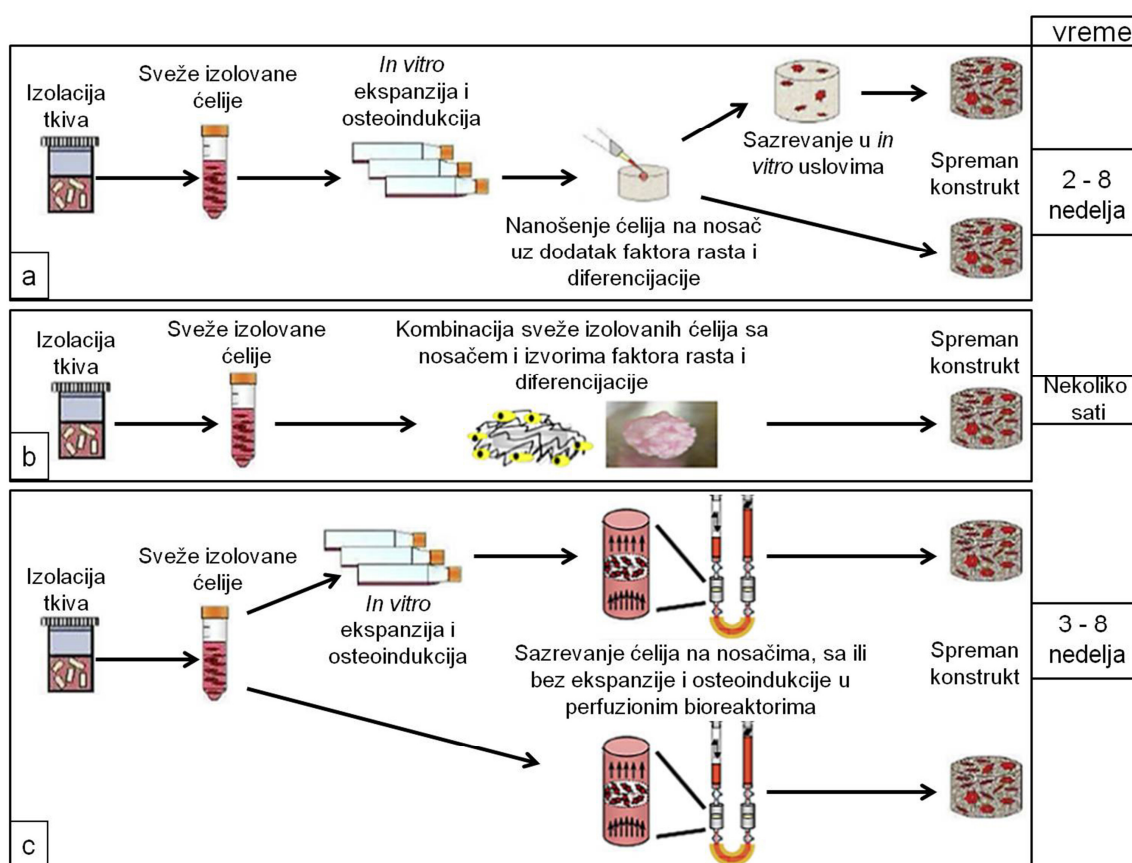
**Slika 1.5.** Mogući putevi diferencijacije ADSC (Adaptirano i modifikovano iz Seong i sar., 2010).

### 1.7. Različiti načini pripreme ADSC za tretman koštanih defekata

ADSC se mogu pripremiti na nekoliko različitih načina za tretman koštanih defekata. Ovde će biti opisana tri načina koji su najzastupljeniji u literaturi.

### 1.7.1. Priprema i primena *in vitro* umnoženih i osteoindukovanih ADSC

Pre primene za tretman koštanih defekata, ADSC se najčešće prethodno pripremaju tako što se umnožavaju *in vitro*, a zatim podvrgavaju *in vitro* osteogenoj indukciji što može da traje nekoliko nedelja. U ovom postupku ćelije se izdvajaju iz heterogene SVF i usmeravaju na diferencijaciju ka osteoprogenitornim ćelijama, pri čemu pokreću ekspresiju gena koji su specifični za ćelije osteoblastne linije (Bourin i sar., 2013). Ovako pripremljene ADSC se kombinuju sa koštanim zamenicima i faktorima rasta i diferencijacije neposredno pre konačne primene (Slika 1.6.a) ili se tako formirani konstrukt može inkubirati *in vitro* radi dodatnog sazrevanja (Huang i sar., 2002; Cowan i sar., 2004; Hattori i sar., 2006; Fraser i sar., 2006).



**Slika 1.6.** Različiti načini pripreme i primene ADSC za tretman koštanih defekata i vreme neophodno za njihovu realizaciju. **a** – priprema i primena *in vitro* umnoženih i osteoindukovanih ADSC; **b** – priprema i primena ADSC sadržanih u sveže izolovanoj SVF - intraoperativni pristup; **c** – priprema i primena konstruktata sa ADSC inkubiranih u bioreaktorima (Adaptirano i modifikovano iz Jakob i sar., 2012).

Takav način primene ADSC zahteva dodatni utrošak materijala za pripremu ćelija, pošto se odvija u nekoliko koraka (bar dva) i traje nekoliko nedelja od izolacije ćelija do konačne primene pripremljenih konstrukata. Pokazano je da *in vitro* osteoindukovane ADSC imaju kapacitet da potpomognu osteogeni proces, što čini ovakav način pripreme izuzetno dobrim za tretman koštanih defekata (Hicok i sar., 2004; Cowan i sar., 2004; Hattori i sar., 2006).

### 1.7.2. Priprema i primena sveže izolovanih ADSC - Intraoperativni pristup

Intraoperativni pristup je proizašao iz koncepta ćelijske i tkivne transplantacije. Zasniva se na primeni autolognih sveže izolovanih ADSC sadržanih u SVF-u, koje se odmah po izolaciji kombinuju sa faktorima rasta i diferencijacije, postavljaju na nosač od biomaterijala, pa se tako pripremljen konstrukt može odmah upotrebiti za tretman koštanog defekta (Jakob i sar., 2012; Coelho i sar., 2012). Pokazano je da ovako pripremljene i primenjene ADSC imaju obećavajući osteogeni kapacitet (Jeon i sar., 2008; Muller i sar., 2010). Intraoperativni pristup je prvobitno predložen od strane Aslan i saradnika; i Evans i saradnika za primenu mezenhimskih matičnih ćelija koštane srži (*Bone marrow stem cells* - BMSC, eng.) za tretman koštanih defekata (Aslan i sar., 2006; Evans i sar., 2007; Scherberich i sar., 2010), koji je kasnije primenjen i sa ADSC (Muller i sar., 2010). Procedura se može završiti u samo jednom koraku, u roku od nekoliko sati uz minimalnu invazivnost i intervenciju (Slika 1.6.b) (Scherberich i sar., 2010; Muller i sar., 2010; Mehrkens i sar., 2012). Tom prilikom preskaču se faze umnožavanja i diferencijacije ćelija u *in vitro* uslovima pri čemu se štede sredstva i vreme za njihovu pripremu. Preskakanje ovih koraka zasniva se na činjenici da se ADSC mogu dobiti u velikom broju prilikom izolacije (Scherberich i sar., 2007; Gimble i sar., 2007; Scherberich i sar., 2010), pa njihovo umnožavanje nije imperativ. Takođe, diferencijacija ADSC ka osteoprogenitornim ćelijama je moguća i u *in vivo* uslovima nakon njihove transplantacije pod stimulativnim uticajem faktora rasta i diferencijacije i osteoinduktivnih svojstava nosača sa kojima se tom prilikom kombinuju (Goto i sar., 2006; Liu i sar., 2008b; Jakob i sar., 2012). Već je pokazano da ovako primenjene ADSC podstiču osteogenezu na ortotopičnim (Vergroesen i sar., 2011) i ektopičnim

modelima (Muller i sar., 2010). Prednost ovog pristupa je velika, u smislu uštede vremena i materijala, a i jednostavnije se izvodi u odnosu na ostale pristupe.

### **1.7.3. Priprema i primena implantata sa ADSC u bioreaktorima**

Bioreaktori omogućavaju odvijanje bioloških procesa u precizno kontrolisanim mikrouslovima, pri čemu je moguće pratiti pH, temperaturu, pritisak, prisustvo neophodnih gasova (pre svega O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub>), odlaganje otpadnih materija kao i dostavu hranljivih materija (Martin i sar., 2004), čime se smanjuju varijacije i imitiraju uslovi koji vladaju u organizmu. Sve ovo omogućava automatizovanu i kontrolisanu proizvodnju 3D konstrukata od koštanih zamenika i osteoprogenitornih ćelija (Slika 1.5.c). Taj proces se obično zasniva na 3D perfuzionom sistemu, gde je "nasađenim" MSC na poroznim 3D nosačima omogućeno da se u dinamičnoj sredini umnožavaju i diferenciraju ka osteoprogenitornim ćelijama (Jakob i sar., 2012; Amini i sar., 2012; Declercq i sar., 2013). Zato se ovakvi sistemi označavaju kao dinamički da bi se razlikovali od statičkih uslova koji se najčešće koriste za pripremu ADSC (Barba i sar., 2013). Drugi način jeste da se ćelije prethodno umnože i diferenciraju u statičkim uslovima, a zatim da se postave na nosače i podvrgnu dodatnom sazrevanju u bioreaktorima (Slika 1.5.c). U svakom slučaju, priprema gotovog konstrukta se odvija u više koraka i traje 3-8 nedelja, što je jedna od mana ovog pristupa. Ekonomičnost nije karakteristika ovog načina pripreme konstrukta sa ADSC. Bioreaktori za potrebe tkivnog inženjerstva imaju visoku cenu, a sama procedura zahteva veći utrošak medijuma za kultivaciju ćelija i drugog materijala što umanjuje pristupačnost metode.

## **1.8. Markeri diferencijacije osteoprogenitornih ćelija i osteogenog procesa**

Osteoprogenitorne ćelije tokom diferencijacije do zrelih koštanih ćelija menjaju obrazac ekspresije specifičnih gena, koji se zato označavaju kao markeri osteoblastne ćelijske linije i osteogeneze. Markeri osteoblastne ćelijske linije, koji se najčešće analiziraju su: transkripcioni faktori Runx2 i osteriks, osteokalcin, alfa 1 lanac kolagena

tipa I, alkalna fosfataza i osteopontin (Ducy, 2000; Standal i sar., 2004; Long, 2012; Bourin i sar., 2013; Zanetti i sar., 2013). Osteoblasti se diferenciraju od multipotentnih mezenhimskih progenitora (Yin i Li, 2006), koji prolaze kroz stadijum preosteoblasta pre konačne diferencijacije u osteoblaste. Proces diferencijacije podrazumeva fino podešenu ekspresiju gena markera osteogeneze, koja je kontrolisana sa dva glavna transkripciona faktora - Runx2 (*Runx2* - *Runx2*, eng.) koji je takođe poznat kao Cbfa1 (*Core-binding factor A1* - *Cbfa1*, eng.) i osteriksa (*Osterix* - *Sp7*, eng.) (Stein i sar., 2004; Baek i sar., 2009).

Runx2 je neophodan za normalan razvoj skeleta, jer indukuje ekspresiju gena za osteoklacin, kolagen tipa I, osteopontin i drugih proteina neophodnih za razvoj kostiju, ali nije usko specifičan za osteoblaste (Lian i Stein, 2003; Kirkham i Cartmell, 2007). Tokom diferencijacije osteoprogenitora, prvo se preko Wnt/ $\beta$ -katenin (*Wingless-int/ $\beta$ -catenin*, eng.) i TGF- $\beta$ /BMP (*Transforming growth factor- $\beta$ /bone morphogenic protein*, eng.) signalnih puteva moduliše aktivnost ključnog transkripcionog faktora Runx2, koji indukuje ekspresiju osteogenog fenotipa tako što podstiče diferencijaciju preosteoblasta iz mezenhimskih progenitora, pritom inhibirajući diferencijaciju progenitora prema hondrocitima i adipocitima (Ducy i sar., 1997; Day i sar., 2005; Datta i sar., 2008). Sinergizam osteriksa i Runx2 u osteogenezi je dokazan više puta. Preosteoblasti pored Runx2 ekspimiraju i osteriks, ključni transkripcioni faktor u ovoj fazi diferencijacije, koji ih usmerava na diferencijaciju direktno prema osteoblastima i u potpunosti eliminiše put diferencijacije prema hondrocitima (Nakashima i sar., 2002; Komori, 2006; Datta i sar., 2008; Long, 2012).

### 1.8.1. Osteriks

Gen koji kodira transkripcioni faktor osteriks lociran je na hromozomu 15 kod miševa (Nakashima i sar., 2002). Osteriks je član *Sp* familije transkripcionih faktora i pored Runx2 je najvažniji faktor za diferencijaciju osteoblasta. Osteriks poseduje tri DNK vezujuća domena tipa C2H2 cinkanih prstiju (*Zinc finger domain*, eng.) na svom C terminusu i deluje nizvodno od Runx2 (Nakashima i sar., 2002; Nishio i sar., 2006). U *Sp7-null* miševima, gde se osteriks ne ekspimirira, Runx2 se normalno ekspimirira što

ukazuje na to da se *Sp7* nalazi nizvodno i da je pod uticajem *Runx2*, a ne i obrnuto (Nakashima i sar. 2002). *Runx2* počinje da se eksprimira mnogo ranije od *Sp7* još u nezrelim osteoprogenitorima, a zatim se nivo njegove ekspresije pojačava kroz razvojne stadijume prema zrelim koštanim ćelijama. Za razliku od njega, *Sp7* se eksprimira samo u preosteoblastima i zrelim osteoblastima (Huang i sar., 2007a). Tokom osteogenog procesa, osteriks indukuje prekursorne ćelije u kojima se eksprimira *Runx2*, da se diferenciraju u zrele i funkcionalne osteoblaste (Sinha i Zhou, 2013; Nakashima i sar., 2002; Nishio i sar., 2006; Zhou, 2010). U embrionima miševa, koji ne ekspimiraju *Sp7*, utvrđeno je da se hrskavičavo tkivo formira, ali potpuno odsustvuje koštano tkivo što znači da je osteriks neophodan za diferencijaciju osteoblasta i razvoj normalnog koštanog tkiva (Nakashima i sar., 2002; Huang i sar., 2004). To je takođe potvrđeno na modelu mišijih embrionalnih matičnih ćelija i na matičnim ćelijama koštane srži u *in vitro* uslovima, gde je ekspresija osteriksa bila neophodna da bi se indukovala osteogena diferencijacija (Kim i sar., 2006).

Postnatalno kod miševa, osteriks se pokazao kao neophodan za rast i normalnu homeostazu koštanog tkiva, dok inaktivacija osteriksa vodi ka nagomilavanju kalcifikovanog hrskavičavog tkiva i smanjenju gustine i veličine osteoklasta (Zhou i sar., 2010). Dokazano je da je neophodno prisustvo oba alela *Sp7* da bi došlo do normalnog razvoja skeleta kod miševa (Cheng i sar., 2013). U prilog ovoj činjenici, pokazano je da mutacije u *Sp7* mogu dovesti do bolesti koštanog tkiva *osteogenesis imperfecta* (Lapunzina i sar., 2010). Takođe, osteriks igra važnu ulogu u kasnijoj fazi enhondralnog okoštavanja (Nishimura i sar., 2012) i u formiranju zuba (Cao i sar., 2012). Do sada, osteriks je označen kao jedini ključni transkripcioni faktor osteoblasta, koji kontroliše njihovu proliferaciju i diferencijaciju (Zhang, 2010) i spada u grupu retkih markera specifičnih za koštano tkivo (Kirkham i Cartmell, 2007).

Ekspresiju *Sp7* može da indukuje BMP-2 (*Bone morphogenic protein 2*, eng.) neposredno preko *Dlx5* (*Distal-less homeobox protein 5*, eng.) (Lee i sar. 2003) i *Msx2* (*Muscle segment homeobox 2*, eng.) (Matsubara i sar. 2008) u ćelijama u kojima se *Runx2* ne eksprimira (*Runx2-null*, eng.). Ova činjenica ukazuje na to da postoji i *Runx2*-nezavisna indukcija ekspresije *Sp7*, ali svakako oba indukciona puta su

neophodna za normalnu osteogenezu. Pored toga, pronađeno je da nivo ekspresije *Sp7* opada pod uticajem p53 tumor supresora (Wang i sar., 2006).

Interesantno je da osteriks inhibira WNT/ $\beta$ -katenin signalni put, koji predstavlja jedan od signalnih puteva u proliferaciji i diferencijaciji osteoblasta. Ova specifična uloga osteriksa ogleda se u mehanizmu povratne sprege i ima smisao u složenom i fino kontrolisanom procesu osteogeneze (Zhang i sar. 2008). U prilog ovome idu rezultati druge studije koji su pokazali da u kasnim stadijumima diferencijacije osteoblasta osteriks inhibira njihovu diferencijaciju (Yoshida i sar., 2012).

S druge strane, u zrelim osteoblastima, osteriks zajedno sa Runx2 reguliše ekspresiju alkalne fosfataze (*Alkaline phosphatase - Alp*, eng.) i alfa 1 lanca kolagena tipa I (*Collagen type I alpha 1 chain - Colla1*, eng.) (Varanasi i Datta, 2005) gena koji su markeri osteogeneze. Vezivanjem NFAT (*Nuclear factor of activated T cells*, eng.) za osteriks formira se kompleks koji aktivira promotor *Colla1* gena (Koga i sar., 2005). Na sličan način, vezivanjem u promotornom regionu gena za alkalnu fosfatazu, osteokalcin i osteopontin, osteriks može takođe dovesti do aktivacije njihove ekspresije (Milat i Ng, 2009; Zanetti i sar., 2013). Uprkos svim poznatim činjenicama o osteriksu, njegova uloga je još uvek nedovoljno istražena. Prema Sinha i Zhou, još uvek traje dilema da li je osteriks "rob" transkripcionog faktora Runx2 ili "gospodar" osteogeneze (Sinha i Zhou, 2013).

### 1.8.2. Osteokalcin

Osteokalcin (*Bone gamma-carboxyglutamic acid protein - Bglap*, eng.) je posle kolagena jedan od najzastupljenijih proteina u koštanom tkivu (Lian i sar., 1989; Lian i Stein, 2003). Gen za osteokalcin kod miša je lociran na hromozomu 3 (Desbois i sar., 1994). Osteokalcin se najjače eksprimira u kasnijim fazama diferencijacije osteoprogenitronih ćelija, u fazi osteoblasta i osteocitima i samim tim predstavlja visoko specifičan marker osteogenog procesa (Lian i sar., 1989; Wang i sar., 2004; Huang i sar., 2007b; Valenti i sar., 2008; Lee i sar., 2013).

Bazalnu ekspresiju osteokalcina omogućavaju visoko konzervirane sekvence tzv. osteokalcin kutije I i II (*OC box I and II*, eng.) kao i TATA sekvenca i 24-nukleotidna sekvenca sa CCAAT motivom (Stein i sar., 1997). Ekspresiju gena za osteokalcin pokreće robustni mehanizam, koji se ogleda u sinergizmu Runx transkripcionih faktora i CCAAT/pojačivač-vezujućeg proteina (*CCAAT/enhancer-binding proteins* (C/EBP), eng.) (Gutierrez i sar., 2002). Pronađeno je da Msx2 suprimira ekspresiju gena za osteokalcin u fazi proliferacije osteoblasta, dok Dlx3, Dlx5 i Runx2 iniciraju transkripciju ovog gena nakon faze proliferacije osteoblasta (Hassan i sar., 2004). Transkripciju osteokalcina stimuliše vitamin D a li on ne inicira transkripciju (Stein i sar., 1997). Ekspresija osteokalcina u koštanom tkivu poklapa se sa početkom mineralizacije, raste sa intenziviranjem mineralizacije, a zatim se smanjuje kako se diferencijacija osteoblasta završava, sa formiranjem zrelog koštanog tkiva (Owen i sar., 1990; White i sar., 1998). Postoje podaci o tome da osteokalcin učestvuje i u regrutaciji ćelija, koje resorbuju koštano tkivo (Liggett i sar., 1994) i na taj način donekle reguliše procese izgradnje i razgradnje koštanog tkiva (White i sar., 1998). Modulišući aktivnost osteoklasta i osteoblasta, osteokalcin može da reguliše mineralizaciju koštanog tkiva. U koštanom matriksu mlade kosti, osteokalcin vezuje kalcijumove jone i na taj način učestvuje u njenoj mineralizaciji (Neve i sar., 2013).

### **1.8.3. Alfa 1 lanac kolagena tipa I**

Kolageni čine familiju od 28 različitih složenih tipova lanaca, koji formiraju vezivno tkivo (Myllyharju i Kivirikko, 2001). Kolagen tipa I je važna komponenta vanćelijskog matriksa koštanog tkiva i ima ulogu u adheziji, proliferaciji i diferencijaciji ćelija osteoplastnog fenotipa, ali se takođe može naći u različitim tkivima, pa se zato ne može smatrati usko specifičnim za koštano tkivo (Kirkham i Cartmell, 2007). Uprkos tome, kolagen tipa I predstavlja važnu komponentu organskog dela koštanog matriksa, čija se ekspresija pokreće još u ranim stadijumima osteogeneze (Wang i sar., 2004; Kirkham i Cartmell, 2007; Valenti i sar., 2008; Lee i sar., 2013).

Kolagen tipa I čine dva alfa 1 lanca i jedan alfa 2 lanac (Van der Rest i Garrone, 1991). Alfa 1 lanac kolagena tipa I kodiran je *Colla1* genom koji se kod miševa nalazi



na hromozomu 11 (Maity i sar., 1988; Karsenty i Crombrugghe, 1990; Nehls i sar., 1991). Za njega je karakteristično da se eksprimira najjače od stadijuma osteoprogenitora do stadijuma zrelih osteoblasta približno istim intenzitetom (Huang i sar., 2007a). To je jedini protein koji je u koštanom tkivu zastupljeniji čak i od osteokalcina (Lian i Stein, 2003) i predstavlja osnovu za depoziciju minerala i samim tim je neophodan za normalan razvoj kostiju (Bonadio i sar., 1990; White i sar., 1998).

Ekspresija *Coll1a1* je veoma redukovana kod miševa gde se osteriks ne eksprimira, dok se drugi markeri, kao što su osteokalcin, osteonektin i koštani sijaloprotein ne ekspimiraju. S druge strane pojačana ekspresija osteriksa indukuje ekspresiju *Bglap* i *Coll1a1* (Nakashima i sar., 2002; Zhang, 2010). Ovo ukazuje na to da osteriks delimično kontroliše *Coll1a1*, a da uglavnom kontroliše ekspresiju osteokalcina, osteonektina i koštanog sijaloproteina. *Coll1a1* može biti aktiviran i od strane Runx2 nezavisno od osteriksa (Ducy i sar., 1997). Takođe, dokazano je i da ekspresija *Coll1a1* može biti suprimirana od strane Msx2 i aktivirana od strane Dlx5 (Dodig i sar., 1999; Tadic i sar., 2002).

#### 1.8.4. Alkalna fosfataza

Alkalna fosfataza (*Alkaline phosphatase - Alp*, eng.), poznata i kao ortofosforni-monoestar (EC 3.1.3.1.) fosfohidrolaza je metaloenzim koji funkcioniše u baznim uslovima, pH 8-10 (Orimo, 2010) i sreće se u nekoliko formi (Golub i Boesze-Battaglia, 2007). Kod ljudi postoje najmanje četiri forme alkalne fosfataze, a na osnovu toga u kojim se tkivima uglavnom ekspimiraju okarakterisane su kao placentalna, intestinalna, alkalna fosfataza iz jetre/kostiju/bubrega i iz polnih ćelija (Sligbrand, 1984; Sharma i sar., 2014). Kod miševa takođe postoje najmanje četiri forme ovog gena. Gen za tkivno nespecifičnu formu alkalne fosfataze, koja se osim u koštanom tkivu može naći i u tkivu jetre i bubrega (*Alkaline phosphatase liver/bone/kidney - Alpl*, eng.) nalazi se na četvrtom hromozomu kod miša (Wilcox i Taylor, 1981).

Jedna od uloga alkalne fosfataze jeste u mineralizaciji matriksa koštanog tkiva (Mulnard i Huygens, 1978; Wuthier i Register, 1985). Osteoblasti je ekspimiraju na

membrani u vidu vezikula (Orimo, 2010) i uz pomoć nje hidrolizuju neorganski pirofosfat (PPi) u matriksu, pri čemu nastaje Pi, koji je neophodan za formiranje hidroksiapatita (Anderson, 1995) - glavne neorganske (mineralne) komponente kostiju. Nedostatak alkalne fosfataze kod miševa prouzrokuje hipomineralizaciju kostiju (Narisawa i sar., 1997), a osteoblasti se u ovakvim uslovima normalno diferenciraju, ali nemaju sposobnost da otpočnu mineralizaciju koštanog matriksa (Wennberg i sar., 2000; Orimo, 2010).

Nezrele osteoprogenitorne ćelije ne ekspimiraju alkalnu fosfatazu, dok se ona može detektovati u zrelih osteoprogenitornih ćelijama, a preosteoblasti i osteoblasti je ekspimiraju najviše, dok ih zreli osteociti ne ekspimiraju (Huang i sar., 2007a). To znači da se u koštanom tkivu alkalna fosfataza ekspimirira ranije prilikom formiranja koštanog tkiva, dok se u kasnijim stadijumima maturacije slabije ekspimirira (Golub i Boesze-Battaglia, 2007). Ekspresiju alkalne fosfataze reguliše BMP/Runx2, osteriks i Wnt signalna kaskada (Gaur i sar., 2005). Pored svega navedenog, alkalna fosfataza se ipak ne može smatrati specifičnim enzimom za koštano tkivo jer se može ekspimirati i u drugim tkivima (Kirkham i Cartmell, 2007).

### 1.8.5. Osteopontin

U genomu miša, gen za osteopontin (*Secreted phosphoprotein 1 - Spp1*, eng.) je lociran na hromozomu 5 (Toma i sar., 1997; You i sar., 2001). Osteopontin je glikofosfoprotein, koji je prisutan u krvnoj plazmi, bubrezima, zubima pa čak i u mleku pored toga što se sreće u koštanom tkivu. Zbog toga se ne može smatrati usko specifičnim za koštano tkivo, ali uprkos tome igra veoma važnu ulogu u kostima omogućavajući adheziju, migraciju i preživljavanje ćelija (Standal i sar., 2004; Kirkham i Cartmell, 2007).

Uloga osteopontina u remodelovanju koštanog tkiva ogleda se u podsticanju diferencijacije osteoklasta, čime se pojačava njihova aktivnost i u inhibiciji mineralizacije, tako što se vezuje za kristale hidroksiapatita koštanog matriksa i time sprečava njihov rast (Standal i sar., 2004; Pampena i sar., 2004). U osteoblastima

ekspresija gena za osteopontin je suprimirana na mestima gde se formira koštano tkivo, a stimulirana je u osteoklastima na mestima remodelovanja kostiju (Gluhak-Heinrich, 2000). Kod miševa, osteopontin nije neophodan za razvoj osteoklasta, ali je neophodan za normalnu osteoklastogenezu kao i za normalno funkcionisanje osteoklasta (Rittling i sar., 1998). Osteoblasti i osteoklasti sekretuju osteopontin (Yamate i sar., 1997), tako da se ovaj protein taloži prvenstveno na mestima gde ove ćelije dolaze u kontakt sa površinom koštanog tkiva (Mckee i Nanci, 1996).

## 2. PREDMET I CILJ ISTRAŽIVANJA

Trenutni trend u tretmanu koštanih defekata i tkivnom inženjerstvu kosti zasnovan je na upotrebi ADSC zbog karakteristika koje im daju prednost u odnosu na druge izvore adultnih mezenhimskih matičnih ćelija. Dva aktualna pristupa podrazumevaju upotrebu sveže izolovanih ADSC ili *in vitro* osteoindukovanih ADSC. Iako primena sveže izolovanih ADSC pokazuje niz tehničkih prednosti, ostalo je otvoreno pitanje da li i u kojoj se meri osteogeni potencijal ADSC razlikuje u odnosu na to kako se ćelije pripremaju i primenjuju. Prema našim saznanjima, u dostupnoj literaturi nema podataka koji se odnose na ovo pitanje. Ova disertacija se bavi uporednom analizom ektopičnog osteogenog potencijala sveže izolovanih ADSC i *in vitro* umnoženih i osteoindukovanih ADSC u kombinaciji sa granulama deproteinizovanog mineralnog koštanog matriksa i PRP-em kao izvorom bioloških faktora na modelu subkutane implantacije kod Balb/c miševa. Takva studija će dati podatak koji će biti od koristi prilikom donošenja odluke kom pristupu treba dati prednost u primeni u tretmanu koštanih defekata i tkivnom inženjerstvu kosti.

Ciljevi istraživanja su podeljeni na *in vitro* i *in vivo* fazu tako da se svaka ostvaruje kroz nekoliko koraka.

U *in vitro* fazi istraživanja vrši se:

- Dobijanje ADSC koje uključuje:
  - izolaciju i karakterizaciju ADSC sadržanih u sveže izolovanoj SVF;
  - *in vitro* umnožavanje izolovanih ADSC pri čemu se ujedno vrši njihova separacija od ostalih ćelija heterogene SVF koja predstavlja startnu ćelijsku populaciju i
  - karakterizaciju *in vitro* umnoženih ADSC.

- Diferencijacija ADSC u osteoprogenitorne ćelije osteogenom indukcijom koja uključuje:
  - *in vitro* indukciju diferencijacije ADSC ka osteoprogenitornim ćelijama i
  - procenu stepena diferencijacije ADSC analizom relativne ekspresije *Sp7*, *Bglap*, *Colla1* i *Alpl*, imunoekspresije osteopontina i detektovanjem fosfatnih depozita.

U *in vivo* fazi istraživanja vrši se:

- Analiza ektopičnog osteogenog potencijala sveže izolovanih i *in vitro* umnoženih i osteoindukovanih ADSC u kombinaciji sa mineralnim koštanim matriksom i PRP-em što uključuje:
  - subkutanu implantaciju implantata sačinjenih od sveže izolovanih ADSC sadržanih u SVF ili *in vitro* umnoženih i osteoindukovanih ADSC sa PRP-em na nosačima od mineralnog koštanog matriksa, sa kontrolama koje čine implantati bez ćelija i
  - ekstrakciju implantata posle prve, druge, četvrte i osme nedelje od implantacije i analizu osteogenog procesa u implantatima na osnovu relativne ekspresije *Sp7*, *Bglap*, *Colla1* i *Alpl*, kao i histomorfoloških, histomorfometrijskih i imunohistohemijskih analiza.

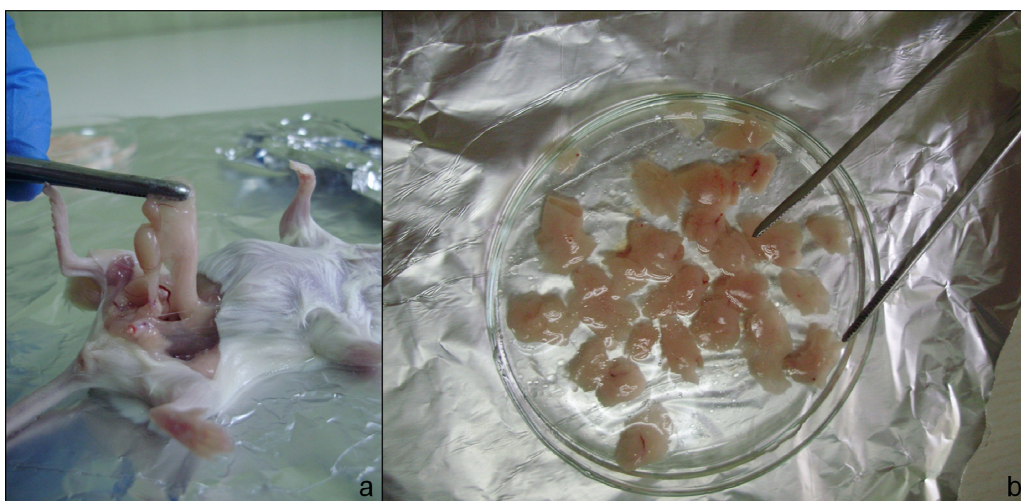
### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Materijal i metode *in vitro* istraživanja

U ovom delu, opisane su metode za dobijanje ADSC, metode za formiranje ćelijske kulture i karakterizaciju izolovanih ADSC. Nakon toga predstavljene su metode za indukciju diferencijacije ADSC ka osteoprogenitornim ćelijama i metode za procenu stepena osteogene diferencijacije ADSC.

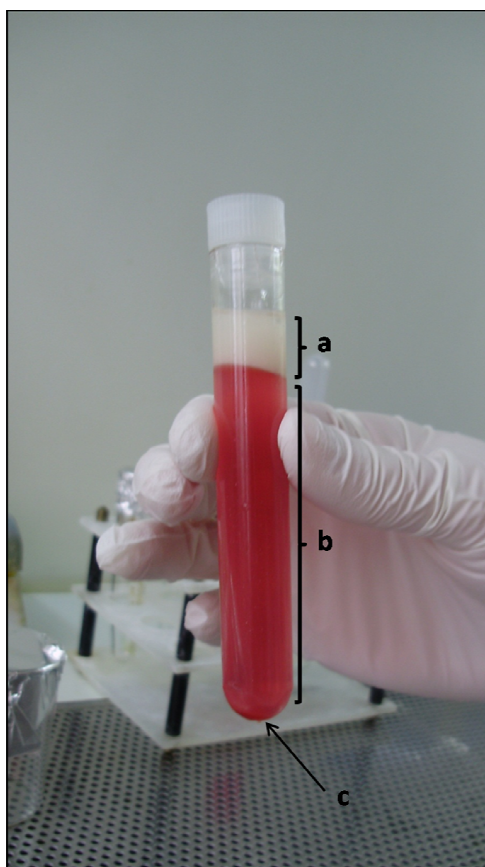
##### 3.1.1. Izolacija SVF

Supraepididimalno belo masno tkivo mužjaka singenih Balb/c miševa starih dva meseca (za detalje o životinjama korišćenim u ovom delu eksperimenta videti "3.2.1. Eksperimentalne životinje"), korišćeno je kao izvor mezenhimskih matičnih ćelija belog masnog tkiva (ADSC) (Sung i sar., 2008). U sterilnim uslovima, supraepididimalno belo masno tkivo je sakupljeno iz većeg broja jedinki, oprano sterilnim fiziološkim rastvorom (Slika 3.1.), a zatim je sterilnim makazama macerirano.



**Slika 3.1.** Izolacija supraepididimalnog belog masnog tkiva. **a** - supraepididimalno belo masno tkivo *in situ*; **b** - izolovani komadi supraepididimalnog masnog tkiva u sterilnom fiziološkom rastvoru.

Nakon toga, masno tkivo je podvrgnuto digestiji kolagenazom tipa 1 (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka*) čiji je liofilizat neposredno pre upotrebe rastvoren u DMEM-u (*Dulbecco's Modified Eagles Minimal Essential Medium, PAA Laboratories GmbH, Austrija*), medijumu za ćelijsku kulturu, u koncentraciji od 2000 I.U. po mililitru. Nakon dodavanja enzima, tkivo je inkubirano 45 minuta u vodenom kupatilu na 37°C uz povremenu agitaciju. Nakon toga, digestija je zaustavljena dodavanjem kompletnog medijuma DMEM (videti sastav u "3.1.2. Formiranje kulture ADSC") jer rad enzima inhibiraju komponente seruma koji je dodat DMEM-u. Dobijeni tkivni homogenat je filtriran kroz sterilnu mrežicu veličine pora 180 μm i zatim centrifugiran 10 minuta na 300 × g. Nakon centrifugiranja prsten od lipida sa površine je pažljivo odstranjen kao i srednji deo supernatanta što je rezultiralo ostatkom taloga (Slika 3.2.) koji predstavlja heterogenu stromalnu vaskularnu frakciju - SVF.



**Slika 3.2.** Izolacija stromalne vaskularne frakcije (SVF). **a** - lipidni prsten, **b** - srednji deo supernatanta, **c** - talog SVF.

Talog SVF je resuspendovan u manjoj zapremini medijuma nakon čega su ćelije obojene bojom *Trypan blue* i prebrojane manuelno korišćenjem hemocitometarske komore po *Malassez-u* (*Malassez counting chamber, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Konigshofen, Nemačka*). Ovako dobijena sveže izolovana SVF korišćena je za formiranje jedne eksperimentalne grupe implantata za *in vivo* eksperiment (videti "3.2.4. Priprema implantata"). Takođe, sveže izolovana SVF je korišćena za formiranje kulture ADSC. Odmah nakon izolacije, ADSC koje su sadržane u svežoj SVF su okarakterisane imunocitohemijskom metodom za detekciju CD29 i CD14 markera (videti "3.1.3. Karakterizacija ADSC sadržanih u sveže izolovanoj SVF i u uspostavljenoj ćelijskoj kulturi").

### **3.1.2. Formiranje kulture ADSC**

Sveže izolovana SVF je zasejana u polistirenskom flasku u gustini od  $1 \times 10^6$  ćelija na površini od 25 cm<sup>2</sup>. Zasejane ćelije su gajene u kompletnom medijumu koga čini DMEM sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma (*Fetal Calf Serum FCS, PAA Laboratories, Austrija*), 1% rastvora antibiotika i antimikotika (*PAA Laboratories, Austrija*) i 2 mM L-glutamina (*PAA Laboratories, Austrija*). Ćelije su kultivisane pod standardnim uslovima na temperaturi od 37°C i prisustvu 5% CO<sub>2</sub>. Svaka dva do tri dana, kada bi postigle konfluentnost od 80%, ćelije su pasažirane uz pomoć rastvora tripsin/EDTA (*PAA Laboratories, Austrija*) kojim su ćelije tretirane da bi se odvojile od dna posude u kojoj su gajene.

### **3.1.3. Karakterizacija ADSC sadržanih u sveže izolovanoj SVF i u uspostavljenoj ćelijskoj kulturi**

Karakterizacija ADSC sadržanih u sveže izolovanoj SVF izvedena je imunocitohemijskom metodom, nakon što je ćelijama omogućeno da adheriraju za mikroskopsku pločicu pod standardnim *in vitro* uslovima u roku od jednog dana.



Takođe, karakterizacija ADSC u uspostavljenoj kulturi posle trećeg pasaža od zasejavanja SVF, izvedena je imunocitohemijskom metodom.

