

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena G. Najdanović

**UTICAJ MEZENHIMSKIH ĆELIJA BELOG
MASNOG TKIVA MIŠA, INDUKOVANIH
IN VITRO KA ENDOTELSKIM I OSTEOGENIM
ĆELIJAMA, NA VASKULARIZOVANOST
EKTOPIČNIH OSTEOGENIH IMPLANATA**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jelena G. Najdanović

**INFLUENCE OF ADIPOSE-DERIVED
MESENCHYMAL STEM CELLS *IN VITRO*
INDUCED INTO ENDOTHELIAL AND
OSTEOGENIC CELLS ON VASCULARIZATION OF
ECTOPIC OSTEOGENIC IMPLANTS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Mentori:

Prof. dr Stevo Najman, redovni profesor
Univerzitet u Nišu-Medicinski fakultet

Prof. dr Maja Čakić-Milošević, docent
Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

Član komisije:

Prof. dr Jelena Živanov-Čurlis, vanredni profesor
Univerzitet u Nišu-Medicinski fakultet

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Eksperimentalni deo ove disertacije urađen je u Naučnoistraživačkom Centru za biomedicinu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu i to u vivarijumu, Laboratoriji za eksperimentalnu medicinu, Laboratoriji za funkcionalnu genomiku i proteomiku, Odeljenju za ćelijsko i tkivno inženjerstvo, kao i u laboratorijama Instituta za biologiju i humanu genetiku. Sva istraživanja su izvedena 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” broj III41017.

Mentoru prof. dr Stevi Najmanu dugujem beskrajnu zahvalnost na ukazanoj šansi da se bavim naučno-istraživačkim radom, na velikodušno pruženom znanju i nesebično prenesenim idejama i iskustvima tokom svih godina zajedničkog rada. Hvala Vam na vremenu, strpljenju, podstreku i neizmernoj podršci koja prati svaki korak mog profesionalnog puta i na tome što ste me naučili kako da pristupim svim problemima koji se na tom putu mogu naći. Posebno Vam zahvaljujem na ličnom angažovanju i svakodnevnoj pomoći u svim segmentima pripreme, izrade i pisanja ove doktorske disertacije i svih naučnih publikacija koji su joj prethodili.

Neizmernu zahvalnost osećam prema mentoru doc. dr Maji Čakić-Milošević koja je tokom čitavog trajanja mojih doktorskih studija pratila moj rad, pružala bezrezervnu podršku i davala konstruktivne savete uvek kada je to bilo potrebno. Hvala Vam što ste uvek imali razumevanja i vremena za mene i bili upućeni u tok mog naučno-istraživačkog napretka, koji je pretočen u ovu doktorsku disertaciju, čijem ste kvalitetu doprineli detaljnim pregledom i korisnim sugestijama.

Veliko hvala prof. dr Jeleni Živanov-Čurlis na ukazanom poverenju, podršci i pomoći, savetima i toploj reči koju je imala u svakom momentu naše dugogodišnje saradnje.

Zahvaljujem prof. dr Snežani Pajović na profesionalnoj i ljudskoj pomoći i podršci.

Zahvaljujem prof. dr Aleksandri Korać koja je uvek bila na raspolaganju da pomogne i da neophodnu podršku tokom mojih doktorskih studija na Biološkom fakultetu.

Laborantkinji Tanji Prokić zahvaljujem na nesebičnoj pomoći i angažovanju u radu sa eksperimentalnim životinjama i na prijateljstvu.

Veliko hvala laborantkinji Esmi Đinđić koja je obavila proceduru sečenja parafinskih kalupa na mikrotomu.

Puno hvala kolegi asist. Vladimiru Cvetkoviću, sa kojim se u naučno-istraživačkom radu odlično dopunjujem i skladno saradjujem, hvala na prijateljstvu i spremnosti da uvek nesebično pruži svoju pomoć.

Veliko hvala kolegici mr. ph. Sanji Stojanović, na pomoći koju mi je pružila izvođenjem histomorfometrijske analize i prijateljstvu.

Kolegicama asist. dr Jeleni Živković, doc. dr Mariji Vukelić-Nikolić, Milici Stanisavljević i Dragani Tričković-Vukić, zahvaljujem na prijateljstvu, podršci i pomoći tokom različitih faza rada.

Hvala Ninoslavu na podršci, ljubavi, razumevanju i vedrom duhu koji mi daje snagu.

Zahvalnost koju osećam prema mojim divnim roditeljima, zbog ljubavi, poverenja, razumevanja i strpljenja koje mi pružaju svih ovih godina, zbog slobode da sama izaberem svoj životni put i zbog toga što su moj životni oslonac u svakom trenutku, nema granica. Ovu disertaciju posvećujem njima.

Jelena Najdanović

UTICAJ MEZENHIMSKIH ČELIJA BELOG MASNOG TKIVA MIŠA, INDUKOVANIH *IN VITRO* KA ENDOTELSKIM I OSTEOGENIM ČELIJAMA, NA VASKULARIZOVANOST EKTOPIČNIH OSTEOGENIH IMPLANATA

SAŽETAK

Koštano tkivo je dobro vaskularizovano, visokog kapaciteta regeneracije, ali su hirurške intervencije neophodne kod defekata kritične veličine. U tkivnom inženjerstvu kosti, problem nedovoljne vaskularizacije nema adekvatno rešenje, pa je s tim ciljem u ovoj disertaciji ispitivan uticaj mezenhimskih matičnih ćelija belog masnog tkiva (ADSC – *Adipose-derived mesenchymal stem cells*, engl.), indukovanih *in vitro* ka endotelskim (EĆ) i osteogenim ćelijama (OĆ), na vaskularizovanost ektopičnih osteogenih implanata. U ADSC dobijenim *in vitro* ekspanzijom ćelija stromalne vaskularne frakcije masnog tkiva BALB/c miševa muškog pola, pre i nakon ekspanzije je praćena imunoekspresija pozitivnih i negativnih ADSC-markera. ADSC iz trećeg pasaža su *in vitro* indukovane u EĆ ili OĆ ili ekspandirane bez induktivnih faktora. Tokom diferencijacije, praćena je ekspresija markerskih gena i proteina. Ekspandirane ADSC i plazma obogaćena trombocitima (PRP – *Platelet-rich plasma*, engl.) nanete na mineralni matriks kosti (MMK) su subkutano implantirane. Vaskularizacija i osteogeni proces u implantima (MMK, MMK/PRP, MMK/PRP/neindukovane ADSC, MMK/PRP/EĆ, MMK/PRP/OĆ, MMK/PRP/EĆ/OĆ) su procenjivani na osnovu ekspresije gena i proteina, histološke slike i histomorfometrijskih parametara. Ćelije iz trećeg pasaža su mezenhimske matične, a ADSC su diferencijirane u EĆ ili OĆ. Implanti sa ili EĆ ili OĆ indukuju vaskularizaciju najpovoljniju za ektopični osteogeni proces. Dobijeni rezultati daju nove podatke o ćelijskim i molekularnim mehanizmima vaskulogenog i angiogenog procesa u osteogenezi i otvaraju nove mogućnosti u tkivnom inženjerstvu kosti i kliničkom tretmanu defekata koštano-zglobnog sistema.

Ključne reči: vaskularizacija, ektopična osteogeneza, mezenhimske matične ćelije masnog tkiva, miš, *in vitro* diferencijacija, endotelske ćelije, osteogene ćelije, mineralni matriks kosti, plazma obogaćena trombocitima, tkivno inženjerstvo kosti

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija ćelija i tkiva

UDK broj: [591.476 : [611.018 : 591.413]] : 611.018.4(043.3)

INFLUENCE OF ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS *IN VITRO* INDUCED INTO ENDOTHELIAL AND OSTEOGENIC CELLS ON VASCULARIZATION OF ECTOPIC OSTEOGENIC IMPLANTS

ABSTRACT

Bone tissue is well vascularized, with high regenerative capacity, but surgical interventions are necessary in critical-sized defects. Since in bone tissue engineering (BTE), insufficient vascularization problem has no adequate solution, the influence of mesenchymal stem cells isolated from white adipose tissue (ADSCs – *Adipose-derived mesenchymal stem cells*) and *in vitro* induced into endothelial (ECs) and osteogenic (OCs) cells, on vascularization of ectopic osteogenic implants was examined in this dissertation. In ADSCs, obtained by *in vitro* expansion of stromal vascular fraction cells isolated from adipose tissue of male BALB/c mice, immunoexpression of positive and negative ADSCs-markers was examined before and after expansion. ADSC from the third passage were *in vitro* induced into ECs and OCs, or expanded without inductive factors. During differentiation, the expression of gene and protein markers was also examined. Expanded ADSCs and platelet-rich plasma (PRP) seeded onto bone mineral matrix (BMM) were subcutaneously implanted. Vascularization and osteogenic process in implants (BMM, BMM/PRP, BMM/PRP/uninduced ADSCs, BMM/PRP/ECs, BMM/PRP/OCs, MMK/PRP/ECs/OCs) were assessed on the basis of the gene and protein expression, histological picture and histomorphometrical parameters. The cells from the third passage were mesenchymal stem cells, and ADSCs were differentiated into ECs and OCs. Implants with ECs or OCs induced the most favorable vascularization for ectopic osteogenic process. The obtained results give some new data about cellular and molecular mechanisms of vasculogenic and angiogenic process during osteogenesis and open some new possibilities in BTE and in clinical treatments of skeletal and articular system defects.

Key words: vascularization, ectopic osteogenesis, adipose-derived mesenchymal stem cells, mice, *in vitro* differentiation, endothelial cells, osteogenic cells, bone mineral matrix, platelet-rich plasma, bone tissue engineering

Scientific field: Biology

Field of scientific specialization: Cell and tissue biology

UDC number: [591.476 : [611.018 : 591.413]] : 611.018.4(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Problem istraživanja.....	1
1.2. Vaskularni sistem	3
1.2.1. Tkivne komponente zida krvnog suda.....	3
1.2.2. Vaskulogeneza i angiogeneza	4
1.3. Koštani sistem	8
1.3.1. Struktura koštanog matriksa.....	9
1.3.2. Periost i endost	9
1.3.3. Čelije koštanog tkiva	10
1.3.4. Makroskopska struktura kostiju	13
1.3.5. Tipovi koštanog tkiva.....	13
1.3.6. Zrelo i nezrelo koštano tkivo.....	14
1.3.7. Formiranje kostiju	16
1.4. Biomaterijali kao koštani zamenci	18
1.5. Plazma obogaćena trombocitima kao prirodni izvor faktora rasta.....	20
1.6. Belo masno tkivo kao izvor adultnih mezenhimskih matičnih ćelija za regeneraciju koštanog tkiva	22
2. PREDMET I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	26
3. MATERIJAL I METODE.....	28
3.1. Eksperimentalne životinje	28
3.2. Metode istraživanja <i>in vitro</i>	28
3.2.1. Dobijanje i zasejavanje mezenhimskih matičnih ćelija stromalne vaskularne frakcije belog masnog tkiva miša.....	28
3.2.2. Postupak kultivacije mezenhimskih matičnih ćelija izolovanih iz stromalne vaskularne frakcije belog masnog tkiva	31