Ćelije su najpre fiksirane u 10% formalinu tokom 20 minuta nakon čega je izvršena blokada endogene peroksidaze pomoću 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u PBS-u (*Phosphate buffered saline*, eng.) u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim su ćelije tretirane *protein block*-om u trajanju od 5 minuta na sobnoj temperaturi da bi se izbeglo nespecifično bojenje pozadine. Nakon toga, ćelije su preko noći na 4°C tretirane primarnim antitelom, anti-CD29 (ab52971, Abcam, SAD) u razblaženju od 1:400, markerom karakterističnim za ADSC (Sung i sar., 2008; Liu i sar., 2012) i sa anti-CD14 (ab106285, Abcam, USA) u razblaženju od 1:1000, markerom koji nije karakterističan za ovaj tip ćelija već je karakterističan za ćelije monocitno/makrofagne linije (Planat-Benard i sar., 2004; Cai i sar., 2012) čime se potvrđuje da su izolovane ćelije poreklom iz masnog tkiva. Za kontrolu bojenja pozadine korišćene su ćelije iz istih grupa, koje su tretirane na isti način, samo je izostavljeno dodavanje primarnog antitela. Kao kit za detekciju korišćen je *Rabbit specific HRP/DAB (Horse radish peroxidase/diaminobenzidine*, eng.) (ab64261, Abcam, USA) prema uputstvima proizvođača. Ukratko, ćelije su inkubirane sa *Biotinylated goat anti-rabbit IgG*, a zatim i sa *Streptavidin* peroksidazom i *DAB* hromogenom pomešanim sa *DAB* supstratom (20 µl *DAB* hromogena na 1 ml *DAB* supstrata). Sve inkubacije su trajale po 10 minuta i izvedene su na sobnoj temperaturi. Na kraju je kontrastiranje ćelija izvršeno aplikacijom hematoksilina u trajanju od 1 minuta, nakon čega je preparat prekriven medijumom za izradu trajnih preparata (*H-5000, VectaMount Permanent Mounting Medium*, UK).

### 3.1.4. Indukcija ADSC ka osteoprogenitornim ćelijama

ADSC koje su nakon trećeg pasaža pokazale karakterističan fenotip i izdvojile se iz heterogene primarne ćelijske kulture, dobijene zasejavanjem sveže izolovane SVF, podvrgnute su *in vitro* osteogenoj indukciji u osteoinduktivnom medijumu. Prema literaturnim podacima, medijum za osteogenu indukciju ADSC ka osteoprogenitornim ćelijama sadržao je 50 µg/mL askorbinske kiseline, 10<sup>-8</sup> M deksazona i 10 mM β-glicerofosfata u DMEM-u sa dodatkom FCS, antibiotičko-antifungalnog rastvora i L-

glutamina (Hayashi i sar., 2008; Phinney, 2008). Čelije su zasejane u gustini od  $1 \times 10^4$  po bunarčiću, na pločama koje su sadržale po 24 bunarčića, i gajene su dvadeset jedan dan u osteoinduktivnom medijumu. Tokom osteogene indukcije, analiziran je izgled ćelijske kulture tako da su ćelije snimljene trećeg, sedmog, desetog, dvanaestog, petnaestog i dvadeset prvog dana uz pomoć invertnog svetlosnog mikroskopa pod faznim kontrastom (*Observer Z1, Carl Zeiss, Nemačka*), u odgovarajućem softveru (*Axiovision, Carl Zeiss, Nemačka*).

#### **3.1.4.1. Metode za procenu stepena osteogene diferencijacije ADSC**

Kod *in vitro* osteoindukovanih ADSC analiziran je nivo ekspresije markera osteogene diferencijacije. To je urađeno metodom analize ekspresije gena markera osteogeneze, analizom imunoekspresije osteopontina i metodom za vizuelizaciju depozita fosfata.

##### **Postupak analize relativne ekspresije gena markera osteogeneze kod osteoindukovanih ADSC**

Metoda analize ekspresije gena markera osteogeneze je pouzdana za procenu stepena diferencijacije ADSC tokom *in vitro* osteogene indukcije. Nakon tri, sedam, deset, dvanaest, petnaest i dvadeset jednog dana, osteoinduktivni medijum je odstranjen iz bunarčića i ćelijama je dodato po 300  $\mu$ l pufera za stabilizaciju i očuvanje RNK, *RNAlater*<sup>®</sup> (*RNA Stabilization Solution, Ambion, Life Technologies, SAD*). Čelije su čuvane ovom puferu na temperaturi od  $-80^{\circ}\text{C}$  do kvantitativne PCR analize u realnom vremenu (*Quantitative real-time polymerase chain reaction - qRT-PCR, eng.*). Ovom metodom analizirana je dinamika relativne ekspresije gena markera osteoblastne aktivnosti i osteogeneze: transkripcionog faktora osteriks (*Osterix - Sp7, eng.*), osteokalcina (*Bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein - Bglap, eng.*), alkalne fosfataze (*Alkaline phosphatase - Alp, eng.*), tačnije forme koja se ekspirira u tkivu jetre, koštanom i bubrežnom tkivu (*Alkaline phosphatase liver/bone/kidney - Alpl, eng.*) i alfa 1 lanca kolagena tipa I (*Collagen type I  $\alpha$ 1 chain - Colla1, eng.*). Metoda

izolacije celokupne RNK iz ćelija, reverzne transkripcije RNK u cDNK i metoda analize relativne ekspresije gena markera osteogeneze opisana je kasnije u "3.2.7.1. Postupak analize relativne ekspresije gena markera osteogeneze u implantatima".

### **Postupak imunocitohemijske analize ekspresije osteopontina**

Imunocitohemijska metoda za detekciju osteopontina, primenjena je na ADSC koje su *in vitro* osteogeno indukovane petnaest dana. Ćelije su tretirane prema protokolu koji je opisan u "3.1.3. Karakterizacija ADSC sadržanih u sveže izolovanoj SVF i u uspostavljenj ćelijskoj kulturi", a kao primarno antitelo, upotrebljen je anti-osteopontin (ab8448, *Abcam*, SAD) u razblaženju 1:200.

### **Metoda citohemijske analize**

Citohemijska analiza metodom *von Kossa*, primenjena je za vizuelizaciju fosfatnih depozita na ćelijama koje su bile podvrgnute osteogenoj indukciji petnaest dana. Ukratko, ćelije su isprane tri puta PBS-om i fiksirane 10% neutralnim formalinom u trajanju od 30 minuta. Zatim su ćelije isprane dva puta sa dH<sub>2</sub>O, a potom pokrivene 2% rastvorom srebrnog nitrata i držane u mraku. Posle 10 minuta ćelije su tri puta isprane sa dH<sub>2</sub>O i zatim pokrivene vodom i pri tom izložene intenzivnoj svetlosti petnaest minuta. Ispod posude za bojenje stavljena je bela podloga da bi se poboljšala refleksija primenjene svetlosti. Kulture su potom analizirane pod svetlosnim mikroskopom. Mineralni depoziti fosfata se boje crno (McGee-Russell, 1958; Morais i sar., 1999).

## **3.2. Materijal i metode *in vivo* istraživanja**

U ovom delu, opisani su materijali i metode koji su bili neophodni za pripremu, implantaciju i ekstrakciju implantata. Nakon toga, predstavljene su metode korišćene za analizu stepena osteogenog procesa u ekstrahovanim implantatima.

### 3.2.1. Eksperimentalne životinje

U ovoj studiji korišćeni su miševi singenog soja Balb/c, muškog pola, težine 23-26 g i starosti dva meseca. Životinje potiču iz vivarijuma Vojnomedicinske akademije iz Beograda. Do eksperimenta i u toku eksperimenta, miševi su gajeni u vivarijumu Medicinskog fakulteta u Nišu pod optimalnim laboratorijskim uslovima, što je podrazumevalo fotoperiod od 12 časova svetla i 12 časova mraka i temperaturu od  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Životinjama je omogućeno da se hrane i poje *ad libitum*. Sve eksperimentalne procedure na životinjama izvedene su u skladu sa aktuelnim Zakonom o dobrobiti životinja ("Sl. glasnik RD, br. 41/2009"). U skladu sa Zakonom, Etički komitet Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu odobrio je sve eksperimentalne procedure nad životinjama u ovom eksperimentu, broj odluke 01-5518-7 (rešenje je dostavljeno prilikom prijave teze).

### 3.2.2. Koštani zamenik

U ovoj studiji korišćen je komercijalni koštani zamenik Bio-Oss<sup>®</sup> (*Geistlich-Pharma, Wolhusen, Švajcarska*) koga čine granule deproteinizovanog mineralnog koštanog matriksa trabekularne goveđe kosti, veličine 0,25 - 1 mm ("S" veličina) (Slika 3.3.).

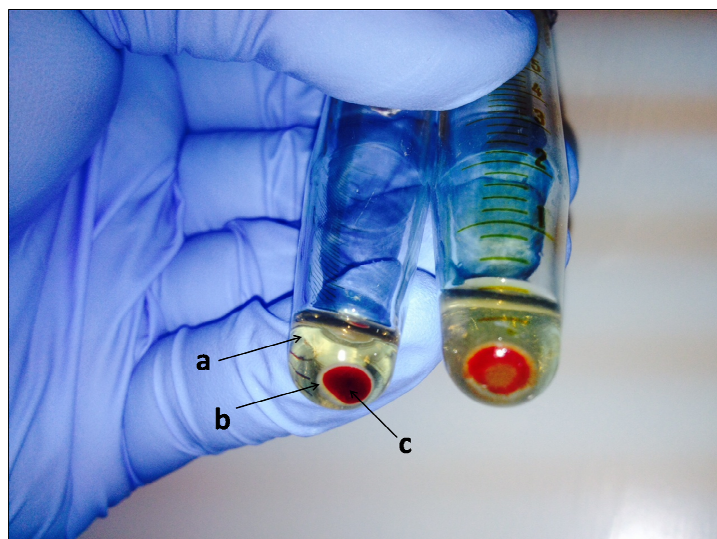


Slika 3.3. Koštani zamenik Bio-Oss<sup>®</sup> (Adaptirano sa <http://www.geistlich.com.br/>).

### 3.2.3. Priprema plazme obogaćene trombocitima

U ovoj studiji, plazma obogaćena trombocitima (PRP) je pripremana iz pune krvi miševa u dva koraka na način koji je ranije opisan (Intini i sar., 2007). Krv je sakupljena iz retro-orbitalnog pleksusa iz više jedinki, prema ranije opisanoj metodi (Hoff, 2000). Epruvete u kojima je sakupljena krv sadržale su 4% natrijum-citrat kao antikoagulans. U prvom koraku centrifugiranja u roku od 10 minuta na  $134 \times g$  na sobnoj temperaturi, trombociti i plazma su odvojeni od ostalih komponenti krvi u supernatantu.

U drugom koraku, frakcija plazme sa trombocitima (supernatant iz prvog koraka) je centrifugirana 10 minuta na  $840 \times g$  na sobnoj temperaturi. Talog trombocita koji je dobijen nakon ovog koraka (Slika 3.4.), rastvoren je u manjoj zapremini plazme tako da je konačna koncentracija trombocita u pripremljenom preparatu bila 2-6 puta veća od fiziološke vrednosti trombocita kod miševa (Longmore i sar., 1993). Broj trombocita od  $1,48 \pm 0,3 \times 10^6$  po mikrolitru PRP-a je utvrđen manuelnim brojanjem korišćenjem hemocitometarske komore po *Malassez*-u.



**Slika 3.4.** Priprema PRP-a. **a** - plazma; **b** - beličast prsten od trombocita; **c** - eritrociti.

### 3.2.4. Priprema implantata

U ovom eksperimentu, neposredno pre implantacije, pripremljene su četiri različite grupe implantata, dve grupe koje su sadržale ćelije i dve kontrolne grupe koje su bile bez ćelija. Prvu grupu su činili implantati sa sveže izolovanim ADSC sadržanim u SVF-u, PRP kao izvor regulatornih signala i granule deproteinizovanog mineralnog koštanog matriksa (*Bone mineral matrix - BMM*, eng.) koje su korišćene kao nosač ćelija - grupa SPN (Tabela 3.1.).

**Tabela 3.1.** Eksperimentalne grupe implantata.

Skraćeni naziv grupe	Sadržaj implantata
<b>SPN</b>	<u>S</u> veže izolovane ADSC sadržane u SVF-u + <u>P</u> RP + <u>N</u> osač
<b>OPN</b>	<u>O</u> steoindukovane ADSC + <u>P</u> RP + <u>N</u> osač
<b>PN</b>	<u>P</u> RP + <u>N</u> osač
<b>N</b>	<u>N</u> osač

Sveže ADSC sadržane u SVF-u izolovane su na način koji je opisan u "3.1.1. Izolacija SVF" neposredno pre pripreme implantata. Za pripremu ovih implantata upotrebljeno je  $5 \times 10^5$  ćelija po mililitru ćelijske suspenzije, gde je kao medijum korišćen čist DMEM. PRP je pripremljena takođe neposredno pre pripreme implantata na način koji je opisan u "3.2.3. Priprema plazme obogaćene trombocitima". Prema literaturnim podacima (Liu i sar., 2008b; Murphy i sar., 2011; Man i sar., 2012) konačni udeo aktivirane PRP u tačnoj fazi, koja je korišćena za pripremu implantata, bio je 10% (v/v). Konačno, jedan implantat SPN grupe činili su 20  $\mu$ l suspenzije sveže izolovanih ADSC sadržanih u SVF-u i PRP što je aplikovano na 10 mg ( $\sim 0,02 \text{ cm}^3$ ) granula deproteinizovanog BMM. Nakon što su implantati formirani, ostavljeni su 10-15 minuta da ćelije adheriraju na materijal kako je preporučeno u ranijim studijama (Helder i sar., 2007; Muller i sar., 2010; Jurgens i sar., 2011) i da bi se formirala fibrinska vlakna iz aktivirane PRP.

Drugu grupu implantata činile su ADSC koje su prethodno petnaest dana inkubirane *in vitro* u osteoinduktivnom medijumu, PRP kao izvor regulatornih signala i

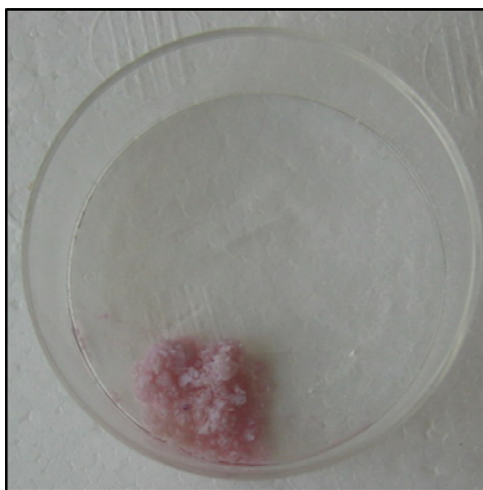
granule deproteinizovanog BMM koje su korišćene kao nosač ćelija - grupa OPN (Tabela 3.1.). ADSC koje su upotrebljene za pripremu implantata OPN grupe, su prethodno izolovane i kultivisane petnaest dana *in vitro* u osteoinduktivnom medijumu na način koji je opisan u "3.1.4. Indukcija ADSC ka osteoprogenitornim ćelijama". Na dan implantacije, *in vitro* osteoindukovane ADSC su uz pomoć rastvora tripsin/EDTA (*PAA Laboratories*, Austrija) odlepljene iz bunarčića plastičnog suda u kojem su kultivisane. Kao prilikom pripreme SPN implantata, isti broj ćelija je korišćen za pripremu OPN implantata, a to je  $5 \times 10^5$  ćelija po mililitru ćelijske suspenzije gde je kao medijum korišćen čist DMEM. PRP je pripremljena neposredno pre pripreme implantata na način koji je opisan u "3.2.3. Priprema plazme obogaćene trombocitima". Konačni udeo aktivirane PRP u tečnoj fazi koja je dodata po svakom implantatu bio je 10% (v/v). Finalno jedan implantat OPN grupe sadržao je 20  $\mu$ l suspenzije *in vitro* osteoindukovanih ADSC pomešanih sa PRP-em što je aplikovano na 10 mg ( $\sim 0,02 \text{ cm}^3$ ) granula deproteinizovanog BMM. Nakon što su implantati pripremljeni, ostavljeni su 10 - 15 minuta da ćelije adheriraju na materijal i da se formiraju fibrinska vlakna iz aktivirane PRP.

Treću grupu (kontrolna grupa) činili su implantati sastavljeni od PRP-a, čistog DMEM-a i granula deproteinizovanog BMM - grupa PN (Tabela 3.1.). Udeo PRP-a u 20  $\mu$ l tečne faze bio je 10% (v/v) što je dodato na 10 mg ( $\sim 0,02 \text{ cm}^3$ ) granula deproteinizovanog BMM. PRP je pripremljena neposredno pre pripreme implantata na način koji je opisan u "3.2.3. Priprema plazme obogaćene trombocitima". Nakon pripreme implantata dopušteno je da se u roku od 10 - 15 minuta formiraju fibrinska vlakna pre implantacije, kao i prilikom pripreme OPN i SPN implantata.

Četvrtu grupu (kontrolna grupa) činili su implantati bez ćelija i PRP-a odnosno samo granule deproteinizovanog BMM natopljene čistim DMEM-om - grupa N (Tabela 3.1.). Implantat N grupe bio je sačinjen samo od 10 mg ( $\sim 0,02 \text{ cm}^3$ ) granula deproteinizovanog BMM na koje je dodato 20  $\mu$ l DMEM-a.

### **3.2.5. Postupak implantacije**

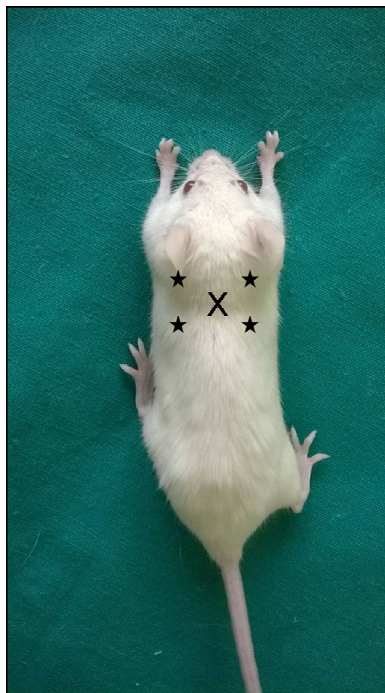
Svaka eksperimentalna grupa je sadržala po dvadeset miševa. Nakon što su životinje anestezirane intraperitonealnom aplikacijom 10% ketamina razblaženim u fiziološkom rastvoru u odnosu 1:10 (v/v), dlačni pokrivač u visini lopatica je uklonjen žiletom. Zatim je koža dezinfikovana povidon jodom pa je sterilnim skalpelom napravljen rez dužine 3-5 mm. Kroz napravljeni otvor na koži iglom dijametra 3-4 mm subkutano su ubačeni pripremljeni implantati (Slika 3.5.).



**Slika 3.5.** Pripremljen implantat neposredno pre implantacije. Implantat je formiran od granula biomaterijala (nosač) sa nanešenom mešavinom suspenzije ćelija i PRP-a.

Svakoj životinji je subkutano na dorzalnoj strani tela, tačnije u visini lopatica, implantirano na četiri različite strane po četiri implantata istog tipa (Slika 3.6.). S obzirom da je otvor na koži bio malih dimenzija, nakon intervencije rana je samo dezinfikovana povidon jodom i ostavljena da spontano zaraste. Tretirani miševi su čuvani grupno u kavezima.





**Slika 3.6.** Subkutana implantacija kod miša. Zvezdice označavaju raspored implantata. "X" označava mesto incizije i penetracije igle za implantaciju.

### 3.2.6. Ekstrakcija implantata

Po isteku eksperimentalnog perioda, nakon prve, druge, četvrte i osme nedelje od implantacije, žrtvovano je po pet miševa iz svake eksperimentalne grupe. Miševi su zatim okupani u 70% etanolu zbog dezinfekcije dlačnog pokrivača i spoljašnjeg dela kože. Jednim parom sterilnih makaza i pincetom napravljen je rez kojim je koža sa leđnog dela odvojena, tako da su implantati bili vidljivi i dostupni. Drugim parom sterilnih makaza i pincetom, implantati su ekstrahovani. Po dva implantata svih grupa su odmah po ekstrakciji nakon prve, druge, četvrte i osme nedelje od implantacije sačuvana u puferu komercijalnog naziva *RNAlater*<sup>®</sup> (*Ambion, Life Technologies, SAD*) koji služi za stabilizaciju i očuvanje integriteta RNK u tkivu do izolacije. Prema preporuci proizvođača, prvih 24 sata implantati su čuvani na +4°C nakon čega su prebačeni na -80°C gde su čuvani do izolacije RNK. Takođe, po dva implantata svih grupa ekstrahovanih nakon druge i osme nedelje od implantacije sačuvana su i fiksirana

u 10% formaldehidu za histomorfološku, imunohistohemijsku i histomorfometrijsku analizu.

### **3.2.7. Metode korišćene za analizu osteogenog procesa u implantatima**

Procena stepena osteogenog procesa u implantatima ostvarena je analizom dinamike relativne ekspresije gena markera osteogeneze, histomorfološkom, histomorfometrijskom i imunohistohemijskom analizom.

#### **3.2.7.1. Postupak analize relativne ekspresije gena markera osteogeneze u implantatima**

Postupak analize relativne ekspresije gena markera osteogeneze se sastojao iz nekoliko sukcesivnih koraka: izolacije RNK, reverzne transkripcije i kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu.

##### **Izolacija RNK**

Iz implantata koji su ekstrahovani posle prve, druge, četvrte i osme nedelje od implantacije, zatim iz ADSC gajenih u osteoinduktivnom medijumu nakon tri, sedam, deset, dvanaest, petnaest i dvadeset jednog dana i iz sveže SVF, izolovana je celokupna RNK uz pomoć kita *RNeasy Mini Kit*<sup>®</sup> (*Qiagen*, Nemačka) prema uputstvima proizvođača. Izolacija je izvedena u posebnom laminaru za sterilan rad sa RNK. Nakon što je tkivo implantata homogenizovano u puferu za liziranje u koji je dodat  $\beta$ -merkaptoetanol, uzorci su centrifugirani. Supernatant je prebačen na kolonice za izolaciju koje poseduju silika membranu za koju se vezuje RNK u postupku izolacije. U toku izolacije primenjen je tretman za uklanjanje rezidualne DNK iz uzoraka *Dnase I Rnase free set* (*Qiagen*, Nemačka). Liofilizirani enzim je rekonstituisan u puferu koji je dobijen uz kit, a zatim je tako rastvoren dodat direktno na membranu kolonice koje su

zatim inkubirane 20 minuta na sobnoj temperaturi. Finalno, iz svakog uzorka izolovana RNK je isprana sa membrana kolonica za izolaciju uz pomoć 40 µl *Rnase free* vode. Neposredno nakon izolacije vršeno je merenje koncentracije izolovane RNK.

### **Merenje koncentracije RNK**

Pre reverzne transkripcije celokupne izolovane RNK, bilo je neophodno izmeriti koncentraciju RNK. Koncentracija RNK je ustanovljena fluorometrijskom metodom uz pomoć kita *Qubit<sup>TM</sup> RNA assay Kit (Invitrogen<sup>TM</sup>, Life technologies, SAD)* koji sadrži specifičnu boju koja nakon vezivanja za RNK iz uzorka fluorescira, što je detektovano aparatom tipa *Qubit<sup>TM</sup> 2.0 fluorometer (Invitrogen<sup>TM</sup>, Life technologies, SAD)* prema uputstvima proizvođača. Fluorescentni signal koji se oslobađa nakon vezivanja boje za RNK je direktno proporcionalan koncentraciji RNK u ispitivanom uzorku. Uzorci RNK kojima je određena koncentracija, do narednog koraka u analizi čuvani su u *Rnase/Dnase free* epruvetama od 0,2 ml na -80°C.

### **Reverzna transkripcija**

Celokupna izolovana RNK je prevedena u ss-cDNK (*Single stranded complementary DNA - ss-cDNA*, eng.) koristeći kit *High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems<sup>®</sup>, Life technologies, SAD)* prema uputstvu proizvođača. U *two-step* metodi analize ekspresije gena, reverzna transkripcija predstavlja prvi korak. Pored komponenti iz kita za reverznu transkripciju (Tabela 3.2.) korišćen je i *RNase inhibitor (Applied biosystems<sup>®</sup>, Life technologies, SAD)*. Prilikom pripreme reakcija, sve komponente kita, uzorci izolovane RNK i pripremljene reakcije držane su na ledu do momenta pokretanja rada PCR aparata. Komponente kita imale su određeni udeo u reakcijama prema preporuci proizvođača, jedino je udeo uzorka zavisio od koncentracije RNK. Prema zapremini uzorka određivana je zapremina vode koja je dodavana u reakciju do ukupne zapremine od 20 µl.

**Tabela 3.2.** Udeo komponenti kita za reverznu transkripciju u ukupnoj reakciji.

Komponente reakcije	Volumen po reakciji ( $\mu$ l)
$10 \times RT$ Buffer	2,0
$25 \times dNTP$ Mix (100 mM)	0,8
$10 \times RT$ Random Primers	2,0
MultiScribe <sup>TM</sup> Reverse Transcriptase	1,0
RNase Inhibitor	1,0
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	varijabilno
RNK uzorak	varijabilno
Ukupni volumen reakcije	20,0

Reakcija reverzne transkripcije izvedena je i praćena u PCR aparatu tipa *SureCycler8800*<sup>®</sup> (*Agilent Technologies*, SAD). Vremenski i temperaturni profil reverzne transkripcije je prikazan u Tabeli 3.3.

**Tabela 3.3.** Vremenski i temperaturni profil reverzne transkripcije.

	1. korak	2. korak	3. korak	4. korak
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Vreme	10 minuta	120 minuta	5 minuta	neograničeno

### Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu

Analiza kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (qRT-PCR) predstavlja drugi korak u *two-step* metodi analize relativne ekspresije gena. Zahvaljući *SYBR*<sup>®</sup> *Green I* koji fluorescira nakon vezivanja za dvolančanu DNK koja nastaje u qRT-PCR reakciji, moguće je kontinuirano praćenje (u realnom vremenu) umnožavanja PCR produkta. Što je koncentracija ciljne RNK u početnom uzorku veća

to je fluorescentni signal koji se emituje u reakciji jači što omogućava preciznu kvantifikaciju ekspresije ciljnog gena.

Smeše komercijalnih *forward/reverse* prajmera za miša (*Quantitect primer assays*, Qiagen, Nemačka) za gene markere osteogenog procesa, *Sp7*, *Bglap*, *Coll1a1* i *Alpl*, korišćene su prilikom ove analize (Tabela 3.4.). Liofilizirani prajmeri su rekonstituisani u TE puferu, pH 8,0 koji je sadržao 10mM Tris-Cl i 1 mM EDTA. TE pufer je prema preporuci proizvođača napravljen od 1 M Tris-Cl rastvora (pH 8,0) i 0,5 M EDTA (pH 8,0) koji su pomešani u odgovarajućim proporcijama.

**Tabela 3.4.** Prajmeri korišćeni u analizi relativne ekspresije gena markera osteogeneze.

Naziv gena	Oznaka	<i>Quantitect Primer assay</i>	Šifra detektabilnog transkripta	Dužina amplikona
Osteriks	<i>Sp7</i>	Mm_Sp7_1_SG, QT00293181	NM_130458	69 bp
Osteokalcin	<i>Bglap</i>	Mm_Bglap1_va. 1_SG, QT01057049	NM_001037939	84 bp
$\alpha 1$ lanac kolagena I	<i>Coll1a1</i>	Mm_Coll1a1_1_SG, QT00162204	NM_007742	98 bp
Alkalna fosfataza	<i>Alpl</i>	Mm_Alpl_2_SG, QT01740221	NM_007431	109 bp
$\beta$ -aktin	<i>Actb</i>	Mm_Actb_2_SG, QT01136772	NM_007393	77 bp

Reakcije su pripremljene koristeći *Kapa Sybr<sup>®</sup> Fast Universal 2 × qPCR Master Mix* (*Kapa Biosystems*, SAD) prema uputstvu proizvođača. Miks je sadržao sve neophodne komponente za odvijanje reakcije osim prajmera. Spisak i udeo komponenti koje su korišćene za pripremu qRT-PCR reakcije, prikazani su u Tabeli 3.5. Reakcije su pripremane u duplikatu za svaki analizirani gen po svakom uzorku tako da je korišćena srednja vrednost ekspresije za dalju analizu. Negativne kontrole sa prajmerima, ali bez matrice (bez uzorka) za qRT-PCR reakciju (*No template control - NTC*, eng.) su takođe postavljane prilikom analize i one su predstavljale kontrolu komponenti kita koje su korišćene u reakciji.

**Tabela 3.5.** Udeo komponenti u qRT-PCR reakciji.

Komponente reakcije	Udeo komponenti u ukupnoj reakciji izražen u % (v/v)
<i>Kapa Sybr<sup>®</sup> Fast Universal 2 × qPCR Master Mix</i>	50
<i>ROX low</i> – referentna boja	2
<i>QuanTitect Primer Assay</i>	11
<i>Nuclease-free H<sub>2</sub>O</i>	27
cDNK	10

Vremenski i temperaturni profil qRT-PCR reakcije činila su tri segmenta (Tabela 3.6.). Reakcija je izvedena i praćena uz pomoć aparata *RealTime termal cycler Stratagen MxPro-Mx3005P* (Agilent Technologies, SAD) i analizirana u *MxPro<sup>™</sup> QPCR software-u* (Agilent Technologies, SAD). Nakon svake qRT-PCR reakcije (1. i 2. segment) sledila je disocijacija (3. segment) koja je rezultirala formiranjem krivi topljenja (*Melting curves*, eng.) čijom se analizom utvrđuje specifičnost i kvalitet dobijenog qRT-PCR produkta.

**Tabela 3.6.** Vremenski i temperaturni profil qRT-PCR reakcije.

	1. segment (1 ciklus)	2. segment (40 ciklusa)			3. segment* (1 ciklus)		
vreme	3 minuta	3 sekunde	20 sekundi	1 sekunda	1 minut	30 sekundi	30 sekundi
temperatura	95°C	95°C	55°C	72°C	95°C	55°C	95°C
faza	<b>aktivacija enzima</b>	<b>denaturacija</b>	<b>vezivanje</b>	<b>ekstenzija</b>	<b>disocijacija</b>		

\* aparat vrši očitavanje promene fluorescence dok se temperatura postepeno povećava od 55°C do 95°C

Zagrevanjem qRT-PCR produkta do 95°C, a zatim naglim hlađenjem do 55°C i zatim ponovnim postepenim zagrevanjem do 95°C, kada aparat vrši očitavanje fluorescence, dobijaju se krive topljenja čija forma zavisi od specifičnog sastava

analiziranih produkta qRT-PCR reakcije, jer različiti produkti disociraju na različitim temperaturama.

*ROX low*, referentna boja, je po preporuci proizvođača dodavana reakcijama sa udelom od 2% (v/v) kako bi se normalizovala fluorescenca *SYBR Green I* koja se emituje prilikom umnožavanja ciljnih gena. Na taj način su neutralisane neznatne razlike između replikata i uzoraka koje su se mogle javiti usled greške u pipetiranju. Takođe, relativna ekspresija ispitivanih gena markera osteogeneze u svakom uzorku normalizovana je u odnosu na ekspresiju *housekeeping* gena  $\beta$ -aktina (*Actb*) (Tabela 3.4.) koji ima konzistentnu ekspresiju u uzorcima i predstavlja endogenu kontrolu. Na taj način su neutralisane razlike u kvalitetu i početnoj koncentraciji RNK u uzorcima nastale nakon izolacije, što povlači za sobom i razlike koje nastaju nakon reverzne transkripcije RNK u cDNK.

Relativna ekspresija ciljnih gena u ispitivanim uzorcima je izražena u odnosu na ekspresiju tih istih gena u referentnom uzorku koji se označava kao kalibrator. Vrednost ekspresije ciljnih gena u kalibratoru označena je kao nulta vrednost ("0"). Vrednosti relativne ekspresije ciljnih gena u eksperimentalnim uzorcima predstavljene su u odnosu na "0" vrednost u kalibratoru i izražene su kao  $\log_2$ . Polazna i zajednička ćelijska komponenta za SPN i OPN implantate jesu sveže izolovane ADSC sadržane u SVF-u. Zato je sveže izolovana SVF upotrebljena kao zajednički kalibrator za sve grupe uključujući i kontrolne, kako bi se relativna ekspresija gena izrazila u odnosu na istu referentnu vrednost. Relativna ekspresija svakog analiziranog gena, poređena je između eksperimentalnih grupa i to u okviru istog termina kada su implantati ekstrahovani. Takođe, vrednosti su poređene i između implantata koji pripadaju istoj grupi, ali su ekstrahovanih u različitim terminima. Kultura ADSC je dobijena nakon zasejavanja sveže izolovane SVF pa je zbog toga u analizi ekspresije gena nakon tri, sedam, deset, dvanaest, petnaest i dvadeset jednog dana kod *in vitro* osteoindukovanih ADSC, sveže izolovana SVF takođe korišćena kao kalibrator.

### Statistička obrada rezultata analize relativne ekspresije gena

Srednje vrednosti relativne ekspresije gena sa standardnom devijacijom korišćene su za statističku analizu. Razlike između grupa utvrđene su neparametarskim *Kruskall-Wallis* ANOVA testom. Dodatno je *post hoc Mann-Withney* testom utvrđena statistička značajnost razlika između parova vrednosti. Statistička obrada podataka sprovedena je u programu *SPSS version 15.0 (SPSS Inc., Chikago, Illionis, SAD)*.

#### 3.2.7.2. Elektroforeza na agaroznom gelu

Provera uspešnosti, kvaliteta i specifičnosti produkata qRT-PCR reakcije urađena je metodom elektroforeze na 2% agaroznom gelu (*Serva, Heidelberg, Nemačka*). Agarozni gel je napravljen uz pomoć  $1 \times$  TAE (Tris, acetat, EDTA) pufera, a postupak elektroforeze je izveden takođe u istom puferu. Etidijum bromid je dodat puferu  $1 \times$  TAE u koncentraciji od 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . Po 5 $\mu\text{l}$  qRT-PCR produkata pomešano je sa 1,5  $\mu\text{l}$  boje bromfenol plavo i nanešeno je u bunarčice gela, u sistemu za elektroforezu (*Serva, Heidelberg, Nemačka*). Elektroforeza je trajala oko jedan sat pri jačini struje od 100 mA. Nakon elektroforeze, fragmenti na gelu su posmatrani na UV transiluminatoru sa sistemom za snimanje (*Vilber Lourmat, Marne La Vallee, Francuska*). Analizirani fragmenti različitih veličina (Tabela 3.4.) prelaze različito rastojanje na gelu, a njihova veličina upoređena je sa DNK standardom za dužinu fragmenata *DNA Standard 100 Bp DNA Ladder (Serva, Heidelberg, Nemačka)*.

#### 3.2.7.3. Metode histomorfološke i histomorfometrijske analize

Histomorfološka i histomorfometrijska metoda su korišćene za analizu morfoloških markera osteogeneze na histološkim isečcima implantata koji su ekstrahovani nakon druge i osme nedelje od implantacije.



### **Obrada implantata za histomorfološku i histomorfometrijsku analizu**

Implantati su po ekstrakciji fiksirani u 10% neutralnom formalinu, a potom su dekalcinisani u rastvoru etilendiamintetrasirćetnoj kiselini (EDTA) (pH 7,4). Nakon dekalcinacije implantati su dehidratirani sukcesivno u rastućoj seriji 50%, 70%, 80% i 95% etanola u trajanju od po 120 minuta, a zatim i u apsolutnom etanolu preko noći. Nakon prosvetljavanja toluolom (u trajanju od 240 minuta), implantati su ukalupljeni u paraplastu. Implantati su sečeni na 3,5 µm debljine na mikrotomu (*Leica RM2235*, Nemačka). Deparafinizacija pločica sa isečcima izvedena je u termostatu na 55°C do 57°C u trajanju od dva sata, nakon čega su pločice tokom 30 minuta tretirane ksilolom.

### **Trihromno bojenje implantata po Masson-u za histomorfološku analizu**

Histomorfološka analiza izvršena je na osnovu isečaka implantata bojenih metodom trihrom po *Masson*-u. Ova metoda bojenja omogućava vizuelizaciju ćelija, ćelijskih struktura i ekstracelularnog matriksa u posmatranom tkivu implantata. Za tu svrhu napravljena su tri rastvora koja su označena kao rastvor I, II i III. Rastvor I je pripremljen od 1 g kiselog fuksina, 100 ml dH<sub>2</sub>O i 1 ml glacijalne sirćetne kiseline. Rastvor II je pripremljen od 1 g *Ponceau de xyloidine*, 100 ml dH<sub>2</sub>O i 1 ml glacijalne sirćetne kiseline. Rastvor III je pripremljen od 2,5 g *Aniline blue* 100 ml dd H<sub>2</sub>O i 2.5 ml glacijalne sirćetne kiseline.

Nakon deparafinizacije (videti "Obrada implantata za histomorfološku i histomorfometrijsku analizu"), isecci su najpre rehidratirani sukcesivno u opadajućim koncentracijama 100%, 95% i 80% etanola, a zatim su isprani sa dH<sub>2</sub>O. Zatim je primenjen *Weigert*-ov hematoksilin u trajanju od 5 minuta, nakon čega su isecci isprani vodom. Rastvorima I i II, u odnosu 1:2, respektivno, isecci su tretirani 2 minuta i nakon toga su isprani vodom. U sledećem koraku 1% fosfomolibdenska kiselina je dodata dva puta u trajanju od 1 minuta, a zatim je bez ispiranja dodat rastvor III u trajanju od 3 minuta. Pločice su posle toga isprane vodom, prelivene 95% etanolom, a zatim 100% etanolom i na kraju osušene u roku od 5 minuta u termostatu. Osušene pločice su tretirane ksilolom 10 minuta i prekrivene kanada balsamom (*Canada balsam*,

eng.). Trajni preparati su posmatrani, analizirani i snimljeni na svetlosnom mikroskopu *Leica System Microscope DM2500* opremljenim *Leica DFC490* digitalnom kamerom (*Leica Microsystems*®, *Wetzlar*, Nemačka).

### **Hematoksilin-eozin bojenje implantata za histomorfometrijsku analizu**

Nakon deparafinizacije i dehidratacije (videti "Obrada implantata za histomorfološku i histomorfometrijsku analizu"), isečci su najpre rehidratirani sukcesivno u opadajućim koncentracijama 100%, 95% i 80% etanola, nakon čega su isprani sa dH<sub>2</sub>O. Nakon toga, isečci su tretirani *Hariss*-ovim hematoksilinom u trajanju od 10 minuta, a zatim su isprani sa dH<sub>2</sub>O. Isečci su zatim preliveni rastvorom eozina, pa su nakon 10 minuta isprani sa dH<sub>2</sub>O. Nakon toga pločice su isprane sa 95% pa 100% etanolom, u trajanjima od po 1 minut. Nakon potapanja u ksilolu pločice su osušene, isečci su prekriveni kanada balsamom i pokrovnim staklom.

### **Histomorfometrijska analiza**

Histomorfometrijska analiza je sprovedena na isečcima bojenim HE metodom. Merenja su sprovedena uz pomoć programskog paketa *NIS-Elements software version 3.2* (*Nikon, Tokyo, Japan*). Slike za histomorfometrijsku analizu su napravljene na mikroskopu *Axio Observer.Z1* (*Carl Zeiss, Nemačka*) opremljenim kamerom *AxioCam HR* na uvećanju od 100×. Uz pomoć softverskog alata *Annotations and Measurements* merena je ukupna površina implantata na preseku i površina granula biomaterijala korišćenog u eksperimentu. Pomoću tih podataka izračunat je procenat infiltriranog tkiva po formuli ((ukupna površina implantata – ukupna površina granula materijala) / ukupna površina implantata)\*100.

### ***Statistička obrada rezultata histomorfometrijske analize***

Srednje vrednosti procenta infiltriranog tkiva između granula BMM i standardna devijacija, izračunate su na osnovu podataka dobijenih analizom implantata

ekstrahovanih iz različitih životinja iste eksperimentalne grupe. Razlike između grupa utvrđene su primenom jednofaktorske ANOVA-e. Za obradu podataka korišćen je *SPSS version 15.0 (SPSS Inc., Chikago, Illionis, SAD)*.