3.2.3. Postupak endotelske diferencijacije mezenhimskih matičnih ćelija izolovanih iz stromalne vaskularne frakcije belog masnog tkiva	32
3.2.4. Postupak osteogene diferencijacije mezenhimskih matičnih ćelija izolovanih iz stromalne vaskularne frakcije belog masnog tkiva	33
3.2.5. Imunocitohemijske metode vizuelizacije proteina markera mezenhimskih matičnih, endotelskih i osteogenih ćelija	33
3.2.6. Metode analize ekspresije gena markera endotelskih i osteogenih ćelija	34
3.2.6.1. Metoda izolacije RNK iz ćelija	34
3.2.6.2. Metoda reverzne transkripcije izolovane RNK u komplementarnu DNK	35
3.2.6.3. Metoda kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (quantitative real-time PCR; qRT-PCR)	35
3.3. Metode istraživanja <i>in vivo</i>	37
3.3.1. Priprema mineralnog matriksa kosti za postupak implantacije	37
3.3.2. Priprema plazme obogaćene trombocitima za postupak implantacije	37
3.3.3. Priprema mezenhimskih matičnih ćelija masnog tkiva za postupak implantacije	38
3.3.4. Formiranje implanata i postupak implantacije	38
3.3.5. Obrada implanata za svetlosno-mikroskopsku analizu	40
3.3.6. Metoda histomorfološke analize implanata	40
3.3.7. Metoda histomorfometrijske analize implanata	41
3.3.8. Imunohistohemijske metode vizuelizacije proteina markera endotelskih i osteogenih ćelija u implantima	41
3.3.9. Metode analize vaskularizovanosti i stepena osteogenog procesa u implantima na osnovu ekspresije markerskih gena	42
3.3.9.1. Metoda izolacije RNK iz implanata	43
3.3.9.2. Metoda reverzne transkripcije izolovane RNK u komplementarnu DNK	43
3.3.9.3. Metoda kvantitativne lančane reakcije polimeraze (PCR) u realnom vremenu (quantitative real-time PCR; qRT-PCR)	43
3.3.10. Provera kvaliteta i specifičnosti produkata qRT-PCR reakcije	44
3.4. Statistička obrada rezultata istraživanja	44

4. REZULTATI.....	45
4.1. Rezultati <i>in vitro</i> istraživanja	45
4.1.1. Morfološka analiza sveže izolovanih ćelija stromalne vaskularne frakcije i kultura ADSC	45
4.1.2. Imunocitohemijska analiza izolovanih ćelija stromalne vaskularne frakcije i kultura ADSC.....	48
4.1.3. qRT-PCR analiza ekspresije gena markera endotelskih ćelija i <i>Spp-a 1</i> u sveže izolovanim ćelijama stromalne vaskularne frakcije i kultura ADSC	51
4.1.4. Morfološka analiza kultura ADSC indukovanih ka endotelskim ćelijama	51
4.1.5. Imunocitohemijska analiza kultura ADSC indukovanih ka endotelskim ćelijama.....	54
4.1.6. qRT-PCR analiza ekspresije gena markera endotelskih ćelija u kulturama ADSC indukovanim ka endotelskim ćelijama u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža	57
4.1.7. qRT-PCR analiza ekspresije gena markera endotelskih ćelija u kulturama ADSC indukovanim ka endotelskim ćelijama u odnosu na stromalnu vaskularnu frakciju.....	58
4.1.8. Morfološka analiza kultura ADSC indukovanih ka osteogenim ćelijama	59
4.1.9. Imunocitohemijska analiza kultura ADSC indukovanih ka osteogenim ćelijama	62
4.1.10. qRT-PCR analiza ekspresije gena markera osteogenih ćelija u ADSC indukovanim ka osteogenim ćelijama u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža	64
4.2. Rezultati <i>in vivo</i> istraživanja	65
4.2.1. Histomorfološka analiza implanata	65
4.2.1.1. Dve nedelje nakon implantacija	65
4.2.1.2. Osam nedelja nakon implantacija.....	69
4.2.2. Histomorfometrijska analiza implanata.....	75
4.2.3. Imunohistohemijska analiza implanata	76
4.2.3.1. Imunoekspresija VEGFR-a 2	76
4.2.3.2. Imunoekspresija VCAM-a 1	84
4.2.3.3. Imunoekspresija osteokalcina.....	91
4.2.4. Analiza kvaliteta i specifičnosti produkata qRT-PCR reakcije.....	98
4.2.5. qRT-PCR analiza ekspresije gena markera endotelskih ćelija u implantima.....	99

4.2.5.1. Ekspresija gena markera endotelskih ćelija u implantima u odnosu na ADSC iz trećeg pasaža.....	99
<i>Vwf</i> gen.....	99
<i>Flt-1</i> gen.....	100
<i>Vcam-1</i> gen.....	102
<i>Egr-1</i> gen.....	103
4.2.5.2. Ekspresija gena markera endotelskih ćelija u implantima u odnosu na plazmu obogaćenu trombocitima	104
<i>Vwf</i> gen.....	104
<i>Flt-1</i> gen.....	104
<i>Vcam-1</i> gen.....	105
<i>Egr-1</i> gen.....	106
4.2.5.3. Ekspresija gena markera endotelskih ćelija u implantima u odnosu na objedinjen kalibrator	108
<i>Vwf</i> gen.....	108
<i>Flt 1</i> gen	109
<i>Vcam-1</i> gen.....	110
<i>Egr-1</i> gen.....	111
4.2.6. qRT-PCR analiza ekspresije <i>Spp1</i> gena u implantima.....	112
4.2.6.1. Ekspresija <i>Spp1</i> gena u implantima u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža	112
4.2.6.2. Ekspresija <i>Spp1</i> gena u implantima u odnosu na plazmu obogaćenu trombocitima	113
4.2.6.3. Ekspresija <i>Spp1</i> gena u implantima u odnosu na objedinjen kalibrator.....	114
4.2.7. Statistička analiza ekspresije gena u implantima	115
4.2.7.1. Statistička analiza ekspresije gena markera endotelskih ćelija u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža.....	115
<i>Vwf</i> gen.....	115
<i>Flt-1</i> gen.....	115
<i>Vcam-1</i> gen.....	116

<i>Egr-1</i> gen.....	117
4.2.7.2. Statistička analiza ekspresije gena markera endotelskih ćelija u odnosu na plazmu obogaćenu trombocitima	118
<i>Vwf</i> gen.....	118
<i>Flt-1</i> gen	119
<i>Vcam-1</i> gen.....	119
<i>Egr -1</i> gen.....	121
4.2.7.3. Statistička analiza ekspresije gena markera endotelskih ćelija u odnosu na objedinjen kalibrator	121
<i>Vwf</i> gen.....	121
<i>Flt-1</i> gen	122
<i>Vcam-1</i> gen.....	122
<i>Egr -1</i> gen.....	123
4.2.7.4. Statistička analiza ekspresije <i>Spp1</i> gena u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža	125
4.2.7.5. Statistička analiza ekspresije <i>Spp1</i> gena u odnosu na plazmu obogaćenu trombocitima	126
4.2.7.6. Statistička analiza ekspresije <i>Spp1</i> gena u odnosu na objedinjen kalibrator	127
5. DISKUSIJA.....	129
5.1. <i>In vitro</i> ispitivanja mezenhimskih matičnih ćelija stromalne vaskularne frakcije masnog tkiva	131
5.1.1. <i>In vitro</i> ekspanzija mezenhimskih matičnih ćelija stromalne vaskularne frakcije	131
5.1.2. <i>In vitro</i> endotelska diferencijacija mezenhimskih matičnih ćelija stromalne vaskularne frakcije	133
5.1.3. <i>In vitro</i> osteogena diferencijacija mezenhimskih matičnih ćelija stromalne vaskularne frakcije	135
5.2. Subkutani implantati kao proizvod tkivnog inženjerstva kosti	137
5.2.1. Vaskularizovanost inženjerisanih subkutanih implanata na modelu miševa.....	137
5.2.2. Osteogeni proces u inženjerisanim subkutanim implantima na modelu miševa .	145

5.2.3. Povezanost vaskularizovanosti i osteogenog procesa u različitim inženjerisanim subkutanim implantima	151
6. ZAKLJUČCI	155
7. LITERATURA.....	160
8. PRILOG-LISTA SKRAĆENICA	188
9. BIOGRAFIJA AUTORA.....	192
Изјава о ауторству.....	193
Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада	194
Изјава о коришћењу.....	195

1. UVOD

1.1. Problem istraživanja

Koštano tkivo je visoko vaskularizovano tkivo građeno od koštanog matriksa i prostorno i funkcionalno povezanih krvnih sudova i ćelija kosti, koji zajedno održavaju integritet skeleta. Formiranje vaskularne mreže prethodi nastanku nove kosti (*Kanczler i Oreffo, 2008*). Vaskularna mreža kost snabdeva kiseonikom i esencijalnim nutrijentima, a iz kosti otklanja produkte metabolizma (*Kanczler i Oreffo, 2008; Yu i sar., 2009*). Iz tih razloga, u tkivnom inženjerstvu kosti, uspostavljanje vaskularne mreže ima ključnu važnost. Tokom embrionalnog razvoja, krvni sudovi se formiraju diferencijacijom endotelskih ćelija iz mezodermalnih prekursora, što predstavlja proces vaskulogeneze (*Beck i D'Amore, 1997; Kume 2008*). U formiranom tkivu, novi krvni sudovi se razvijaju proliferacijom i migracijom već postojećih diferenciranih endotelskih ćelija, odnosno procesom angiogeneze (*Beck i D'Amore, 1997; Adair i Montani, 2010*). U cilju rasvetljavanja mehanizama uključenih u proces osteogeneze, vaskulogeneza i angiogeneza su proučavane u uslovima *in vitro* i *in vivo* (*Young i sar., 2008*).

Efikasnost formiranja nove kosti određena je intenzitetom vaskularizacije i razgranatošću vaskularne mreže tako da, ukoliko je snabdevenost krvnim sudovima neodgovarajuća, nema efikasnog transporta kiseonika, nutrijenata i metabolita (*Yu i sar., 2009*). Neadekvatna vaskularizovanost kostiju u vezi je i sa smanjenim formiranjem koštanog tkiva i smanjenjem mase kostiju. Inhibicija angiogeneze tokom reparacije fraktura kosti kod životinja dovodi do formiranja gustog, organizovanog vezivnog tkiva, što podseća na atrofična nesjedinjavanja fraktura kod ljudi (*Carano i Filvaroff, 2003*).

Za regeneraciju koštanih defekata, mogu se primenjivati autografti, alografti, ksenografti, polimerni i metalni implantati, koji kostima pružaju ili strukturnu i/ili mehaničku potporu. Međutim, na ovaj način se ne mogu rešiti problemi nedovoljnog snabdevanja ćelija putem vaskularne mreže, potencijalnog prenosa bolesti, odbacivanja, visoke cene i potencijalne nemogućnosti integrisanja u okolno tkivo domaćina. Ovakvi problemi bi mogli biti prevaziđeni primenom tkivnih matriksa (skafolda), koji poseduju aktivnu mrežu krvnih sudova (*Kanczler i Oreffo, 2008*). Danas su aktuelna ispitivanja,

na ćelijskom i molekularnom nivou, interakcija krvnih sudova i ćelija koštanog tkiva, sa ciljem da se konstruišu pogodni vaskularizovani skafoldi, što bi rešilo problem integracije implanata sa okolnim tkivom domaćina.