#### **3.2.7.4. Metoda imunohistohemijske analize**

Imunohistohemijska analiza ekspresije osteopontina može biti važan pokazatelj osteogenog procesa. Za tu analizu, isečci implantata svih eksperimentalnih grupa ekstrahovanih nakon druge i osme nedelje, pripremljeni su na način koji je opisan u "Obrada implantata za histomorfološku i histomorfometrijsku analizu". Tako pripremljeni, podvrgnuti su daljoj obradi specifičnoj za imunohistohemijsku analizu. Primarno antitelo, anti-osteopontin u razblaženju 1:1000 (ab8448, *Abcam*, SAD) aplikovano je na isečke implantata, koji su prethodno tretirani sa 10 mM natrijum-citratnim puferom (pH 6,0) u mikrotalasnoj pećnici na 96°C, a zatim inkubirani preko noći na 4°C. Kao kit za detekciju korišćen je *Rabbit specific HRP/DAB* (ab64261, *Abcam*, SAD) na način koji je opisan u "3.1.3. Karakterizacija ADSC sadržanih u sveže izolovanoj SVF i u uspostavljenoj ćelijskoj kulturi". Na kraju, kontrastiranje je urađeno hematoksilinom u trajanju od 5 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je preparat prekriven medijumom za trajne preparate (*H-5000, VectaMount Permanent Mounting Medium*, UK) i analiziran.

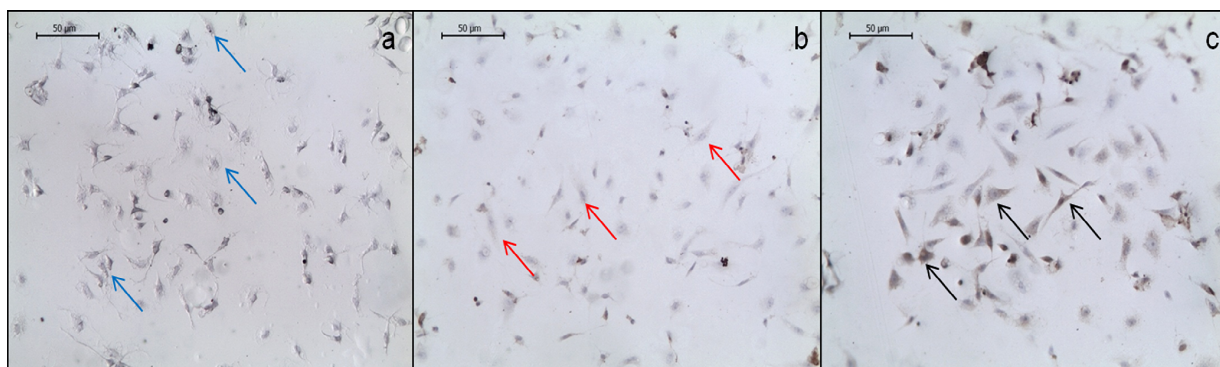
## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati *in vitro* istraživanja

U ovom delu su predstavljeni rezultati analize imunoekspresije CD29 i CD14 kod ADSC nakon izolacije i nakon formiranja ćelijske kulture. Predstavljen je izgled uspostavljene ćelijske kulture ADSC pre i tokom *in vitro* osteogene indukcije. Nakon toga prikazani su rezultati analize stepena *in vitro* osteogene diferencijacije ADSC.

#### 4.1.1. Karakterizacija ADSC sadržanih u sveže izolovanoj SVF

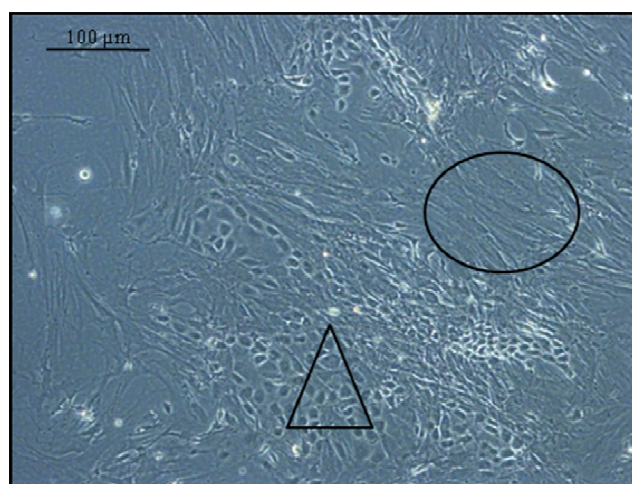
ADSC karakteriše specifičan obrazac ekspresije CD markera. Pored ostalih CD markera, karakteristika ADSC je da ekspimiraju CD29 i da ne ekspimiraju CD14 marker. Neposredno po izolaciji, ćelije koje su sadržane u SVF su okarakterisane pomoću imunocitohemijske analize da bi se utvrdila ekspresija ova dva markera. U odnosu na negativnu kontrolu, koja je bila uzorak kome nije aplikovano primarno antitelo (Slika 4.1.b), većina ćelija zastupljenih u SVF-u nije ekspimirala CD14 (Slika 4.1.a) a ekspimirala je CD29 marker (Slika 4.1.c).



**Slika 4.1.** Ekspresija CD29 i CD14 kod ADSC sadržanih u sveže izolovanoj SVF. **a** - negativna ekspresija CD14 markera (pokazano plavim strelicama); **b** - negativna kontrola (pokazano crvenim strelicama); **c** - CD29 pozitivna ekspresija (pokazano crnim strelicama). Uvećanje 200×. Skala pokazuje 50 µm.

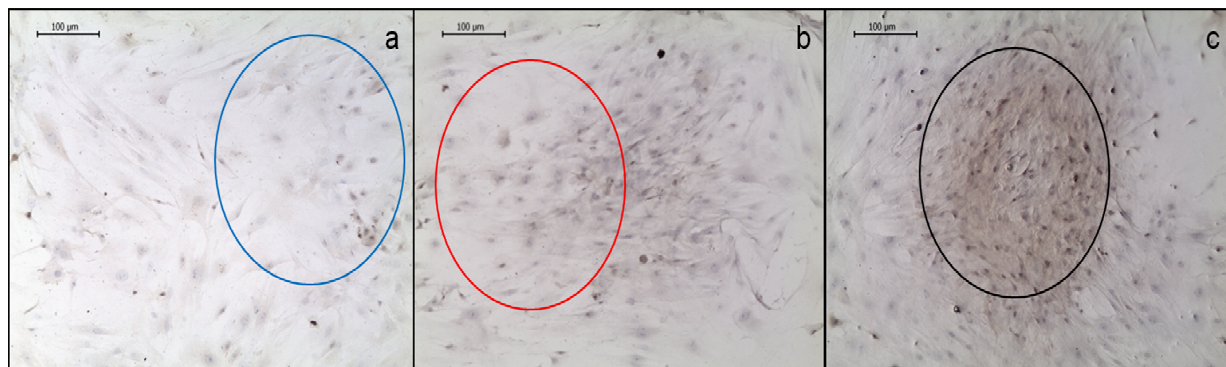
#### 4.1.2. Karakterizacija ADSC u uspostavljenoj ćelijskoj kulturi

Posle trećeg pasaža od zasejavanja sveže izolovane SVF, iz heterogene ćelijske populacije izdvojile su se i umnožile ćelije koje su dobro adherirale za dno plastičnog suda i koje su nalikovale fibroblastnim ćelijama, što je karakteristično za ADSC. Ovaj tip ćelija je činio većinu u uspostavljenoj kulturi, dok su u manjoj meri bile prisutne ćelije koje su nalikovale epitelnim ćelijama. Izgled uspostavljene ćelijske kulture nakon trećeg pasaža od zasejavanja sveže izolovane SVF, a neposredno pre podvrgavanja osteogenoj indukciji prikazan je na Slici 4.2.



**Slika 4.2.** Izgled kulture ADSC nakon trećeg pasaža od zasejavanja sveže izolovane SVF. Krug pokazuje ćelije koje nalikuju fibroblastima. Trougao pokazuje ćelije nalik epitelnim ćelijama. Uvećanje 100×. Skala pokazuje 100 μm.

Pre podvrgavanja osteogenoj indukciji, u uspostavljenoj kulturi ADSC posle trećeg pasaža od zasejavanja sveže izolovane SVF, ćelije su okarakterisane imunocitohemijskom metodom radi detekcije CD29 i CD14 markera. U odnosu na negativnu kontrolu, koja je bila uzorak kome nije aplikovano primarno antitelo (Slika 4.3.b), pokazano je da većina ćelija u kulturi ne eksprimira CD14 marker (Slika 4.3.a) i da eksprimira CD29 marker (Slika 4.3.c).



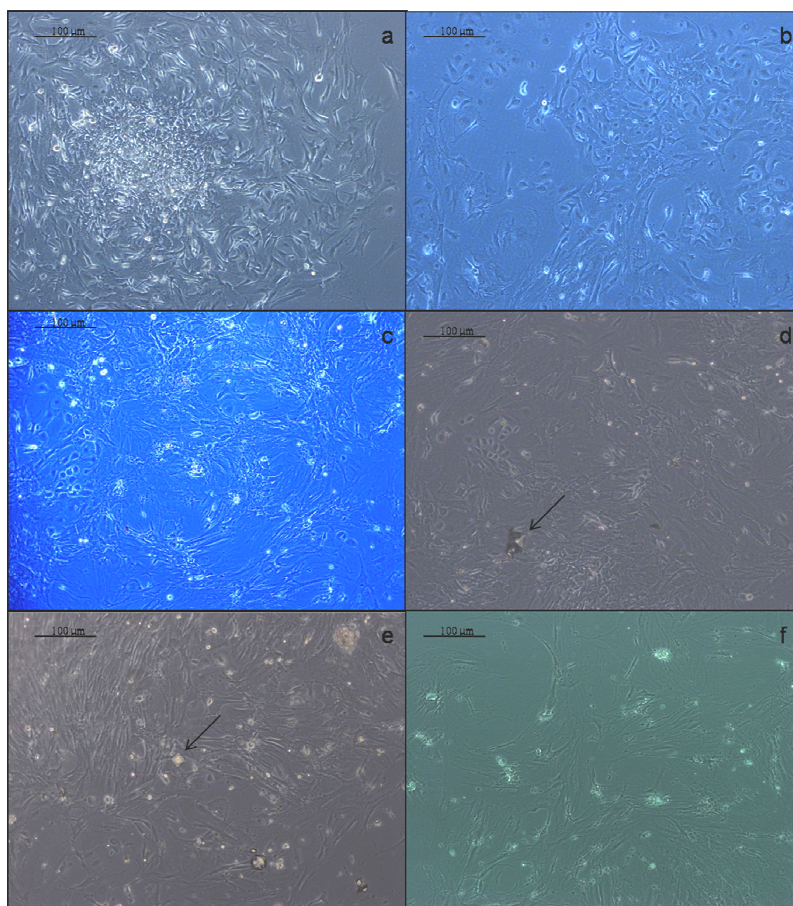
**Slika 4.3.** Ekspresija CD29 i CD14 kod ADSC u uspostavljenoj ćelijskoj kulturi nakon trećeg pasaža od zasejavanja sveže izolovane SVF. **a** - negativna ekspresija CD14 (pokazano plavim krugom); **b** - negativna kontrola (pokazano crvenim krugom); **c** - pozitivna ekspresija CD29 (pokazano crnim krugom). Uvećanje 100×. Skala pokazuje 100 µm.

#### 4.1.3. *In vitro* osteogena indukcija ADSC

Nakon formiranja kulture ADSC, ćelije su podvrgnute *in vitro* osteogenoj indukciji. Na Slici 4.4. prikazana je kultura ADSC snimljena trećeg, sedmog, desetog, dvanaestog, petnaestog i dvadeset prvog dana *in vitro* osteogene indukcije.

Nađeno je da najveći deo ćelija tokom osteogene indukcije ima vretenast oblik, nalik fibroblastima što je karakteristično za ADSC (Slika 4.4.a-f). Od trećeg do petnaestog dana nađeno je umnožavanje ćelija (4.4.a-e), dok je dvadeset prvog dana nađen manji broj ćelija u kulturi nego u prethodnim terminima (4.4.f). Nađeno je da su ćelijske grupacije bile najbrojnije dvanaestog i petnaestog dana osteogene indukcije. U tim terminima, u ekstracelularnom matriksu su zapažene kristalne strukture, koje mogu biti proizvod mineralizacije vanćelijskog matriksa.





**Slika 4.4.** Kultura ADSC tokom *in vitro* osteogene indukcije (fazni kontrast): **a** - trećeg dana; **b** - sedmog dana; **c** - desetog dana; **d** - dvanaestog dana; **e** - petnaestog dana; **f** - dvadeset prvog dana. Strelice pokazuju kristalne strukture u vanćelijskoj sredini. Uvećanje 100×. Skala pokazuje 100 µm.

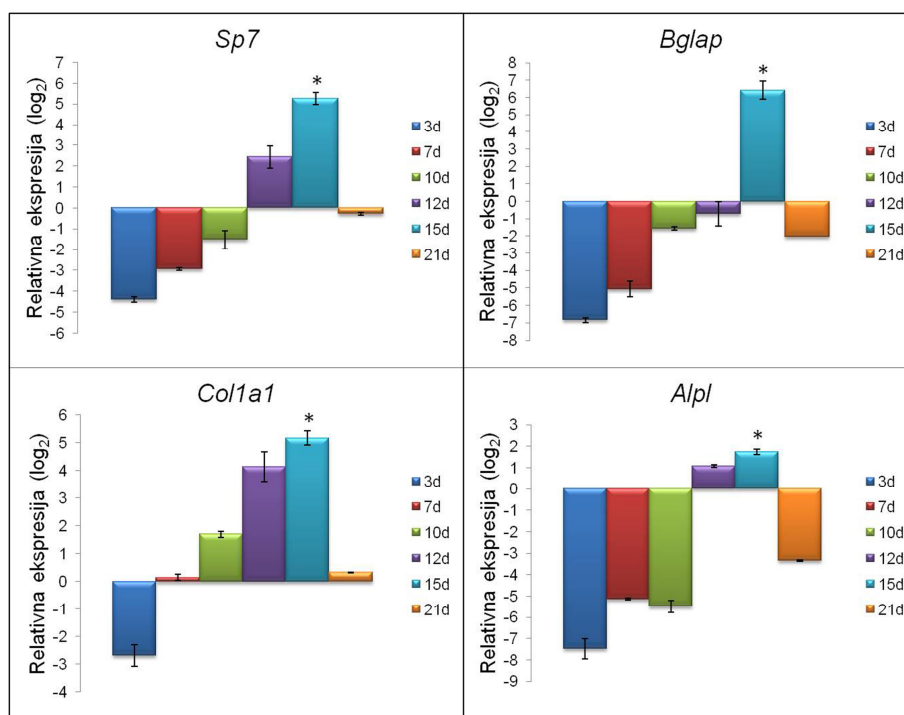
#### 4.1.4. Procena stepena *in vitro* osteogene diferencijacije ADSC

Rezultate procene stepena *in vitro* osteogene diferencijacije ADSC čine rezultati analize ekspresije gena markera osteogeneze, citohemijske analize i analize imunoekspresije osteopontina kod *in vitro* osteoindukovanih ADSC.

##### 4.1.4.1. Analiza ekspresije gena markera osteogeneze

Stepen osteogene diferencijacije ADSC procenjen je analizom relativne ekspresije gena *Sp7*, *Bglap*, *Colla1* i *Alpl* tokom *in vitro* osteogene indukcije ADSC

(Slika 4.5.). U periodu od trećeg do petnaestog dana zapažen je postepeni porast ekspresije, dok je dvadeset prvog dana zapaženo naglo smanjenje ekspresije svih analiziranih gena. Značajno najviša ekspresija svih analiziranih gena ( $p < 0,05$ ) zapažena je petnaestog dana u odnosu na prethodne termine i u odnosu na dvadeset prvi dan. Pozitivna ekspresija *Colla1* izmerena je sedmog dana koja se postepeno uvećala desetog, dvanaestog, a najviša je bila petnaestog dana. Ekspresija *Sp7* i *Alpl* je dostigla pozitivnu vrednost dvanaestog dana dok se petnaestog dana dodatno uvećala i postigla najvišu vrednost. Pozitivna ekspresija *Bglap* zapažena je samo petnaestog dana kada je imala najvišu vrednost.

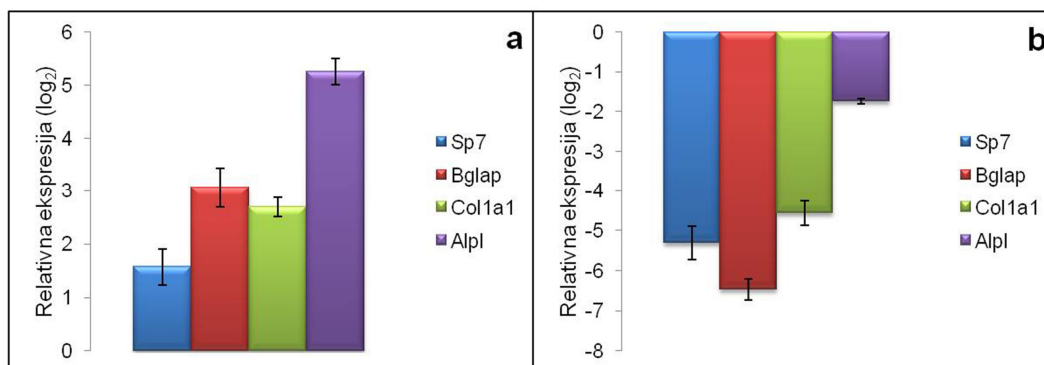


**Slika 4.5.** Relativna ekspresija gena markera osteogeneze, *Sp7*, *Bglap*, *Colla1* i *Alpl* tokom *in vitro* osteogene indukcije ADSC: **3d** - trećeg dana; **7d** - sedmog dana; **10d** - desetog dana; **12d** - dvanaestog dana; **15d** - petnaestog dana i **21d** - dvadeset prvog dana. \*  $p < 0,05$ .

U sveže izolovanoj SVF nađena je povišena ekspresija gena markera osteogeneze *Sp7*, *Bglap*, *Colla1*, *Alpl* u odnosu na kulturu ADSC formiranoj posle trećeg pasaža od zasejavanja sveže izolovane SVF (Slika 4.6.a). Međutim, u odnosu na



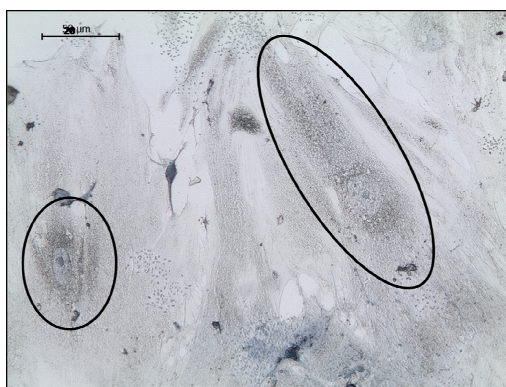
ADSC koje su *in vitro* osteoindukovane petnaest dana, u sveže izolovanoj SVF zapažena je znatno niža ekspresija analiziranih gena (Slika 4.6.b).



**Slika 4.6.** Relativna ekspresija gena markera osteogeneze, *Sp7*, *Bglap*, *Col1a1* i *Alpl* u sveže izolovanoj SVF u odnosu na: **a** - ADSC iz kulture posle trećeg pasaža od zasejavanja sveže izolovane SVF; **b** - ADSC iz kulture nakon petnaestodnevne *in vitro* osteoindukcije.

#### 4.1.4.2. Citohemijska analiza

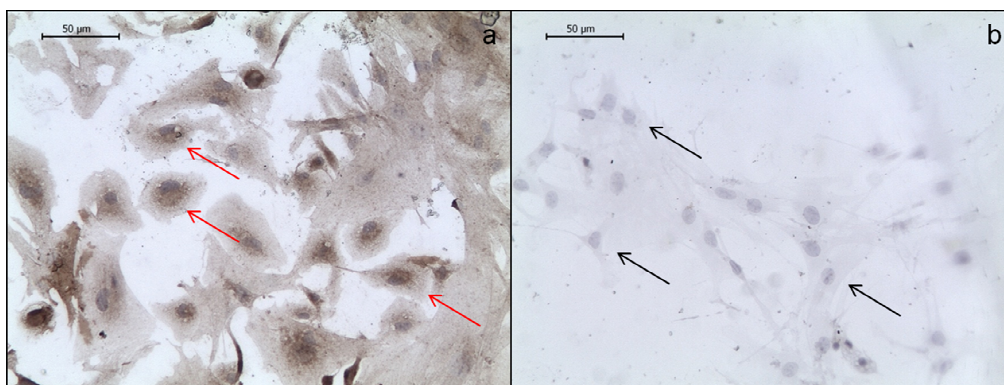
Citohemijska analiza metodom *von Kossa* omogućava vizuelizaciju mineralnih depozita fosfata koji se boje tamno. Prisustvo fosfatnih depozita može ukazivati na proces mineralizacije što je karakteristično za ćelije osteoblastne linije. Na Slici 4.7. prikazani su depoziti fosfata koji su zapaženi u ADSC koje su bile petnaest dana podvrgnute *in vitro* osteogenoj indukciji.



**Slika 4.7.** Depoziti fosfata (pokazano elipsama) u ADSC koje su bile podvrgnute *in vitro* osteogenoj indukciji petnaest dana. Bojenje metodom *von Kossa*. Uvećanje 400×. Skala pokazuje 20 μm.

#### 4.1.4.3. Analiza imunoekspresije osteopontina

Ekspresija osteopontina je karakteristična za ćelije osteoblastne linije, pa su zato ADSC koje su osteogeno indukovane petnaest dana podvrgnute imunocitohemijskoj analizi za vizuelizaciju ekspresije osteopontina. Potvrđeno je da su osteoindukovane ADSC ekspimirale osteopontin (Slika 4.8.a) u poređenju sa negativnom kontrolom (Slika 4.8.b).



**Slika 4.8.** Imunoekspresija osteopontina kod ADSC koje su bile podvrgnute *in vitro* osteogenoj indukciji petnaest dana. **a** - ćelije koje su pozitivne na osteopontin (pokazano crvenim strelicama). **b** - negativna kontrola (pokazano crnim strelicama). Uvećanje 200×. Skala pokazuje 50 µm.

## 4.2. Rezultati *in vivo* istraživanja

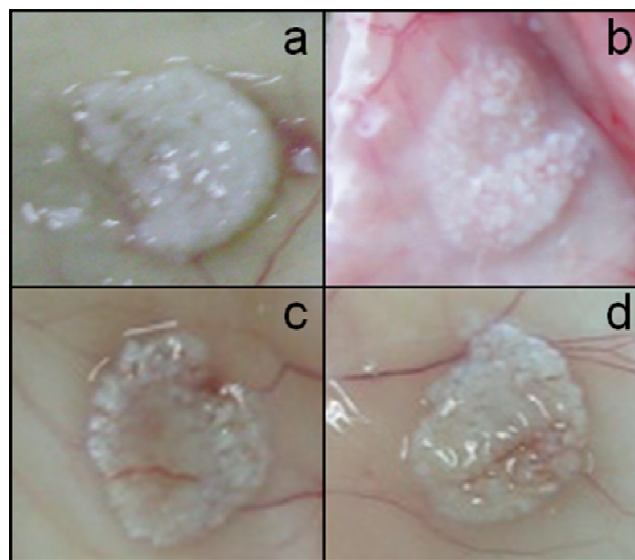
U ovom delu, predstavljeni su rezultati koji se odnose na analizu osteogenog procesa u implantatima ekstrahovanim nakon isteka *in vivo* eksperimentalnog perioda.

### 4.2.1. Analiza osteogenog procesa u implantatima

Rezultate o stepenu osteogenog procesa u eksperimentalnim implantatima čine rezultati analize makroskopskog izgleda implantata neposredno pre ekstrakcije, rezultati analize relativne ekspresije gena markera osteogeneze, histomorfološke, histomorfometrijske i imunohistohemijske analize ekstrahovanih implantata.

#### 4.2.1.1. Analiza makroskopskog izgleda implantata

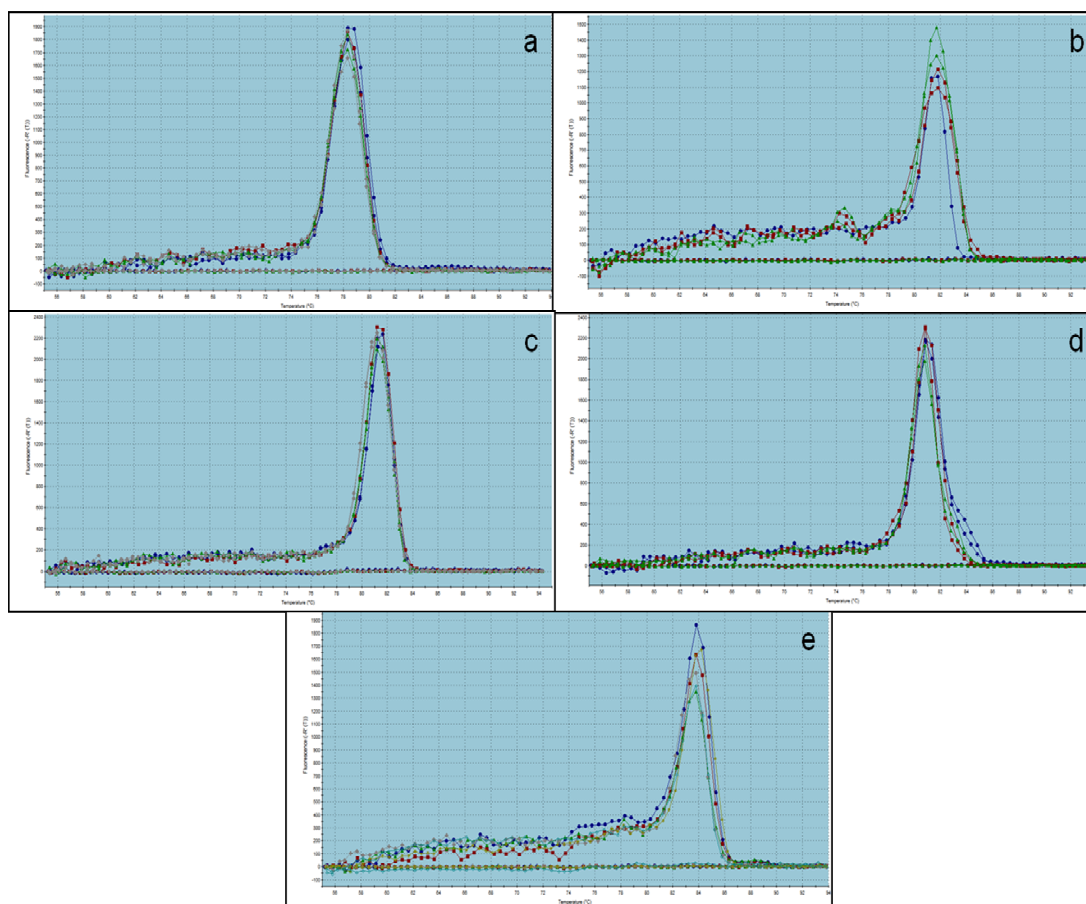
U momentu žrtvovanja i ekstrakcije implantata, u istim terminima nisu primećene makroskopske razlike između implantata različitih grupa (rezultati nisu prikazani). Međutim, razlike su bile primetne između implantata koji su ekstrahovani u različitim terminima nakon implantacije. Kao primer prikazani su implantati iz SPN grupe (Slika 4.9.). Nakon prve nedelje od implantacije, implantati su bili nepotpuno integrisani u okolno potkožno tkivo, manje kompaktni i krupniji u odnosu na kasnije termine (Slika 4.9.a). Nakon druge nedelje od implantacije implantati su bili kompaktniji sa razvijenim krvnim sudovima u svom okruženju u odnosu na implantate ekstrahovanih posle prve nedelje (Slika 4.9.b). Nakon četvrte nedelje od implantacije implantati su bili kompaktni, dobro integrisani u okolno potkožno tkivo, ali primetno manji nego implantati nakon prve dve nedelje (Slika 4.9.c). Nakon osme nedelje od implantacije, implantati su bili kompaktni, jako dobro integrisani u okolno tkivo i primetno manji nego u prethodnim terminima žrtvovanja (Slika 4.9.d).



**Slika 4.9.** Primer makroskopskog izgleda implantata SPN grupe neposredno pre ekstrakcije nakon: **a** - prve; **b** - druge; **c** - četvrte i **d** - osme nedelje od implantacije.

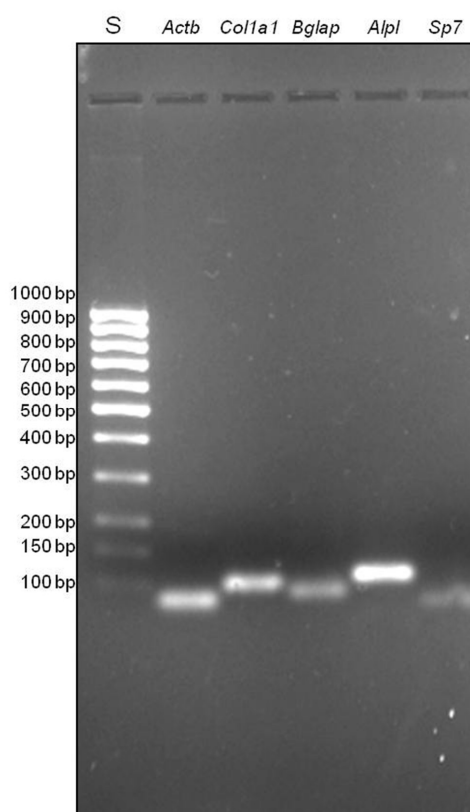
#### 4.2.1.2. Analiza relativne ekspresije gena markera osteogeneze u implantatima

Pre analize relativne ekspresije gena markera osteogeneze, nakon završetka qRT-PCR reakcije, analizirane su krive topljenja kako bi se utvrdila specifičnost dobijenih produkata lančane reakcije polimeraze (Slika 4.10.a-e). Svaki od analiziranih produkata qRT-PCR reakcije - *Sp7*, *Bglap*, *Coll1a1* i *Alpl* kao i *housekeeping* gen *Actb*, koji je korišćen kao normalizator u reakcijama, imao je specifičnu krivu topljenja koja je bila ista u različitim uzorcima koji su uključeni u dalju analizu relativne ekspresije. Krive predstavljene u okviru Slike 4.10. su generisane u programu *MxPro*<sup>TM</sup> *QPCR*. Krive različitih boja predstavljaju intenzitet fluorescence analiziranog produkta u funkciji temperature u različitim uzorcima.



**Slika 4.10.** Krive topljenja qRT-PCR produkata u različitim uzorcima (predstavljeno različitim bojama): **a** - *Sp7*; **b** - *Bglap*; **c** - *Alpl*; **d** - *Coll1a1*; **e** - *Actb*. Temperatura je prikazana na x osi, fluorescencija na y osi.

Takođe, nakon završetka qRT-PCR reakcije, urađena je elektroforeza na gelu dobijenih produkata lančane reakcije polimeraze, kako bi se potvrdila njihova specifičnost i kvalitet. Na Slici 4.11. prikazan je rezultat elektroforeze na gelu. U odnosu na fragmente iz standarda, produkti qRT-PCR reakcije su pozicionirani na gelu u odnosu na svoju veličinu. Razdvojeni fragmenti qRT-PCR produkata na gelu, podudaraju se sa dužinom amplikona koja je navedena u specifikaciji proizvođača prajmera. Dužine amplikona *Actb* (77 bp), *Colla1* (98 bp), *Bglap* (84 bp), *Alpl* (109 bp) i *Sp7* (69 bp) pozicionirane su na gelu u visini oko fragmenta veličine 100 bp.

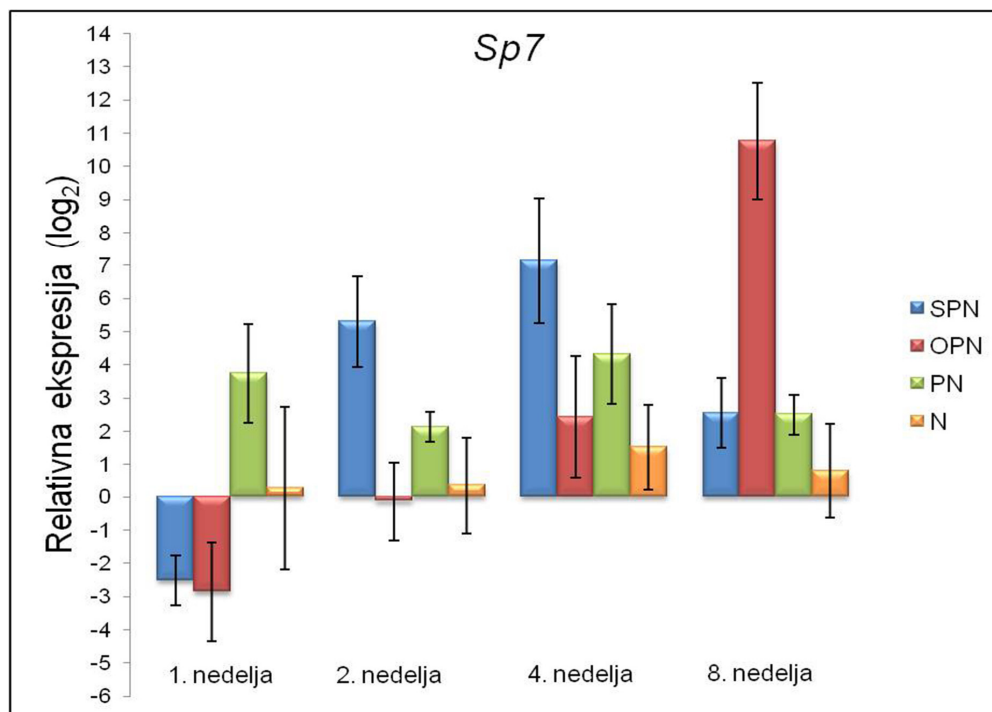


**Slika 4.11.** Elektroforeza na agaroznom gelu. S - standard za dužinu fragmenata. Analizirani produkti qRT-PCR reakcije, *Actb* (77 bp), *Colla1* (98 bp), *Bglap* (84 bp), *Alpl* (109 bp) i *Sp7* (69 bp).

### Relativna ekspresija *Sp7*

Dinamika relativne ekspresije *Sp7* u implantatima eksperimentalnih grupa SPN, OPN, PN i N ekstrahovanim nakon prve, druge, četvrte i osme nedelje od implantacije,

prikazana je na Slici 4.12. Srednje vrednosti relativne ekspresije *Sp7* sa standardnom devijacijom, predstavljene su u odnosu na kalibrator i izražene kao  $\log_2$ .



**Slika 4.12.** Dinamika relativne ekspresije *Sp7* u implantatima eksperimentalnih grupa SPN, OPN, PN i N ekstrahovanim nakon prve, druge, četvrte i osme nedelje od implantacije.

U Tabeli 4.1. su prikazani rezultati *post hoc Mann-Whitney* uporedne statističke analize relativne ekspresije *Sp7* između SPN, OPN, PN i N implantata u okviru svakog termina kada je vršena njihova ekstrakcija. Posle prve nedelje od implantacije značajno viša ekspresija *Sp7* ( $p < 0,05$ ) zapažena je u PN grupi u odnosu na SPN i OPN grupe. Posle druge nedelje od implantacije u SPN grupi zapažena je značajno viša ekspresija *Sp7* ( $p < 0,05$ ) u poređenju sa svim ostalim grupama. Znatno viša ekspresija *Sp7* ( $p < 0,05$ ) u ovom terminu izmerena je u PN u odnosu na OPN grupu. Posle četvrte nedelje od implantacije značajno povišena ekspresija *Sp7* ( $p < 0,05$ ) nađena je u SPN grupi u odnosu na OPN i N grupe. Posle osme nedelje od implantacije u OPN grupi nađena je značajno viša ekspresija *Sp7* ( $p < 0,05$ ) u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe dok je u PN grupi značajno viša ekspresija *Sp7* ( $p < 0,05$ ) zapažena u odnosu na N grupu.



**Tabela 4.1.** Uporedna analiza ekspresije *Sp7* između implantata različitih grupa u okviru istih termina ekstrakcije.

Komparirane grupe	Termini			
	1. nedelja	2. nedelja	4. nedelja	8. nedelja
SPN/OPN	0,486	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>
SPN/PN	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,057	0,200
SPN/N	0,057	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,886
OPN/PN	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,114	<b>0,029*</b>
OPN/N	0,114	0,686	0,343	<b>0,029*</b>
PN/N	0,114	0,114	0,057	<b>0,029*</b>

\* p&lt;0,05

U Tabeli 4.2. prikazani su rezultati *post hoc Mann-Withney* uporedne statističke analize relativne ekspresije *Sp7* između implantata iz istih eksperimentalnih grupa koji su ekstrahovani u različitim terminima posle implantacije. Značajno viša ekspresija *Sp7* ( $p<0,05$ ) u SPN grupi zapažena je nakon druge i četvrte nedelje od implantacije, u odnosu na termine nakon prve i osme nedelje od implantacije. Značajnih razlika nije bilo između termina nakon druge i četvrte nedelje od implantacije. Nakon osme nedelje od implantacije, ekspresija *Sp7* je bila značajno viša ( $p<0,05$ ) nego nakon prve nedelje od implantacije. U OPN grupi značajno viša ekspresija *Sp7* ( $p<0,05$ ) izmerena je nakon osme nedelje od implantacije u odnosu na sve ostale termine. Nakon četvrte nedelje od implantacije detektovana je značajno viša ekspresija *Sp7* ( $p<0,05$ ) u odnosu na termin posle prve nedelje od implantacije. U kontrolnim PN i N grupama, ekspresija *Sp7* nije značajno varirala tokom eksperimentalnog perioda.

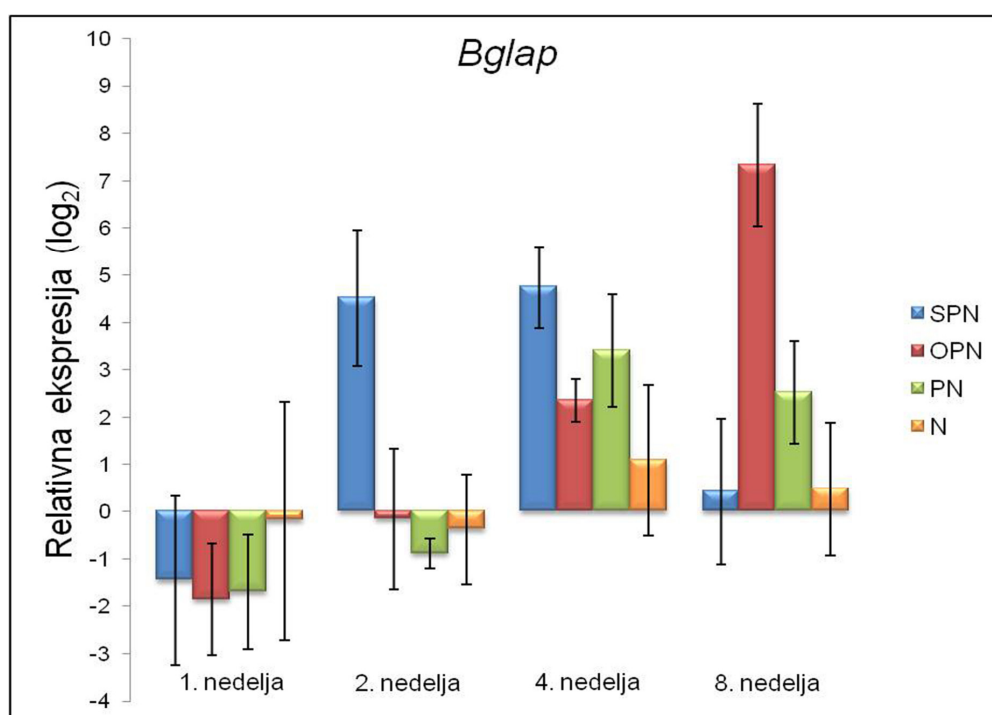
**Tabela 4.2.** Uporedna analiza ekspresije *Sp7* između implantata ekstrahovanih u različitim terminima u okviru istih grupa.