Nakon implantacije biomaterijala tipa koštanih zamenika, usled inflamatornog odgovora koji se javlja tokom zalečenja rana, krvni sudovi tkiva domaćina spontano prodiru u implant. Ovakvo vaskularno urastanje je ograničeno na nekoliko desetina mikrometara dnevno, što je presporo za obezbeđivanje adekvatne ishrane ćelija u unutrašnjem delu implanta (*Wang i sar., 2010*). Angiogeneza i regeneracija koštanog tkiva koja sledi, potpomognute biomaterijalima tipa koštanih zamenika, mogu biti poboljšane povećavanjem pora biomaterijala, povećanjem njihove međusobne povezanosti, dodavanjem angiogenih faktora rasta i/ili *in vivo* prevaskularizacijom implanata formiranjem vaskularnih čvorova. Noviji pristupi uključuju različite modele *in vitro* prevaskularizacije trodimenzionalnih skafolda pomoću kokultura mezenhimskih matičnih ćelija (MSC, *Mesenchymal stem cells*, engl.), vaskularnih endotelskih ćelija i osteogenih ćelija, u različitim kombinacijama (*Grellier i sar., 2009; Rouwkema i sar., 2009*). Takav biomaterijal ima funkciju nosača ćelija. Interakcija ćelija u biomaterijalu obezbedila bi formiranje živog koštanog zamenika. Iz tih razloga je *in vitro* pristup prevaskularizaciji implanata važan za rešavanje problema nedovoljnog snabdevanja krvlju nakon implantacije.

U oblasti izučavanja regeneracije koštanog tkiva, vaskularizacija predstavlja problem za koji još uvek nije nađeno zadovoljavajuće rešenje. Iako ima radova na temu prevaskularizacije implanata pomoću MSC gajenih u kulturi, sa ili bez endotelske i/ili osteogene indukcije, implantacije su uglavnom rađene na modelu ortotopske osteogeneze i uz primenu prethodno kokultivisanih ćelija. Karakteristika modela ortotopske osteogeneze je da faktori iz same kosti utiču na angiogeni i osteogeni proces (*Scott i sar., 2012*). S druge strane, ograničenje metoda sa kokultivacijom ćelija je to što one ne daju mogućnost da se sagleda efekat svakog od tipova ćelija na regeneraciju koštanog tkiva ponaosob (*Grellier i sar., 2009*).

Prema našim saznanjima, obrasci ekspresije proteina i genskih markera endotelske diferencijacije kao i vaskularizovanost implanata nisu do sada sagledavani na modelu ektopične osteogeneze, u kojem su isključeni faktori iz same kosti koji utiču na angiogeni i osteogeni proces.

1.2. Vaskularni sistem

Vaskularni sistem je prvi funkcionalni sistem koji se javlja tokom embrionalnog razvoja i od koga zavisi razvoj drugih organa i sistema, prenatalno i postnatalno (*Kume, 2008; Sârb i sar., 2011*). Visoko je organizovan sistem čiji se oblik, zbog razgranatosti mreže krvnih sudova, često opisuje kao “vaskularno drvo” (*Rouwkema i sar. 2008; Audigier, 2011*). Zid krvnog suda sačinjen je od tri osnovna konstituenta: endotela, mišićnog i vezivnog tkiva koje uključuje i elastične elemente (*Junqueira i Carneiro, 2005*). Endotel je specijalni tip epitela koji predstavlja polupropustljivu barijeru postavljenu između dva odeljka unutrašnje sredine – krvne plazme i intersticijelne tečnosti. U cilju aktivnog obavljanja intenzivne dvosmerne razmene malih molekula i ograničavanja transporta određenih makromolekula, endotel je visoko diferenciran (*Junqueira i Carneiro, 2005*).

1.2.1. Tkivne komponente zida krvnog suda

Zidovi arterija i vena sastoje se iz tri sloja (Slika 1.1.) koji se nazivaju tunike (lat. *tunica*, pokrivač): tunika intima, tunika medija i tunika adventicija (*Ross i Pawlina, 2011*).

Tunika intima je sačinjena od endotelskih ćelija, bazalne lamine endotelskih ćelija i podendotelskog sloja koji se sastoji iz rastresitog vezivnog tkiva (*Junqueira i Carneiro, 2005; Ross i Pawlina, 2011*). Endotelske ćelije su ćelije mezodermalnog porekla i u vidu jednog sloja oblažu unutrašnju površinu svakog krvnog suda (*Sumpio i sar., 2002*). Usled ovakvog položaja, endotelske ćelije obezbeđuju antikoagulantnu barijeru između krvi i zidova krvnih sudova (*Sumpio i sar., 2002*). Apikalna površina endotelske ćelije okrenuta je ka lumenu krvnog suda, a suprotna strana leži na podendotelskoj bazalnoj lamini. Bazalna lamina endotelskih ćelija je tanki vanćelijski omotač sastavljen od kolagena, proteoglikana i glikoproteina, dok podendotelskih sloj čini rastresito vezivno tkivo sa ponekom glatkom mišićnom ćelijom (*Ross i Pawlina, 2011*). U arterijama je tunika intima odvojena od tunike medije unutrašnjom elastičnom laminom, koja predstavlja spoljašnju komponentu tunike intime (*Junqueira i Carneiro, 2005*). Unutrašnja elastična lamina sačinjena je od elastina i ima otvore za difuziju

supstanci koje ishranjuju ćelije zida krvnih sudova (*Junqueira i Carneiro, 2005; Ross i Pawlina, 2011*).

Tunika medija, središnji sloj zida krvnih sudova, sastoji se od koncentričnih slojeva glatkih mišićnih ćelija između kojih se nalaze promenljive količine elastina, retikularnih vlakana i proteoglikana (*Junqueira i Carneiro, 2005; Ross i Pawlina, 2011*). Glatke mišićne ćelije proizvode sve vanćelijske komponente tunike medije (*Ross i Pawlina, 2011*). Umesto glatkih mišićnih ćelija, u sastav tunike medije kapilara i postkapilarnih venula ulaze periciti (*Hirschi i d'Amore, 1996; Rouwkema i sar. 2008*). Tunika medija je prilično debeli sloj u arterijama i pruža se od unutrašnje do spoljašnje elastične lamine (*Ross i Pawlina, 2011*). Spoljašnja elastična lamina je sačinjena od elastina i odvaja tuniku mediju od tunike adventicije (*Junqueira i Carneiro, 2005*).

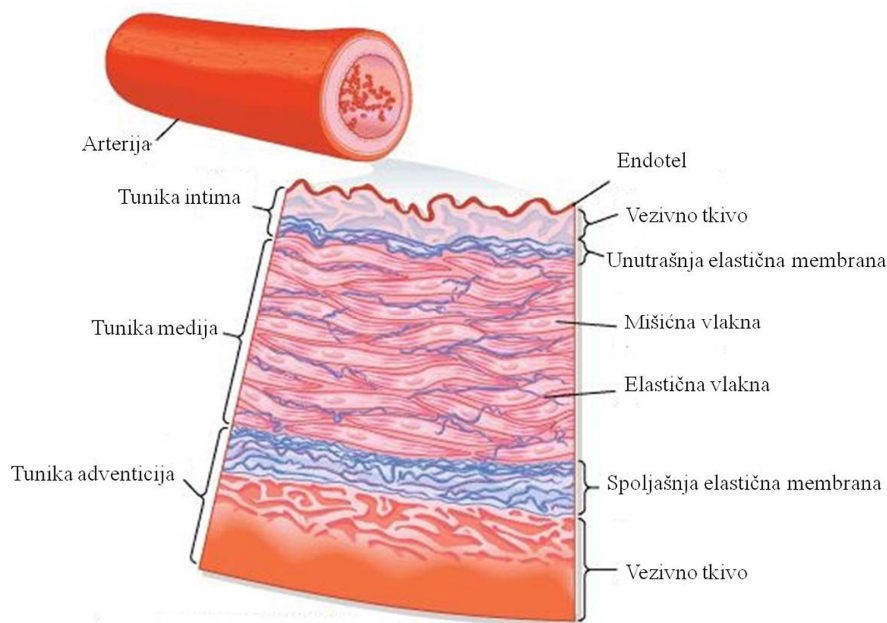
Glavna komponenta tunike adventicije je kolagen tipa I, čija su vlakna uzdužno postavljena. Osim kolagena, tunika adventicija sadrži i elastična vlakna (*Ross i Pawlina, 2011*). Vezivno tkivo ovog sloja zida krvnog suda postepeno prelazi u rastresito vezivno tkivo organa kroz koje krvni sud prolazi (*Junqueira i Carneiro, 2005*). Tunika adventicija je relativno tanka u većem delu arterijskog sistema, dok je u velikim arterijama i venama prilično debela i čini glavnu komponentu zida krvnog suda (*Ross i Pawlina, 2011*).

Endotelske ćelije sadrže *Weibel-Palade*-ova telašca, specijalizovane sekretne granule širine 0,1 μm , a dužine 3 μm (*Sumpio i sar., 2002*). *Weibel-Palade*-ova telašca su, pre svega, rezervoari fon Vilebrandovog faktora (vWF – *Von Willebrand factor*, engl.). Osim vWF-a, u ovim telašcima se mogu naći i drugi proteini, koji učestvuju u procesima inflamacije, angiogeneze i reparacije tkiva (*Valentijn i sar., 2011*). U odgovoru na stimulaciju aktivnosti endotelskih ćelija, sadržaj *Weibel-Palade*-ovih telašaca može biti egzocitoziran bez *de novo* sinteze proteina (*van Mourik i sar., 2002*).

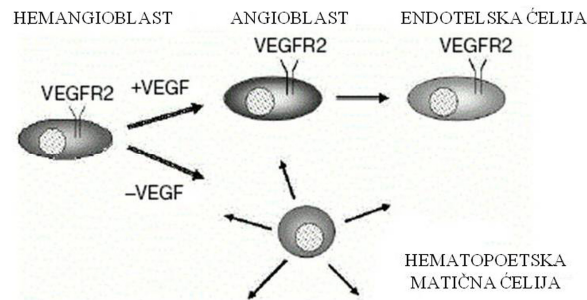
1.2.2. Vaskulogeneza i angiogeneza

Endotelske ćelije nastaju diferencijacijom angioblasta (vaskulogeneza) ili nakon migracije i proliferacije endotelskih ćelija iz već postojećih krvnih sudova (angiogeneza) (*Jain, 2003*). Angioblasti su progenitori endotelskih ćelija koji nastaju diferencijacijom hemangioblasta (Slika 1.2.). Hemangioblasti su prisutni u različitim

organima (prenatalna vaskulogeneza) ili su poreklom iz kostne srži (postnatalna vaskulogeneza). Za razliku od hemangioblasta, zajedničkih prekursora hematopoetskih matičnih ćelija i angioblasta, angioblasti su opredeljene ćelije za diferencijaciju ka endotelskim ćelijama (*Carmeliet, 2000*). Hemangioblasti ekspimiraju receptor vaskularnog endotelskog faktora rasta 2 (VEGFR-2/*Kdr* – *Vascular endothelial growth factor receptor 2/Kinase insert domain protein receptor*, engl.). Faktor koji određuje da li će se hemangioblast opredeliti ka endotelskoj ili hematopoetskoj ćelijskoj liniji je vaskularni endotelski faktor rasta (VEGF, VEGFA – *Vascular endothelial growth factor*, engl.). U prisustvu VEGF-a, hemangioblasti se diferenciraju u angioblaste, a potom u endotelne ćelije, pri čemu i angioblasti i endotelne ćelije zadržavaju ekspresiju VEGFR-a 2 (*Karamysheva, 2008*). U odsustvu ovog proteina, hemangioblasti se opredeljuju za diferencijaciju ka hematopoetskoj matičnoj ćeliji kod koje dolazi do inhibicije ekspresije VEGFR-a 2 (Slika 1.2.). Za dalji razvoj krvnih sudova embriona, u smislu njihove organizacije, važan je i receptor vaskularnog endotelskog faktora rasta 1 (VEGFR-1/*Flt-1* – *Vascular endothelial growth factor receptor 1/ Fms-related tyrosine kinase*, engl.).



Slika 1.1. Građa zida krvnog suda. Preuzeto i izmenjeno iz <http://www.britannica.com/science/tunica-intima>

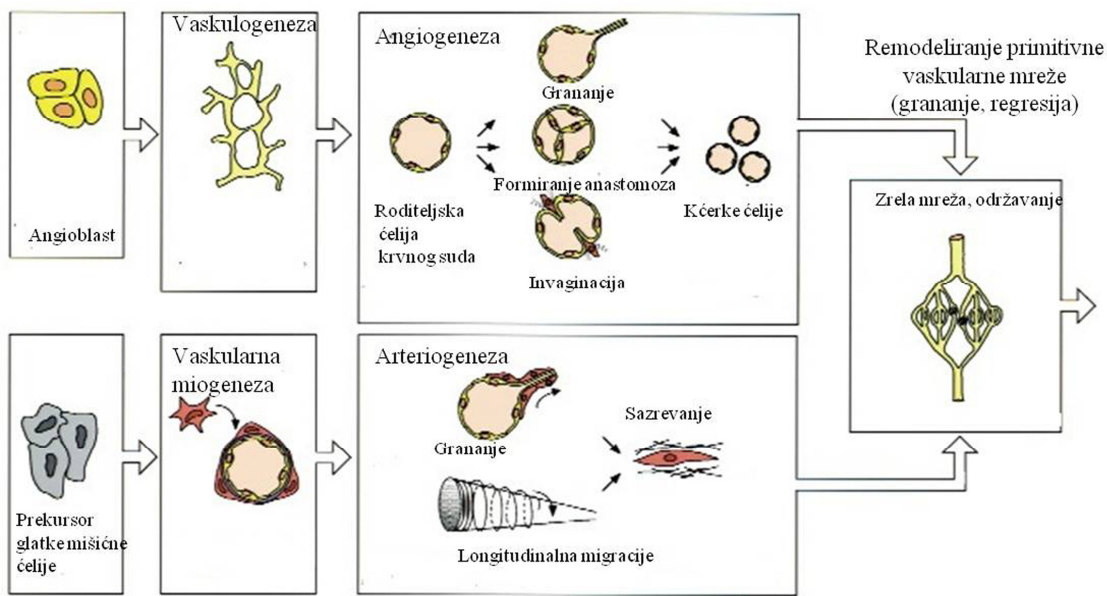


Slika 1.2. Opredeljivanje hemangioblasta ka angioblastu ili hematopoetskoj matičnoj ćeliji u zavisnosti od prisustva VEGF-a. Preuzeto i izmenjeno iz *Karamysheva, 2008.*

Vaskulogeneza i angiogeneza su kompleksni procesi pod koordinisanom kontrolom različitih tipova ćelija koje učestvuju u formiranju i remodeliranju vaskularne mreže. Specifični signalni molekuli i njihova interakcija sa specifičnim receptorima imaju suštinsku važnost za formiranje i remodeliranje krvnih sudova (*Patel-Hett i D'Amore, 2011*). U embrionu sisara, vaskulogeneza počinje nakon inicijacije gastrulacije (*Patel-Hett i D'Amore, 2011*) i odvija se u mezodermu samog embriona, ali i u žumancetnoj kesi, alantoisu i placenti (*Caprioli i sar., 2001*). Na modelu embriona glodara je nađeno da hemangioblasti migriraju, diferenciraju se i povezuju u klastere koji se nazivaju krvna ostrvca (*Patel-Hett i D'Amore, 2011*). Hemangioblasti unutrašnjeg sloja krvnih ostrvaca se diferenciraju u prekursore hematopoetskih matičnih ćelija, a spoljašnjeg u angioblaste (*Carmeliet, 2000*). Angioblasti se potom dele, migriraju i povezuju u primitivnu vaskularnu mrežu (Slika 1.3.). Primitivna vaskularna mreža dalje raste i remodelira se u kompleksnu mrežu krvnih sudova zahvaljujući procesu angiogeneze (*Carmeliet, 2000; Patel-Hett i D'Amore, 2011*).

Angiogeneza se može odvijati stvaranjem invaginacija ili pupoljaka (Slike 1.3 i 1.4.). Invaginacije nastaju umetanjem kolonija ćelija iz intersticijskog tkiva u lumen već postojećeg krvnog suda (*Vailhé i sar., 2001*). Rast kolonija ćelija i njihova stabilizacija dovode do pregrađivanja krvnih sudova i remodeliranja vaskularne mreže (*Flamme i sar., 1997*). Formiranje pupoljaka krvnih sudova podseća na proces pupljenja kvasca. Tako, u prvoj fazi ovog tipa angiogeneze, angiogeni faktori aktiviraju odgovarajuće receptore na endotelskim ćelijama. Aktivirane endotelske ćelije otpuštaju proteaze, enzime koji razgrađuju bazalnu laminu, a potom se endotelske ćelije odvajaju od roditeljskog krvnog suda, dele u okolnom matriksu i obrazuju grane koje se povezuju

sa susednim krvnim sudovima (Vailhé i sar., 2001). Ove grane formiraju petlje i na taj način nastaje lumen krvnog suda. Bazalna membrana oko novih krvnih sudova se obnavlja i oblaže glatkim mišićnim ćelijama (Carmeliet, 2000; Ribatti i Crivellato, 2012), što predstavlja početak procesa sazrevanja vaskularne mreže (Slika 1.3.).

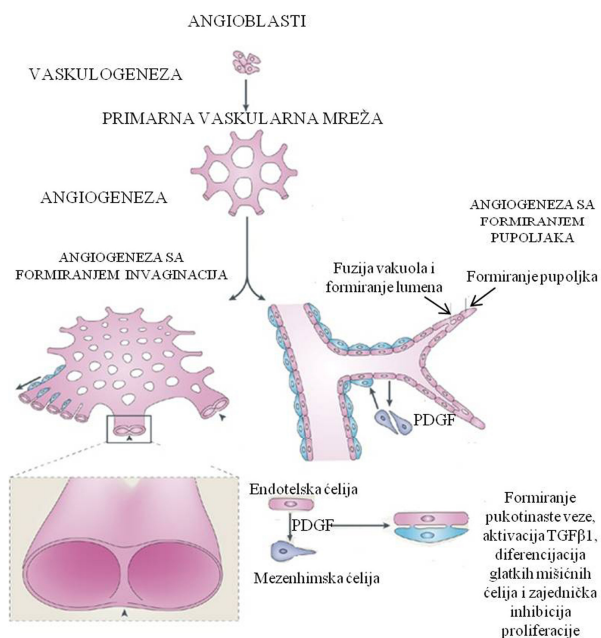


Slika 1.3. Vaskulogeneza i angiogeneza: Povezivanje angioblasta u embrionu u primitivnu vaskularnu mrežu (vaskulogeneza) koja se širi i remodelira (angiogeneza). Glatke mišićne ćelije prekrivaju endotelne ćelije tokom vaskularne miogeneze i stabilizuju tokom arteriogeneze. Preuzeto i izmenjeno iz Carmeliet, 2000.

Ćelije zida krvnog suda, glatke mišićne ćelije i periciti, inhibiraju deobe i migraciju endotelne ćelije i stimulišu proizvodnju vanćelijskog matriksa, čime obezbeđuju hemostatičku kontrolu i sprečavaju pucanje ili povlačenje novog endotela (Carmeliet, 2000). Kada ovih ćelija nema, krvni sudovi se mnogo brže povlače (Benjamin, 1998), dok krvni sudovi obloženi mišićnim omotačem poseduju neophodnu elastičnost i vazomotorna svojstva (Carmeliet, 2000). Pored toga, ćelije zida krvnog suda učestvuju u specijalizaciji endotelne ćelije za određene funkcije u različitim organima u telu (Hirschi i d'Amore, 1996).

Molekularni mehanizam koji stoji u osnovi procesa sazrevanja krvnih sudova je interakcija između integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4 – *Very late antigen 4*, engl.) na endotelne ćelije i vaskularnog ćelijskog adhezivnog molekula 1 (VCAM 1 – *Vascular cell*

adhesion molecule 1, engl.) na ćelijama zida krvnog suda. Ova interakcija se odigrava jedino kada su oba tipa ćelija u stanju deobe (*Garmy-Susini i sar., 2005*). Ukoliko dođe do supresije ove interakcije, sazrevanje krvnog suda se neće dogoditi zbog direktne apoptoze endotelskih ćelija i indirektno apoptoze ćelija zida krvnog suda (*Garmy-Susini i sar., 2005*). Pored uloge u sazrevanju krvnih sudova, interakcija VCAM-a 1 i VLA-4 je važna i tokom razvoja krvnih sudova u embrionu (*Kwee i sar., 1995*). U tom slučaju, VCAM-1 je eksprimiran na endotelskim ćelijama pupčane vene i interaguje sa ćelijama koje eksprimiraju VLA-4 poput monocita, limfocita, bazofila i eozinofila (*Fries i sar., 1993*). Transkripcioni faktor vrlo ranog odgovora 1 (*Egr-1 – Early growth response protein 1*, engl.) pozitivno reguliše ekspresiju gena za VCAM-1 (*Fu i sar., 2003*).



Slika 1.4. Mehanizmi angiogeneze. Preuzeto i izmenjeno iz *ten Dijke i Arthur, 2007. Nat Rev Molr Cell Biol. 8.*

1.3. Koštani sistem

Koštani sistem se sastoji iz kostiju, koje su izgrađene iz koštanog, hematopoetskog i hrskavičavog tkiva (*Ross i Pawlina, 2011*). Predstavlja zaštitu za kostnu srž i vitalne organe u lobanji i grudnoj duplji, omogućava održavanje homeostaze minerala u telesnim tečnostima i potporna je struktura na koju se vezuju

mišići. Hematopoetsko tkivo je mesto gde se odvija proces formiranja krvnih ćelijskih komponenti – hematopoeza (*Junqueira i Carneiro, 2005*). Hrskavičavo tkivo je prisutno u okviru zglobne površine kostiju i predstavlja adultno potporno vezivno tkivo koje organizmu daje oblik, trpi pritisak i istovremeno održava elastičnost i pruža potporu mekim tkivima (*Sophia Fox i sar., 2009*).