Komparirani termini	Grupe			
	SPN	OPN	PN	N
1. ned./2. ned.	<b>0,029*</b>	0,114	0,057	0,886
1. ned./4. ned.	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,486	0,486
1. ned./8. ned.	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,200	0,686
2. ned./4. ned.	0,200	0,114	0,057	0,486
2. ned./8. ned.	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,686	1,000
4. ned./8. ned.	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,114	1,000

\* p&lt;0,05

### Relativna ekspresija *Bglap*

Dinamika relativne ekspresije *Bglap* u implantatima eksperimentalnih grupa SPN, OPN, PN i N ekstrahovanim nakon prve, druge, četvrte i osme nedelje od implantacije, prikazana je na Slici 4.13. Srednje vrednosti relativne ekspresije *Bglap* sa standardnom devijacijom predstavljene su u odnosu na kalibrator i izražene kao  $\log_2$ .



**Slika 4.13.** Dinamika relativne ekspresije *Bglap* u implantatima eksperimentalnih grupa SPN, OPN, PN i N ekstrahovanim nakon prve, druge, četvrte i osme nedelje od implantacije.

U Tabeli 4.3. prikazani su rezultati *post hoc Mann-Whitney* uporedne statističke analize relativne ekspresije *Bglap* između SPN, OPN, PN i N implantata u okviru svakog termina kada je vršena njihova ekstrakcija. Posle prve nedelje od implantacije nije bilo značajnih razlika između eksperimentalnih grupa, a ekspresija *Bglap* je bila negativna u svim grupama u odnosu na kalibrator. Posle druge nedelje od implantacije u SPN grupi izmerena je značajno viša ekspresija *Bglap* ( $p < 0,05$ ) u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe u kojima je ekspresija i dalje bila negativna. Posle četvrte nedelje od implantacije u SPN grupi nađena je značajno viša ekspresija *Bglap* ( $p < 0,05$ )



samo u odnosu na OPN i N grupe. Posle osme nedelje od implantacije značajno viša ekspresija ( $p < 0,05$ ) je zapažena u OPN grupi u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe.

**Tabela 4.3.** Uporedna analiza ekspresije *Bglap* između implantata različitih grupa u okviru istih termina ekstrakcije.

Komparirane grupe	Termini			
	1. nedelja	2. nedelja	4. nedelja	8. nedelja
SPN/OPN	0,886	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>
SPN/PN	1,000	<b>0,029*</b>	0,343	0,114
SPN/N	0,686	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,886
OPN/PN	0,886	0,886	0,200	<b>0,029*</b>
OPN/N	0,343	0,886	0,343	<b>0,029*</b>
PN/N	0,686	0,886	0,114	0,114

\*  $p < 0,05$

U Tabeli 4.4. prikazani su rezultati *post hoc Mann-Whitney* uporedne statističke analize relativne ekspresije *Sp7* između implantata iz istih eksperimentalnih grupa koji su ekstrahovani u različitim terminima posle implantacije. Značajno viša ekspresija *Bglap* ( $p < 0,05$ ) u SPN grupi zapažena je nakon druge i četvrte nedelje u odnosu na termine nakon prve i osme nedelje od implantacije. Značajnih razlika u ekspresiji *Bglap* nije bilo između termina nakon druge i četvrte nedelje od implantacije.

**Tabela 4.4.** Uporedna analiza ekspresije *Bglap* između implantata ekstrahovanih u različitim terminima u okviru istih grupa.

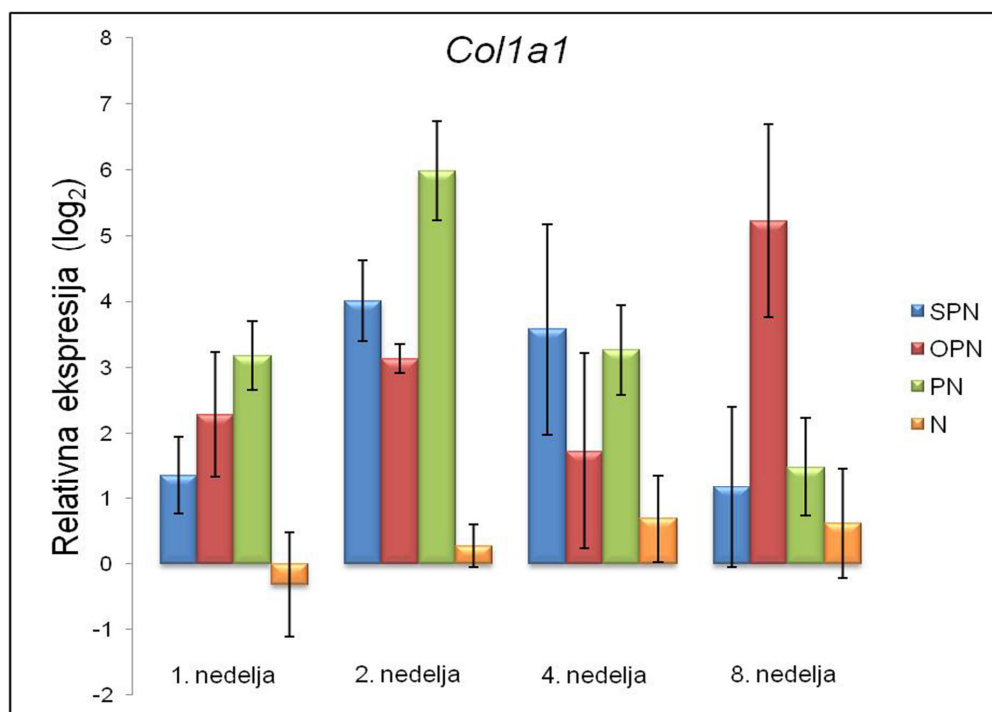
Komparirani termini	Grupe			
	SPN	OPN	PN	N
1. ned./2. ned.	<b>0,029*</b>	0,114	0,686	1,000
1. ned./4. ned.	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,686
1. ned./8. ned.	0,343	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,886
2. ned./4. ned.	0,686	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,200
2. ned./8. ned.	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,343
4. ned./8. ned.	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,886

\*  $p < 0,05$

U OPN grupi značajno viša ekspresija *Bglap* ( $p < 0,05$ ) izmerena je nakon osme nedelje od implantacije u odnosu na sve ostale termine. Nakon četvrte nedelje od implantacije detektovana je značajno povišena ekspresija *Bglap* ( $p < 0,05$ ) u odnosu na termine posle prve i druge nedelje od imlantacije. U PN grupi značajno viša ekspresija *Bglap* ( $p < 0,05$ ) nađena je u terminima nakon četvrte i osme nedelje od implantacije u odnosu na ostale termine. Znatno viša ekspresija *Bglap* ( $p < 0,05$ ) izmerena je nakon četvrte u odnosu na period nakon osme nedelje od implantacije. U N grupi nije bilo značajnih razlika u ekspresiji *Bglap* između termina.

### Relativna ekspresija *Coll1a1*

Dinamika relativne ekspresije *Coll1a1* u implantatima eksperimentalnih grupa SPN, OPN, PN i N ekstrahovanim nakon prve, druge, četvrte i osme nedelje od implantacije, prikazana je na Slici 4.14. Srednje vrednosti relativne ekspresije *Coll1a1* sa standardnom devijacijom predstavljene su u odnosu na kalibrator kao  $\log_2$ .



**Slika 4.14.** Dinamika relativne ekspresije *Coll1a1* u implantatima eksperimentalnih grupa SPN, OPN, PN i N ekstrahovanim nakon prve, druge, četvrte i osme nedelje od implantacije.

U Tabeli 4.5. prikazani su rezultati *post hoc Mann-Withney* uporedne statističke analize relativne ekspresije *Collal* između SPN, OPN, PN i N implantata u okviru svakog termina kada je vršena njihova ekstrakcija. Nakon prve nedelje zapažena je značajno viša ekspresija *Collal* ( $p < 0,05$ ) u svim grupama u odnosu na kontrolnu N. U ovom terminu, značajno viša ekspresija *Collal* ( $p < 0,05$ ) izmerena je u PN u odnosu na SPN grupu. Posle druge nedelje od implantacije značajno viša ekspresija *Collal* ( $p < 0,05$ ) detektovana je u PN grupi u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe dok je u grupi N zapažena značajno niža ekspresija *Collal* ( $p < 0,05$ ) u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe. Nakon četvrte nedelje od implantacije najviša ekspresija *Collal* je zapažena u SPN, a zatim u PN, OPN i N grupi respektivno, ali značajno viša ekspresija *Collal* ( $p < 0,05$ ) zapažena je u PN u odnosu na N grupu. Nakon osme nedelje od implantacije samo je u OPN grupi izmerena značajno viša ekspresija *Collal* ( $p < 0,05$ ) u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe.

**Tabela 4.5.** Uporedna analiza ekspresije *Collal* između implantata različitih grupa u okviru istih termina ekstrakcije.

Komparirane grupe	Termini			
	1. nedelja	2. nedelja	4. nedelja	8. nedelja
SPN/OPN	0,200	0,114	0,114	<b>0,029*</b>
SPN/PN	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,686	0,686
SPN/N	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,057	0,886
OPN/PN	0,200	<b>0,029*</b>	0,114	<b>0,029*</b>
OPN/N	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,200	<b>0,029*</b>
PN/N	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,686

\*  $p < 0,05$

U Tabeli 4.6. prikazani su rezultati *post hoc Mann-Withney* uporedne statističke analize relativne ekspresije *Collal* između implantata iz istih eksperimentalnih grupa koji su ekstrahovani u različitim terminima posle implantacije. U SPN grupi, nakon druge nedelje od implantacije zapažena je značajno viša ekspresija *Collal* ( $p < 0,05$ ) u odnosu na termine nakon prve i osme nedelje od implantacije. Značajna razlika u ekspresiji nije zapažena između termina nakon druge i četvrte nedelje od implantacije. Nakon osme nedelje zapažena je znatno niža ekspresija *Collal* ( $p < 0,05$ ) u odnosu na četvrtu nedelju. U OPN grupi, nakon osme nedelje nađena je značajno povišena ekspresija *Collal* ( $p < 0,05$ ) u odnosu na sve ostale termine unutar grupe. Znatno viša

ekspresija *Collal* ( $p < 0,05$ ) nakon druge nedelje od implantacije u odnosu na sve ostale termine, izmerena je u PN grupi. Značajni pad ekspresije *Collal* ( $p < 0,05$ ) detektovan je nakon osme nedelje od implantacije u odnosu na sve ostale termine unutar grupe. U kontrolnoj grupi N nađena je pozitivna ekspresija *Collal* u odnosu na kalibrator, ali značajnih razlika nije bilo između termina u kojima je merena ekspresija.

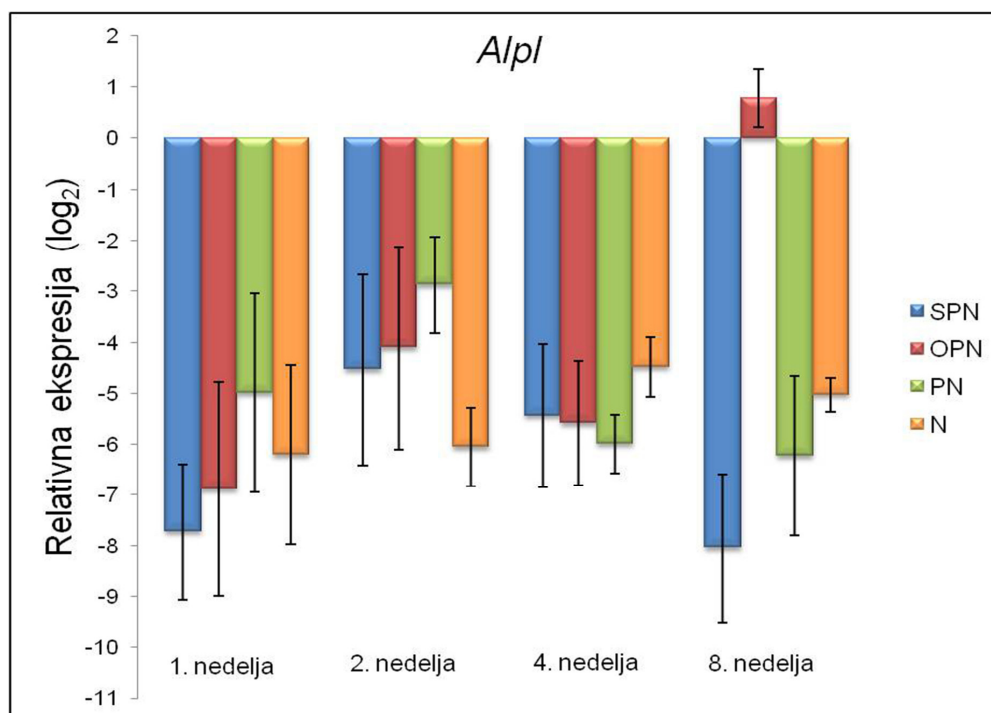
**Tabela 4.6.** Uporedna analiza ekspresije *Collal* između implantata ekstrahovanih u različitim terminima u okviru istih grupa.

Komparirani termini	Grupe			
	SPN	OPN	PN	N
1. ned./2. ned.	<b>0,029*</b>	0,343	<b>0,029*</b>	0,343
1. ned./4. ned.	0,114	0,686	1,000	0,114
1. ned./8. ned.	0,114	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,200
2. ned./4. ned.	0,686	1,000	<b>0,029*</b>	0,486
2. ned./8. ned.	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,343
4. ned./8. ned.	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,886

\*  $p < 0,05$

### Relativna ekspresija *Alpl*

Dinamika relativne ekspresije *Alpl* u implantatima eksperimentalnih grupa SPN, OPN, PN i N ekstrahovanim nakon prve, druge, četvrte i osme nedelje od implantacije, prikazana je na Slici 4.15. Srednje vrednosti relativne ekspresije *Alpl* sa standardnom devijacijom predstavljene su u odnosu na kalibrator i izražene kao  $\log_2$ .



**Slika 4.15.** Dinamika relativne ekspresije *Alpl* u implantatima eksperimentalnih grupa SPN, OPN, PN i N ekstrahovanim nakon prve, druge, četvrte i osme nedelje od implantacije.

U Tabeli 4.7. prikazani su rezultati *post hoc Mann-Withney* uporedne statističke analize relativne ekspresije *Alpl* između SPN, OPN, PN i N implantata u okviru svakog termina kada je vršena njihova ekstrakcija. Nakon prve nedelje od implantacije, ekspresija *Alpl* je bila negativna u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na kalibrator bez značajnih razlika među njima. Nakon druge nedelje od implantacije u PN grupi je zapažena značajno viša ekspresija *Alpl* ( $p < 0,05$ ) nego u kontrolnoj N grupi dok između ostalih grupa nisu zapažene značajne razlike. U terminima posle druge i četvrte nedelje od implantacije ekspresija *Alpl* u implantatima svih grupa je bila negativna u odnosu na kalibrator. Nakon četvrte nedelje od implantacije, znatno viša ekspresija *Alpl* ( $p < 0,05$ ) izmerena je u N grupi samo u odnosu na PN grupu. Posle osme nedelje u OPN grupi izmerena je pozitivna i značajno viša ekspresija *Alpl* ( $p < 0,05$ ) u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe. U ovom terminu značajno viša ekspresija *Alpl* ( $p < 0,05$ ) detektovana je u N grupi u odnosu na SPN grupu.

**Tabela 4.7.** Uporedna analiza ekspresije *Alpl* između implantata različitih grupa u okviru istih termina ekstrakcije.

Komparirane grupe	Termini			
	1. nedelja	2. nedelja	4. nedelja	8. nedelja
SPN/OPN	0,686	0,886	0,886	<b>0,029*</b>
SPN/PN	0,200	0,343	0,486	0,114
SPN/N	0,486	0,343	0,486	<b>0,029*</b>
OPN/PN	0,114	0,686	1,000	<b>0,029*</b>
OPN/N	0,686	0,343	0,486	<b>0,029*</b>
PN/N	0,486	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,686

\*  $p < 0,05$

U Tabeli 4.8. prikazani su rezultati *post hoc Mann-Whitney* uporedne statističke analize relativne ekspresije *Alpl* između implantata iz istih eksperimentalnih grupa koji su ekstrahovani u različitim terminima posle implantacije. U SPN grupi, značajno viša ekspresija *Alpl* ( $p < 0,05$ ) izmerena je nakon druge nedelje u odnosu na termine nakon prve nedelje od implantacije. Nakon četvrte i osme nedelje zapažen je pad ekspresije u odnosu na termin posle druge nedelje od implantacije koji nije značajan.

**Tabela 4.8.** Uporedna analiza ekspresije *Alpl* između implantata ekstrahovanih u različitim terminima u okviru istih grupa.

Komparirani termini	Grupe			
	SPN	OPN	PN	N
1. ned./2. ned.	<b>0,029*</b>	0,114	0,114	0,686
1. ned./4. ned.	0,114	0,343	0,343	0,200
1. ned./8. ned.	0,686	<b>0,029*</b>	0,343	0,343
2. ned./4. ned.	0,686	0,343	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>
2. ned./8. ned.	0,057	<b>0,029*</b>	<b>0,029*</b>	0,057
4. ned./8. ned.	0,057	<b>0,029*</b>	0,886	0,343

\*  $p < 0,05$

U OPN grupi nakon osme nedelje od implantacije zapažena je pozitivna i značajno viša ekspresija *Alpl* ( $p < 0,05$ ) u odnosu na sve ostale termine. Nakon prve, druge i četvrte nedelje od implantacije ekspresija je bila negativna u odnosu na kalibrator i nije se značajno menjala. U PN grupi ekspresija *Alpl* je bila negativna u odnosu na kalibrator i nije mnogo varirala. Nakon druge nedelje, izmerena je značajno viša ekspresija ( $p < 0,05$ ) u odnosu na termine nakon četvrte i osme nedelje od

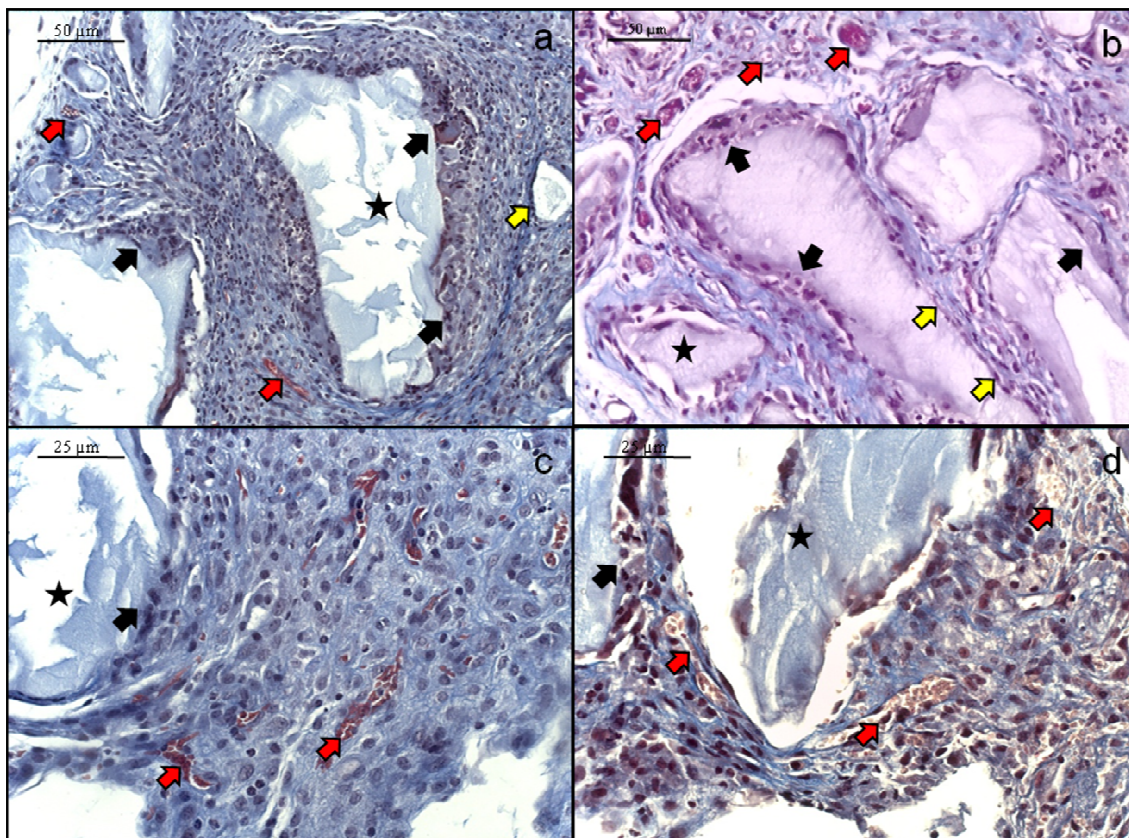
implantacije. U N grupi, nađena je povišena ekspresija nakon četvrte i osme nedelje, ali je značajno bila viša ( $p < 0,05$ ) jedino u četvrtoj nedelji u odnosu na drugu nedelju od implantacije.

#### 4.2.1.3. Histomorfološka analiza

Histomorfološka analiza je sprovedena na implantatima ekstrahovanim nakon druge (Slike 4.16. i 4.17.) i osme nedelje od implantacije (Slike 4.18. i 4.19.) čiji su isečci tretirani trihromnim bojenjem po *Masson*-u.

Nakon druge nedelje od implantacije, na isečcima implantata iz SPN i OPN grupe (Slika 4.16.) zapažena je opsežna celularizovanost uz prisustvo različitih tipova ćelija u poređenju sa PN i N grupama (Slika 4.17.). Prisustvo džinovskih višejedarnih ćelija koje nalikuju osteoklastima oko granula materijala karakteristično je za SPN i OPN implantate dok je ovakvih ćelija bilo primetno manje u implantatima PN i N grupa. Na ivicama granula materijala gde su zapažene ove ćelije, prisutni su znakovi resorpcije. U ovom terminu u svim tipovima implantata zapažaju se ćelije koje prema morfologiji i položaju nalikuju na osteoblaste.

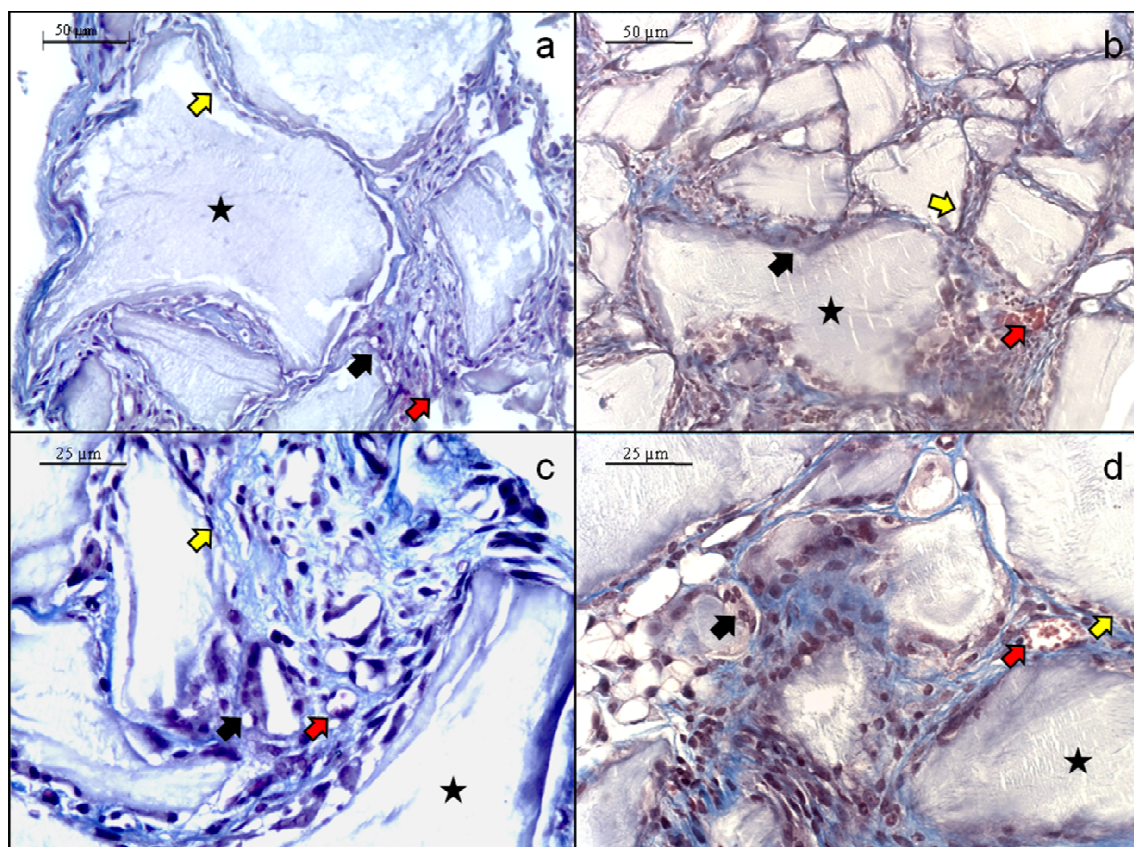




**Slika 4.16.** Histomorfološka analiza implantata ekstrahovanih nakon druge nedelje od implantacije: **a, c** - SPN grupa, **b, d** - OPN grupa. Crne strelice pokazuju višejedarne džinovske ćelije koje nalikuju osteoklastima. Crvene strelice pokazuju krvne sudove. Žute strelice pokazuju ćelije koje nalikuju osteoblastima. Zvezdice označavaju granule mineralnog koštanog matriksa - nosača. Trihromno bojenje po *Masson*-u. Uvećanje 200× (**a, b**) i 400× (**c, d**). Skala pokazuje 50 μm (**a, b**) i 25 μm (**c, d**).

U prostoru između granula materijala, prisustvo rastresito raspoređenih kolagenih vlakana zapaženo je u svim tipovima implantata. Međutim, kolageni matriks je najzastupljeniji u SPN i OPN implantatima, zatim u PN i najmanje u N implantatima. U ovom terminu, uočava se mnoštvo krvnih sudova manjeg volumena u infiltriranom tkivu SPN i OPN implantata, zapaženi su i u kontrolnim PN i N implantatima (Slike 4.16. i 4.17.). U implantatima svih eksperimentalnih grupa u ovom terminu uočeno je obimnije prisustvo sitnijih granula materijala u odnosu na implantate nakon osme nedelje od implantacije.

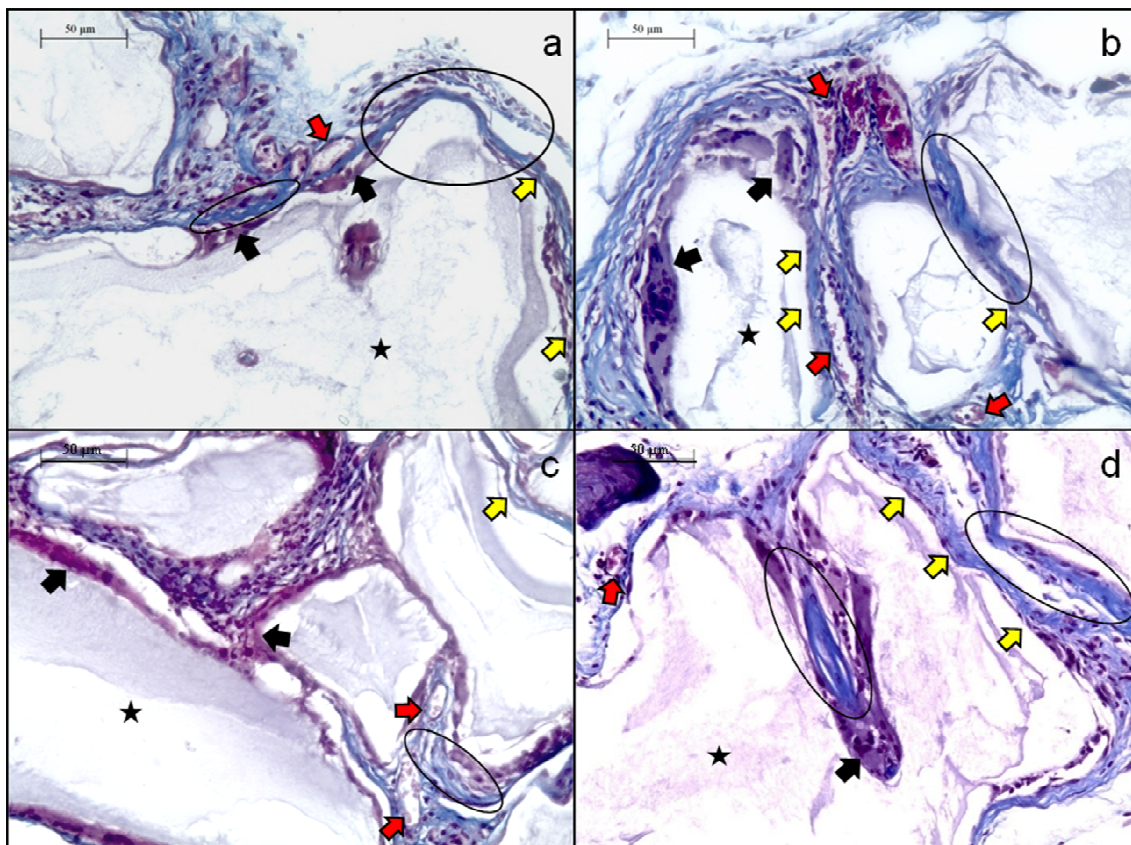




**Slika 4.17.** Histomorfološka analiza implantata ekstrahovanih nakon druge nedelje od implantacije: **a, c** - PN grupa, **b, d** - N grupa. Crne strelice pokazuju višejedarne džinovske ćelije koje nalikuju osteoklastima. Crvene strelice pokazuju krvne sudove. Žute strelice pokazuju ćelije koje nalikuju osteoblastima. Zvezdice označavaju granule mineralnog koštanog matriksa - nosača. Trihromno bojenje po *Masson*-u. Uvećanje 200× (**a, b**) i 400× (**c, d**). Skala pokazuje 50 μm (**a, b**) i 25 μm (**c, d**).

Nakon osme nedelje od implantacije u SPN i OPN implantatima (Slika 4.18.) zapaženi su znakovi obimne resorpcije granula materijala i prisutvo ćelija nalik osteoklastima što je bilo izraženije nego nakon druge nedelje od implantacije. Veliki infiltrati tkiva sa višejedarnim džinovskim ćelijama u granulama materijala, karakteristične su za OPN implantate. U PN i N implantatima (Slika 4.19.) ovakvih promena na materijalu je bilo primetno manje, a ćelije nalik osteoklastima su takođe bile prisustne uz ivice granula materijala. U PN i N implantatima vidljivi su znakovi degradacije uz prisustvo ćelijskog detritusa. Ćelije koje po morfologiji nalikuju osteoblastima sa krupnim okruglim jedrom, poređane u nizu na ivicama granula materijala najviše su prisutne u implantatima OPN i SPN grupa. Ćelije nalik

osteoblastima su u ovom terminu bile zastupljenije u implantatima nego nakon druge nedelje od implantacije.

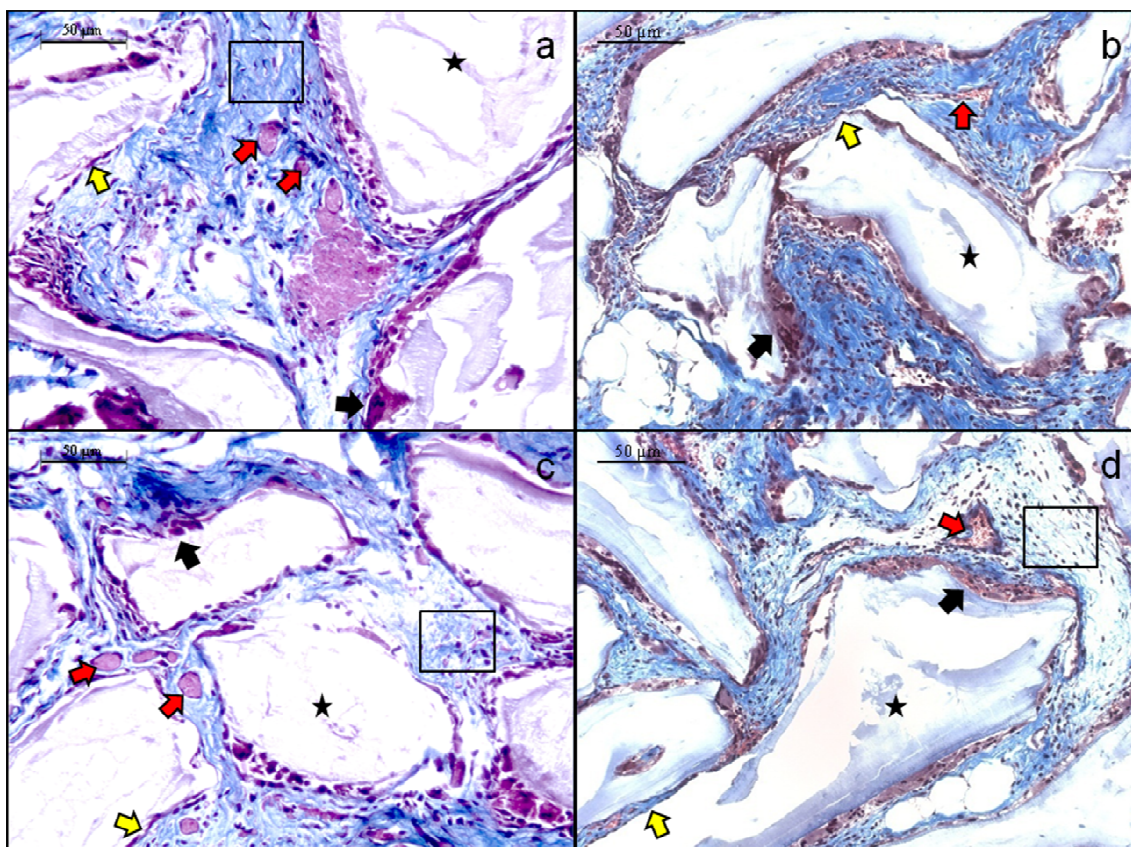


**Slika 4.18.** Histomorfološka analiza implantata ekstrahovanih nakon osme nedelje od implantacije: **a, c** - SPN grupa, **b, d** - OPN grupa. Crne strelice pokazuju višejedarne džinovske ćelije koje nalikuju osteoklastima. Crvene strelice pokazuju krvne sudove. Žute strelice pokazuju ćelije koje nalikuju osteoblastima. Zvezdice označavaju granule mineralnog koštanog matriksa - nosača. Elipse označavaju tkivo nalik osteoidu. Trihromno bojenje po *Masson*-u. Uvećanje 200×. Skala pokazuje 50 µm.

U kontrolnim grupama ćelije nalik osteoblastima su manje zastupljene nego u SPN i OPN implantatima. Pravilno raspoređena i gusto usnopljena vlakna kolagena koja formiraju tkivo nalik osteoidu, uočljiva su u SPN i OPN implantatima. Rastresito raspoređena kolagena vlakna, dominirala su u PN i N implantatima, usnopljena kolagena vlakna nisu zapažena u ovim grupama. Zastupljenost i volumen krvnih sudova u OPN i SPN implantatima je bila veća u odnosu na termin nakon druge nedelje. U ovom terminu u PN i N grupama zapaženi su krvni sudovi manjeg volumena nego u



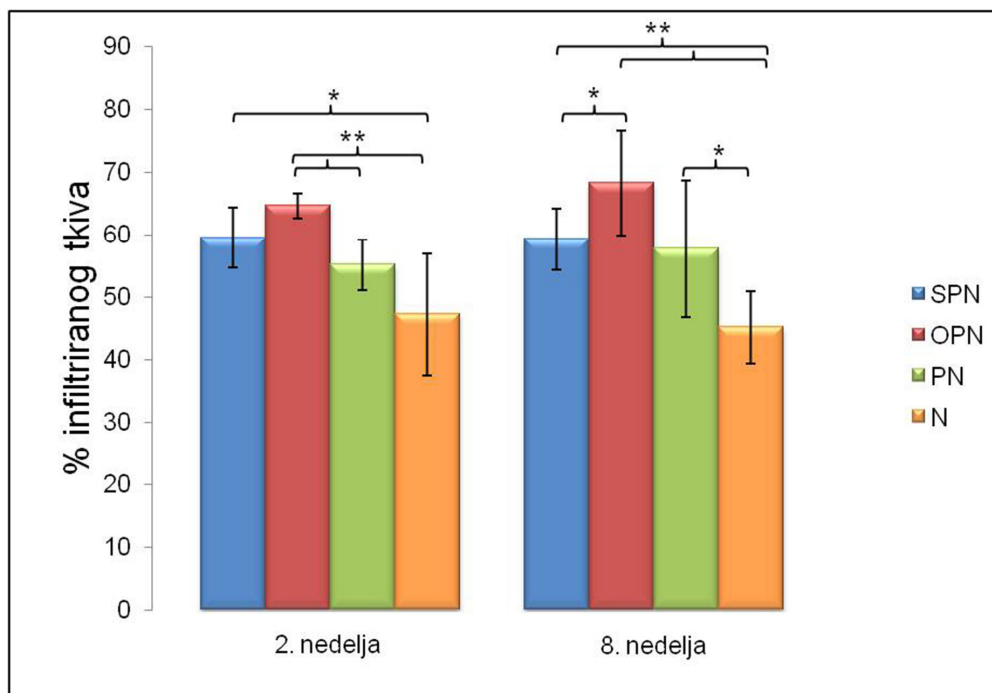
OPN i SPN. Takođe, zastupljenost i volumen krvnih sudova u PN i N implantatima se nakon osme nedelje uvećao u poređenju sa terminom nakon druge nedelje od implantacije, ali u mnogo manjoj meri nego u SPN i OPN implantatima.



**Slika 4.19.** Histomorfološka analiza implantata ekstrahovanih nakon osme nedelje od implantacije: **a, c** - PN grupa, **b, d** - N grupa. Crne strelice pokazuju višejedarne džinovske ćelije koje nalikuju osteoklastima. Crvene strelice pokazuju krvne sudove. Žute strelice pokazuju ćelije koje nalikuju osteoblastima. Zvezdice označavaju granule mineralnog koštanog matriksa - nosača. Kvadrati označavaju rastresito kolageno tkivo. Trihromno bojenje po *Masson*-u. Uvećanje 200×. Skala pokazuje 50 µm.

#### 4.2.1.4. Histomorfometrijska analiza

Procenat infiltriranog tkiva između granula BMM je dobijen histomorfometrijskom analizom SPN, OPN, PN i N implantata ekstrahovanih nakon druge i osme nedelje od implantacije, prikazan je na Slici 4.20.



**Slika 4.20.** Procenat infiltriranog tkiva u SPN, OPN, PN i N implantatima ekstrahovanih nakon druge i osme nedelje od implantacije. \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .

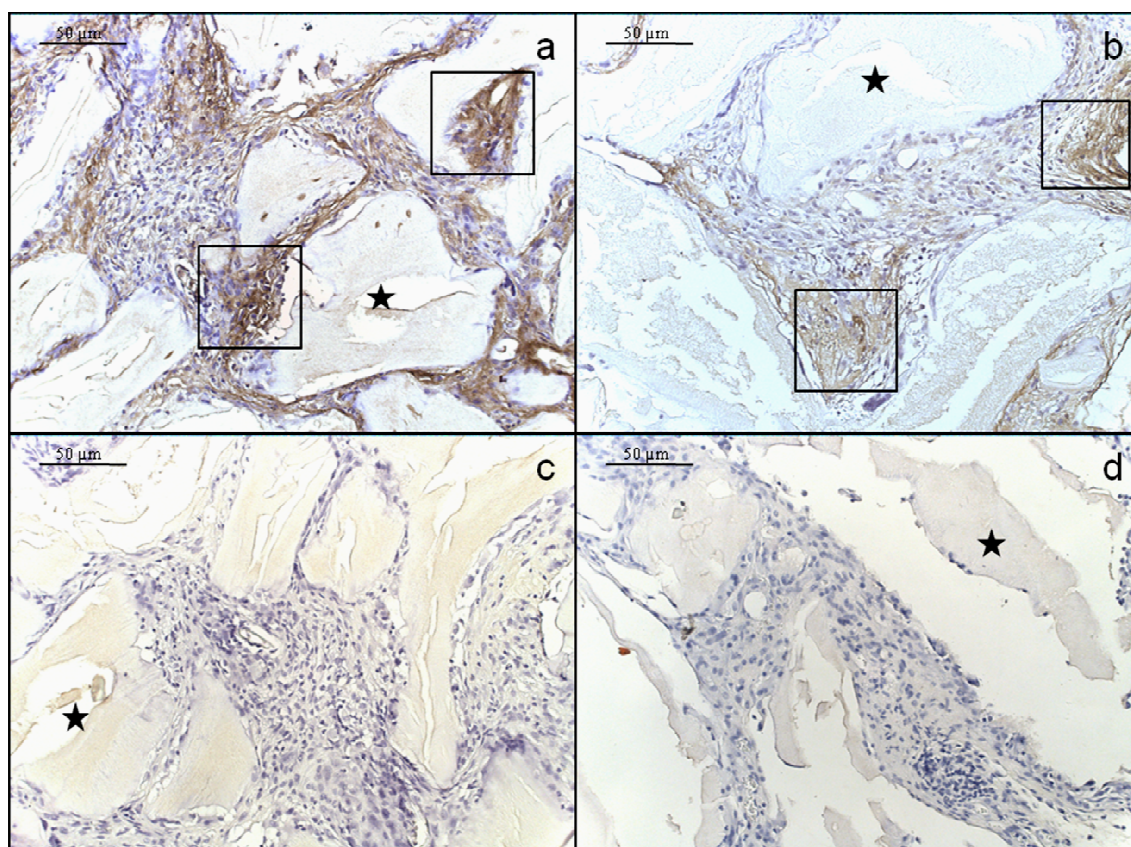
Procenat infiltriranog tkiva između granula BMM nakon druge nedelje od implantacije je najviši u OPN implantatima u odnosu na implantate ostalih eksperimentalnih grupa. Međutim, značajne razlike ( $p < 0,01$ ) utvrđene su između OPN i kontrolnih PN i N implantata. U SPN grupi izmerena vrednost je značajno viša ( $p < 0,05$ ) u odnosu na N grupu dok u odnosu na PN grupu razlika nije bila značajna. Najniže vrednosti procenta infiltriranog tkiva zapažene su u kontrolnim implantatima, a u PN grupi vrednost je bila viša u poređenju sa N implantatima, ali bez značajnih razlika.

U svim eksperimentalnim grupama osim u OPN, nakon osme nedelje od implantacije vrednosti procenta infiltriranog tkiva se nisu značajno promenile od termina nakon druge nedelje od implantacije, ali su se održale iste razlike među grupama. Procenat infiltriranog tkiva bio je najviši u OPN implantatima zatim u SPN, PN, a najniža vrednost je u N kontrolnoj grupi. Procenat infiltriranog tkiva u OPN implantatima je uvećan nakon osme nedelje u odnosu na termin posle druge nedelje od implantacije. Značajne razlike ( $p < 0,01$ ) uočene su u SPN i OPN implantatima u odnosu na implantate iz N grupe, a značajno viša vrednost nađena je i u PN u odnosu na N

grupu ( $p < 0,05$ ). Takođe, znatno viši procenat infiltriranog tkiva ( $p < 0,05$ ) u ovom terminu zapažen je u implantatima OPN u odnosu na implantate SPN grupe.

#### 4.2.1.5. Analiza imunoekspresije osteopontina

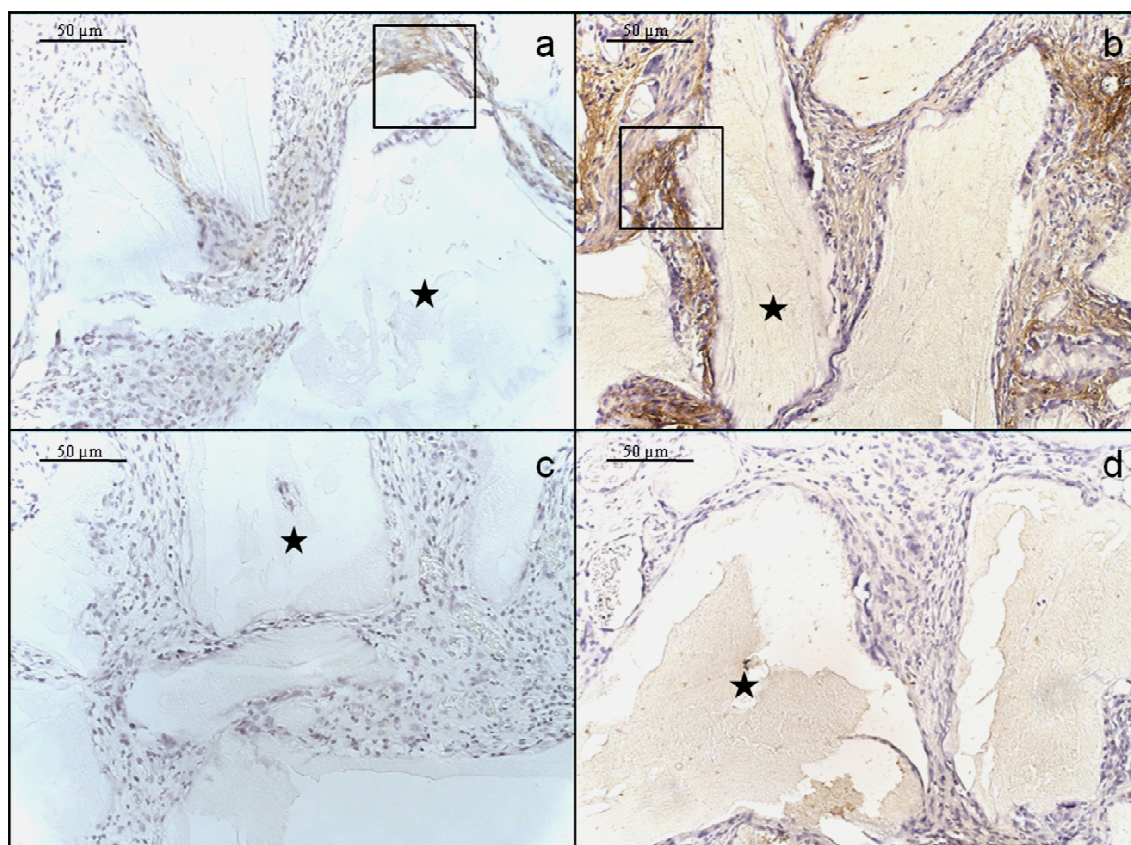
Imunoekspresija osteopontina urađena je na implantatima SPN, OPN, PN i N grupa ekstrahovanim nakon druge nedelje od implantacije i prikazana je na Slikama 4.21. i 4.22.



**Slika 4.21.** Ekspresija osteopontina (polja oivičena kvadratima) u implantatima ekstrahovanim nakon druge nedelje od implantacije u: **a** - SPN grupi; **b** - OPN grupi. Negativna kontrola (bez primarnog antitela): **c** - SPN grupa; **d** - OPN grupa. Zvezdice označavaju granule mineralnog koštanog matriksa - nosača. Uvećanje 200×. Skala pokazuje 50 μm.

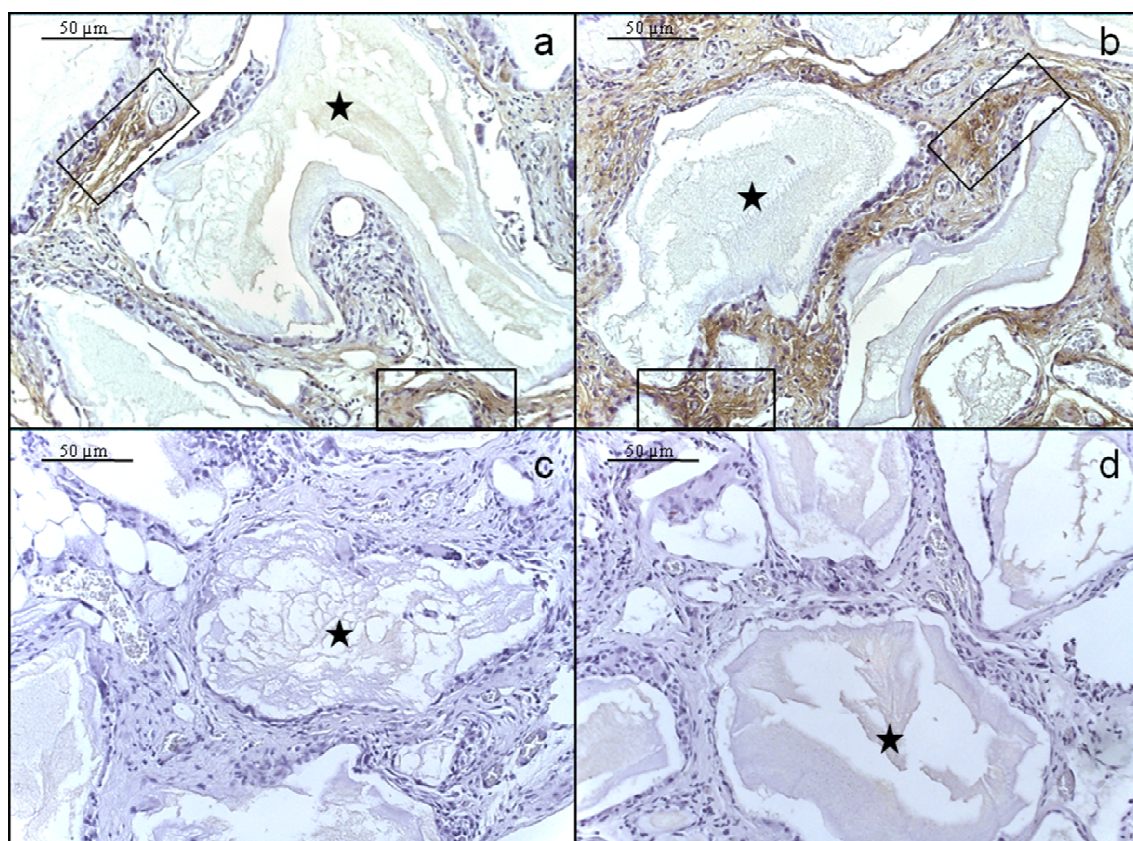


Kao jedan od karakterističnih markera koštanog tkiva i ćelija osteoblaste linije, ekspresija osteopontina može da se poveže sa procesom osteogeneze. U poređenju sa negativnom kontrolom, uzorkom koji nije tretiran primarnim antitelom (Slike 4.21.c,d i 4.22.c,d) zapažena je imunoekspresija osteopontina u implantatima svih eksperimentalnih grupa. Imunoekspresija osteopontina je bila najizraženija oko granula BMM, prvenstveno na mestima gde su prisutni znakovi resorpcije granula materijala. Takođe, imunoekspresija osteopontina je zapažena i u infiltriranom tkivu između granula BMM. Najjača imunoekspresija zapažena je u SPN (Slika 4.21.a), a zatim u OPN implantatima (Slika 4.21.b) dok je u implantatima grupa PN i N ekspresija bila slabija (Slika 4.22.a,b).



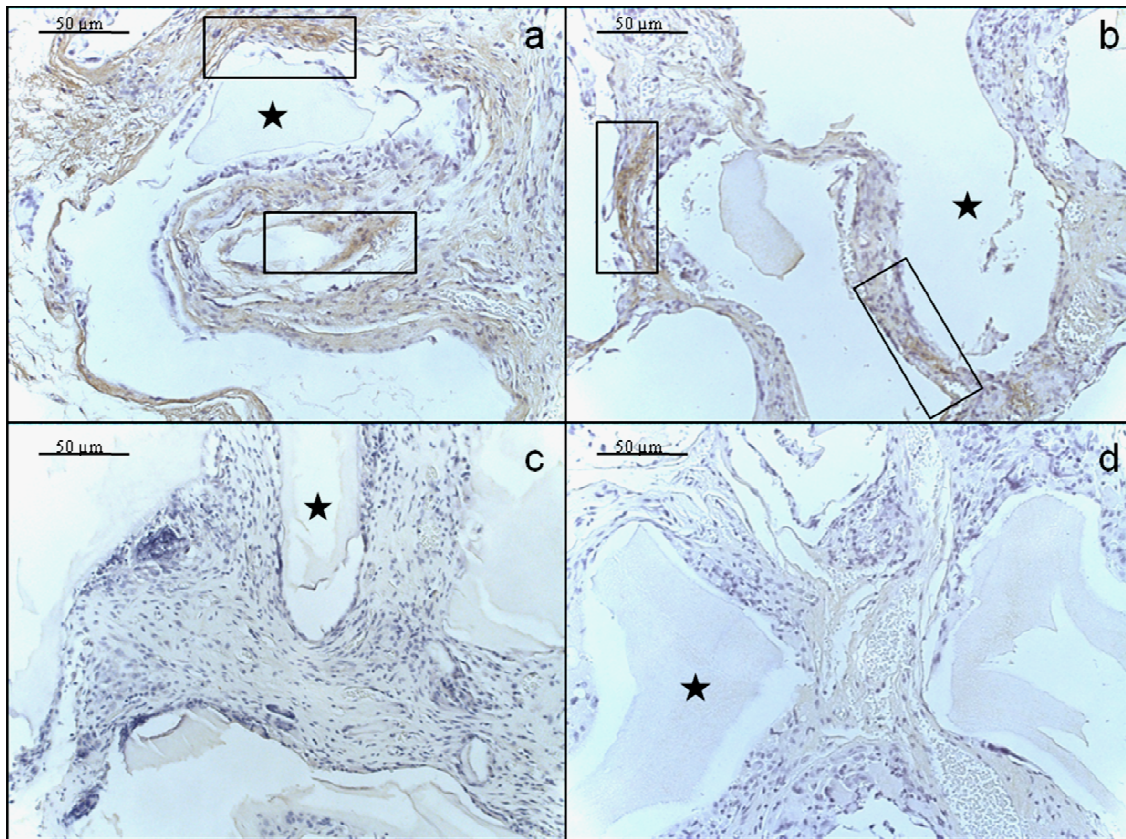
**Slika 4.22.** Ekspresija osteopontina (polja oivičena kvadratima) u implantatima ekstrahovanim nakon druge nedelje od implantacije u: **a** - PN grupi; **b** - N grupi. Negativna kontrola (bez primarnog antitela): **c** - PN grupa; **d** - N grupa. Zvezdice označavaju granule mineralnog koštanog matriksa - nosača. Uvećanje 200×. Skala pokazuje 50 µm.

Imunoekspresija osteopontina u implantatima SPN, OPN, PN i N grupa ekstrahovanim nakon osme nedelje od implantacije, prikazana je na Slikama 4.23. i 4.24. U poređenju sa negativnom kontrolom, uzorkom koji nije tretiran primarnim antitelom (Slike 4.23.c,d i 4.24.c,d) zapažena je imunoekspresija osteopontina u implantatima svih eksperimentalnih grupa. Najintenzivnija ekspresija osteopontina zapažena je oko granula BMM uglavnom na mestima gde su prisutni znakovi resorpcije, dok je nešto slabija ekspresija zapažena u infiltriranom tkivu između granula BMM. Najjača ekspresija zapažena je u OPN grupi (Slika 4.23.b), a zatim u SPN implantatima (Slika 4.23.a), dok je u implantatima grupa PN i N ekspresija bila znatno slabija (Slika 4.24.a,b).



**Slika 4.23.** Ekspresija osteopontina (polja oivičena pravougaonicima) u implantatima ekstrahovanim nakon osme nedelje od implantacije u: **a** - SPN grupi; **b** - OPN grupi. Negativna kontrola (bez primarnog antitela): **c** - SPN grupa; **d** - OPN grupa. Zvezdice označavaju granule mineralnog koštanog matriksa - nosača. Uvećanje 200×. Skala pokazuje 50 µm.





**Slika 4.24.** Ekspresija osteopontina (polja oivičena pravougaonicima) u implantatima ekstrahovanim nakon osme nedelje od implantacije u: **a** - PN grupi; **b** - N grupi. Negativna kontrola (bez primarnog antitela): **c** - PN grupa; **d** - N grupa. Zvezdice označavaju granule mineralnog koštanog matriksa - nosača. Uvećanje 200×. Skala pokazuje 50 μm.



## 5. DISKUSIJA

Brojne studije potvrđuju da su ADSC veoma dobar kandidat za tretman koštanih defekata baziran na upotrebi ćelija, prvenstveno zbog sposobnosti da brzo proliferišu i da se diferenciraju u osteoprogenitorne ćelije (Hicok i sar., 2004; Cowan i sar., 2004; Hattori i sar., 2006; Jeon i sar., 2008; Muller i sar., 2010; Scherberich i sar., 2010; Mehrkens i sar., 2012; Cvetković i sar., 2015). Nekoliko karakteristika posebno izdvaja ADSC dajući im prednost u odnosu na druge izvore MSC. ADSC se mogu dobiti u velikom broju prilikom izolacije (Scherberich i sar., 2007; Gimble i sar., 2007; Scherberich i sar., 2010), pa nije neophodno umnožavanje ćelija posle izolacije, dok je kod drugih MSC najčešće neophodno *in vitro* umnožavanje pre konačne primene. Postoje podaci da stromalna vaskularna frakcija, koja se dobija po izolaciji iz masnog tkiva, sadrži oko 500 puta više klonogenih osteoprogenitornih ćelija po 1 ml tkivnog volumena od aspirata koštane srži (Scherberich i sar., 2007; Scherberich i sar., 2010). U odnosu na druge izvore MSC, ADSC se duže održavaju u *in vitro* uslovima (Barba i sar., 2013) i znatno brže proliferišu (Cowan i sar., 2004), što pruža mogućnost da se jednostavnom *in vitro* kultivacijom ADSC lako odvoje iz heterogene SVF. Takođe, veoma je važno da se neinvazivnim metodama ADSC mogu jednostavno izolovati iz dostupnog masnog tkiva (Amini i sar., 2012), nasuprot metodi za izolaciju ćelija iz koštane srži.

Pokazano je da je diferencijacija transplantiranih ADSC ka osteoprogenitornim ćelijama moguća u *in vivo* uslovima, pod uticajem faktora rasta i diferencijacije i osteoinduktivnih svojstava nosača sa kojima se tom prilikom ćelije kombinuju (Goto i sar., 2006; Liu i sar., 2008b; Jakob i sar., 2012). Poznato je da ovako primenjene ADSC podstiču osteogenezu u ortotopičnim (Vergroesen i sar., 2011) i ektopičnim uslovima (Muller i sar., 2010). Ovakav pristup gde se u jednom koraku ADSC mogu izolovati, pripremiti i aplikovati u roku od nekoliko sati poznat je i kao intraoperativni pristup (Muller i sar., 2010). S druge strane, uobičajen pristup se sprovodi u više koraka i podrazumeva izolaciju, kultivaciju, *in vitro* osteoindukciju i na kraju primenu tako pripremljenih ADSC (Hicok i sar., 2004; Cowan i sar., 2004; Hattori i sar., 2006;

Cvetković i sar., 2015). Međutim, još uvek nema dovoljno podataka o tome kolike su razlike u osteogenom potencijalu između sveže izolovanih ADSC i *in vitro* umnoženih i osteoindukovanih ADSC. Osnovni cilj ove disertacije jeste upravo da se dobiju odgovori na ova otvorena pitanja. Odgovori o razlikama u osteogenom potencijalu ADSC koje su upotrebljene na dva različita načina su od značaja za donošenje odluke kom pristupu treba dati prednost za potencijalnu primenu u tretmanu koštanih defekata.

### 5.1. Analiza *in vitro* istraživanja

Pre postavke *in vivo* eksperimenta bilo je neophodno dobiti sveže izolovane i *in vitro* osteoindukovane ADSC. Pokazano je da se mezenhimske matične ćelije mogu podjednako uspešno dobiti iz potkožnog i viscelarnog masnog tkiva (Peptan i sar., 2006; Amini i sar., 2012). U našem istraživanju, korišćene su ADSC koje su izolovane iz supraepididimalnog belog masnog tkiva, jer je pokazano da ADSC iz viscelarnog masnog tkiva imaju veći osteogeni potencijal od ADSC koje potiču iz potkožnog masnog tkiva (Peptan i sar., 2006). Iako je izolacija izvršena po već utvrđenom protokolu (Sung i sar., 2008, Cvetković i sar., 2015; Najdanović i sar., 2015), potvrda prisustva ADSC u heterogenoj SVF, prvoj ćelijskoj frakciji koja se dobija nakon izolacije iz masnog tkiva, bio je jedan od neophodnih koraka u ostvarenju ciljeva ove disertacije.

Neposredno nakon izolacije, imunocitohemijskom analizom pokazano je da većina ćelija sadržanih u sveže izolovanoj SVF eksprimira CD29 i da ne eksprimira CD14 marker. Ovakav specifičan obrazac ekspresije CD29 i CD14 karakteristika je mišijih ADSC (Dominici i sar., 2006; Liu i sar., 2012; Cai i sar., 2012; Cvetković i sar., 2015; Najdanović i sar., 2015), što ukazuje da sveže izolovana SVF sadrži ADSC. Ovako dobijene ADSC koje su sadržane u sveže izolovanoj SVF korišćene su za pripremu SPN implantata kao i za uspostavljanje ćelijske kulture, što je bilo neophodno za dobijanje osteoindukovanih ADSC koje su korišćene za pripremu implantata OPN grupe.

U uspostavljenoj ćelijskoj kulturi nakon zasejavanja SVF, posle trećeg pasaža, najveći deo ćelija bio je vretenastog oblika i nalikovao je fibroblastnim ćelijama, što je karakteristika mezenhimskih matičnih ćelija (Dominici i sar., 2006; Cai i sar., 2012; Barba i sar., 2013). Ćelije su pokazale da poseduju odličnu proliferativnu sposobnost i da dobro adheriraju za dno suda u kojem su gajene *in vitro*, što je takođe karakteristično za ADSC (Cai i sar., 2012; Barba i sar., 2013; Bourin i sar., 2013). Na ovom nivou, imunocitohemijskom analizom potvrđeno je da većina ćelija eksprimira CD29 i ne eksprimira CD14 marker. Grupe ćelija koje ekspimiraju CD29 su bile veoma rasprostranjene u ćelijskoj kulturi, dok u sveže izolovanoj SVF nije bilo moguće uočiti ovako grupisane, već odvojene ćelije pozitivne na CD29, ali i druge ćelije koje su CD29 negativne. Takvi nalazi ukazuju da su se ADSC *in vitro* kultivacijom umnožile, formirale grupe i u velikoj meri "prečistile" iz heterogene ćelijske populacije SVF. Nakon što je kultura ADSC uspešno uspostavljena, ćelije su podvrgnute osteogenoj indukciji.

Umnožavanje i osteogena indukcija ćelija u *in vitro* uslovima su postupci koji najčešće prethode konačnoj primeni ADSC za tretman koštanih defekata (Huang i sar., 2002; Cowan i sar., 2004; Hattori i sar., 2006). U tom smislu, u našoj studiji su implantati OPN grupe sadržali ADSC, koje su prethodno *in vitro* umnožene i osteogeno indukovane. Prema literaturnim podacima, ADSC se mogu *in vitro* indukovati ka osteoprogenitornim ćelijama za dve nedelje (Huang i sar., 2002), a po nekim podacima za dve do tri nedelje (Halvorsen i sar., 2001; Zuk i sar., 2002; Fraser i sar., 2006) ili tri do četiri nedelje (Pittenger i sar., 1999; Beni i sar., 2013; Daei-farshbaf i sar., 2014). Zato su u ovom eksperimentu ADSC, posle prethodnog *in vitro* umnožavanja, bile podvrgnute osteogenoj indukciji dvadeset jedan dan i pri tom je njihov stepen osteogene diferencijacije analiziran u više vremenskih termina tokom perioda indukcije.

Poznato je da *in vitro* osteogena indukcija mezenhimskih ćelija podstiče ekspresiju markera osteogeneze: osteriksa, alkalne fosfataze, osteokalcina, kolagena tipa I, osteopontina i depoziciju fosfata (Halvorsen i sar., 2001; Zuk i sar., 2001; Zuk i sar., 2002; Beni i sar., 2013). Shodno tome, da bi se utvrdio stepen diferencijacije ADSC, sprovedena je analiza dinamike i obrasca relativne ekspresije gena markera osteogeneze trećeg, sedmog, desetog, dvanaestog, petnaestog i dvadeset prvog dana *in vitro*

osteogene indukcije. Analizirana je ekspresija *Sp7* i *Bglap*, karakterističnih za ćelije osteoblastne linije (Bourin i sar., 2013), zatim *Coll1a1* kao nespecifičnog, ali takođe važnog markera osteogeneze (Bonadio i sar., 1990; Huang i sar., 2007a) i forme alkalne fosfataze (*Alp*) koja se eksprimira u tkivu jetre, koštanom i bubrežnom tkivu (*Alpl*), koja se često analizira kada se ispituje osteogeni proces i diferencijacija osteoprogenitornih ćelija (Mathews i sar., 2012; Schwarting i sar., 2015; Cvetković i sar., 2015). Od trećeg do petnaestog dana osteogene indukcije ADSC, zapažen je postepeni porast ekspresije *Sp7*, *Bglap*, *Coll1a1* i *Alpl* dok je petnaestog dana zapažena najviša ekspresija, ali je dvadeset prvog dana ekspresija značajno opala u odnosu na petnaesti dan. Rezultati ukazuju da je frakcija ADSC koja je izvedena iz SVF imala nižu ekspresiju *Sp7* i *Alpl* do dvanaestog dana, *Bglap* do petnaestog dana i *Coll1a1* do sedmog dana osteogene indukcije u odnosu na sveže izolovanu SVF kao početnu ćelijsku populaciju. Pojava da ćelije "prigušuju" ili smanjuju ekspresiju gena kada im se promeni sredina opisana je ranije (Lian i Stein, 1995), čime se mogu objasniti dobijeni rezultati. U prilog ovom objašnjenju ide i rezultat o povišenoj ekspresiji *Sp7*, *Bglap*, *Coll1a1* i *Alpl* u sveže izolovanoj SVF u odnosu na uspostavljenu ćelijsku kulturu ADSC nakon trećeg pasaža od zasejavanja SVF neposredno pre podvrgavanja osteogenoj indukciji. Posle perioda adaptacije i pod uticajem osteogenog medijuma, nakon petnaest dana *in vitro* osteogene indukcije, ADSC su pokazale značajno povišenu ekspresiju *Sp7*, *Bglap*, *Coll1a1* i *Alpl* u odnosu na sveže izolovanu SVF kao početnu ćelijsku populaciju.

Dobijeni rezultati o obrascu ekspresije analiziranih markera osteogeneze u *in vitro* uslovima slični su literaturnim podacima. Za ekspresiju *Coll1a1* karakteristično je da se pokreće ranije (Huang i sar., 2007a), još za vreme faze proliferacije ćelija, a zatim se održava na određenom nivou tokom diferencijacije ćelija i osteogeneze (Lian i Stein, 1995). Rezultati naše studije su pokazali da se ekspresija *Coll1a1* tokom *in vitro* osteogene indukcije pokreće pre ostalih analiziranih gena markera, što je uporedivo sa literaturnim podacima. Smanjena ekspresija *Sp7* i *Alpl* nakon nedelju dana zapažena je kod humanih MSC gajenih *in vitro* (Sollazzo i sar., 2010), što se takođe slaže sa našim dobijenim rezultatima na mišijim ADSC. Osteriks je neophodan za osteoblastogenezu (Nakashima i sar., 2002), jer je on specifičan transkripcioni faktor za osteoblaste koji aktivira veliki broj gena u genetskom programu formiranja koštanog tkiva. Pokazano je da osteriks aktivira gene za alfa lanac kolagena tipa I, osteokalcin, osteopontin, alkalnu

fosfatazu i druge (Sinha i Zhou, 2013). Ekspresije ovih gena povećane su u mišijim ADSC koje ekspimiraju osteriks (Wu i sar., 2007). Takav obrazac je sličan onome koji je nađen u našoj *in vitro* studiji gde je ekspresija *Sp7* pokrenuta ranije tokom *in vitro* osteogene indukcije u poređenju sa ekspresijama *Alpl* i *Bglap*. Međutim, ekspresija *Colla1* je pokrenuta pre *Sp7* što može da se objasni time što *Colla1* nije usko specifičan marker osteogeneze kao osteokalcin i osteriks (Bonadio i sar., 1990; Huang i sar., 2007a), a samim tim verovatno može da ga aktivira i neki drugi regulatorni faktor, nezavisno od osteriksa. Osteokalcin se eksprimira u postproliferativnoj fazi osteoprogenitornih ćelija u *in vitro* uslovima (Owen i sar., 1990), a to se slaže sa dinamikom ekspresije *Bglap* u našoj studiji. Slično, zaključeno je da se inhibicija ekspresije gena za osteokalcin i alkalnu fosfatazu javlja nedelju dana nakon *in vitro* kultivacije MSC iz periferne krvi (Sollazzo i sar., 2010), što je uporedivo sa našim rezultatima o ekspresiji ovih gena kod *in vitro* osteoindukovanih ADSC. Još jedna studija kod ćelija strome koštane srži, gajenih *in vitro* u osteogenom medijumu, je dala slične rezultate da se ekspresija alkalne fosfataze indukuje pre nego ekspresija osteokalcina (Lian i sar., 1989; Huang i sar., 2007b). Poređenjem rezultata dobijenih u ovoj studiji sa literaturnim podacima može se zaključiti da se obrasci i dinamika ekspresije analiziranih gena ne razlikuju puno kod različitih tipova MSC podvrgnutih *in vitro* osteogenoj indukciji, već naprotiv da su vrlo slični kada je u pitanju proces njihove diferencijacije u ćelije osteoblastne linije.

Tokom osteogene indukcije u našim eksperimentima ADSC su imale fibroblastoliki izgled koji je karakterističan za mezenhimske matične ćelije (Dominici i sar., 2006; Barba i sar., 2013). Zapaženo je formiranje mineralnih kristalnih struktura u ekstracelularnom matriksu petnaestog dana osteogene indukcije, što može biti jedan od znakova diferencijacije ADSC ka osteoprogenitornim ćelijama. Petnaestog dana indukcije zapaženo je da su ćelije dostigle vrhunac rasta u kulturi formirajući grupacije širom suda u kojem su gajene dok je dvadeset prvog dana došlo do značajnog smanjenja rasta ADSC.

Kao potvrda stepena osteogene diferencijacije ADSC nakon petnaest dana, primenjene su imunocitohemijska analiza ekspresije osteopontina i citohemijsko bojenje metodom *Von Kossa* za vizuelizaciju fosfatnih depozita. Rezultati imunocitohemijske

analize pokazali su da su ADSC petnaestog dana osteoindukcije eksprimirale osteopontin, jedan od markera ćelija osteoblastne linije (Kirkham i Cartmell, 2007; Standal i sar., 2004). Slično tome, nađeno je da *in vitro* osteoindukovane ADSC povećavaju ekspresiju osteopontina između sedmog i dvadeset prvog dana (Elisa i sar., 2009). Takođe, u našem istraživanju je utvrđeno da petnaestog dana osteogene indukcije ADSC formiraju depozite fosfata, nalik osteoprogenitornim ćelijama. Ovo prisustvo mineralnih depozita se može dovesti u vezu sa detektovanom povišenom ekspresijom *Alpl* i *Bglap*. Ranije je objavljeno da povećana ekspresija alkalne fosfataze i osteokalcina može biti povezana sa inicijacijom mineralizacije (Owen i sar., 1990; Orimo, 2010), što je karakteristika ćelija osteoblastne linije.

Dobijeni rezultati iz dela *in vitro* istraživanja nedvosmisleno ukazuju da su ADSC koje su bile podvrgnute *in vitro* osteogenoj indukciji na petnaest dana uspešno pokrenule diferencijaciju ka ćelijama osteoblastne linije, što je bio važan preduslov za jedan od osnovnih ciljeva ove disertacije. Zato su ADSC koje su *in vitro* osteogeno indukovane na petnaest dana i ADSC sadržane u sveže izolovanoj SVF upotrebljene za formiranje dve osnovne eksperimentalne grupe implantata za *in vivo* studiju, OPN i SPN grupe.

## 5.2. Analiza *in vivo* istraživanja

Uprkos težnji da se u *in vitro* uslovima što vernije reprodukuje fiziološka sredina živog organizma za svrhu eksperimenta, još uvek su *in vivo* eksperimenti nezamenljivi za pretkliničke analize (Lopez i Daigle, 2013; Im, 2013). Jedan od ključnih momenata prilikom dizajniranja *in vivo* eksperimenta jeste odabir adekvatnog modela shodno postavljenim ciljevima (Cvetkovic i sar., 2013). Dva osnovna tipa modela za ispitivanje osteogenog potencijala komponenti koje potencijalno mogu da se upotrebe za tretman koštanih defekata su ortotopični i ektopični modeli. Ortotopični modeli podrazumevaju implantacije direktno u koštano tkivo na mesto veštački napravljenog defekta koštanog tkiva. Najčešće se koriste modeli na kalvariji (pljosnate kosti krova lobanje) (Cowan i sar., 2004) ili dugim kostima ekstremiteta eksperimentalnih životinja (Hao i sar., 2010;

Niemeyer i sar., 2010), kao što su psi, koze, ovce, kunići, a takođe i sitniji glodari, prvenstveno pacovi, gde je moguće u određenim kostima napraviti defekt kritične veličine. Ovi modeli omogućavaju da se proceni osteogeni kapacitet komponenata konstrukta (implantata) u prirodnom okruženju koštanog tkiva (Scott i sar., 2011). Međutim, mikrosredina samog koštanog tkiva domaćina može maskirati efekat ispitivanog konstrukta koji se implantira na ortotopično mesto. Uticaj bliskog prisustva osteoprogenitornih ćelija iz koštanog tkiva, stimulišuća mehanotransdukcija, prisustvo citokina i drugih faktora, koji normalno deluju u takvoj sredini, redukovani su ili potpuno odsutni u ektopičnim uslovima (Scott i sar., 2011). Zato ektopični model omogućava objektivnu procenu osteogenog potencijala ispitivanog konstrukta, jer se implantacije vrše najčešće u mišić ili potkožno (Scott i sar., 2011) van uticaja mikrosredine koštanog tkiva (Scherberich i sar., 2007). Najčešće se praktikuju subkutane implantacije koje se jednostavno mogu izvesti gotovo na svakom sisarskom modelu, ali se najčešće za tu svrhu koriste sitni glodari kao što su miševi (Goto i sar., 2006; Scott i sar., 2011; Cvetković i sar., 2015; Najdanović i sar., 2015). Ovim pristupom se životinje praktično koriste kao inkubatori u kojima su prisutni različiti faktori iz organizma, što predstavlja realniju mikrosredinu nego što je to slučaj sa inkubacijom u *in vitro* uslovima. Model ektopične osteogeneze je korišćen u našoj studiji, sa ciljem da se objektivno proceni osteogeni kapacitet različito pripremljenih mezenhimskih matičnih ćelija belog masnog tkiva.

Prema brojnim literaturnim podacima, upotreba ADSC za tretman koštanih defekata podrazumeva da se one prethodno *in vitro* umnože i osteogeno indukuju (Huang i sar., 2002; Cowan i sar., 2004; Hattori i sar., 2006; Fraser i sar., 2006). Na taj način se ADSC izdvajaju iz heterogene SVF i usmeravaju na diferencijaciju ka osteoprogenitornim ćelijama. Tek nakon toga, ovako pripremljene ADSC se kombinuju sa koštanim zamenicima i faktorima rasta i diferencijacije neposredno pre konačne primene. Celokupan ovakav postupak zahteva dodatni utrošak materijala za pripremu ćelija i traje nekoliko nedelja od izolacije ćelija do konačne primene pripremljenih konstrukata. Međutim, nedavno je pokazano da ADSC koje su sadržane u sveže izolovanoj SVF bez prethodnog *in vitro* umnožavanja i osteogene indukcije takođe poseduju osteogeni potencijal (Scherberich i sar., 2010; Muller i sar., 2010; Vergroesen i sar., 2011; Mehrkens i sar., 2012). To omogućava da se celokupna procedura završi u

samo jednom koraku u roku od nekoliko sati uz minimalnu invazivnost i intervenciju (Scherberich i sar., 2010; Muller i sar., 2010; Mehrkens i sar., 2012), što je poznato i kao intraoperativna metoda. Izostavljanje *in vitro* umnožavanja ADSC zasniva se na činjenici da se ove ćelije mogu dobiti u velikom broju prilikom izolacije (Scherberich i sar., 2007; Gimble i sar., 2007; Scherberich i sar., 2010) i da je diferencijacija ADSC ka osteoprogenitornim ćelijama moguća i u *in vivo* uslovima nakon njihove transplantacije pod stimulativnim uticajem faktora rasta i diferencijacije i osteoinduktivnih svojstava nosača sa kojima se tom prilikom kombinuju (Goto i sar., 2006; Jakob i sar., 2012; Liu i sar., 2008b). Prednost ovog pristupa je velika u smislu uštede materijala i vremena, a takođe i zbog jednostavnosti izvođenja same procedure. I jedan i drugi način pripreme ADSC imaju i prednosti i mane, ali ono što je zajedničko za ADSC pripremljene na oba načina jeste da poseduju osteogeni potencijal. Jedan od glavnih ciljeva ove disertacije je zato bio da se direktno uporede osteogeni potencijali sveže izolovanih i *in vitro* umnoženih i osteoindukovanih ADSC, jer o tome nema literaturnih podataka. Slično našim zapažanjima jesu konstatacije drugih istraživača da nema studija o poređenju osteogenog potencijala različito pripremljenih i primenjenih mezenhimskih matičnih ćelija (Gimble i sar., 2011; Agnieszka i sar., 2013). Rešavanje ovog problema je veoma važno zbog mogućnosti unapređenja metoda u tretmanu koštanih defekata, kao i razjašnjenja koji način pripreme ADSC i pod kojim uslovima predstavlja bolji terapijski izbor. Zato je ovo istraživanje kreirano tako da se pod istim uslovima ispita i uporedi ektopični osteogeni potencijal ADSC sadržanih u sveže izolovanoj SVF i *in vitro* umnoženih i osteoindukovanih ADSC.