1.3.1. Struktura koštanog matriksa

Ćelije čine manji deo koštanog tkiva, dok većinu ovog tkiva čini međućelijski, kalcifikovani matriks kosti. Glavne komponente koštanog matriksa su: organski matriks i neorganske soli. Mineralna faza skeleta čini dve trećine ukupne mase skeleta, a preostala trećina je organski matriks (*Hill, 1998*).

Glavne mineralne komponente koštanog matriksa su soli kalcijuma i fosfata, a pored njih prisutne su i značajne količine bikarbonata, karbonata, natrijuma, kalijuma, magnezijuma, fluorida, cinka, barijuma i stroncijuma (*Florencio-Silva i sar., 2015*). Glavni depoziti kalcijuma i fosfata u koštanom matriksu su kristali hidroksiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, koji se pod mikroskopom vide kao pločice duž kolagenih fibrila okružene amorfnom osnovnom materijom. Joni na površini hidroksiapatita su hidratirani, pa se oko kristala formira sloj vode i jona (hidratacijska ljuska) koja olakšava razmenu jona između kristala i telesnih tečnosti (*Junqueira i Carneiro, 2005*).

Organski matriks sačinjen je od približno 90% kolagenskih proteina, od toga 97% kolagena tipa I i 3% kolagena tipa II, i oko 10% nekolagenskih proteina (*Anselme, 2000*). U najvažnije nekolagenske proteine koštanog tkiva se ubrajaju osteokalcin, osteopontin, osteonektin, koštani sijaloproteini I i II, proteoglikani i njihovi agregati i alkalna fosfataza (*Anselme, 2000*). Povezanost hidroksiapatita sa vlaknima kolagena i nekolagenskim proteinima čini koštano tkivo čvrstim i otpornim (*Florencio-Silva i sar., 2015*).

1.3.2. Periost i endost

Periost ili pokosnica je gusto vezivno tkivo koje prekriva sve delove kostiju, osim mesta zglobljavanja sa drugim kostima. U spoljašnjem sloju periosta preovlađuju

gusto postavljena, usnopljena kolagena vlakna (Ross i Pawlina, 2011). Deo ovih vlakana koji iz periosta prodire u matriks kostiju i na taj način povezuje periost i kost su Šarpejeva vlakna (Junqueira i Carneiro, 2005). Unutrašnji sloj periosta je, od spoljašnjeg, bogatiji ćelijama koje nalikuju fibroblastima i nazivaju se osteogene ili osteoprogenitorne ćelije (Junqueira i Carneiro, 2005; Ross i Pawlina, 2011).

Endost prekriva sve unutrašnje površine kostiju (Ross i Pawlina, 2011). Izgrađen je od jednog sloja spljoštenih osteogenih ćelija i malo vezivnog tkiva (Junqueira i Carneiro, 2005).

1.3.3. Ćelije koštanog tkiva

Ćelije koštanog tkiva su osteogene ćelije, osteoblasti, osteociti, ćelije koje oblažu koštano tkivo i osteoklasti (Ross i Pawlina, 2011).

Osteogene ćelije (Slika 1.5.) nastaju diferencijacijom mezenhimskih matičnih ćelija kostne srži (BMSC – *Bone marrow stem cells*, engl.) i nalaze se na unutrašnjoj i spoljašnjoj površini kostiju kao i u mikrovaskulaturi (arteriole, kapilari, metarteriole, venule) kostiju. Spljoštene su ili skvamozne, imaju izdužena ili jajolika jedra, bogate su granulisanim endoplazminim retikulumima i slobodnim ribozomima (Ross i Pawlina, 2011). Mogu se diferencirati u ćelije koje oblažu koštano tkivo (*Bone lining cells*, engl.) ili osteoblaste (Ross i Pawlina, 2011).

Osteoblasti su jednojedarne ćelije koje sintetišu organske komponente koštanog matriksa i obavljaju mineralizaciju matriksa (Slika 1.5.). Uvek se nalaze na površini koštanog tkiva, poređani u nizu tako da nalikuju jednoslojnom epitelu (Junqueira i Carneiro, 2005). Granulisani endoplazmin retikulum i Goldžijev aparat su jako dobro razvijeni u osteoblastima (Florencio-Silva i sar., 2015). Tokom intenzivne sinteze matriksa, osteoblasti su kockastog ili prizmatičnog oblika, citoplazma im je bazofilna i sadrži mnogo alkalne fosfataze, enzima čija je osnovna funkcija formiranje depozita minerala. Sa smanjenjem aktivnosti, dolazi do spljoštavanja osteoblasta i sledstvenog smanjenja bazofilnosti citoplazme i količine alkalne fosfataze (Junqueira i Carneiro, 2005). Nivoi alkalne fosfataze i osteokalcina su klinički markeri aktivnosti osteoblasta (Ross i Pawlina, 2011). Za kost je relevantna forma alkalne fosfataze ona koja se eksprimira u jetri, bubrezima i kostima (Schwartz i sar., 2015). Matriks najbliži

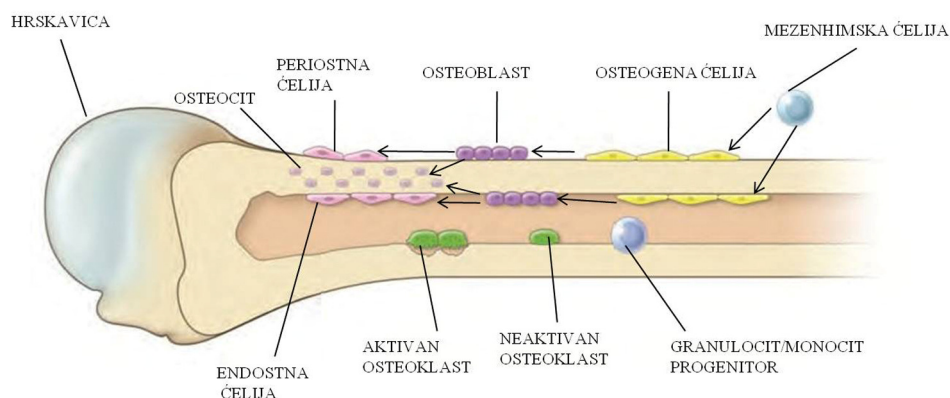
osteoblastima, koji još nije kalcifikovan, naziva se osteoid ili pre-kost. Bogat je vlaknima kolagena tipa I i proteinima koštanog matriksa (*Ross i Pawlina, 2011*). Usled aktivnosti osteoblasta, dolazi do taloženja kalcijumovih soli i fosfata iz krvi, koji se dalje vezuju za osteoid dovodeći do mineralizacije koštanog tkiva (*Junqueira i Carneiro, 2005*).

Osteociti (Slika 1.5.) su zrele ćelije koštanog tkiva (*Ross i Pawlina, 2011*). Okruženi su mineralizovanim matriksom i nalaze se u lakunama tako da svaka sadrži samo jedan osteocit (*Franz-Odenaal i sar., 2006; Schneider i sar. 2010*). Spljoštene su, bademastog oblika, granulisani endoplazmin retikulum i Goldžijev kompleks su mnogo oskudniji, a hromatin kondenzovaniji nego u osteoblastima (*Junqueira i Carneiro, 2005*). Usled redukovane količine citoplazme oko jedara, osteociti su manjih dimenzija od osteoblasta (*Ross i Pawlina, 2011*). Citoplazmatski nastavci osteocita se pružaju kroz kanalikle koji prodiru u koštani matriks, te se tako osteociti povezuju sa susednim osteocitima i ćelijama na površini kostiju (*Bennett i sar., 2001; Schneider i sar. 2010*). Zahvaljujući ovakvoj morfologiji, rasporedu u koštanom matriksu, međusobnoj povezanosti i povezanosti sa drugim ćelijama, osteociti imaju važnu ulogu u detekciji mehaničkih sila koje deluju na kost (*Westbroek i sar., 2002; Schneider i sar. 2010*). Oni prenose primljene mehaničke senzacije i organizuju ih tokom procesa formiranja i resorpcije koštanog tkiva (*Schneider i sar. 2010*). Pored ove funkcije, smatra se da su osteociti uključeni i u regulaciju metabolizma fosfata u kostima (*Westbroek i sar., 2002*).

Ćelije koje oblažu koštano tkivo, u odnosu na položaj u kostima, mogu biti periostne i endostne. Periostne ćelije oblažu spoljašnju površinu kostiju, a endostne unutrašnje površine kostiju. Periostne i endostne ćelije su spljoštene, imaju malu količinu citoplazme i mali broj organela (*Florencio-Silva i sar., 2015*). Preko pukotinastih veza, koje se nalaze u okviru njihovih nastavaka, ove ćelije komuniciraju sa susednim ćelijama istog tipa, ali i sa osteocitima (*Miller i sar., 1989*). Zahvaljujući ovim vezama, ćelije koje oblažu koštano tkivo učestvuju u snabdevanju osteocita nutrijentima i regulisanju protoka kalcijuma i fosfata u kostima (*Ross i Pawlina, 2011*).

Osteoklasti (Slika 1.5.) su najkrupnije ćelije koštanog tkiva (20-100 μm prečnik) i imaju veliki broj jedara (do 48 jedara) (*Junqueira i Carneiro, 2005*). Nastaju diferencijacijom jednojedarnih hematopoetskih progenitorskih ćelija iz kostne srži

(*Florencio-Silva i sar., 2015*) i naležu na delove kostiju gde se odvija resorpcija koštanog matriksa (*Ross i Pawlina, 2011*). Usled enzimske aktivnosti osteoklasta, direktno ispod samog osteoklasta dolazi do stvaranja ulegnuća u koštanom matriksu – Haušipove lakune (*Väänänen i sar, 1996*). Kako bi uopšte došlo do resorpcije mineralne i organske komponente koštanog matriksa, osteoklast prethodno mora biti aktiviran (*Ross i Pawlina, 2011*).



Slika 1.5. Čelije koštanog tkiva. Preuzeto i izmenjeno iz *Ross i Pawlina, 2011*.

Tokom aktivacije osteoklasta, dolazi i do polarizacije ovih ćelija, pa se na njima mogu uočiti tri specijalizovana regiona: resasta ivica, svetla zona i bazo-lateralni region (*Ross i Pawlina, 2011*). Resasta ivica je region aktiviranog osteoklasta koji je u direktnom kontaktu sa koštanim matriksom (*Junqueira i Carneiro, 2005*). Sadrži brojne mikrovile, zahvaljujući kojima je površina resaste ivice uvećana i u kojima se obavljaju egzocitoza lizozomskih enzima – hidrolaza, izbacivanje protona preko protonske pumpe i endocitoza produkata degradacije kostiju (*Ross i Pawlina, 2011*). Sa unutrašnje strane resaste ivice i u njoj blizini su brojne mitohondrije i lizozomi, dok su jedra, granulisani endoplazmin retikulum, Goldžijev aparat i brojne vezikule na mestima udaljenijim od površine kostiju. Svetla zona je prstenoliki deo koji se nalazi oko resaste ivice i mesto je adhezije osteoklasta za koštani matriks. Osteoklasti adheriraju za koštani matriks preko integrinskih adhezionih molekula u delu svetle zone koji je bogat aktinskim filamentima, a naziva se podozom. Na strani osteoklasta suprotnoj u odnosu na resastu ivicu i svetlu zonu nalazi se bazo-lateralni region u kome se obavlja egzocitoza digestovanog materijala. U bazo-lateralnom regionu se transportne vezikule sa degradiranim matriksom stapaju sa ćelijskom membranom i oslobađaju svoj sadržaj

(Ross i Pawlina, 2011). U ovim vezikulama nalazi se enzim tartarat-rezistentna kisela fosfataza (TRAP – *Tartrate-resistant acid phosphatase*, engl.), koji ima ulogu u fragmentaciji endocitoziranog materijala (Junqueira i Carneiro, 2005).

1.3.4. Makroskopska struktura kostiju

Anatomski se mogu razlikovati duge, kratke, pljosnate i nepravilne kosti (Ross i Pawlina, 2011).

Duge kosti, kao što su humerus i femur, cilindričnog su oblika i imaju izraženu dužinu u odnosu na druge dve dimenzije, debljinu i širinu (Ross i Pawlina, 2011). Njihov glavni deo naziva se dijafiza, dok se na krajevima nalaze epifize (Junqueira i Carneiro, 2005). Metafiza je region koji se nalazi između dijafize i epifize u kosti koja raste i uključen je u izduživanje kostiju (Ross i Pawlina, 2011). Dijafize su gotovo u celini izgrađene od kompaktnog koštanog tkiva, dok se sunderasto koštano tkivo nalazi samo na površini okrenutoj ka kostnoj srži. Epifize se sastoje od trabekula sunderastog tkiva, prekrivenih tankim slojem kompaktne kosti (Junqueira i Carneiro, 2005). Unutrašnjost dugih kostiju ispunjava kostna srž (Ross i Pawlina, 2011).

Kod kratkih kostiju, u koje se ubrajaju kosti šake, nijedna dimenzija se naročito ne ističe (Ross i Pawlina, 2011).

Pljosnate kosti, poput kostiju lobanje, su tanke i tanjiraste. Sastoje se iz dva sloja debele kompaktne kosti i jednog sloja sunderaste kosti između njih, te se može reći da imaju formu sendviča (Junqueira i Carneiro, 2005). Kod njih je debljina znatno manja od druge dve dimenzije.

Nepravilne kosti imaju oblik koji se ne uklapa ni u jednu od prethodnih grupa, a njima pripadaju kičmeni pršljenovi i etmoidalna kost (Ross i Pawlina, 2011).

1.3.5. Tipovi koštanog tkiva

Bez obzira na anatomsku formu, na poprečnom preseku kosti se uočavaju kompaktno koštano tkivo, koje je područje bez šupljina, i područje sa brojnim, međusobno povezanim šupljinama – sunderasto ili trabekularno koštano tkivo (Junqueira i Carneiro, 2005).

Kompaktno koštano tkivo je kompaktni, gusti omotač kosti (*Ross i Pawlina, 2011*) i čini oko 80% ukupne mase kostiju (*Josse, 2009*). Ima strukturnu ulogu i pruža zaštitu organima i tkivima u telu (*El-Ganzuri i sar., 2015*).

Sunderasta kost se sastoji iz rešetke ili mreže granajućih koštanih spikula i trabekula i čini oko 20% ukupne mase kostiju (*Josse, 2009*). U prostorima između spikula su kostna srž i krvni sudovi (*Ross i Pawlina, 2011*). Zahvaljujući većoj površini od volumena u odnosu na kompaktno koštano tkivo, pogodno je za metaboličke aktivnosti poput razmene jona kalcijuma (*El-Ganzuri i sar., 2015*).

Prema spoljašnjem izgledu, kostna srž može biti crvena ili žuta (*Junqueira i Carneiro, 2005*). Crvena kostna srž sadrži ćelije krvi na različitim stadijumima razvoja i mrežu retikularnih ćelija i vlakana koje su skelet za ćelije krvi i krvne sudove. Tokom života se smanjuje proizvodnja ćelija krvi, a adipociti postepeno ispunjavaju tkivo u šupljini kostne srži. Na ovaj način se smanjuje količina crvene kostne srži i koju zamenjuje žuta kostna srž (*Ross i Pawlina, 2011*).

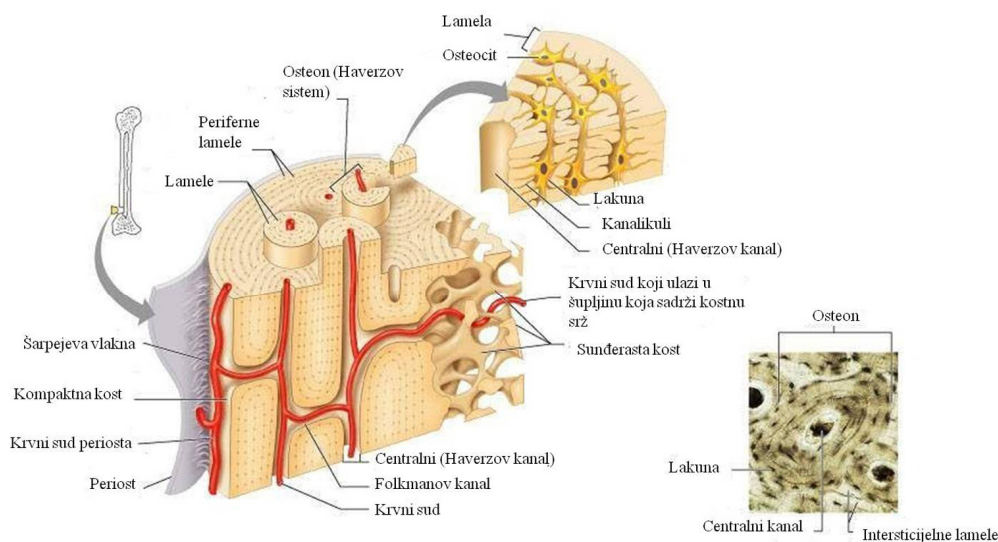
1.3.6. Zrelo i nezrelo koštano tkivo

Gledajući mikroskopsku građu koštanog tkiva, zaključeno je da ono može biti primarno ili nezrelo i sekundarno ili zrelo (*Junqueira i Carneiro, 2005*). Zrelo koštano tkivo dominira kod odraslih organizama, a nezrelo u skeletu fetusa koji se razvija. Međutim, na pojedinim mestima, poput alveolarnih šupljina i mesta insercije tetiva u kost, nezrelo koštano tkivo se zadržava i kod odraslih osoba. Za razliku od zrelog koštanog tkiva, nezrelo nema organizovan lamelarni izgled, ima relativno veći broj ćelija po jedinici površine od zrelog, a same ćelije su nasumično raspoređene (*Ross i Pawlina, 2011*).

Zrelo kompaktno koštano tkivo (Slika 1.6.) se najvećim delom sastoji iz dugačkih cilindričnih strukturnih jedinica koje se nazivaju osteoni ili Haverzovi sistemi (*Ross i Pawlina, 2011*). Na površini osteona se nalazi sloj cementa. Svaki osteon je izgrađen od centralnog Haverzovog kanala, koji je okružen sa 4-20 koncentričnih lamela, a između ovih lamela su lakune sa osteocitima (*Junqueira i Carneiro, 2005*). U samom Haverzovom kanalu se nalaze krvni sudovi i nervi, a oko njega se radijalno pružaju kanalikuli koji sadrže nastavke osteocita (*Ross i Pawlina, 2011*). Između

osteona su intersticijske lamele, koje su ostaci nekadašnjih koncentričnih lamela (Cvetković i sar., 2013). Duža osa osteona je uglavnom paralelna dužoj osi kosti. Vlakna kolagena u koncentričnim lamelama jednog osteona su paralelno postavljena jedna u odnosu na druge, ali u suprotnom smeru u odnosu na lamele susednih osteona. Unutrašnja i spoljašnja površina kompaktnih kostiju sadrže dodatne lamele koje se nazivaju perifernim. Unutrašnje periferne lamele su u dodiru sa tankim endostom, dok su spoljašnje u dodiru sa periostom (Ross i Pawlina, 2011). Sa površine periosta i endosta polaze Folkmanovi kanali koji su poprečni u odnosu na dužu osu kosti i u kojima se nalaze krvni sudovi i nervi (El-Ganzuri i sar., 2015). Krvni sudovi i nervi iz Folkmanovih kanala dolaze do Haverzovih kanala i tako omogućavaju međusobno povezivanje osteona. Za razliku od Haverzovog kanala, Folkmanovi kanali nisu okruženi koncentričnim lamelama (Ross i Pawlina, 2011).

Zrelo sunderasto koštano tkivo ima strukturu sličnu zrelog kompaktnom tkivu, matriks kosti je takođe lamelaran, ali je, za razliku od zrelog kompaktnog tkiva, organizovano u spikule ili trabekule. Brojni, međusobno povezani prostori različitih veličina, u ovom tkivu su ispunjeni kostnom srži (Ross i Pawlina, 2011).



Slika 1.6. Građa zrele kosti. Preuzeto i izmenjeno iz <http://sribiosmamda2.blogspot.rs/2012/08/movement-system.html>.

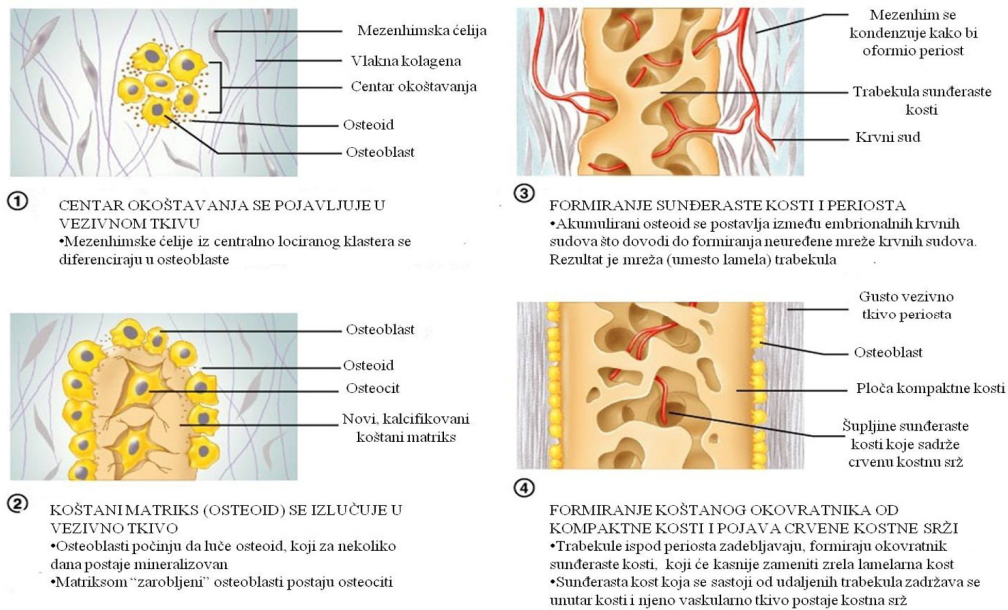
1.3.7. Formiranje kostiju

Postoje dva načina okoštavanja, unutarmembransko (Slika 1.7.) i endohondralno (Slika 1.8.).