Poznato je da broj i gustina ćelija može da utiče na ukupni osteogeni kapacitet konstrukta namenjenog reparaciji koštanog tkiva (Sumanasinghe i sar., 2009). Zato je odnos broja ADSC i veličine pripremljenih implantata SPN i OPN grupe u našem istraživanju bio sličan onim koji su preporučeni u literaturi (Cowan i sar., 2004; Liu i sar., 2008a; Tu i sar., 2009; Niemeyer i sar., 2010). Tačnije, svaki implantat zapremine od  $\sim 0,02 \text{ cm}^3$  i težine  $\sim 10 \text{ mg}$  je sadržao oko  $5 \times 10^4$  ćelija. Intraoperativna procedura podrazumeva da se odmah nakon izolacije, sveže izolovane ADSC sadržane u SVF postave na nosač (biomaterijal) i ostave 10-15 minuta na sobnoj temperaturi da bi adherirale (Helder i sar., 2007; Muller i sar., 2010; Jurgens i sar., 2011) i da bi se formirala fibrinska vlakna iz aktivirane PRP pre implantacije. Da bi uslovi bili potpuno



jednaki, implantati svih eksperimentalnih grupa su nakon pripreme ostavljeni na sobnoj temperaturi 10-15 minuta pre nego što su implantirani.

PRP je u našem istraživanju korišćena kao nepromenljivi deo implantata SPN, OPN grupa i kontrolne PN grupe, koji je sa granulama BMM činio nosač za ćelije. Formirana fibrinska vlakna iz PRP-a poput "biološkog lepka" poboljšavaju vezivanje ćelija za granule materijala (Fang i sar., 2003; Freymiller i Aghaloo, 2004; Malicev i sar., 2007; Lee i sar., 2008; Liu i sar., 2008b; Muller i sar., 2010; Mehrkens i sar., 2012). Takođe, aktivirana PRP oslobađa biološke faktore (Intini, 2009) koji podstiču diferencijaciju i proliferaciju MSC, što konačno može da dovede do indukcije osteogenog procesa (Vogel i sar., 2006; Liu i sar., 2008b; Kasten i sar., 2008b; Cervelli i sar., 2010). U ovoj studiji, konačni udeo aktivirane PRP u tečnoj fazi po svakom implantatu SPN, OPN i PN grupe bio je 10% (v/v), jer u kombinaciji sa osteoprogenitornim ćelijama takav udeo PRP-a je ranije pokazao najbolje rezultate (Liu i sar., 2008b; Murphy i sar., 2011; Man i sar., 2012). Poznato je da različite koncentracije trombocita u PRP-u mogu različito da utiču na osteoprogenitorne ćelije i osteogeni proces. Manje koncentracije mogu biti nedovoljne, a veće koncentracije mogu imati čak i inhibitorni efekat (Tanaka i sar., 2003; Weibrich i sar., 2004; Intini, 2009; DeLong i sar., 2011). Zato je koncentracija trombocita u pripremljenoj PRP, koja je korišćena za pripremu implantata grupa SPN, OPN i PN, bila oko 4 puta veća od fiziološke koncentracije trombocita karakteristične za miševе (Longmore i sar., 1993), jer je ranije pokazano da takva koncentracija deluje stimulatивно na proliferaciju MSC (Marx, 2004) i preporučena je kao optimalna (Weibrich i sar., 2004; Intini, 2009; DeLong i sar., 2011). Takođe, dodavanjem PRP-a implantatima težilo se da se simuliraju prirodni uslovi koji inače nastaju prilikom povrede tkiva i prilikom hirurške intervencije. U vezi sa tim, zaključeno je da je sveže izolovanim ADSC neophodan dodatak osteogenih faktora kako bi se podržala diferencijacija ćelija u osteoblaste u ektopičnim uslovima (Scherberich i sar., 2010; Muller i sar., 2010; Mehrkens i sar., 2012). Aktivirani trombociti koji se nađu na mestu povrede u roku od desetak minuta otpuste 70-95% bioloških faktora, a ostatak se oslobodi u narednih nedelju dana (Dovi i sar., 2003; DeLong i sar., 2011; Brogkini i sar., 2011), pa smo pretpostavili da će se tako dešavati i u implantatima. Pod uticajem oslobođenih faktora odigrava se niz aktivnosti kao što su regrutacija ćelija (Cervelli i sar., 2009), proliferacija,

diferencijacija ćelija u implantatima (Intini, 2009), depozicija kolagena i formiranje krvnih sudova (DeLong i sar., 2011; Broggin i sar., 2011), što konačno može da indukuje osteogenezu. U našem istraživanju, ideja je bila da se iskoriste navedene osobine PRP-a i da se pomoću nje stimulišu implantirane ADSC koje bi u kasnijim fazama trebalo da preuzmu primarnu ulogu u "upravljanju" osteogenim procesom u ektopičnim implantatima.

Koštani zamenici od neorganskog materijala kao što su  $\beta$ -trikalcijum fosfat i prirodni mineralni koštani matriks najvernije imitiraju mikrosredinu koštanog tkiva (Storgard-Jensen i sar., 1996; Hattori i sar., 2006). Jedan od najčešće korišćenih i ispitivanih koštanih zamenika u kliničkoj praksi je deproteinizovani mineralni koštani matriks goveđe kosti, komercijalnog naziva Bio-Oss<sup>®</sup> (Freymiller i Aghaloo, 2004; Mooren i sar., 2007; Sollazzo i sar., 2010; Mooren i sar., 2010; Daei-farshbaf i sar., 2014, Barbeck i sar., 2014; Cvetković i sar., 2015; Najdanović i sar., 2015). Granule Bio-Oss<sup>®</sup> imaju poroznost 70% - 80% sa kristalima veličine oko 10 nm između kojih je rastojanje 3 - 26 nm i makroporama 300 - 1500  $\mu$ m veličine (Storgard-Jensen i sar., 1996; Peetz, 1997; Berglundh i sar., 1997). Poroznost ovog materijala omogućava formiranje krvnih sudova i naseljavanje osteoprogenitornim ćelijama što je preduslov za uspešnu osteogenezu (Jensen i sar., 1996; Scherberich i sar., 2010). Poznato je da se Bio-Oss<sup>®</sup> često koristi za tretman koštanih defekata (Wetzel i sar., 1995; Jensen i sar., 1996; Thorwarth i sar., 2006; Traini i sar., 2008) i pri tom je biokompatibilan sa koštanim tkivom životinja (Piattelli i sar., 1998). Okarakterisan je kao dobar osteokonduktivni koštani zamenik (Berglundh i sar., 1997), koji ne pojačava niti izaziva inflamaciju (Clergeau i sar., 1996; Amerio i sar., 2010). Zbog svega navedenog, Bio-Oss<sup>®</sup> je u našoj studiji korišćen za pripremu implantata eksperimentalnih grupa u količini od 10 mg odnosno  $\sim 0,02$  cm<sup>3</sup> po implantatu.

### 5.2.1. Komparativna analiza implantata

Poređenje ektopičnog osteogenog potencijala sveže izolovanih i *in vitro* osteoindukovanih ADSC implantiranih na nosačima od BMM i PRP-a sprovedena je uz pomoć analize relativne ekspresije gena markera osteogeneze (*Sp7*, *Bglap*, *Coll1a1* i

*Alpl*) nakon prve, druge, četvrte i osme nedelje od implantacije. Ova metoda je često korišćena za procenu osteogenog procesa (Niemeyer i sar., 2004; Bahrambeigi i sar., 2012; Cvetković i sar., 2015). Histomorfološka analiza može da pruži veoma važne informacije u cilju formiranja potpunije slike o osteogenom procesu na osnovu strukture tkiva (Moioli i sar., 2008; Mehrkens i sar., 2012; Živković i sar., 2015). Imunohistohemijska analiza ekspresije osteopontina i histomorfometrijska analiza mogu biti od velike koristi kao dopunske metode. Najinformativniji termini za histomorfološku, histomorfometrijsku i imunohistohemijsku analizu jesu nakon druge i osme nedelje od implantacije (Najdanović i sar., 2015; Cvetković i sar., 2015). Nakon druge nedelje mogu da se uoče najranije promene u tkivu, a nakon osme nedelje od implantacije može se uočiti rezultat kasne faze osteogenog procesa. Pored toga što su uporedno analizirane grupe koje su sadržale različito pripremljene ADSC, što predstavlja osnovni cilj ove disertacije, u analizu su uključene i dve kontrolne grupe: jednu je činio BMM i PRP, a drugu samo BMM. Svrha ovako formiranih kontrolnih grupa bila je da se pokaže u kojoj meri se osteogeni proces u implantatima sa ADSC razlikuje od efekta samog BMM bez ćelija i BMM samo sa PRP-em bez ćelija.

Ujednačene krive topljenja za iste analizirane gene u različitim uzorcima, ukazuju na postojanje jednog specifičnog produkta koji je dobrog kvaliteta i takođe ukazuju na to da su reakcije bile potpuno optimizovane. Ova analiza je pokazala da uzorci korišćeni kao matrice za qRT-PCR nisu bili kontaminirani (Slika 4.10. i Slika 4.11.). Takođe, rezultati elektroforeze na agaroznom gelu navode na zaključak da su produkti qRT-PCR reakcije bili specifični i dobrog kvaliteta. Veličine razdvojenih fragmenata na agaroznom gelu u potpunosti su odgovarale opisu analiziranih produkata qRT-PCR reakcije koja je navedena u specifikaciji proizvođača. Ovo su bili važni preduslovi za dalju analizu relativne ekspresije ciljnih gena *Sp7*, *Bglap*, *Colla1* i *Alpl*.

Transkripcioni faktor osteriks je visoko specifičan marker aktivnosti ćelija osteoblastne linije (Nakashima i sar., 2002; Zhang, 2010) i samim tim je karakterističan marker osteogeneze i diferencijacije osteoprogenitornih ćelija. Osteriks reguliše diferencijaciju osteoblasta i normalno formiranje koštanog tkiva kako u rastućim, tako i u formiranim kostima (Baek i sar., 2009). Na modelu ortotopične osteogeneze kod miša ranije je zapaženo da se dve nedelje nakon frakture osteriks eksprimira uglavnom na

mestima zarastanja (Kaback i sar., 2008), drugim rečima na mestima gde se odvija osteogeni proces. Osteriks i osteokalcin spadaju u grupu specifičnih markera osteogeneze i diferencijacije osteoprogenitornih ćelija, s tim što se osteokalcin eksprimira u kasnijim fazama osteogeneze (Lian i sar., 1989; Wang i sar., 2004; Huang i sar., 2007a). Zato je analiza ekspresije *Sp7* i *Bglap* bila od velikog značaja za naša istraživanja jer može biti veoma informativna za procenu stepena osteogeneze u analiziranim implantatima.

Ekspresija *Sp7* i *Bglap* u OPN i SPN implantatima ima veoma sličan obrazac nakon prve nedelje od implantacije, a zatim se menja tako što se značajno povećava u SPN grupi nakon druge nedelje, dok je u OPN grupi zapaženo neznatno povećanje u tom terminu (Slika 4.12. i Slika 4.13.). Značajno viša ekspresija *Sp7* i *Bglap* u SPN implantatima nakon druge nedelje je održana i dodatno je uvećana nakon četvrte nedelje, ali je nakon osme nedelje od implantacije značajno opala u poređenju sa OPN implantatima. Pad ekspresije *Sp7* i *Bglap* nakon osme nedelje od implantacije ukazuje na slabljenje osteogenog procesa u SPN implantatima. S druge strane, u OPN implantatima obrazac ekspresije *Sp7* i *Bglap* je značajno drugačiji ne samo u odnosu na SPN već i na kontrolne PN i N implantate. Unutar OPN grupe beleži se postepen i stabilan porast ekspresije *Sp7* i *Bglap* do kraja četvrte nedelje kada se beleži značajan skok ekspresije ovih gena, koji se dodatno uvećava nakon osme nedelje od implantacije. U tom periodu dostiže značajno najviše vrednosti u odnosu na sve predhodne termine i u odnosu na sve ostale grupe. Takva dinamika ekspresije *Sp7* i *Bglap* sugerise da je intenzitet osteogeneze u OPN bio najjači nakon osme nedelje od implantacije. Rezultati navode na zaključak da je prisustvo različito pripremljenih ADSC; sveže izolovanih u SPN implantatima i osteoindukovanih ADSC u OPN implantatima, rezultovalo razlikama u dinamici ekspresije *Sp7* i *Bglap* među ovim grupama, ali i u poređenju sa kontrolama. Nađeno je da se dinamika ekspresije dva ključna gena markera, *Bglap* i *Sp7*, sinhronizovano menja u zavisnosti od faze diferencijacije ćelija i razvoja osteogenog procesa u OPN i SPN implantatima. Ovom zapažanju idu u prilog podaci da transkripcioni faktor osteriks može da reguliše ekspresiju osteokalcina (Milat i Ng, 2009; Zanetti i sar., 2013). Ustanovljeno je da se osteokalcin u *in vivo* uslovima eksprimira u postproliferativnoj fazi osteoprogenitornih ćelija (Hauschka i sar., 1989) što može da objasni njegov nizak nivo ekspresije u implantatima u ranijim terminima i

povećanje ekspresije u kasnijim terminima *in vivo* eksperimentalnog perioda. Na osnovu dinamike ekspresije *Bglap* i *Sp7* može se zaključiti da se proliferativna faza završila ranije u SPN nego u OPN grupi, drugim rečima da je proces osteogeneze pokrenut ranije u SPN nego u OPN grupi.

Snižena ekspresija *Sp7* i *Bglap* na kraju prve nedelje u SPN i OPN implantatima verovatno je prouzrokovana time što je implantiranim ADSC promenjena sredina, čime su one pretrpele "stres" i samim tim prigušile ekspresiju analiziranih gena. Poznato je od ranije da ćelije prilikom promene sredine prigušuju ekspresiju gena (Lian i Stein, 1995), a samim tim i usporavaju procese diferencijacije i druge aktivnosti. Verovatno je ćelijama bio neophodan određen period da bi se adaptirale na novonastale uslove i potom nastavile sa svojom aktivnošću i procesom diferencijacije ka osteoblastima. Taj mehanizam može da objasni zašto se ekspresija *Sp7* i *Bglap* pojačala nakon druge nedelje u SPN grupi, a nakon četvrte nedelje u OPN grupi u odnosu na ekspresiju tih gena u startnoj ćelijskoj komponenti. U prilog ovoj tvrdnji ide činjenica da je kod osteoindukovanih ADSC petnaestog dana u kulturi nađena povišena ekspresija svih analiziranih gena markera osteogeneze, a da je nakon prve i druge nedelje od njihove implantacije zapažena znatno snižena ekspresija tih istih gena u OPN implantatima čiji su sastavni deo bile ove osteoindukovane ADSC. Za razliku od sveže izolovanih ADSC, možemo da tumačimo da su osteoindukovane ADSC dva puta pretrpele "stres" prilikom promene sredine. Prvi put nakon izolacije i *in vitro* kultivacije i drugi put kada su implantirane (Cvetković i sar., 2015). Sveže izolovane ADSC su pretrpele "stres" prilikom promene sredine samo jednom kada su izolovane, jer su odmah zatim implantirane. Pošto sveže izolovane ADSC nisu pre implantacije dodatno podvrgavane osteogenoj indukciji, onda su verovatno bile podložnije bržoj indukciji ekspresije *Sp7* i *Bglap*. S druge strane, osteoindukovane ADSC su bile prethodno usmerene na diferencijaciju ka osteoblastima, pa im je verovatno zbog toga bilo potrebno više vremena za adaptaciju i nastavak procesa diferencijacije nakon implantacije. Na ovaj način se može objasniti zapažen sporiji trend porasta ekspresije *Sp7* i *Bglap* u OPN nego u SPN implantatima. Ovde je važno uzeti u obzir takođe činjenicu da je u grupi SPN implantirana SVF, koja je heterogena ćelijska populacija, jer pored ADSC sadrži i druge ćelije (Scherberich i sar., 2007; Schäffler i Büchler, 2007; Scherberich i sar., 2010; Bourin i sar., 2013), dok su se *in vitro* kultivacijom i osteogenom indukcijom iz SVF

izdvojile i "prečistile" ADSC od ostalih ćelija. To pravi dodatnu razliku u ovim različitim pristupima upotrebe ADSC, jer je moguće da su i druge ćelije iz SVF, pored ADSC, u nekoj meri doprinele bržem pokretanju ekspresije *Sp7* i *Bglap* u SPN u odnosu na OPN grupu gde je taj proces bio sporiji, ali sa stabilnim i ravnomernim porastom do kraja osme nedelje od implantacije.

Poznato je da implantirane ADSC svojom parakrinom aktivnošću mogu regrutovati rezidentne ćelije (Hao i sar., 2010; Amini i sar., 2012; Barba i sar., 2013; Beni i sar., 2013), a ovu sposobnost takođe ima i aktivirana PRP (Veillette i McKee, 2007; Cervelli i sar., 2009). Implantirane ADSC i PRP mogle su zajedno sa regrutovanim rezidentnim progenitornim ćelijama koje su naknadno, posle implantacija naselile SPN i OPN implantate, doprineti razvoju biološke situacije prema osteogenom procesu.

Makroskopskim pregledom u momentu ekstrakcije utvrđeno je da su od prve do osme nedelje nakon implantacije implantati bili sve manji, kompaktniji i bolje integrisani u okolno tkivo domaćina. To može da znači da je stepen resorpcije u implantatima rastao od kraja prve do kraja osme nedelje od implantacije, ali takođe ukazuje da je proces resorpcije povezan sa dobrom integracijom implantata sa tkivom domaćina.

Nakon druge nedelje od implantacije u OPN i SPN implantatima, na mikroskopskim preparatima zapažena je obilna celularizovanost u poređenju sa kontrolnim grupama. S obzirom da su ove grupe sadržale ADSC, može se reći da su one u startu imale prednost u broju ćelija nego kontrolne grupe koje nisu sadržale ćelije. Međutim, u SPN grupi u ovom periodu primećuje se za nijansu bolja celularizovanost i veće prisustvo ćelija koje učestvuju u osteogenezi nego u OPN grupi. Rezultati histomorfometrijske analize su u saglasnosti sa histološkom slikom zapaženom u SPN i OPN implantatima. Procenat infiltriranog tkiva između granula materijala nakon druge nedelje bio je značajno najviši u OPN implantatima u poređenju sa kontrolama, ali ne i u odnosu na SPN grupu (Slika 4.20.). Značajno veći procenat infiltriranog tkiva zapažen je u SPN samo u odnosu na kontrolne N implantate. Ovakav rezultat ukazuje da je dodavanje ADSC u kombinaciji sa PRP indukovalo obimniju proliferaciju tkiva između granula BMM nego u kontrolnim implantatima. Iz toga sledi da su se proces

prolifracije ćelija i tkiva koji su karakteristični za inicijaciju osteogeneze, odvijali u SPN i OPN implantatima u značajno većoj meri nego u kontrolama. Takođe, nakon dve nedelje od implantacije u SPN i OPN implantatima se beleži za nijansu jači intenzitet ekspresije osteopontina nego u kontrolnim grupama (Slika 4.21.).

Ekspresija osteopontina nije specifična samo za koštano tkivo (Standal i sar., 2004; Kirkham i Cartmell, 2007), ali on spada u rane markere izgradnje koštanog tkiva i ima kritičnu ulogu u remodelovanju koštanog tkiva (Kirkham i Cartmell, 2007). Zato imunoekspresija osteopontina može biti veoma informativna za svrhu praćenja osteogeneze. Poznato je da se osteopontin eksprimira u fazi proliferacije ćelija (Lian i Stein, 1995). To može objasniti pojačanu imunoekspresiju osteopontina u infiltriranom tkivu između granula materijala, koja je zapažena na kraju druge nedelje od implantacije u periodu kada je u SPN i OPN implantatima zapaženo opsežno prisustvo ćelija. U ovom terminu, na ivicama granula materijala zapažene su velike višejedarne ćelije nalik osteoklastima, a najviše ih je bilo u SPN i OPN implantatima. Uprkos prisustvu ovakvog tipa ćelija, znakovi resorpcije su u ovom periodu bili minimalni, što ukazuje da je proces resorpcije mogao biti u inicijalnoj fazi. Za ovaj termin je karakteristično prisustvo ćelija koje nalikuju osteoblastima na ivicama granula u pojedinim delovima svih implantata. Ćelije nalik osteoblastima su na analiziranim preparatima brojnije zastupljene u SPN i OPN implantatima u poređenju sa kontrolnim grupama. Takva histološka slika se slaže sa izmerenom ekspresijom *Sp7* i *Bglap* i ukazuje na procese koji odgovaraju početnim fazama resorpcije mineralnih granula materijala gde je proliferaciju ćelija i tkiva, regrutacija progenitornih ćelija i diferencijacija ćelija koje nalikuju osteoklastima, glavni događaj (Feng i McDonald, 2011). Skupa, svi analizirani parametri nakon druge nedelje od implantacije ukazuju na bržu inicijaciju osteogenog procesa u SPN nego u OPN implantatima.

Nakon osme nedelje od implantacije histološka slika u implantatima svih eksperimentalnih grupa je potpuno drugačija od one koja se mogla videti posle dve nedelje. Celularizovanost je znatno opala u svim tipovima implantata u odnosu na period posle dve nedelje, a posebno prisustvo višejedarnih džinovskih ćelija koje je bilo moguće videti uglavnom na mestima gde su prisutni znakovi resorpcije granula mineralnog matriksa. Međutim, procenat infiltriranog tkiva u implantatima svih

eksperimentalnih grupa nije značajno opao u poređenju sa terminom nakon druge nedelje od implantacije već su se održale iste razlike među grupama. Pri tom značajno najviši procenat infiltriranog tkiva izmeren je u OPN grupi u poređenju sa svim ostalim grupama, ali ne značajno u odnosu na PN implantate. To znači da je u grupama sa ćelijama indukovano formiranje većeg procenta tkiva u implantatima nakon osme nedelje što zajedno sa ostalim rezultatima potvrđuje da je osteogeni proces najizraženiji baš u ovim grupama, a prvenstveno u OPN grupi nakon osam nedelja.

U OPN implantatima je primećena obimna resorpcija granula BMM i prisustvo ćelija nalik osteoklastima u osmonedeljnom terminu. Na puno mesta na histološkim preparatima se mogu naći veliki infiltrati tkiva sa džinovskim višejedarnim ćelijama i kolagenim vlaknima u granulama materijala. Postoje podaci o tome da osteokalcin učestvuje u regrutaciji ćelija koje resorbuju koštano tkivo (Liggett i sar., 1994). Prema tome, ekspresija *Bglap* u našim eksperimentima je u saglasnosti sa prisustvom ćelija koje nalikuju osteoklastima u OPN i SPN implantatima u poređenju sa kontrolama. U SPN implantatima nakon osme nedelje znakovi resorpcije su slabije izraženi nego u OPN, a takođe je slabije i prisustvo ćelija nalik osteoklastima. Ovakav nalaz se može protumačiti tako da je proces resorpcije u SPN implantatima bio najintenzivniji u nekom ranijem terminu, verovatno oko četvrte nedelje, što se može pretpostaviti na osnovu najviše ekspresije osteoklacina u tom terminu.

Nakon osme nedelje od implantacije karakteristično je pojačano prisustvo na ivicama granula BMM ćelija kuboidalnog oblika sa krupnim jedrom koje formiraju jednoslojnu formaciju, pa takvim izgledom nalikuju na osteoblaste. Pozicija i izgled opisanih ćelija odgovara ranije objavljenim opisima osteoblasta (Ross i sar., 1989; Jilka i sar., 1998). U ovom terminu, ćelije nalik osteoblastima su bile zastupljenije u OPN nego u SPN implantatima, dok je u kontrolnim grupama njihovo prisustvo bilo vrlo slabo. To se slaže sa povišenom ekspresijom *Sp7* i *Bglap* u OPN grupi nakon osme nedelje od implantacije, jer se radi o markerima koji su karakteristični za ćelije osteoblastne linije. Slabije prisustvo osteoblasta u SPN nego u OPN grupi povezano je sa značajno nižom ekspresijom *Sp7* i *Bglap* u ovom nego u prethodnim terminima, tako da ovi rezultati uzeti zajedno idu u prilog zaključku da je osteogeni proces bio intenzivniji u OPN nego u SPN grupi tokom osmonedeljnog perioda.



### 5.2.2. Efekti PRP-a u ispitivanim implantatima

Pokazano je da faktori PDGF, TGF- $\beta$ , i EGF koji se oslobađaju iz aktivirane PRP stimulišu proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta (Piche i Graves, 1989; Kasperk i sar., 1990; Katagiri i sar., 1990), kao i da u *in vitro* uslovima PRP stimuliše proliferaciju i diferencijaciju ćelija koštane srži pacova (Dolder i sar., 2006). Takođe, i ostali biološki faktori oslobođeni aktivacijom trombocita kao što su Ang-2, fibronektin, PDECGF, TSP-1, VEGF, FGF-2, IGF-1 i drugi imaju povoljan uticaj na osteogeni proces (Intini, 2009). Konkretno, IGF-1 može da stimuliše ekspresiju *Bglap* i *Alp* (Intini, 2009) i pojača ekspresiju *Sp7* (Celil i sar., 2005). IGF-1 deluje i sistemski i lokalno regulišući funkciju osteoblasta (Gazzerro i Canalis, 2006) tako što stimuliše funkciju osteoblasta i formiranje koštanog tkiva (Zhao i sar., 2000; Im, 2013). Faktor rasta FGF-2 ima snažnu anaboličku ulogu u koštanom tkivu *in vivo* i kod osteoblasta *in vitro* (Naganawa i sar., 2006; Sabbieti i sar., 2008; Im, 2013). Pošto je PRP činila nepromenljivi deo OPN i SPN implantata u našem eksperimentu, onda je njen doprinos razvoju osteogenog procesa bio isti u obe grupe, pa razlike koje se javljaju u ekspresiji *Sp7* i *Bglap* i ekspresiji ostalih markera osteogeneze gotovo se isključivo mogu objasniti uticajem jedine promenljive komponente u ovim grupama, a to su različito pripremljene ADSC.

U kontrolnoj PN grupi zapažen je značajan porast nivoa ekspresije *Sp7* u odnosu na sve grupe već nakon prve nedelje od implantacije. Međutim, od kraja prve nedelje sve do kraja osme nedelje od implantacije nije bilo značajnih promena nivoa ekspresije *Sp7* u PN grupi. Obrazac ekspresije *Bglap* u PN implantatima ne prati dinamiku ekspresije *Sp7*, kao što je to bio slučaj u SPN i OPN implantatima. Nakon četvrte i osme nedelje od implantacije, ekspresija *Bglap* je bila značajno povišena u ovoj grupi u odnosu na prvu i drugu nedelju. Štaviše, nakon četvrte nedelje ekspresija se nije značajno razlikovala u odnosu na OPN i SPN implantate, a na kraju osme nedelje se nije razlikovala od SPN grupe. Pošto je PN grupa sadržala PRP, može se zaključiti da su biološki faktori iz aktivirane PRP doprineli inicijalnoj stimulaciji ekspresije *Sp7* i karakterističnoj ekspresiji *Bglap* u ovoj grupi implantata. S druge strane, PN grupa nije sadržala ćelije prilikom implantacije, pa se prisustvo ćelija u ovim implantatima može objasniti uticajem otpuštenih faktora iz aktivirane PRP na regrutaciju rezidentnih ćelija

(Cervelli i sar., 2009) i takođe povoljnim svojstvima materijala koji omogućava spontanu kolonizaciju ćelijama (Scherberich i sar., 2010). Tome idu u prilog zapažanja iz drugih studija da PRP u kombinaciji sa BMM može da indukuje osteogeni proces u određenoj meri (Kasten i sar., 2008a; Intini, 2009). Na našim histološkim preparatima se zapaža da su markeri osteogenog procesa prisutni u PN implantatima, ali su na značajno nižem nivou u poređenju sa SPN i OPN grupama. Takođe, procenat infiltriranog tkiva između granula materijala je značajno manji u PN nego u OPN nakon druge nedelje, a nakon osme nedelje i od SPN grupe što može biti rezultat i slabije proliferacije tkiva u ovoj grupi. Međutim, PRP u PN grupi je svakako doprinela većem procentu infiltriranog tkiva nego u kontrolnoj N grupi, koja nije sadržala PRP. Takav trend je održan od kraja druge do kraja osme nedelje od implantacije.

Na osnovu podataka iz literature i na osnovu rezultata ove disertacije, može se zaključiti da PRP ima povoljan uticaj na inicijaciju ekspresije markera osteogeneze u implantatima gde je kombinovana samo sa BMM, ali da je za progresivan i održivi razvoj osteogenog procesa neophodno prisustvo ćelija kao što su ADSC koje su nosioci osteogenog procesa u ektopičnim uslovima.

### 5.2.3. Uloga BMM u ispitivanim implantatima

U kontrolnoj N grupi ekspresija *Sp7* i *Bglap* je bila bez značajnih fluktuacija tokom *in vivo* eksperimentalnog perioda i pri tom značajno niža u poređenju sa OPN, SPN i PN grupama. S obzirom da implantati N grupe nisu sadržali niti ćelije, niti PRP već samo BMM, prisustvo ćelija u implantatima iz ove grupe može se objasniti naknadnom migracijom rezidentnih ćelija podstaknutom samim materijalom i biološkim faktorima oslobođenim na mestu incizije kože kroz koju su implantati implantirani pod kožu (Diegelmann i Evans, 2004). Ustanovljeno je da Bio-Oss<sup>®</sup> ima osteokonduktivna svojstva i omogućava spontanu kolonizaciju, iako ne sadrži sopstvene ćelije (Scherberich i sar., 2010). Time su verovatno stvoreni uslovi za formiranje osteogenih i vaskulogenih struktura u kontrolnim N implantatima koji su inače bili najslabije izraženi u odnosu na sve ostale grupe. Takođe, analizom histoloških preparata je nađeno da je celularizovanost tkiva u N implantatima slabije izražena u poređenju sa ostalim

grupama. U vezi sa tim i procenat infiltriranog tkiva je bio najniži u N grupi u poređenju sa svim ostalim grupama nakon druge i osme nedelje od implantacije. Takav rezultat pokazuje da sam BMM bez PRP-a i ADSC indukuje veoma slabu proliferaciju tkiva u N implantatima, a verovatno je s tim u vezi i slabiji intenzitet osteogenog procesa. Na histološkim preparatima se može videti da su znakovi osteogenog procesa veoma slabi ili odsutni u N kontrolnoj grupi, što se slaže sa izmerenom ekspresijom *Sp7* i *Bglap* čiji je nivo u ovoj grupi bio gotovo konstanto nizak i bez promena u intenzitetu tokom *in vivo* eksperimentalnog perioda.

#### 5.2.4. Analiza prisustva kolagena i kolagenogeneze u ispitivanim implantatima

Kolagen tipa I je nespecifičan marker koštanog tkiva (Kirkham i Cartmell, 2007), ali ipak ima veoma važnu ulogu u procesu osteogeneze (Bonadio i sar., 1990; Wang i sar., 2004; Lee i sar., 2013). Ekspimiraju ga ćelije osteoblastne linije od stadijuma osteoprogenitora do osteoblasta (Huang i sar., 2007a). Takođe, pokazano je da se *Coll1a1*, koji kodira protein koji ulazi u sastav kolagena tipa I (Van der Rest i Garrone, 1991), eksprimira ranije za vreme faze proliferacije, a zatim blago opada u kasnijim fazama osteogenog procesa održavajući ujednačenu ekspresiju (Lian i Stein, 1995).

Rezultati naših istraživanja ukazuju da se dinamika ekspresije *Coll1a1* u implantatima eksperimentalnih grupa razlikuje u odnosu na dinamiku ekspresije *Sp7* i *Bglap*. Pozitivna ekspresija *Coll1a1* prisutna je kod svih grupa od samog početka merenja, što nije bio slučaj sa *Sp7* i *Bglap*. Jedini izuzetak jeste kontrolna N grupa gde se nakon prve nedelje beleži negativna ekspresija verovatno zbog toga što u ovoj grupi nije bilo niti PRP-a, niti ADSC koje bi podstakle ekspresiju *Coll1a1* kao u ostalim grupama. Rana ekspresija *Coll1a1* u SPN, OPN i PN grupama može se objasniti na najmanje dva načina. Jedno od objašnjenja je da se u procesu osteogeneze ekspresija kolagena pokreće ranije i gotovo istim intenzitetom se eksprimira tokom diferencijacije osteoprogenitora sve do faze zrelih osteoblasta, kao što je to ranije pokazano (Lian i Stein, 1995; Huang i sar., 2007a). Takvoj dinamici ekspresije su u implantatima SPN, OPN i PN mogle doprineti implantirane ADSC i regrutovane rezidentne progenitorne

ćelije koje su naselile implantate nakon implantacije. Drugo objašnjenje bi bilo da kolagen nije specifičan marker osteogeneze (Kirkham i Cartmell, 2007), pa ga mogu eksprimirati i druge ćelije, osim osteoprogenitornih, koje su bile prisutne u implantatima u tom periodu.

U SPN implantatima, pik ekspresije *Coll1a1* zapažen je nakon druge i četvrte nedelje od implantacije. Slično tome, pokazano je da kolagen tipa I ima najvišu ekspresiju dve nedelje nakon frakture na mestu regeneracije (Kaback i sar., 2008). Histološka slika nakon druge nedelje od implantacije se slaže sa obrascem ekspresije *Coll1a1*. Kolagena vlakna su bila najzastupljenija u SPN, a zatim u OPN grupi, dok ih je znatno manje bilo u kontrolnim PN i N grupama. Kolagena vlakna koja su u ovom terminu zapažena u implantatima bila su nepravilnog oblika i formirala su rastresitu strukturu, što je karakteristika nezrelog kolagenog tkiva. Proliferacija kolagenog tkiva u OPN i SPN grupi je najverovatnije proizvod uticaja kombinacije ADSC i PRP-a. Slična reakcija opisana je ranije od strane Brown i saradnika (Brown i sar., 2009). Prisustvo celularnih komponenti, čak i autoložnih, u nosačima (skafoldima), modulišu odgovor organizma tako da pojačavaju formiranje vezivnog tkiva što konačno vodi ka remodelovanju tkiva (Brown i sar., 2009). U implantatima PN grupe je nađeno znatno manje kolagenih vlakana u terminu od dve nedelje, dok je u N grupi bilo najmanje kolagenog tkiva u odnosu na implantate koji su sadržali ADSC. Rezultati histomorfometrijske analize odgovaraju histološkoj slici, jer je najveći deo infiltriranog tkiva između granula implantata činio upravo kolagen.

Između SPN i OPN implantata nakon prve, druge i četvrte nedelje od implantacije nije bilo značajnih razlika u ekspresiji *Coll1a1*, ali nakon osme nedelje značajno viša ekspresija se beleži u OPN grupi u odnosu na SPN, kao i u poređenju sa kontrolama. Poznato je da kolagen tipa I eksprimiraju zreli osteoblasti (Liu i sar., 2008a; Zanetti i sar., 2013), a u našoj studiji je nađeno da je najviša ekspresija *Coll1a1* nakon osme nedelje u OPN implantatima, u periodu kada je zapaženo obimnije prisustvo osteoblasta. Takođe, najviša ekspresija *Coll1a1* u OPN grupi je u skladu sa obrascem ekspresije *Sp7* i *Bglap*, što potvrđuje činjenicu da povišena ekspresija *Sp7* verovatno u nekoj meri može da utiče na povećanje ekspresije *Coll1a1* (Koga i sar., 2005). Nakon osme nedelje, u OPN i SPN implantatima, gusto i pravilno usnopljena kolagena vlakna

gradila su strukture koje su se nalazile neposredno iznad sloja ćelija koje nalikuju osteoblastima. Takve strukture izgrađene od pravilno usnopljenih kolagenih vlakana opisuju se kao tkivo koje nalikuje osteoidu, mladom koštanom tkivu (Ross i sar., 1989; Muller i sar., 2010). Kolageno tkivo ovog tipa nalazi se prvenstveno na mestima gde su vidljivi znakovi resorpcije mineralnih granula. Ovakva situacija u implantatima podseća na sukcesiju procesa razgradnje i izgradnje tkiva, što je karakteristično za osteogeni proces (Feng i McDonald, 2011). Rezultati sličnih studija potvrđuju da sveže izolovane ADSC sa fibrinskim lepkom i koštanim zamenikom imaju kapacitet da indukuju formiranje tkiva nalik osteoidu u ektopičnim uslovima nakon osam nedelja (Muller i sar., 2010). U istoj studiji, formirano tkivo koje je nalikovalo osteoidu bilo je pozitivno na osteokalcin (Muller i sar., 2010), a to se podudara sa povećanom ekspresijom *Bglap* zapaženoj u OPN grupi nakon osme nedelje od implantacije u našim istraživanjima. Rezultati histomorfometrijske analize su u saglasnosti sa histološkom slikom nakon osme nedelje. Najveći procenat infiltriranog tkiva koji je zapažen u OPN i SPN implantatima nakon osme nedelje uglavnom je bilo sastavljen od gusto usnopljenih kolagenih vlakana koja su formirala tkivo nalik osteoidu. Međutim, za osam nedelja koliko je trajala naša *in vivo* studija, nije zapaženo formiranje zrelog koštanog tkiva niti u jednoj od grupa koje su sadržale ADSC, verovatno zbog odsustva osteogenih faktora koji su prisutni u koštanom tkivu, a neophodni su da se proces osteogeneze završi do kraja.

Ekspresiju *Coll1a1* u kontrolnoj grupi PN karakteriše značajno povišen nivo ekspresije nakon prve i druge nedelje od implantacije u odnosu na ostale eksperimentalne grupe. Međutim, nakon četvrte nedelje ekspresija počinje da pada i taj trend se održava do kraja osme nedelje od implantacije. Ovo je još jedan dokaz da aktivirana PRP može da indukuje ekspresiju markera osteogenog procesa, ali u poređenju sa SPN i OPN grupom ekspresija *Coll1a1* veoma brzo slabi i opada. Na osnovu predstavljenih rezultata može se zaključiti da je na ektopičnom modelu PRP dobar induktor osteogeneze, samo kratko vreme nakon implantacije, ali ne i na duži vremenski period. Odmah po aktiviranju PRP otpusti većinu bioloških faktora, dok se ostatak oslobodi u narednih nedelju dana (Dovi i sar., 2003; DeLong i sar., 2011; Brogini i sar., 2011), pa uticaj oslobođenih faktora vrlo brzo opada. Samo PRP u kombinaciji sa Bio-Oss<sup>®</sup>-om i materijalima koji su slični njemu, u najvećem broju

istraživanja na različitim modelima se nije pokazala kao značajno dobar tretman za regeneraciju koštanog tkiva (Freymiller i Aghaloo, 2004; Mooren i sar., 2007; Mooren i sar., 2010). Takvi zaključci idu u prilog našim dobijenim rezultatima ekspresije *Coll1a1* i ostalih analiziranih gena, histološke slike i histomorfometrijske analize u PN implantatima. Nakon osme nedelje od implantacije procenat infiltriranog tkiva sastavljenog od rastresitog kolagena u PN grupi bio je manji nego u OPN i SPN grupama, ali bez značajne razlike, dok je u odnosu na N grupu imala višu vrednost. Slično rezultatima našeg istraživanja, ranije objavljena studija na ortotopičnom modelu pokazala je da ADSC u kombinaciji sa Bio-Oss<sup>®</sup>-om i gelom od kolagena tipa I kao nosačem, dovode do bolje regeneracije koštanog tkiva u poređenju sa grupom koju je činio samo nosač Bio-Oss<sup>®</sup> sa gelom od kolagena tipa I (Daei-farshbaf i sar., 2014).