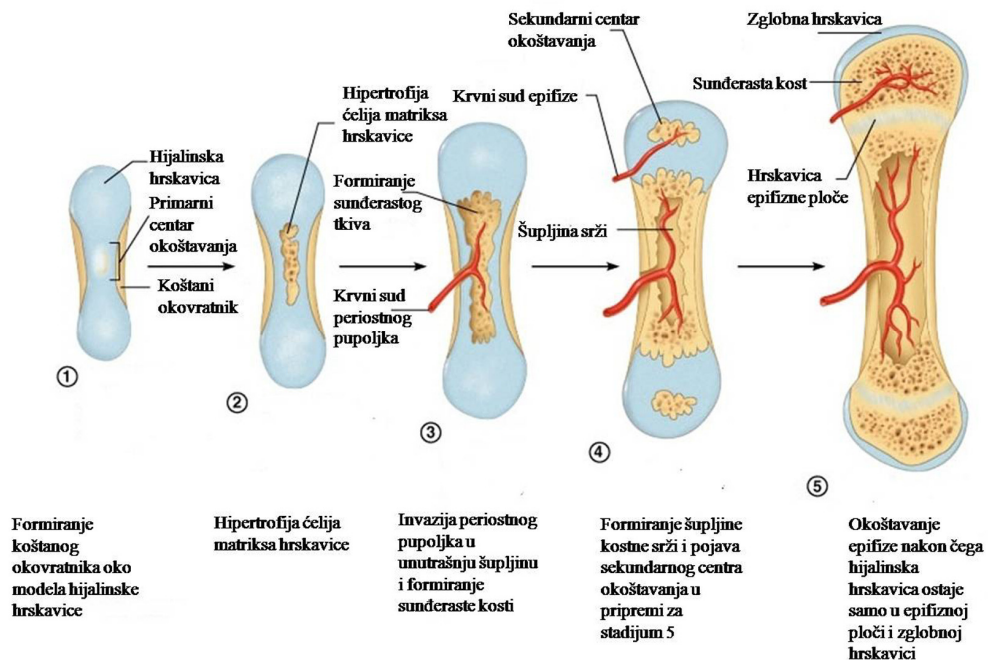
Prvi koraci kod unutarmembranskog okoštavanja su: migracija grupe MSC, njihovo udruživanje u specifičnim oblastima na kojima će doći do formiranja kosti i diferenciranje u osteogene ćelije (*Ross i Pawlina, 2011*). Osteogene ćelije se zaokrugljuju, njihova citoplazma postaje bazofilna i u njima se uočavaju Goldžijevi aparati, što su citološke promene koje ukazuju na diferenciranje osteogenih ćelija u osteoblaste (*Ross i Pawlina, 2011*). Osteoblasti stvaraju koštani matriks, mineralizuju ga i potom se diferenciraju u osteocite, koji su, sa svih strana, okruženi mineralizovanim koštanim matriksom (*Junqueira i Carneiro, 2005*). Ostrvca tako nastale kosti (koštane gredice, spikule) formiraju zidove koji ograničavaju izdužene šupljine koje sadrže kapilare, ćelije kostne srži i nediferencirane ćelije. U centru okoštavanja istovremeno nastaje nekoliko takvih gredica koje kostima daju sunderast izgled, a u vezivno tkivo između gredica prodiru krvni sudovi i nediferencirane MSC od kojih nastaju ćelije kostne srži (*Junqueira i Carneiro, 2005*). Centri okoštavanja rastu radijalno, spajaju se, pa mezenhimsko tkivo biva zamenjeno koštanim. Od vezivnog tkiva koje se nalazi oko unutarmembranski nastale kosti i koje ne okoštava nastaju endost i periost (*Junqueira i Carneiro, 2005*).

Proces endohondralnog okoštavanja počinje formiranjem hrskavičavog modela, „piškote”, koji oblikom podseća na buduću dugu kost, samo je mali. Potom se u regionu koji bi odgovarao budućoj dijafizi formira koštani okovratnik (*Junqueira i Carneiro, 2005; Ross i Pawlina, 2011*). Zatim, u zoni matriksa hrskavice, dolazi do hipertrofije ćelija i kalcifikacije matriksa. Kroz otvore u koštanom okovratniku, koji je formirao osteoklast, u ovu zonu ulaze krvni sudovi i donose osteogene ćelije (*Ross i Pawlina, 2011*). Primarni centar okoštavanja nastaje tako što se osteoblasti pričvršćuju na kalcifikovani matriks stvarajući kontinuirani sloj primarne kosti koji okružuje ostatak hrskavičavog matriksa, dok sekundarni centar okoštavanja nastaje sličnim procesima u terminalnim delovima hrskavičavog modela – epifizama (*Junqueira i Carneiro, 2005*). Tokom širenja i razgradnje, u oba tipa centara dolazi do stvaranja šupljina koje se postepeno ispunjavaju kostnom srži. Kada koštano tkivo, nastalo u sekundarnim

centrima, ispuni epifiznu, hrskavičavo tkivo se zadržava u regionu zglobne i epifizne hrskavice (Junqueira i Carneiro, 2005).



Slika 1.7. Unutarmembransko okoštavanje. Preuzeto i izmenjeno iz http://www.apsubiology.org/anatomy/2010/2010_Exam_Reviews/Exam_2_Review/Ch_6_Modes_of_Ossification.htm



Slika 1.8. Endohondralno okoštavanje. Preuzeto i izmenjeno iz http://www.apsubiology.org/anatomy/2010/2010_Exam_Reviews/Exam_2_Review/Ch_6_Modes_of_Ossification.htm

1.4. Biomaterijali kao koštani zamenici

Regenerativni kapacitet kostiju je jedinstven. Kostii postnatalno zadržavaju: 1) urođenu sposobnost kontrolisanog rasta, 2) sposobnost remodeliranja u odgovoru na mehaničke nadražaje i 3) sposobnost regeneracije nakon oštećenja (*Tang i sar., 2016*). Pošto se u slučaju velikih defekata, uzrokovanih povredom ili bolešću, kosti ne mogu zalečiti spontano (*Nair i sar., 2006*), a autologni, alogeni i ksenogeni koštani grafovi, polimerni i metalni implantii ne rešavaju problem nedostatka adekvatne vaskularizacije (*Navarro i sar., 2008; O'Brien, 2011; Allo i sar., 2012*), došlo je do razvoja oblasti tkivnog inženjerstva kosti.

Iako se ideja o zameni tkiva pojavila još u šesnaestom veku (*O'Brien, 2011*), termin "tkivno inženjerstvo" zvanično je uveden tek 1988. Prema definiciji objavljenoj u *Annual report of the Whitaker Foundation: tissue engineering (1995)*, tkivno inženjerstvo je "primena principa i metoda inženjerstva i nauka o živim organizmima, u cilju suštinskog razumevanja strukturno-funkcionalnih veza u normalnim i patološkim tkivima sisara, i razvoj bioloških zamenika za obnovu, održavanje i poboljšanje funkcije tkiva". Čelije se u prirodnom tkivu drže u okviru vanćelijskog matriksa, koji upravlja razvojem i regeneracijom tkiva, omogućava raspoređivanje ćelija u prostoru i snabdeva ih signalima iz okolne sredine. Cilj tkivnog inženjerstva kosti je regeneracija oštećenih tkiva (*Partap i sar., 2010*). Ostvarivanje ovog biološkog trojstva (ćelije, mehanizmi međućelijske signalizacije i vanćelijski matriks) u oblasti tkivnog inženjerstva kosti može biti postignuto upotrebom biomaterijala u funkciji skafolda, regulatornih signala i ćelija (*Healy i Guldborg, 2007; Partap i sar., 2010*).

Skafoldi koji se primenjuju u tkivnom inženjerstvu kosti moraju imati sledeće karakteristike:

a) Biokompatibilnost. Biokompatibilnost je svojstvo skafolda da ispolji željene funkcije u odnosu na primenjenu medicinsku terapiju, a da ne pobudi neželjenu imunsku, niti inflamatornu reakciju kada se uvede u organizam pacijenta (*Williams, 2008*). Pored toga, poželjno je da skafoldi koji se primenjuju u tkivnom inženjerstvu potpomažu diferencijaciju osteogenih ćelija u osteoblaste (osteoinduktivnost), podržavaju rast kostiju i urastanje okolnog tkiva (osteokonduktivnost) i da potpomažu

angiogenezu, dozvoljavajući da se nekoliko nedelja nakon implantacije krvni sudovi formiraju oko implantiranog skafolda (*Stevens, 2008; Tang i sar., 2016*).

b) Biodegradabilnost. Biodegradabilnost je karakteristika skafolda da, nakon unošenja u živi organizam, vremenom može potpuno da bude zamenjen regenerisanim vanćelijskim matriksom. Regenerisani vanćelijski matriks se potom integriše u okolno tkivo, čime se eliminiše potreba za hirurškim otklanjanjem skafolda (*Langer i Vacanti, 1993; Brånemark i sar., 2001; Bose i sar., 2012*). Zbog toga bi sami materijali i njihovi produkti trebalo da se kontrolisano degradiraju, stopom kojom to čini prirodno tkivo, a produkti raspadanja biomaterijala ne smeju biti toksični (*Freyman i sar., 2001*).

c) Mehanička svojstva. Skafoldi bi trebalo da budu napravljeni tako da, u vreme implantacije, imaju dovoljno mehaničkog integriteta, kako bi mogli da se odupru mehaničkim silama koje se nameću tokom procedure implantacije i opstanu u fiziološkim uslovima. Odmah po implantaciji, skafold mora da obezbedi minimalan nivo biomehaničke funkcije, koji će se postepeno poboljšavati dok se ne obnovi normalna funkcija kostiju (*Partap i sar., 2010*).

d) Arhitektura skafolda. Čelije sa skafoldima prvenstveno interaguju preko hemijskih grupa na površini materijala ili topografskih obeležja, kao što su hrapavost površine i arhitektura pora. Zbog toga, skafold mora da poseduje odgovarajuću površinsku hemijsku strukturu koja bi omogućila prijanjanje, proliferaciju i diferencijaciju ćelija (*Freyman i sar., 2001*). Porozna struktura omogućava optimalnu interakciju skafolda sa ćelijama. Arhitektura pora skafolda podrazumeva odgovarajuću veličinu i oblik pora i njihovu međusobnu povezanost (*Freyman i sar., 2001; Allo i sar., 2012; Bose i sar., 2012; Tang i sar., 2016*).