Ekspresija *Coll1a1* u N kontrolnim implantatima je bila konstantno niska u poređenju sa ostalim grupama i bez značajnih promena tokom eksperimentalnog perioda. Nakon osme nedelje od implantacije, kolagen rastresitog tipa je bio najzastupljeniji u kontrolnim grupama PN i N. U PN grupi na pojedinim mestima bilo je naznaka prisustva tkiva koje nalikuje osteoidu ali ga je bilo mnogo manje nego u implantatima sa ADSC. Odsustvo tkiva nalik osteoidu u N grupi je u saglasnosti sa zaključcima iz sličnih studija (Hicok i sar., 2004). Takođe, najslabije prisustvo infiltriranog tkiva sačinjenog od rastresitog kolagenog tkiva zapaženo je nakon osme nedelje u ovim implantatima. Na osnovu iznetih rezultata do sada može se zaključiti da je osteogeni proces u N kontrolnoj grupi bio na veoma niskom nivou u poređenju prvenstveno sa SPN i OPN, ali i kontrolnim PN implantatima.

#### **5.2.5. Karakteristike ekspresije markera mineralizacije u implantatima**

Dinamika ekspresije *Alpl* u implantatima svih eksperimentalnih grupa je karakteristična po tome što je negativna u odnosu na kalibrator. Pošto se radi o analizi relativne ekspresije, a ne apsolutne, negativan predznak je posledica toga što je u kalibratoru, sveže izolovanoj SVF, nivo ekspresije *Alpl* viši nego u implantatima svih eksperimentalnih grupa. To može biti zbog toga što je *Alpl* tkivno nespecifična, tj. ekspimiraju je i druge ćelije, sem osteoprogenitornih (Sharma i sar., 2014), koje su

prisutne u SVF-u. Uprkos tome, ekspresija ovog tipa alkalne fosfataze je vrlo često analizirana u studijama kada je ispitan osteogeni proces i diferencijacija osteoprogenitornih ćelija (Mathews i sar., 2012; Schwarting i sar., 2015). S druge strane, ovakav rezultat takođe ukazuje na to da je ekspresija *Alpl* u SVF-u višestruko viša od ekspresije svih ostalih analiziranih gena.

Trend rasta i opadanja ekspresije *Alpl* u implantatima je najbliži trendu ekspresije *Colla1*. Konkretno u SPN grupi značajno viša ekspresija *Alpl* unutar grupe zapažena je nakon druge nedelje od implantacije u odnosu na ostale termine, a u OPN grupi značajno povišena ekspresija *Alpl* zapažena je nakon osme nedelje od implantacije unutar grupe. Kada se uporedi ekspresija *Alpl* u OPN i SPN grupi, može se zaključiti da nije bilo značajnih razlika između njih do kraja osme nedelje. Jedino je posle osme nedelje od implantacije u OPN grupi ekspresija bila pozitivna i značajno viša u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe. U kontrolnoj grupi PN, kao i u slučaju ekspresije *Colla1*, beleži se značajniji skok nivoa ekspresije nakon druge nedelje u odnosu na prvu nedelju od implantacije, ali u kasnijim terminima nivo ekspresije *Alpl* ponovo opada. U N kontrolnoj grupi blago povišena ekspresija *Alpl* beleži se nakon četvrte i osme nedelje u odnosu na termine nakon prve i druge nedelje od implantacije.

Alkalna fosfataza je jedan od markera čija ekspresija može da ukazuje na mineralizaciju koštanog matriksa (Orimo, 2010), jer je osteoblasti ekspimiraju neposredno pre početka mineralizacije (Fedarko i sar., 1990), prilikom diferencijacije i maturacije koštanog tkiva (Pineri i sar., 1995). Na osnovu obrasca ekspresije *Alpl*, može se pretpostaviti da su uslovi za proces mineralizacije bili najpogodniji nakon osme nedelje od implantacije u OPN implantatima, dok su u tom terminu u svim ostalim grupama bili na znatno nižem nivou. Owen i saradnici (Owen i sar., 1990) objavili su da faktori koji produžavaju vreme odvijanja proliferacije osteoprogenitornih ćelija mogu izazvati kasniju indukciju ekspresije *Alpl* i *Bglap* i obrnuto (Owen i sar., 1990). To takođe može biti jedan od razloga niske ekspresije *Alpl* do kraja četvrte nedelje i njenog povećanja nakon osme nedelje u OPN grupi, jer se prema rezultatima histomorfološke i histomorfometrijske analize proliferacija u ovoj grupi intenzivnije odvijala u ranijim terminima.

Kao marker zrelih osteoblasta, (Lian i sar., 1989) osteokalcin je takođe uključen u regulaciju depozicije minerala u koštanom matriksu (DeFranco i sar., 1991; Chenu i sar., 1994), a maksimalno se eksprimira na početku mineralizacije matriksa (Owen i sar., 1990). Modulišući aktivnost osteoklasta i osteoblasta, osteokalcin reguliše mineralizaciju koštanog tkiva. U koštanom matriksu mladog koštanog tkiva, pokazano je da osteokalcin vezuje kalcijumove jone i na taj način učestvuje u njegovoj mineralizaciji (Neve i sar., 2013). Slična zapažanja da se osteokalcin eksprimira u kasnijim fazama diferencijacije koštanog tkiva, nakon stadijuma diferencijacije i maturacije, sa početkom mineralizacije, objavili su i drugi istraživači (Bills i sar., 1971; Lian i sar., 1982; Gerstenfeld i sar., 1987). Istovremeni pik ekspresije *Alpl* i *Bglap* u OPN grupi u terminu od osam nedelja ukazuje da je tada priprema tkiva za mineralizaciju, što je funkcija aktivnosti alkalne fosfataze, bila sinhronizovana sa početnom fazom mineralizacije, za koju se vezuje ekspresija osteokalcina (Lian i Stein, 1992). U SPN grupi ekspresija *Alpl* je imala pik ranije, nakon druge i četvrte nedelje od implantacije, što se takođe poklapa sa najvišom ekspresijom *Bglap*. Ovakav rezultat ukazuje da su uslovi za mineralizaciju tkiva bili povoljniji ranije u SPN nego što je to bio slučaj u OPN grupi, tek nakon osme nedelje od implantacije.

Na kraju osme nedelje od implantacije znatno jača imunoekspresija osteopontina zapaža se u OPN grupi, nešto slabija u SPN grupi, dok je u kontrolnim grupama ekspresija dosta slabija, manja čak i u odnosu na period posle druge nedelje. Najjača ekspresija osteopontina u ovom terminu je registrovana na mestima gde su ispoljeni znakovi resorpcije i gde su prisutne višejedarne ćelije nalik osteoklastima. Sličan obrazac ekspresije osteopontina objavljen je ranije od strane drugih istraživača (Gluhak-Heinrich i sar., 2000). Takođe, ekspresija je zapažena i na mestima formiranja osteoida. Objavljeno je da se osteopontin eksprimira tokom mineralizacije vanćelijskog matriksa (Lian i Stein, 1995) i to najintenzivnije nakon stadijuma diferencijacije i maturacije ćelija, sa početkom mineralizacije (Gerstenfeld i sar., 1987; Owen i sar., 1990), što je još jedan nalaz koji potvrđuje da su uslovi za mineralizaciju u OPN grupi bili najpovoljniji nakon osme nedelje. Ovo zapažanje dodatno potvrđuju rezultati histomorfološke i histomorfometrijske analize, kao i analize ekspresije *Alpl* i *Bglap* nakon osme nedelje od implantacije u OPN implantatima. Takođe, u OPN grupi se na kraju osme nedelje od implantacije najviša ekspresija *Sp7* poklapa sa jakom



imunoekspresijom osteopontina. Povezanost ekspresije ova dva markera utvrđena je ranije i to tako da osteriks može da aktivira ekspresiju osteopontina vezujući se u promotornom regionu ovog gena (Milat i Ng, 2009; Zanetti i sar., 2013).

Nakon osme nedelje u N implantatima u blizini granula materijala zapaženi su znakovi degradacije sa dosta ćelijskog detritusa što može biti posledica jake granulomatozne reakcije. Postojanje ovakvih procesa govori o tome da je resorpcija granula materijala bila inhibirana na neki način, a samim tim i proces osteogeneze. Vrlo slični znakovi slabe resorpcije mineralnih granula materijala uprkos prisustvu ćelija nalik osteoklastima zapaženi su i u kontrolnoj PN grupi. Slična zapažanja kod ektopičnih implantata od osam nedelja sastavljenih od granula Bio-Oss<sup>®</sup>, objavljena su ranije (Živković i sar., 2015). Najslabiji intenzitet imunoekspresije osteopontina u ovom terminu je u skladu sa zapažanjem da je osteogeni proces najslabijeg intenziteta u N grupi.

#### **5.2.6. Vaskularizovanost ispitivanih implantata**

U momentu ekstrakcije implantata primećena je makroskopski vidljiva mreža kapilara u samom tkivu implantata. Takođe, dobra vaskularizacija je bila primetna i oko implantata, u potkožnom tkivu koje ih je okruživalo, što je ukazivalo na dobru integraciju implantata sa okolnim tkivom domaćina na mestu implantacije. Razlika u vaskularizaciji nije bila makroskopski uočljiva između implantata različitih grupa. Jedine uočljive razlike između implantata ekstrahovanih u različitim terminima bile su u kasnijim terminima žrtvovanja, nakon četvrte i osme nedelje od implantacije, gde je uočena jače razvijena mreža krvnih sudova oko implantata nego kod implantata u ranijim terminima žrtvovanja.

Nakon druge nedelje od implantacije, primećeno je pojačano prisustvo krvnih sudova manjeg lumena u OPN i SPN implantatima, što je veoma važan faktor za osteogeni proces. Međutim, u ovom terminu zapaženo je prisustvo krvnih sudova i u kontrolnim PN i N grupama. Razviće vaskularne mreže je preduslov za odvijanje osteogenog procesa (Carano i Filvaroff, 2003), jer omogućava stalni dotok kiseonika i

hranljivih materija (Yu i sar., 2009), što je neophodno za normalno funkcionisanje osteoblasta (Zhou, 2012). Koliko je vaskularizacija važna za osteogeni proces govori i činjenica da se razvijaju strategije dodavanja faktora koji mogu da podstaknu angiogenezu prilikom tretmana koštanih defekata (Patel i sar., 2008; Sun i sar., 2011). Zato je u SPN i OPN implantatima dodavana PRP kao izvor faktora koji mogu da podstaknu angiogenezu (Intini, 2009). Moguće je da su se pod uticajem implantiranih ADSC i PRP, regrutovale rezidentne progenitorne ćelije koje su naselile implantate i diferencirale se u endotelne ćelije (EĆ) koje su doprinele intenzivnijoj angiogenezi u OPN i SPN implantatima. Takođe, pokazano je da osteoblasti otpuštaju VEGF koji stimuliše vaskulogenezu i angiogenezu (Santos i sar., 2010). Rezultati histomorfološke analize pokazuju da su osteoblasti najzastupljeniji u SPN i OPN grupama, što se slaže sa zapažanjem da je vaskularizacija najintenzivnija u ovim grupama. SVF koja je komponenta SPN implantata, pored ADSC sadrži i endotelijalne progenitorne ćelije (Scherberich i sar., 2007; Scherberich i sar., 2010), tako da je verovatno i ova komponenta doprinela vaskularizovanosti u SPN implantatima. S druge strane, pojava krvnih sudova u kontrolnim grupama u sličnoj meri kao i kod SPN i OPN grupe nakon druge nedelje od implantacije ima svoje objašnjenje. Već je objavljeno da Bio-Oss® može da indukuje pojavu krvnih sudova u ektopičnim implantatima koji se javljaju kao odgovor na prisustvo ćelija nalik osteoklastima čija je regrutacija indukovana prisustvom granula materijala (Barbeck i sar., 2014). Opisani proces okarakterisan je kao neophodan za integraciju koštanog zamenika u ektopičnoj sredini (Barbeck i sar., 2014).

Nakon osme nedelje proces vaskularizacije u implantatima se promenio u poređenju sa implantatima nakon druge nedelje od implantacije. Krvni sudovi znatno šireg lumena, karakteristični su za OPN implantate nakon osme nedelje od implantacije što se razlikuje od izgleda i zastupljenosti krvnih sudova zapaženih nakon druge nedelje u ovoj grupi. U OPN implantatima zapaža se nešto više ovakvih krvnih sudova u odnosu na SPN, dok ih je mnogo manje u implantatima kontrolnih grupa. Takvi nalazi ukazuju da je prokrvljenost nakon osme nedelje od implantacije najintenzivnija u OPN, a zatim u nešto manjoj meri i u SPN implantatima što odgovara nivou osteogenog procesa u tim grupama. Povezanost napredovanja osteogeneze i razvića krvnih sudova u implantatima je veoma bitna, jer je za regeneraciju koštanog tkiva neophodno dobro

balansirano razviće vaskularne mreže (Kanczler i Oreffo, 2008). U OPN implantatima razviće mreže krvnih sudova prati inicijaciju osteogenog procesa nakon druge nedelje, a zatim dodatno napreduje u kasnijoj fazi nakon osme nedelje što nameće zaključak da se u ovim implantatima odvijao progresivan i dobro balansiran osteogeni proces. S druge strane, u kontrolnim grupama vaskularizovanost je slabija nakon osme nedelje u poređenju sa periodom nakon druge nedelje od implantacije. Nakon osme nedelje od implantacije u kontrolnim grupama je zastupljenost i lumen krvnih sudova takođe znatno manji u poređenju sa OPN i SPN grupama.

### **5.3. Komparativna analiza uticaja sveže izolovanih i osteoindukovanih ADSC na ektopični osteogeni proces**

Rezultati našeg istraživanja ukazuju da sveže izolovane ADSC sadržane u SVF-u poseduju ektopični osteogeni potencijal koji se značajno razlikuje od osteogenog potencijala *in vitro* osteoindukovanih ADSC. *In vitro* osteoindukovane ADSC u OPN implantatima uzrokuju stabilan razvoj osteogenog procesa koji ima tendenciju postepenog napredovanja do kraja osme nedelje od implantacije. Postepeni porast ekspresije gena markera osteogeneze, pojačano prisustvo ćelija nalik osteoblastima i osteoklastima, prisustvo znakova resorpcije granula materijala i najviši procenat infiltriranog tkiva ukazuju na fazu proliferacije ćelija i tkiva, odnosno na inicijaciju osteogeneze na kraju druge nedelje u OPN implantatima. Formiranje osteoida, znakovi koji ukazuju na inicijaciju mineralizacije, najviša ekspresija gena markera osteogeneze i najviši procenat infiltriranog tkiva između granula materijala, ukazuju da je osteogeni proces u OPN implantatima dostigao vrhunac nakon osme nedelje od implantacije u poređenju sa ranijim terminima. Napredovanje osteogenog procesa se paralelno odvijalo sa razvićem vaskularne mreže tokom *in vivo* eksperimentalnog perioda. S druge strane, u SPN implantatima, zapažena je nešto drugačija situacija nego u OPN implantatima. Obrazac kojim su se ispoljavali markeri osteogenog procesa značajno su se razlikovali između ove dve grupe, ali takođe odstupanje je bilo značajno i od kontrolnih grupa. Sveže izolovane ADSC izazvale su bržu inicijaciju osteogenog procesa, ali od kraja četvrte do kraja osme nedelje od implantacije, ekspresija gena markera osteogeneze

opada. Slične razlike između ove dve grupe viđene su i u rezultatima histomorfološke analize (od Slike 4.16. do Slike 4.19.), a i histološka slika ide u prilog slabljenju osteogenog procesa nakon osme nedelje. Naši rezultati ukazuju na to da u ektopičnim uslovima PRP u kombinaciji sa sveže izolovanim ADSC ne može da indukuje takav stepen osteogenog procesa kao kombinacija osteoindukovanih ADSC i PRP. Sveže izolovanim ADSC su verovatno nedostajali osteogeni faktori kako bi se u ektopičnim uslovima omogućio nastavak njihove diferencijacije u ćelije osteoblastne linije i održanje osteogenog procesa. U skladu sa zapažanjima iz naše studije jesu rezultati studija na ortotopičnim i ektopičnim modelima objavljeni ranije. U kalvariji miševa, implantirane mezenhimske matične ćelije koštane srži kod kojih je indukovana ekspresija osteriksa, stimulišu ekspresiju gena markera osteogeneze i formiranje koštanog tkiva značajno bolje nego ćelije kod kojih prethodno nije indukovana ekspresija osteriksa (Tu i sar., 2007). Takođe, na ektopičnom modelu pokazano je da su osteogeno diferencirane ADSC implantirane na nosačima baziranim na hidroksiapatitu ili PRP gelu, podstakle formiranje koštanog tkiva nakon osam nedelja od implantacije (Hatori i sar., 2006; Scherberich i sar., 2007; Muller i sar., 2009; Scherberich i sar., 2010). Navedene činjenice iz literature potvrđuju da prethodna indukcija mezenhimskih matičnih ćelija ima povoljan uticaj na tok osteogenog procesa. S druge strane, pokazano je da sveže izolovane ADSC u kombinaciji sa fibrinskim lepkom imaju ektopični osteogeni kapacitet, ali bez osteoinduktivnih faktora proces diferencijacije osteoblasta i formiranje koštanog tkiva nije završeno do kraja (Muller i sar., 2010). Slično tome, They i saradnici su zaključili da je kombinacija SVF i materijala na bazi kalcijum-fosfata bila nedovoljna da izazove formiranje koštanog tkiva (They i sar., 2015). Studija Mehrkens i saradnika je potvrdila da sveže izolovane ADSC implantirane ektopično na nosaču baziranom na hidroksiapatitu sa fibrinskim lepkom, ali sa dodatkom osteogenog faktora rhBMP-2 (*Recombinant human bone morphogenic protein 2*, eng.) imaju kapacitet da iniciraju i podržavaju osteogeni proces (Mehrkens i sar., 2012). Međutim, malo je studija o osteogenom potencijalu sveže izolovanih ADSC i PRP kao izvora osteogenih faktora u kombinaciji. Jedna od njih potvrdila je da ove dve komponente deluju sinergistički u zarastanju koštanog defekta u vilici pacova (Barba-Recreo i sar., 2015). Do sada nema podataka o ektopičnom osteogenom potencijalu sveže izolovanih ADSC sadržanih u SVF i PRP, tako da su rezultati ovog istraživanja

prema našim saznanjima jedinstveni. Rezultati našeg istraživanja navode na zaključak da su, pored *in vitro* osteoindukovanih ADSC, i sveže izolovane ADSC potencijalno dobar kandidat za tretman koštanih defekata, a pritom ovaj način pripreme i primene ADSC pruža mogućnost za uštedu vremena u situacijama kada je u kliničkoj praksi neophodan intraoperativni pristup, odnosno rešavanje problema u jednom koraku. Međutim, neophodna su dodatna istraživanja, kako bi se precizno definisale doze osteogenih faktora koje je neophodno kombinovati sa svežim ADSC sa ciljem da se podrži na duže vreme osteogeni proces, kao i provera prikazanih rezultata iz ektopičnog modela na ortotopičnim modelima, koji su bliži kliničkim uslovima.

## 6. ZAKLJUČAK

### Zaključci *in vitro* istraživanja

- potvrđeno je prisustvo ADSC sadržanih u sveže izolovanoj SVF na osnovu pozitivne ekspresije CD29 i negativne ekspresije CD14 markera.
- nakon trećeg pasaža od zasejavanja SVF, većinu ćelija u kulturi činile su ADSC fibroblastolikog izgleda, pozitivne na CD29 i negativne na CD14.
- sveže izolovane ADSC sadržane u SVF-u imaju višu ekspresiju gena *Sp7*, *Bglap*, *Colla1* i *Alpl* u odnosu na ADSC iz kulture posle trećeg pasaža od zasejavanja sveže izolovane SVF.
- u ispitivanom periodu od 21 dan osteogene indukcije ADSC, najviša ekspresija gena *Sp7*, *Bglap*, *Colla1* i *Alpl*, imunoekspresija osteopontina i prisustvo depozita fosfata su nađeni petnaestog dana, što ukazuje na to da je u tom periodu u kulturama ADSC pokrenuta diferencijacija ka osteoprogenitornim ćelijama.

### Zaključci *in vivo* istraživanja

#### *Zaključci komparativne analize implantata:*

- u implantatima sa sveže izolovanim ADSC nađena je značajno najviša ekspresija *Sp7* i *Bglap* nakon druge nedelje i najviša ekspresija *Colla1* i *Alpl* nakon druge i četvrte nedelje u poređenju sa svim ostalim grupama.
- u implantatima sa osteoindukovanim ADSC nađen je postepen i stalan porast ekspresije markera *Sp7*, *Bglap*, *Colla1* i *Alpl* do termina osme nedelje, kada dostižu i značajno najvišu vrednost u poređenju sa svim ostalim grupama.

- u implantatima sa ADSC nakon druge nedelje nađena je obimna celularizovanost sa prisustvom ćelija nalik osteoklastima i osteoblastima za razliku od kontrola.
- u implantatima sa ADSC izmeren je najviši procenat infiltriranog tkiva između granula BMM u odnosu na kontrole, koje je bilo i pozitivno na osteopontin.
- prisutvo kolagena je bilo puno obimnije i ekspresija gena *Coll1a1* značajno viša nakon druge nedelje u implantatima sa ADSC nego u kontrolama.
- tkivo nalik osteoidu, sastavljeno od gusto usnopljenih kolagenih vlakana bilo je najzastupljenije u implantatima sa osteoindukovanim ADSC, slabije u implantatima sa svežim ADSC, dok je u kontrolama bilo odsutno ili veoma retko detektovano.
- obimna resorpcija granula BMM i pojačano prisustvo ćelija nalik osteoklastima i osteoblastima nakon osme nedelje nađena je u implantatima sa osteoindukovanim ADSC, slabije u implantatima sa svežim ADSC, dok je u kontrolama bila odsutna ili veoma retko detektovana.
- pojačana ekspresija osteopontina nakon osme nedelje u implantatima sa osteoindukovanim ADSC detektovana je u tkivu oko resorbovanih granula BMM, slabije u implantatima sa svežim ADSC, dok je u kontrolama ekspresija osteopontina bila znatno slabija.
- u implantatima sa ADSC nađena je obimna vaskularizovanost istovremeno sa jako izraženim osteogenim procesom.

*Zaključci komparativne analize uticaja sveže izolovanih i osteoindukovanih ADSC na ektopični osteogeni proces:*

- sveže izolovane i osteoindukovane ADSC poseduju značajno različite potencijale da započnu i održavaju osteogeni proces u ektopičnim uslovima.

- *in vitro* osteoindukovane ADSC imaju sposobnost da započnu i održe osteogeni proces u ektopičnim uslovima i uz prisustvo PRP-a do kraja osme nedelje, što čini osteoindukciju pouzdanom metodom za pripremu ADSC za njihovu potencijalnu primenu u kliničkoj praksi za tretman koštanih defekata.
- sveže izolovane ADSC imaju sposobnost da brže iniciraju osteogeni proces nego osteoindukovane ADSC u ektopičnim uslovima sa prisustvom PRP-a, ali u periodu od kraja četvrte do kraja osme nedelje od implantacije ekspresija svih analiziranih markera osteogeneze slabi i opada što ukazuje da neindukovane ADSC nisu sposobne da održe osteogeni proces na visokom nivou u navedenim eksperimentalnim uslovima.
- sveže izolovane ADSC su dobar kandidat za tretman koštanih oštećenja zbog svog osteogenog potencijala, ali i zbog uštede vremena u onim situacijama kada je u kliničkoj praksi neophodan brz intraoperativni pristup, odnosno rešavanje problema u jednom koraku.
- potrebna su dodatna istraživanja kako bi se precizno definisale doze osteogenih faktora koje je neophodno kombinovati sa svežim ADSC sa ciljem da se podrži na duže vreme osteogeni proces, kao i provera prikazanih rezultata iz ektopičnog modela na ortotopičnim modelima, koji su bliži kliničkim uslovima.



## **7. LITERATURA**

Agnieszka A, Zannettino A, Gronthos S (2013) Multipotential mesenchymal stromal/stem cells in skeletal tissue repair. In: Rajendram R, Preedy VR, Patel VB (eds.) Stem cells and bone tissue. Taylor and Francis group, CRC Press, US, pp 83-102

Amerio P, Vianale G, Reale M, Muraro R, Tulli A, Piattelli A (2010) The effect of deproteinized bovine bone on osteoblast growth factors and proinflammatory cytokine production. *Clinical oral implants research* 21 (6):650-655

Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP (2012) Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical reviews in biomedical engineering* 40 (5):363-408

Anderson HC (1995) Molecular biology of matrix vesicles. *Clinical orthopaedics and related research* 314:266-280

Aslan H, Zilberman Y, Kandel L, Liebergall M, Oskouian RJ, Gazit D, Gazit Z (2006) Osteogenic differentiation of noncultured immunoisolated bone marrow-derived CD105<sup>+</sup> cells. *Stem cells* 24:1728-1737

Baek WY, Lee MA, Jung JW, Kim SY, Akiyama H, de Crombrughe B, Kim JE (2009) Positive regulation of adult bone formation by osteoblast-specific transcription factor osterix. *Journal of bone and mineral research* 24 (6):1055-1065

Bahrambeigi V, Salehi R, Hashemibeni B, Esfandiari E (2012) Transcriptomic comparison of osteopontin, osteocalcin and core binding factor 1 genes between human adipose derived differentiated osteoblasts and native osteoblasts. *Advanced biomedical research* 1:8. doi:10.4103/2277-9175.94431

Balogh ZJ, Reumann MK, Gruen RL, Mayer-Kuckuk P, Schuetz MA, Harris IA, Gabbe BJ, Bhandari M (2012) Advances and future directions for management of trauma patients with musculoskeletal injuries. *The Lancet* 380 (9847):1109-1119

Barba M, Cicione C, Bernardini C, Michetti F, Lattanzi W (2013) Adipose-derived mesenchymal cells for bone regeneration: state of the art. *BioMed research international* 2013:416391. doi:10.1155/2013/416391

Barba-Recreo P, Georgiev-Hristov T, Bravo-Burguillos ER, Abarrategi A, Burgueño M, García-Arranz M (2015) Adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma for preventive treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in a murine model. *Journal of cranio-maxillofacial surgery* 43:1161-1168

Barbeck M, Udeabor S, Lorenz J, Kubesch A, Choukroun J, Sader R, Kirkpatrick C, Ghanaati S (2014) Induction of multinucleated giant cells in response to small sized bovine bone substitute (Bio-Oss™) results in an enhanced early implantation bed vascularization. *Annals of maxillofacial surgery* 4 (2):150-157

Bauer TW, Muschler GF (2000) Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clinical orthopaedics and related research* 371:10-27

Beni BH, Zarei R, Esfandiari E, Valiani A (2013) Adipose-derived stem cells and application in musculoskeletal tissue repair. *Global journal of medicine researches and studies* 1 (1):11-16

Berglundh T, Lindhe J (1997) Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss: An experimental study in the dog. *Clinical oral implants research* 8:117-124

Bills C, Eisenberg H, Pallante SL (1971) Complexes of organic acids with calcium phosphate: the von Kossa stain as a clue to the composition of bone mineral. *The Johns Hopkins medical journal* 128 (4):194-207

Bonadio J, Saunders TL, Tsai E, Goldstein SA, Morris-Wiman J, Brinkley L, Dolan DF, Altschuler RA, Hawkins JE, Bateman JF (1990) Transgenic mouse model of the mild dominant form of osteogenesis imperfecta. *Proceedings of the national academy of sciences* 87 (18):7145-7149

Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM (2013) Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal

vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 15 (6):641-648

Broggini N, Hofstetter W, Hunziker E, Bosshardt DD, Bornstein MM, Seto I, Weibrich G, Buser D (2011) The influence of PRP on early bone formation in membrane protected defects. A histological and histomorphometric study in the rabbit calvaria. *Clinical implant dentistry and related research* 13 (1):1-12

Brown BN, Valentin JE, Stewart-Akers AM, McCabe GP, Badylak SF (2009) Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials* 30 (8):1482-1491

Buma P, Schreurs W, Verdonchot N (2004) Skeletal tissue engineering-from *in vitro* studies to large animal models. *Biomaterials* 25:1487-1495

Cai X, Su X, Li G, Wang J, Lin Y (2012) Osteogenesis of adipose-derived stem cells. In: Lin Y (ed.) *Osteogenesis*. ISBN: 978-953-51-0030-0, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/osteogenesis/osteogenesis-of-adipose-derived-stem-cells>

Cao Z, Zhang H, Zhou X, Han X, Ren Y, Gao T, Xiao Y, de Crombrughe B, Somerman MJ, Feng JQ (2012) Genetic evidence for the vital function of osterix in cementogenesis. *Journal of bone and mineral research* 27 (5):1080-1092

Carano RAD, Filvaroff EH (2003) Angiogenesis and bone repair. *Drug discovery today* 8:980-989

Celil AB, Hollinger JO, Campbell PG (2005) Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling. *Journal of cellular biochemistry* 95 (3):518-528

Cervelli V, De Angelis B, Lucarini L, Spallone D, Balzani A, Palla L, Gentile P, Cerulli P (2010) Tissue regeneration in loss of substance on the lower limbs through use of platelet-rich plasma, stem cells from adipose tissue, and hyaluronic acid. *Advances in skin and wound care* 23 (6):262-272

Cervelli V, Gentile P, Scioli MG, Grimaldi M, Casciani CU, Spagnoli LG, Orlandi A (2009) Application of platelet-rich plasma in plastic surgery: clinical and in vitro evaluation. *Tissue engineering part C: Methods* 15 (4):625-634

Cheng S, Xing W, Zhou X, Mohan S (2013) Haploinsufficiency of osterix in chondrocytes impairs skeletal growth in mice. *Physiological genomics* 45 (19):917-923

Chenu C, Colucci S, Grano M, Zigrino P, Barattolo R, Zambonin G, Baldini N, Vergnaud P, Delmas P, Zallone A (1994) Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *The Journal of cell biology* 127 (4):1149-1158

Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2002) Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *Journal of bone and mineral research* 17 (3):513-520

Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh JJ, Lee SH (2004) Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 33:56-59

Clergeau LP, Danan M, Clergeau-Guerithault S, Brion M (1996) Healing response to anorganic bone implantation in periodontal bony defects in dogs. Part I. Bone regeneration. A micrographic study. *Journal of periodontology* 67:1140-1149

Coelho MB, Cabral JM, Karp JM (2012) Intraoperative stem cell therapy. *Annual review of biomedical engineering* 14:325-349

Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, Quarto N, Contag CH, Wu B, Longaker MT (2004) Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nature biotechnology* 22 (5):560-567

Cvetkovic V, Najman S, Rajkovic J, Zabar AL, Vasiljevic P, Djordjevic LB, Trajanovic M (2013) A comparison of the microarchitecture of lower limb long bones between some animal models and humans: a review. *Veterinarni medicina* 58 (7):339-351

Cvetković VJ, Najdanović JG, Vukelić-Nikolić MĐ, Stojanović S, Najman SJ (2015) Osteogenic potential of in vitro osteo-induced adipose-derived mesenchymal stem cells

combined with platelet-rich plasma in an ectopic model. *International orthopaedics* 39 (11):2173-2180

Daei-farshbaf N, Ardeshirylajimi A, Seyedjafari E, Piryaei A, Fathabady FF, Hedayati M, Salehi M, Soleimani M, Nazarian H, Moradi SL (2014) Bioceramic-collagen scaffolds loaded with human adipose-tissue derived stem cells for bone tissue engineering. *Molecular biology reports* 41 (2):741-749

Datta H, Ng W, Walker J, Tuck S, Varanasi S (2008) The cell biology of bone metabolism. *Journal of clinical pathology* 61 (5):577-587

Dawson E, Mapili G, Erickson K, Taqvi S, Roy K (2008) Biomaterials for stem cell differentiation. *Advanced drug delivery reviews* 60:215-228

Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y (2005) Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Developmental cell* 8 (5):739-750

Declercq HA, De Caluwé T, Krysko O, Bachert C, Cornelissen MJ (2013) Bone grafts engineered from human adipose-derived stem cells in dynamic 3D-environments. *Biomaterials* 34 (4):1004-1017

DeFranco DJ, Glowacki J, Cox KA, Lian JB (1991) Normal bone particles are preferentially resorbed in the presence of osteocalcin-deficient bone particles *in vivo*. *Calcified tissue international* 49 (1):43-50

DeLong JM, Beitzel K, Mazzocca AD, Shepard D, Roller BL, Hanypsiak BT (2011) Update on platelet-rich plasma. *Current orthopaedic practice* 22 (6):514-523

Desbois C, Seldin M, Karsenty G (1994) Localization of the osteocalcin gene cluster on mouse chromosome 3. *Mammalian genome* 5 (5):321-322

Diegelmann RF, Evans MC (2004) Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in biosciences* 9 (1):283-289

Doblare M, Garcia JM, Gomez MJ (2004) Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Engineering fracture mechanics* 71 (13-14):1809-1840

Dodig M, Tadic T, Kronenberg MS, Dacic S, Liu Y-H, Maxson R, Rowe DW, Lichtler AC (1999) Ectopic Msx2 overexpression inhibits and Msx2 antisense stimulates calvarial osteoblast differentiation. *Developmental biology* 209 (2):298-307

Dolder JVD, Mooren R, Vloon AP, Stoelinga PJ, Jansen JA (2006) Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue engineering* 12 (11):3067-3073

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8 (4):315-317

Dovi JV, He LK, DiPietro LA (2003) Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *Journal of leukocyte biology* 73:448-455

Ducy P (2000) Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Developmental dynamics* 219 (4):461-471

Ducy P, Schinke T, Karsenty G (2000) The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289:1501-1504

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997) Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89 (5):747-754

Elisa M, Massimo B, Aaron M, Shanna M, Walter L, Matthew B (2009) Morphological and transcriptomic comparison of adipose and bone marrow derived porcine stem cells. *The open tissue engineering and regenerative medicine journal* 2:20-33

Evans CH, Palmer GD, Pascher A, Porter R, Kwong FN, Gouze E, Gouze JN, Liu F, Steinert A, Betz O, Betz V, Vrahas M, Ghivizzani SC (2007) Facilitated endogenous repair: Making tissue engineering simple, practical, and economical. *Tissue engineering* 13:1987-1993

Fang H, Peng S, Chen A, Li F, Ren K, Hu N (2003) Biocompatibility studies on fibrin glue cultured with bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*. *Journal of Huazhong university of science and technology medical sciences* 24 (3):272-274

Fedarko N, Bianco P, Vetter U, Robey PG (1990) Human bone cell enzyme expression and cellular heterogeneity: correlation of alkaline phosphatase enzyme activity with cell cycle. *Journal of cellular physiology* 144 (1):115-121

Feng X, McDonald J (2010) Disorders of bone remodeling. *Annual review of pathology* 6:121-145

Fisher LW, Hawkins GR, Tuross N, Termine JD (1987) Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *Journal of biological chemistry* 262 (20):9702-9708

Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH (2006) Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in biotechnology* 24 (4):150-154

Freymler EG, Aghaloo TL (2004) Platelet-rich plasma: ready or not. *Journal of oral and maxillofacial surgery* 62:484-488

Friedenstein AJ (1961) Osteogenetic activity of transplanted transitional epithelium. *Cells tissues organs* 45 (1-2):31-59

Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, Van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS (2005) Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *Journal of biological chemistry* 280 (39):33132-33140

Gay C, Gilman V, Sugiyama T (2000) Perspectives on osteoblast and osteoclast function. *Poultry science* 79 (7):1005-1008

Gazzerro E, Canalis E (2006) Skeletal actions of insulin-like growth factors. *Expert review of endocrinology and metabolism* 1:47-56

Gerstenfeld LC, Chipman SD, Glowacki J, Lian JB (1987) Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. *Developmental biology* 122 (1):49-60

Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA (2007) Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research* 100 (9):1249-1260

Gimble JM, Bunnell BA, Chiu ES, Guilak F (2011) Concise Review: Adipose-derived stromal vascular fraction cells and stem cells: Let's not get lost in translation. *Stem cells* 29 (5):749-754

Gluhak-Heinrich J, Villarreal A, Pavlin D (2000) Reciprocal regulation of osteopontin gene during mechanically induced bone formation and resorption. *Journal of bone and mineral research* 15 (1):M086-M086

Golub EE, Boesze-Battaglia K (2007) The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current opinion in orthopaedics* 18 (5):444-448

Goto H, Matsuyama T, Miyamoto M, Yonamine Y, Izumi Y (2006) Platelet-rich plasma/osteoblasts complex induces bone formation via osteoblastic differentiation following subcutaneous transplantation. *Journal of periodontal research* 41 (5):455-462

Gutierrez S, Javed A, Tennant DK, van Rees M, Montecino M, Stein GS, Stein JL, Lian JB (2002) CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP)  $\beta$  and  $\delta$  activate osteocalcin gene transcription and synergize with Runx2 at the C/EBP element to regulate bone-specific expression. *Journal of biological chemistry* 277 (2):1316-1323

Hadjidakis DJ, Androulakis II (2006) Bone remodeling. *Annals of the New York academy of sciences* 1092 (1):385-396

Halvorsen YDC, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, Paschalis EP, Wilkison WO, Gimble JM (2001) Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue engineering* 7 (6):729-741

Hao W, Pang L, Jiang M, Lv R, Xiong Z, Hu YY (2010) Skeletal repair in rabbits using a novel biomimetic composite based on adipose-derived stem cells encapsulated in collagen I gel with PLGA-beta-TCP scaffold. *Journal of orthopaedic research* 28 (2):252-257



Hassan MQ, Javed A, Morasso MI, Karlin J, Montecino M, Van Wijnen AJ, Stein GS, Stein JL, Lian JB (2004) Dlx3 transcriptional regulation of osteoblast differentiation: temporal recruitment of Msx2, Dlx3, and Dlx5 homeodomain proteins to chromatin of the osteocalcin gene. *Molecular and cellular biology* 24 (20):9248-9261

Hattori H, Masuoka K, Sato M, Ishihara M, Asazuma T, Takase B, Kikuchi M, Nemoto K, Ishihara M (2006) Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *Journal of biomedical materials research part B: Applied biomaterials* 76 (1):230-239

Hauschka PV, Lian JB, Cole D, Gundberg CM (1989) Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological reviews* 69 (3):990-1047

Hayashi O, Katsube Y, Hirose M, Ohgushi H, Ito H (2008) Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcified tissue international* 82 (3):238-247

Helder MN, Knippenberg M, Klein-Nulend J, Wuisman PI (2007) Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine. *Tissue engineering* 13 (8):1799-1808

Hert J, Fiala P, Petrtyl M (1994) Osteon orientation of the diaphysis of the long bones in man. *Bone* 15:269-277

Hicok KC, Du Laney TV, Zhou YS, Halvorsen Y-DC, Hitt DC, Cooper LF, Gimble JM (2004) Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid *in vivo*. *Tissue engineering* 10 (3-4):371-380

Hoff J (2000) Methods of blood collection in the mouse. *Lab animal* 29:47-53

Hoffman LM, Carpenter MK (2005) Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 23 (6):699-708

Horwitz EM, Le BK, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A (2005) Clarification of the nomenclature for MSC: The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 7:393-395

Huang JI, Beanes SR, Zhu M, Lorenz HP, Hedrick MH, Benhaim P (2002) Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. *Plastic and reconstructive surgery* 109 (3):1033-1041

Huang L, Teng XY, Cheng YY, Lee KM, Kumta SM (2004) Expression of preosteoblast markers and Cbfa-1 and Osterix gene transcripts in stromal tumour cells of giant cell tumour of bone. *Bone* 34:393-401

Huang W, Yang S, Shao J, Li YP (2007a) Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Frontiers in bioscience* 12:3068-3092

Huang Z, Nelson ER, Smith RL, Goodman SB (2007b) The sequential expression profiles of growth factors from osteroprogenitors to osteoblasts *in vitro*. *Tissue engineering* 13 (9):2311-2320

Im GI (2013) Adipose stem cells and skeletal repair. *Histology and histopathology* 28 (5):557-564

Intini G (2009) The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials* 30 (28):4956-4966

Intini G, Andreana S, Intini FE, Buhite RJ, Bobek LA (2007) Calcium sulfate and platelet-rich plasma make a novel osteoinductive biomaterial for bone regeneration. *Journal of translational medicine* 5 (1):13

Jakob M, Saxer F, Scotti C, Schreiner S, Studer P, Scherberich A, Heberer M, Martin I (2012) Perspective on the evolution of cell-based bone tissue engineering strategies. *European surgical research* 49 (1):1-7

Janicki P, Schmidmaier G (2011) What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury* 42 (2):S77-S81

Jensen SS, Aaboe M, Pinholt EM, Hjørting-Hansen E, Melsen F, Ruyter IE (1996) Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *International journal of oral and maxillofacial implants* 11:55-66

Jeon O, Rhie JW, Kwon IK, Kim JH, Kim BS, Lee S-H (2008) *In vivo* bone formation following transplantation of human adipose-derived stromal cells that are not differentiated osteogenically. *Tissue engineering Part A* 14 (8):1285-1294

Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC (1998) Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *Journal of bone and mineral research* 13 (5):793-802

Jurgens WJ, Kroeze RJ, Bank RA, Ritt MJ, Helder MN (2011) Rapid attachment of adipose stromal cells on resorbable polymeric scaffolds facilitates the one-step surgical procedure for cartilage and bone tissue engineering purposes. *Journal of orthopaedic research* 29 (6):853-860

Kaback LA, Soung DY, Naik A, Smith N, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Drissi H (2008) Osterix/Sp7 regulates mesenchymal stem cell mediated endochondral ossification. *Journal of cellular physiology* 214 (1):173-182

Kanczler J, Oreffo R (2008) Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *European cells and materials* 15:100-14

Karsenty G, de Crombrughe B (1990) Two different negative and one positive regulatory factors interact with a short promoter segment of the alpha 1 (I) collagen gene. *Journal of biological chemistry* 265 (17):9934-9942

Kasperk CH, Wergedal JE, Mohan S, Long DL, William Latj K, Baylink DJ (1990) Interactions of growth factors present in bone matrix with bone cells: effects on DNA synthesis and alkaline phosphatase. *Growth factors* 3 (2):147-158

Kasten P, Vogel J, Geiger F, Niemeyer P, Luginbühl R, Szalay K (2008a) The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials* 29 (29):3983-3992

Kasten P, Vogel J, Beyen I, Weiss S, Niemeyer P, Leo A, Luginbühl R (2008b) Effect of platelet-rich plasma on the *in vitro* proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on distinct calcium phosphate scaffolds: the specific surface area makes a difference. *Journal of biomaterials applications* 23 (2):169-188

Katagiri T, Lee T, Takeshima H, Suda T, Tanaka H (1990) Transforming growth factor- $\beta$  modulates proliferation and differentiation of mouse clonal osteoblastic MC3T3-E1 cells depending on their maturation stages. *Bone and mineral* 11 (3):285-293

Kim YJ, Kim HN, Park EK, Lee BH, Ryoo HM, Kim SY, Kim IS, Stein JL, Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, Choi JY (2006) The bone-related Zn finger transcription factor Osterix promotes proliferation of mesenchymal cells. *Gene* 366:145-151.

Kirkham G, Cartmell S (2007) Genes and proteins involved in the regulation of osteogenesis. In: Ashammakhi N, Reis R, Chiellini E, (eds.) *Topics in tissue engineering*, vol. 3, pp 1-22

Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrughe B, Nakashima K, Takayanagi H (2005) NFAT and osterix cooperatively regulate bone formation. *Nature medicine* 11 (8):880-885

Komori T (2006) Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *Journal of cellular biochemistry* 99 (5):1233-1239

Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG (2001) Circulating skeletal stem cells. *The journal of cell biology* 153:1133-1140

Langer R, Vacanti, JP (1993) Tissue engineering. *Science* 260:920-926

Lapunzina P, Aglan M, Temtamy S, Caparrós-Martín JA, Valencia M, Letón R, Martínez-Glez V, Elhossini R, Amr K, Vilaboa N (2010) Identification of a frameshift mutation in Osterix in a patient with recessive osteogenesis imperfecta. *The american journal of human genetics* 87 (1):110-114

Lee HR, Kim HJ, Ko JS, Choi YS, Ahn MW, Kim S, Do SH (2013) Comparative characteristics of porous bioceramics for an osteogenic response in vitro and in vivo. *Plos one* 8 (12):e84272

Lee LT, Kwan P-C, Chen YF, Wong YK (2008) Comparison of the effectiveness of autologous fibrin glue and macroporous biphasic calcium phosphate as carriers in the osteogenesis process with or without mesenchymal stem cells. *Journal of the Chinese medical association* 71 (2):66-73

Lee MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM, Ryoo HM (2003) BMP-2-induced Osterix expression is mediated by *Dlx5* but is independent of *Runx2*. *Biochemical and biophysical research communications* 309 (3):689-694

Lian J, Roufosse A, Reit B, Glimcher M (1982) Concentrations of osteocalcin and phosphoprotein as a function of mineral content and age in cortical bone. *Calcified tissue international* 34 (2):S82-87

Lian J, Stewart C, Puchacz E, Mackowiak S, Shalhoub V, Collart D, Zambetti G, Stein G (1989) Structure of the rat osteocalcin gene and regulation of vitamin D-dependent expression. *Proceedings of the national academy of sciences* 86 (4):1143-1147

Lian JB, Stein GS (1992) Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Critical reviews in oral biology and medicine* 3 (3):269-305

Lian JB, Stein GS (1995) Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *Iowa orthopaedic journal* 15:118-140

Lian JB, Stein GS (2003) *Runx2/Cbfa1*: a multifunctional regulator of bone formation. *Current pharmaceutical design* 9 (32):2677-2685

Liggett WH, Lian JB, Greenberger JS, Glowacki J (1994) Osteocalcin promotes differentiation of osteoclast progenitors from murine long-term bone marrow cultures. *Journal of cellular biochemistry* 55 (2):190-199

Liu Q, Cen L, Yin S, Chen L, Liu G, Chang J, Cui L (2008a) A comparative study of proliferation and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells on akermanite and  $\beta$ -TCP ceramics. *Biomaterials* 29 (36):4792-4799

Liu SS, Lei JX, Li Y, Xiang P, Zhou DH (2012) Isolation, Identification, and Biological Characteristics of Mouse Adipose-derived Stromal Cells. *Journal of Sun Yat-Sen university (medical sciences)* 3:299-304.

Liu Y, Zhou Y, Feng H, Ma G-e, Ni Y (2008b) Injectable tissue-engineered bone composed of human adipose-derived stromal cells and platelet-rich plasma. *Biomaterials* 29 (23):3338-3345

Long F (2012) Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature reviews molecular cell biology* 13 (1):27-38

Longmore GD, Pharr P, Neumann D, Lodish HF (1993) Both megakaryocytopoiesis and erythropoiesis are induced in mice infected with a retrovirus expressing an oncogenic erythropoietin receptor. *Blood* 82 (8):2386-2395

Lopez MJ, Daigle PR (2013) Adult multipotent stromal cell technology for bone regeneration: a review. *Veterinary surgery* 42 (1):1-11

Maity S, Golumbek P, Karsenty G, de Crombrughe B (1988) Selective activation of transcription by a novel CCAAT binding factor. *Science* 241:582-585.

Malicev E, Radosavljevic D, Velikonja NK (2007) Fibrin gel improved the spatial uniformity and phenotype of human chondrocytes seeded on collagen scaffolds. *Biotechnology and bioengineering* 96 (2):364-370

Man Y, Wang P, Guo Y, Xiang L, Yang Y, Qu Y, Gong P, Deng L (2012) Angiogenic and osteogenic potential of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cell laden alginate microspheres. *Biomaterials* 33 (34):8802-8811

Mark MP, Prince CW, Gay S, Austin RL, Butler WT (1988) 44-kDal bone phosphoprotein (osteopontin) antigenicity at ectopic sites in newborn rats: kidney and nervous tissues. *Cell and tissue research* 251 (1):23-30

Martin I, Wendt D, Heberer M (2004) The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in biotechnology* 22 (2):80-86

Marx RE (2004) Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of oral and maxillofacial surgery* 62 (4):489-496

Mathews S, Bhonde R, Gupta PK, Totey S (2012) Extracellular matrix protein mediated regulation of the osteoblast differentiation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *Differentiation* 84:185-92

Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R, Yoneda T (2008) BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *Journal of biological chemistry* 283 (43):29119-29125

McGee-Russell S (1958) Histochemical methods for calcium. *Journal of histochemistry & cytochemistry* 6 (1):22-42

Mckee MD, Nanci A (1996) Osteopontin: an interfacial extracellular matrix protein in mineralized tissues. *Connective tissue research* 35 (1-4):197-205

Mehrkens A, Saxer F, Güven S, Hoffmann W, Müller AM, Jakob M, Weber FE, Martin I, Scherberich A (2012) Intraoperative engineering of osteogenic grafts combining freshly harvested, human adipose-derived cells and physiological doses of bone morphogenetic protein-2. *European cells and materials* 24:308-319

Menea C, Kurihara N, Roodman GD (2000) CFU-GM-derived cells form osteoclasts at a very high efficiency. *Biochemical and biophysical research communications* 267 (3):943-946

Milat F, Ng KW (2009) Is Wnt signalling the final common pathway leading to bone formation? *Molecular and cellular endocrinology* 310:52-62

Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G (2006) Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem cells* 24 (2):376-385

Mizuno H, Tobita M, Uysal AC (2012) Concise review: adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem cells* 30 (5):804-810

Moshiri A, Oryan A (2013) Role of platelet rich plasma in soft and hard connective tissue healing: an evidence based review from basic to clinical application. *Hard Tissue* 2 (1):6

Moioli EK, Clark PA, Chen M, Dennis JE, Erickson HP, Gerson SL, Mao JJ (2008) Synergistic actions of hematopoietic and mesenchymal stem/progenitor cells in vascularizing bioengineered tissues. *Plos one* 3 (12):e3922. doi:10.1371/journal.pone.0003922

Mooren R, Dankers A, Merckx M, Bronkhorst E, Jansen J, Stoelinga P (2010) The effect of platelet-rich plasma on early and late bone healing using a mixture of particulate autogenous cancellous bone and Bio-Oss<sup>®</sup>: an experimental study in goats. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 39 (4):371-378

Mooren R, Merckx M, Bronkhorst E, Jansen J, Stoelinga P (2007) The effect of platelet-rich plasma on early and late bone healing: an experimental study in goats. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 36 (7):626-631

Morais S, Dias N, Sousa J, Fernandes M, Carvalho G (1999) *In vitro* osteoblastic differentiation of human bone marrow cells in the presence of metal ions. *Journal of biomedical materials research* 44 (2):176-190

Muller A, Mehrkens A, Schafer D, Jaquiere C, Guven S, Lehmicke M, Martinetti R, Farhadi I, Jakob M, Scherberich A (2010) Towards an intraoperative engineering of osteogenic and vasculogenic grafts from the stromal vascular fraction of human adipose tissue. *European cells and materials* 19:127-135

Muller AM, Davenport M, Verrier S, Drosier R, Alini M, Bocelli-Tyndall C, Schaefer DJ, Martin I, Scherberich A (2009) Platelet lysate as a serum substitute for 2D static and 3D perfusion culture of stromal vascular fraction cells from human adipose tissue. *Tissue engineering part a* 15:869-875

Mulnard J, Huygens R (1978) Ultrastructural localization of non-specific alkaline phosphatase during cleavage and blastocyst formation in the mouse. *Journal of embryology and experimental morphology* 44 (1):121-131

Murphy MB, Blashki D, Buchanan RM, Fan D, De Rosa E, Shah RN, Stupp SI, Weiner BK, Simmons PJ, Ferrari M (2011) Multi-composite bioactive osteogenic sponges featuring mesenchymal stem cells, platelet-rich plasma, nanoporous silicon enclosures,



and peptide amphiphiles for rapid bone regeneration. *Journal of functional biomaterials* 2 (2):39-66

Myllyharju J, Kivirikko KI (2001) Collagens and collagen-related diseases. *Annals of medicine* 33 (1):7-21

Naganawa T, Xiao L, Abogunde E, Sobue T, Kalajzic I, Sabbieti M, Agas D, Hurley MM (2006) *In vivo* and *in vitro* comparison of the effects of FGF-2 null and haplo-insufficiency on bone formation in mice. *Biochemical and biophysical research communication* 339:490-498

Najdanović JG, Cvetković VJ, Stojanović S, Vukelić-Nikolić MĐ, Stanisavljević MN, Živković JM, Najman SJ (2015) The influence of adipose-derived stem cells induced into endothelial cells on ectopic vasculogenesis and osteogenesis. *Cellular and molecular bioengineering* 8 (4):577-590

Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrugge B (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108 (1):17-29

Nandi S, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, De D, Basu D (2010) Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *Indian journal of medical research* 132:15-30

Narisawa S, Fröhlander N, Millán JL (1997) Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Developmental dynamics* 208 (3):432-446

Nehls MC, Rippe RA, Veloz L, Brenner DA (1991) Transcription factors nuclear factor I and Sp1 interact with the murine collagen alpha 1 (I) promoter. *Molecular and cellular biology* 11 (8):4065-4073

Neve A, Corrado A, Cantatore FP (2013) Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. *Journal of cellular physiology* 228 (6):1149-1153

Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp NP, Mehlhorn AT, Pearce S, Kasten P (2010) Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose

tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials* 31 (13):3572-3579

Niemeyer P, Krause U, Fellenberg J, rg o, Kasten P, Seckinger A, Ho AD, Simank HG (2004) Evaluation of mineralized collagen and  $\alpha$ -tricalcium phosphate as scaffolds for tissue engineering of bone using human mesenchymal stem cells. *Cells tissues organs* 177 (2):68-78

Nishimura R, Wakabayashi M, Hata K, Matsubara T, Honma S, Wakisaka S, Kiyonari H, Shioi G, Yamaguchi A, Tsumaki N (2012) Osterix regulates calcification and degradation of chondrogenic matrices through matrix metalloproteinase 13 (MMP13) expression in association with transcription factor Runx2 during endochondral ossification. *Journal of biological chemistry* 287 (40):33179-33190

Nishio Y, Dong Y, Paris M, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H (2006) Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene* 372:62-70

O'Keefe RJ, Mao J (2011) Bone tissue engineering and regeneration: from discovery to the clinic-an overview. *Tissue engineering Part B: Reviews* 17 (6):389-392

Orimo H (2010) The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *Journal of Nippon medical school* 77 (1):4-12

Oryan A, Alidadi S, Moshiri A (2013) Current concerns regarding healing of bone defects. *Hard tissue* 2 (2):13

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 (18) doi:10.1186/1749-799X-9-18

Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS (1990) Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *Journal of cellular physiology* 143 (3):420-430

Pampena D, Robertson K, Litvinova O, Lajoie G, Goldberg H, Hunter G (2004) Inhibition of hydroxyapatite formation by osteopontin phosphopeptides. *Biochemical journal* 378:1083-1087

Parfitt AM (2008) Skeletal heterogeneity and the purposes of bone remodeling: implications for the understanding of osteoporosis. In: Marcus R, Feldman D, Nelson DA, Rosen CJ (eds.) *Osteoporosis*, Elsevier, San Diego, pp 71-92

Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong ME, Mikos AG (2008) Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone* 43 (5):931-940

Peetz M (1997) Characterisation of xenogenic bone material. In: Boyne PJ (ed.) *Osseous Reconstruction of the maxilla and mandibula: Surgical techniques using titanium mesh and bone mineral*, Carol Stream, IL. Quintessence, pp 87-100

Peptan IA, Hong L, Mao JJ (2006) Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plastic and reconstructive surgery* 117 (5):1462-1470.

Phinney D (2008) Isolation of mesenchymal stem cells from murine bone marrow by immunodepletion. In: Prockop D, Phinney D, Bunnell B (eds.) *Mesenchymal stem cells, Methods in molecular biology*, Humana Press, vol. 449, pp 171-186

Piattelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piattelli A (1998) Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 14 (6):835-840

Piche J, Graves D (1989) Study of the growth factor requirements of human bone-derived cells: a comparison with human fibroblasts. *Bone* 10 (2):131-138

Pinero GJ, Farach-Carson MC, Devoll RE, Aubin JE, Brunn JC, Butler WT (1995) Bone matrix proteins in osteogenesis and remodelling in the neonatal rat mandible as studied by immunolocalization of osteopontin, bone sialoprotein,  $\alpha$  2 HS-glycoprotein and alkaline phosphatase. *Archives of oral biology* 40 (2):145-155

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147

Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M (2004) Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109 (5):656-663

Raggatt LJ, Partridge NC (2010) Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *Journal of biological chemistry* 285 (33):25103-25108

Rittling SR, Matsumoto HN, Mckee MD, Nanci A, An XR, Novick KE, Kowalski AJ, Noda M, Denhardt DT (1998) Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *Journal of bone and mineral research* 13 (7):1101-1111

Robey PG (2011) Cell sources for bone regeneration: the good, the bad, and the ugly (but promising). *Tissue engineering Part B: Reviews* 17 (6):423-430

Rodriguez I, Growney KE, Bowlin G, Sell S (2014) Platelet-rich plasma in bone regeneration: engineering the delivery for improved clinical efficacy. *BioMed research international* 2014:392398

Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ (1989) *Histology: a text and atlas*. Williams & Wilkins Baltimore, MD

Sabbieti MG, Agas D, Materazzi S, Capacchietti M, Materazzi G, Hurley MM, Menghi G, Marchetti L (2008) Prostaglandin F2alpha involves heparan sulphate sugar chains and FGFRs to modulate osteoblast growth and differentiation. *Journal of cellular physiology* 217:48-59

Santos A, Bakker A, Klein-Nulend J (2009) The role of osteocytes in bone mechanotransduction. *Osteoporosis International* 20 (6):1027-1031

Santos MI, Reis RL (2010) Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromolecular bioscience* 10:12-27

Schäffler A, Büchler C (2007) Concise review: Adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem cells* 25 (4):818-827

Scherberich A, Galli R, Jaquiere C, Farhadi J, Martin I (2007) Three-dimensional perfusion culture of human adipose tissue-derived endothelial and osteoblastic progenitors generates osteogenic constructs with intrinsic vascularization capacity. *Stem cells* 25 (7):1823-1829

Scherberich A, Müller AM, Schäfer DJ, Banfi A, Martin I (2010) Adipose tissue-derived progenitors for engineering osteogenic and vasculogenic grafts. *Journal of cellular physiology* 225 (2):348-353

Schneider P, Meier M, Wepf R, Müller R (2010) Towards quantitative 3D imaging of the osteocyte lacuno-canalicular network. *Bone* 47: 848-858

Schwarting T, Benölken M, Ruchholtz S, Frink M, Lechler P (2015) Bone morphogenetic protein-7 enhances bone-tendon integration in a murine *in vitro* co-culture model. *International orthopaedics* 39:799-805

Scott MA, Levi B, Askarinam A, Nguyen A, Rackohn T, Ting K, Soo C, James AW (2011) Brief review of models of ectopic bone formation. *Stem cells and development* 21 (5):655-667

Secunda R, Vennila R, Mohanashankar AM, Rajasundari M, Jeswanth S, Surendran R (2015) Isolation, expansion and characterisation of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study. *Cytotechnology* 67 (5):793-807

Seong JM, Kim B-C, Park JH, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang YS (2010) Stem cells in bone tissue engineering. *Biomedical materials* 5 (6):062001. doi:10.1088/1748-6041/5/6/062001

Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG (2008) Bone remodelling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in cell and developmental biology* 19:459-466

Sharma U, Pal D, Prasad R (2014) Alkaline phosphatase: An overview. *Indian journal of clinical biochemistry* 29 (3):269-278

Sinha KM, Zhou X (2013) Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *Journal of cellular biochemistry* 114 (5):975-984

Sollazzo V, Palmieri A, Scapoli L, Martinelli M, Girardi A, Alviano F, Pellati A, Perrotti V, Carinci F (2010) Bio-Oss<sup>®</sup> acts on stem cells derived from peripheral blood. *Oman medical journal* 25 (1):26-31

Standal T, Borset M, Sundan A (2004) Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Experimental oncology* 26 (3):179-184

Stein GS, Lian JB, Van Wijnen AJ, Stein JL (1997) The osteocalcin gene: a model for multiple parameters of skeletal-specific transcriptional control. *Molecular biology reports* 24 (3):185-196

Stein GS, Lian JB, Van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Javed A, Zaidi SK, Young DW, Choi J-Y, Pockwinse SM (2004) Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene* 23 (24):4315-4329

Stigbrand T (1984) Present status and future trends of human alkaline phosphatases. In: Stigbrand T, Fishman WH (eds.) *Human alkaline phosphatases*, Alan R. Liss, New York, pp 3-14

Storgard-Jensen S, Aaboe M, Pinholt ES, Hjørtting-Hansen E, Melsen F, Ruyter IE (1996) Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *International journal of oral and maxillofacial implants* 11:55-66

Sumanasinghe RD, Osborne JA, Lobo EG (2009) Mesenchymal stem cell-seeded collagen matrices for bone repair: Effects of cyclic tensile strain, cell density, and media

conditions on matrix contraction *in vitro*. Journal of biomedical materials research Part A 88 (3):778-786

Sun G, Shen YI, Kusuma S, Fox-Talbot K, Steenbergen CJ, Gerecht S (2011) Functional neovascularization of biodegradable dextran hydrogels with multiple angiogenic growth factors. Biomaterials 32 (1):95-106

Sung J, Yang H, Park J, Choi G, Joh J, Kwon C, Chun J, Lee S, Kim S (2008) Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. Transplantation proceedings 40(8):2649-2654

Tadic T, Dodig M, Erceg I, Marijanovic I, Mina M, Kalajzic Z, Velonis D, Kronenberg MS, Kosher RA, Ferrari D (2002) Overexpression of Dlx5 in chicken calvarial cells accelerates osteoblastic differentiation. Journal of bone and mineral research 17 (6):1008-1014

Tanaka H, Wakisaka A, Ogasa H, Kawai S, Liang CT (2003) Effects of basic fibroblast growth factor on osteoblast-related gene expression in the process of medullary bone formation induced in rat femur. Journal of bone and mineral metabolism 21 (2):74-79

Thery A, Bléry P, Malard O, Pilet P, Sourice S, Corre P, Guicheux J, Weiss P, Espitalier F (2015) Role of the stromal vascular fraction from adipose tissue in association with a phosphocalcic scaffold in bone regeneration in an irradiated area. Journal of cranio-maxillofacial surgery 43 (7):1169-1176

Thorwarth M, Schlegel KA, Wehrhan F, Srour S, Schultze-Mosgau S (2006) Acceleration of de novo bone formation following application of autogenous bone to particulated anorganic bovine material *in vivo*. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontology 101 (3):309-316

Toma C, Ashkar S, Gray M, Schaffer J, Gerstenfeld L (1997) Signal transduction of mechanical stimuli is dependent on microfilament integrity: identification of osteopontin as a mechanically induced gene in osteoblasts. Journal of bone and mineral research 12 (10):1626-1636

Traini T, Degidi M, Sammons R, Stanley P, Piattelli A (2008) Histologic and elemental microanalytical study of anorganic bovine bone substitution following sinus floor augmentation in humans. *Journal of periodontology* 79 (7):1232-1240

Tu J, Wang H, Li H, Dai K, Wang J, Zhang X (2009) The *in vivo* bone formation by mesenchymal stem cells in zein scaffolds. *Biomaterials* 30 (26):4369-4376

Tu Q, Valverde P, Li S, Zhang J, Yang P, Chen J (2007) Osterix overexpression in mesenchymal stem cells stimulates healing of critical-sized defects in murine calvarial bone. *Tissue engineering* 13 (10):2431-2440

Tuan RS, Boland G, Tuli R (2003) Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis research and therapy* 5 (1):32-45

Väänänen H, Karhukorpi E, Sundquist K, Wallmark B, Roininen I, Hentunen T, Tuukkanen J, Lakkakorpi P (1990) Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H (+)-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. *The journal of cell biology* 111 (3):1305-1311

Vaananen H, Zhao H, Mulari M, Halleen JM (2000) The cell biology of osteoclast function. *Journal of cell science* 113 (3):377-381

Valenti MT, Carbonare LD, Donatelli L, Bertoldo F, Zanatta M, Lo Cascio V (2008) Gene expression analysis in osteoblastic differentiation from peripheral blood mesenchymal stem cells. *Bone* 43 (6):1084-1092

Van der Rest M, Garrone R (1991) Collagen family of proteins. *The FASEB journal* 5 (13):2814-2823

Varanasi SS, Datta HK (2005) Characterisation of cytosolic FK506 binding protein 12 and its role in modulating expression of Cbfa1 and osterix in ROS 17/2.8 cells. *Bone* 36:243-253

Veillette CJ, McKee MD (2007) Growth factors-BMPs, DBMs, and buffy coat products:are there any proven differences amongst them? *Injury* 38 (1):s38-s48



Vergroesen PPA, Kroeze RJ, Helder MN, Smit TH (2011) The use of poly (L-lactide-co-caprolactone) as a scaffold for adipose stem cells in bone tissue engineering: application in a spinal fusion model. *Macromolecular bioscience* 11 (6):722-730

Vogel JP, Szalay K, Geiger F, Kramer M, Richter W, Kasten P (2006) Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics. *Platelets* 17 (7):462-469

Wang C, Duan Y, Markovic B, Barbara J, Howlett CR, Zhang X, Zreiqat H (2004) Phenotypic expression of bone-related genes in osteoblasts grown on calcium phosphate ceramics with different phase compositions. *Biomaterials* 25 (13):2507-2514

Wang X, Kua HY, Hu Y, Guo K, Zeng Q, Wu Q, Ng HH, Karsenty G, de Crombrughe B, Yeh J (2006) p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis, and bone remodeling. *The Journal of cell biology* 172 (1):115-125

Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE (2004) Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 34 (4):665-671

Wennberg C, Hessle L, Lundberg P, Mauro S, Narisawa S, Lerner UH, Millán JL (2000) Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *Journal of bone and mineral research* 15 (10):1879-1888

Wetzel AC, Stich H, Caffesse RG (1995) Bone apposition onto oral implants in the sinus area filled with different grafting materials. A histological study in beagle dogs. *Clinical oral implants research* 6:155-163

White C, Gardiner E, Eisman J (1998) Tissue specific and vitamin D responsive gene expression in bone. *Molecular biology reports* 25 (1):45-61

Wilcox FH, Taylor BA (1981) Genetics of the Akp-2 locus for alkaline phosphatase of liver, kidney, bone, and placenta in the mouse linkage with the Ahd-1 locus on chromosome 4. *Journal of heredity* 72 (6):387-390

Wu L, Wu Y, Lin Y, Jing W, Nie X, Qiao J, Liu L, Tang W, Tian W (2007) Osteogenic differentiation of adipose derived stem cells promoted by overexpression of osterix. *Molecular and cellular biochemistry* 301 (1-2):83-92

Wuthier RE, Register T (1985) Role of alkaline phosphatase, a polyfunctional enzyme, in mineralizing tissues. In: Butler WT, (ed.) *Chemistry and biology of mineralized tissues*, Birmingham: EBSCO Media, pp 113-124

Yamate T, Mocharla H, Taguchi Y, Igietseme JU, Manolagas SC, Abe E (1997) Osteopontin expression by osteoclast and osteoblast progenitors in the murine bone marrow: demonstration of its requirement for osteoclastogenesis and its increase after ovariectomy. *Endocrinology* 138 (7):3047-3055

Yin T, Li L (2006) The stem cell niches in bone. *Journal of clinical investigation* 116 (5):1195-1201

Yoshida CA, Komori H, Maruyama Z, Miyazaki T, Kawasaki K, Furuichi T, Fukuyama R, Mori M, Yamana K, Nakamura K (2012) SP7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice. *Plos one* 7(3): e32364

You J, Reilly GC, Zhen X, Yellowley CE, Chen Q, Donahue HJ, Jacobs CR (2001) Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts. *Journal of biological chemistry* 276 (16):13365-13371

Yu H, VandeVord PJ, Mao L, Matthew HW, Wooley PH, Yang SY (2009) Improved tissue-engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization. *Biomaterials* 30 (4):508-517

Zanetti AS, Sabliov C, Gimble JM, Hayes DJ (2013) Human adipose-derived stem cells and three-dimensional scaffold constructs: A review of the biomaterials and models

currently used for bone regeneration. *Journal of biomedical materials research Part B: Applied biomaterials* 101 (1):187-199

Zhang C (2010) Review Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor *Osx*. *Journal of orthopaedic surgery and research* 5:37

Zhang C, Cho K, Huang Y, Lyons JP, Zhou X, Sinha K, McCrea PD, de Crombrugge B (2008) Inhibition of Wnt signaling by the osteoblast-specific transcription factor *Osterix*. *Proceedings of the national academy of sciences* 105 (19):6936-6941

Zhao G, Monier-Faugere MC, Langub MC, Geng Z, Nakayama T, Pike JW, Chernausk SD, Rosen CJ, Donahue LR, Malluche HH, Fagin JA, Clemens TL (2000) Targeted overexpression of insulin-like growth factor I to osteoblasts of transgenic mice: increased trabecular bone volume without increased osteoblast proliferation. *Endocrinology* 141:2674-2682

Zhou J, Dong J (2012) Vascularization in the bone repair. In: Lin Y, (ed.) *Osteogenesis*, InTech, doi:10.5772/36325

Zhou X, Zhang Z, Feng JQ, Dusevich VM, Sinha K, Zhang H, Darnay BG, de Crombrugge B (2010) Multiple functions of *Osterix* are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. *Proceedings of the national academy of sciences* 107 (29):12919-12924

Živković JM, Najman SJ, Vukelić MĐ, Stojanović S, Aleksić MV, Stanisavljević MN, Najdanović JG (2015) Osteogenic effect of inflammatory macrophages loaded onto mineral bone substitute in subcutaneous implants. *Archives of biological sciences* 67 (1): 173-186

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell* 13 (12):4279-4295

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering* 7:211-228

<http://www.geistlich.com.br/>

## **PRILOG - Lista skraćenica**

**ADSC** (*Adipose-derived mesenchymal stem cells*, eng.) – mezenhimske matične ćelije masnog tkiva

**Alpl** (*Alkaline phosphatase liver/bone/kidney*, eng.) – gen za tkivno-nespecifičnu alkalnu fosfatazu koja se eksprimira u jetri, kostima i bubrezima

**Actb** – gen za  $\beta$ -aktinski lanac

**Ang-2** (*Angiopoietin 2*, eng.) – angiopoetin-2

**ADP** (*Adenosine diphosphate*, eng.) – adenzin difosfat

**ATP** (*Adenosine triphosphate*, eng.) – adenzin trifosfat

**Bglap** (*Bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein*, eng.) – gen za osteokalcin

**BMM** (*Bone mineral matrix*, eng.) – mineralni koštani matriks

**Bio-Oss**<sup>®</sup> – komercijalni naziv koštanog zamenika (biomaterijala)

**BMP-2** (*Bone morphogenetic protein 2*- eng.) – protein morfogeneze kosti 2

**BMP** (*Bone morphogenetic protein*- eng.) – protein morfogeneze kosti

**BMSC** (*Bone marrow stem cells*, eng.) – mezenhimske matične ćelije koštane srži

**Col1a1** (*Collagen type I  $\alpha 1$  chain*, eng.) – gen za alfa 1 lanac kolagena tipa I

**CD** (*Cluster of differentiation*, eng.) – klaster diferencijacije; oznaka za međunarodnu klasifikaciju membranskih antigena

**CD29** (*Cluster of differentiation 29*, eng.) – klaster diferencijacije 29, anti-Integrin  $\beta 1$

**CD14** (*Cluster of differentiation 14*, eng.) – klaster diferencijacije 14, marker monocita i makrofaga

**cDNK** – jednolančana, komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina

**DMEM** (*Dulbecco's modified eagles minimal essential medium*, eng.) – standardni medijum za ćelijske kulture

**DAB** (*Diaminobenzidine*, eng.) – di amino benzidin

**dH<sub>2</sub>O** – destilovana voda

**DNK** – dezoksiribonukleinska kiselina

**dNTP** – dezoksiribonukleotid trifosfat

**EDTA** (*Ethylenediaminetetraacetic acid*, eng.) – etilendiamintetrasirćetna kiselina

**EGF** (*Epidermal growth factor*, eng.) – epidermalni faktor rasta

**ESCs** (*Embryonic Stem Cells* - eng.) – embrionalne matične ćelije

**EĆ** – endotelne ćelije

**FCS** (*Foetal calf serum*, eng.) – fetalni teleći serum

**FGF** (*Fibroblast growth factor*, eng.) – faktor rasta fibroblasta

**FGF2** (*Fibroblast growth factor 2*, eng.) – faktor rasta fibroblasta 2

**HE** – hematoksilin-eozin bojenje

**HRP** (*Horse raddish peroxidase*, eng.) – peroksidaza rena

**IGF-1** (*Insulin-like growth factor 1*, eng.) – insulinu-sličan faktor rasta

**IL** (*Interleukin*, eng.) – interleukin

**TIK** (*Bone tissue engineering*, eng.) – tkivno inženjerstvo kosti

**MSC** (*Mesenchymal stem cells*, eng.) – mezenhimske matične ćelije

**M-CSF** (*Monocyte/macrophage colony-stimulating factor*, eng.) –

Monocitno/makrofagni stimulišući faktor kolonija

**N grupa implantata** – implantati sačinjeni od BMM-a

**NFAT** (*Nuclear factor of activated T cells*, eng.) – nukleusni faktor aktiviranih T ćelija

**NTC** (*No template control*, eng.) – kontrola bez matrice (bez DNK koja se umnožava PCR-om)

**OPN grupa implantata** – implantati sačinjeni od BMM-a, PRP-a i *in vitro* osteoindukovanih ADSC

**OĆ** – osteogene ćelije ili osteoprogenitorne ćelije

**PN grupa implantata** – implantati sačinjeni od BMM-a i PRP-a

**PRP** (*Platelet-rich plasma*, eng.) – plazma obogaćena trombocitima

**PBS** (*Phosphate buffered saline*, eng.) – fiziološki rastvor puferovan fosfatnim puferom

**PDECGF** (*Platelet-derived endothelial cell growth factor*, eng.) – trombocitni faktor rasta endotelnih ćelija

**PDGF** (*Platelet-derived growth factor*, eng.) – trombocitni faktor rasta

**qRT-PCR** (*Quantitative real time polymerase chain reaction*, eng.) – kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu

**RNK** – ribonukleinska kiselina

**RT** – reverzna transkripcija

**Runx2** (*Runt-related transcription factor 2*, eng.) – gen za transkripcioni faktor koji je esencijalan za diferencijaciju i funkciju osteoblasta

**RANKL** (*Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ligand*, eng.) – receptor aktivator nukleusnog faktora kapa-B liganda

**rhBMP-2** (*Recombinant human bone morphogenic protein 2*, eng.) – rekombinantni protein morfogeneze kosti 2 humanog porekla

**SPN grupa implantata** – implantati sačinjeni od BMM-a, PRP-a i sveže izolovanih ne tretiranih ADSC

**Sp7** (*Osterix*, eng.) – gen za transkripcioni faktor osteriks

**SVF** (*Stromal vascular fraction*, eng.) – stromalna vaskularna frakcija

**Spp1** (*Secreted phosphoprotein 1*, eng.) – gen za osteopontin (sekretovani fosfoprotein 1)

**ss-cDNK** (*Single stranded complementary DNA*, eng.) – jednolančana komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina

**TAE** – pufer sačinjen od komponenti Tris, acetat i EDTA pufer

**TNF- $\alpha$**  (*Tumour necrosis factor- $\alpha$* , eng.) – faktor nekroze tumora alfa

**TGF- $\beta$**  (*Transforming growth factor beta*, eng.) – transformišući faktor rasta beta

**TE pufer** – Tris-Cl, EDTA pufer

**TSP-1** (*Thrombospondin-1*, eng.) – trombospondin 1

**VEGF** (*Vascular endothelial growth factor*, eng.) – vaskularni endotelski faktor rasta

**vWF** (*Von Willebrand factor*, eng.) – fon Vilebrandov faktor



## **Biografija autora**

Vladimir Cvetković je rođen 22. marta 1985. godine u Nišu, Republika Srbija, gde je završio osnovnu i srednju školu. Studije je upisao školske 2004/05. godine na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu. Proglašen je za najboljeg studenta na Departmanu za biologiju i ekologiju u školskoj 2004/05. godini. U toku studija bio je stipendista Ministarstva prosvete Republike Srbije. Diplomirao je decembra 2008. godine sa prosečnom ocenom 9.50. Doktorske studije na studijskom programu Biologija, modul Genetika, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, upisao je školske 2009/10. godine.

Na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu, od marta 2010. godine angažovan je kao saradnik u nastavi za užu naučnu oblast Biotehnologija (sadašnji naziv Eksperimentalna biologija i biotehnologija), a zatim od marta 2012. godine kao asistent na istom radnom mestu. Od 2011. godine angažovan je na nacionalnom projektu Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, eviden. br. projekta III 41017.

Do odbrane doktorske disertacije, Vladimir je kao autor i koautor objavio ukupno šesnaest naučnih radova, a od toga četiri rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), sedam radova u časopisima međunarodnog značaja (M23) i pet radova u nacionalnim časopisima (M53), zatim 20 saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova štampanih u izvodu (M34) i tri saopštenja sa nacionalnih naučnih skupova štampanih u izvodu (M64).

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Владимир Ј. Цветковић

Број индекса Б3505/2009

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Анализа ектопичног остеогеног потенцијала мезенхимских матичних ћелија белог  
масног ткива код миша на основу релативне експресије гена маркера остеогенезе

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 1.8.2016.

Владимир Цветковић

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Владимир Ј. Цветковић

Број индекса Б3505/2009

Студијски програм Биологија, модул Генетика

Наслов рада Анализа ектопичног остеогеног потенцијала мезенхимских матичних ћелија белог масног ткива код миша на основу релативне експресије гена маркера остеогенезе

Ментори др Стево Најман, редовни професор

др Марина Стаменковић-Радак, редовни професор

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 1.8.2016.

Владимир Цветковић

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Анализа ектопичног остеогеног потенцијала мезенхимских матичних ћелија белог масног ткива код миша на основу релативне експресије гена маркера остеогенезе

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 1.8.2016.

Владимир Младеновић

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.