Biomaterijali dobijeni iz prirodnog koštanog tkiva, bilo mineralizovani, delimično ili potpuno demineralizovani, imaju u osnovi kalcijum fosfat i, zbog sličnosti sa strukturom i funkcijom autologne kosti, često se primenjuju kao skafoldi u tkivnom inženjerstvu kosti (*Mauney i sar., 2005*). Među njima su od posebnog značaja oni koji u sastavu imaju hidroksiapatit (HA – *Hydroxyapatite*, engl.) ili tri-kalcijum fosfat (TCP – *Tricalcium phosphate*, engl.). Mogu se primenjivati sami (*Ignjatović i sar., 2001; Döri i sar., 2007; You i sar., 2007*) ili kao komponente implanata (*Döri i sar., 2007; You i sar., 2007; Cvetković i sar., 2015; Najdanović i sar., 2015; Rajković i sar., 2015; Živković i sar., 2015*).

Biomaterijali na bazi HA su odlični nosači osteoinduktivnih faktora rasta (*Ajduković i sar., 2005*). Jedan od najprimenijivijih biomaterijala u funkciji koštanog zamenika je prirodni, goveđi, mineralni matriks kosti (MMK) Bio-Oss[®] (Geistlich-Pharma, Wolhusen, Switzerland). U cilju sprečavanja potencijalnog imunskog odgovora (*Hislop i sar., 1993; Indovina i Block, 2002*), ovom MMK su pirolizom na 300°C, u alkalnom rastvoru, uklonjeni organski elementi, a HA je ostavljen kao glavna komponenta (*Hanseler i sar., 2012*). HA jako upija ligande za integrinsku familiju ćelijskih adhezivnih receptora, fibronektin i vitronektin, koji imaju ključnu ulogu u posredovanju u adheziji MSC i prekursora osteoblasta (*Kilpadi i sar., 2001*). Bio-Oss[®] je visoko kompatibilan i osteokonduktivan biomaterijal, čime ispunjava zahteve za ulogu nosača ćelija i faktora rasta (*Piattelli i sar., 1999*). Osteokonduktivnost ovog MMK je pokazana u brojnim studijama (*Klinge i sar., 1992; Merckx i sar., 1999; Yildirim i sar., 2001*).

1.5. Plazma obogaćena trombocitima kao prirodni izvor faktora rasta

Inkorporacija biomolekula, poput faktora rasta, u skafolde je moguća alternativa za poboljšanje angiogenog i osteogenog potencijala biomaterijala (*Allo i sar., 2012*). Za razliku od veštačkih faktora rasta, koji zahtevaju sintetičke ili životinjske proteine kao nosače, plazma obogaćena trombocitima (PRP – *Platelet-rich plasma*, engl.) je sama po sebi prirodni nosač faktora rasta (*Marx, 2001; Anitua i sar., 2004*). Moć PRP-a leži u svojstvu proizvodnje i istovremenog oslobađanja faktora rasta nakon aktivacije trombocita (*Alsousou i sar., 2009*). Trombociti počinju da oslobađaju faktore rasta deset minuta nakon zgrušavanja krvi, pri čemu se čak više od 95% prethodno sintetisanih faktora oslobodi za jedan sat (*Marx, 2004*). Međutim, nakon inicijalnog eksplozivnog oslobađanja faktora rasta iz trombocita, još se samo u narednih pet do deset dana ovi proteini oslobađaju, dok trombociti ne okončaju svoj životni vek (*Choi i sar., 2004; Marx, 2004; Eppley i sar., 2006*).

Da bi pozitivni efekti bili postignuti, koncentracija trombocita u PRP-u bi trebalo da bude dva do šest puta viša od one u fiziološkim uslovima (*Initini, 2009*). Kada je koncentracija trombocita viša, PRP inicira snažniji inicijalni ćelijski odgovor u koštanom graftu u odnosu na normalni krvni ugrušak.

Događaji koji se nakon povrede tkiva odigravaju na nivou ćelija pod značajnom su kontrolom faktora rasta koji se oslobađaju iz trombocita (*Zhang i sar., 2005*). Nakon adheriranja, agregacije i formiranja fibrinske mreže, trombociti otpuštaju faktore rasta i citokine (*Lippross i Alini, 2007*). Među molekulima koje sekretuju trombociti su trombocitni faktor rasta (PDGF – *Platelet-derived growth factor*, engl.), transformišući faktor rasta beta (TGF- β – *Transforming growth factor beta*, engl.), trombocitni faktor 4 (PF4 – *Platelet factor 4*, engl.), interleukin 1 (IL-1 – *Interleukin 1*, engl.), VEGF, epidermalni faktor rasta (EGF – *Epidermal growth factor*, engl.), trombocitni faktor angiogeneze (PDAF – *Platelet-derived angiogenesis factor*, engl.), trombocitni endotelni faktor rasta (PDEGF – *Platelet-derived endothelial growth factor*, engl.), faktor rasta epitelnih ćelija (ECGF – *Epithelial cell growth factor*, engl.), insulinu-sličan faktor rasta (IGF – *Insulin-like growth factor*, engl.), osteokalcin, osteonektin, fibrinogen, vitronektin, fibronektin i trombospondin 1 (TSP-1 – *Thrombospondin-1*, engl.) (*Weibrich i sar., 2002; Eppley i sar., 2004*). Sekretija faktora rasta počinje nakon aktivacije trombocita (*Gentile i sar., 2011*). U laboratorijskim uslovima, trombociti iz PRP-a se mogu aktivirati korišćenjem jona kalcijuma Ca^{2+} koji je kofaktor za agregaciju trombocita (*Cervelli i sar., 2009*).

Mnogi autori su pronašli vezu između faktora koje trombociti oslobađaju i regeneracije koštanog tkiva (*Glowacki, 1998; Kim i sar 2002; Lucarelli i sar., 2003; Hanna i sar., 2004; Aghaloo i sar., 2005; Boyan i sar., 2006*). Dodatna prednost primene PRP-a u kombinaciji sa biomaterijalom kao nosačem i ćelijama je sposobnost PRP-a da obrazuje fibrinsku mrežu. Fibrinska mreža se ponaša kao tkivni lepak, što sprečava pomeranje materijala nakon implantacije (*Lysiak-Drwal i sar., 2008*) i omogućava adheziju, migraciju i proliferaciju ćelija posle aktivacije PRP-a (*Xie i sar., 2012*). Uz to, nađeno je da dodavanje PRP-a (*Hanna i sar., 2004; Torres i sar., 2009*) ili krvi (*Barbeck i sar., 2015*) može dovesti do povećanja osteoinduktivnosti (*Hanna i sar., 2004*), osteokonduktivnosti (*Torres i sar., 2009*) biomaterijala ili uzrokovati povećanu vaskularizaciju u implantima (*Barbeck i sar., 2015*).

1.6. Belo masno tkivo kao izvor adultnih mezenhimskih matičnih ćelija za regeneraciju koštanog tkiva

Najnovija dostignuća u proučavanju MSC su podstakla razvoj terapija zasnovanih na primeni ovih ćelija u cilju regeneracije koštanog tkiva i tretmana metaboličkih bolesti kostiju (*Undale i sar., 2009*). MSC se konvencionalno klasifikuju na embrionalne i adultne (*Lin i sar., 2010*). Embrionalne MSC se dobijaju iz blastociste embriona (*Lin i sar., 2010*). Mogu se samoobnavljati tokom dužeg perioda vremena, a da ne podlegnu diferencijaciji, ali poseduju i sposobnost diferencijacije u različite tipove ćelija (*Thomson i sar., 1998*). Terapijsku primenu ovih ćelija komplikuju imunološka inkompatibilnost i mogući razvoj teratoma i neoplazmi, kao i etička i pravna pitanja (*Hentze i sar., 2007; Tögel i Westenfelder, 2007*).

Adultne MSC su potencijalna alternativa embrionalnim MSC. Jedna od pogodnosti njihove primene je ta što ne ekspimiraju drugu klasu ćelijskih površinskih markera glavnog sistema histokompatibilnosti, već samo prvu, što bi značilo da ne izazivaju imunsku reakciju (*Le Blanc i sar., 2003*). Prema kriterijumima Internacionalnog društva za ćelijsku terapiju, adultnom MSC smatra se ona ćelija koja zadovoljava sledeća tri kriterijuma: 1) adherira za plastiku pri *in vitro* kultivaciji; 2) ima visoku ekspresiju površinskih antigenskih markera (CD – *Cluster of differentiation*, engl.) CD105, CD73 i CD90, tipičnih za MSC, a nisku ekspresiju CD markera svojstvenih hematopoetskim ćelijama CD45, CD34, CD14 ili CD11b, CD79a ili CD19 i humanih leukocitnih antigena (HLA – *Human leukocyte antigen*, engl.) klase II i 3) pod standardnim uslovima u ćelijskoj kulturi poseduje multipotentni potencijal diferencijacije u minimalno tri ćelijske linije – osteoblaste, adipocite i hondroblaste (*Dominici i sar., 2006*).

Adultne MSC mogu biti izolovane iz velikog broja tkiva i organa, ali je u naučnim krugovima posebna pažnja posvećena BMSC i, poslednjih godina, mezenhimskim matičnim ćelijama masnog tkiva (ADSC – *Adipose-derived mesenchymal stem cells*, engl.). Masno tkivo je visoko specijalizovano vezivno tkivo i postoji u vidu mrkog i belog masnog tkiva (*Gomillion i Burg, 2006*). Kod adultnih sisara dominira belo masno tkivo, dok je mrko prisutno pretežno kod novorođenčadi (*Ross i Pawlina, 2011*). Mrko masno tkivo je jako vaskularizovano, a glavna funkcija

ovog tkiva je da služi kao izvor toplote u telu fetusa (*Lin i sar., 2010*). U prvoj dekadi života, ovo tkivo se postepeno zamenjuje belim masnim tkivom (*Lindsay, 1996*). Belo masno tkivo služi kao rezervoar energije za telo, zaštitu i izolaciju za vitalne organe, a sadrži i ćelije koje sekretuju mnoge hormone, faktore rasta i citokine (*Ross i Pawlina, 2011*). Ono nije tako dobro vaskularizovano kao mrko, ali svaka ćelija u ovom tkivu je u kontaktu sa bar jednim kapilansom, što obezbeđuje vaskularnu mrežu potrebnu za kontinualni rast tkiva (*Patrick, 2000*).

Primarne ćelijske komponente masnog tkiva, adipociti, su ćelije ispunjene lipidima (*Patrick, 2004*). Osim adipocita, u masnom tkivu se nalazi i stromalna vaskularna frakcija (SVF – *Stromal vascular fraction*, engl.) koja sadrži mikrovaskularne endotelne ćelije, ćelije zida krvnog suda, fibroblaste, makrofage, leukocite, preadipocite, mastocite i MSC (*Pettersson i sar., 1984; Zuk i sar., 2001; Tapp i sar., 2009; Lin i sar., 2010*).

Belo masno tkivo je zbog relativno lakog postupka izolacije (*Conrad i Huss, 2005; Mizuno, 2009*), dostupnosti i velikog prinosa (*Fraser., i sar 2006; Lin i sar 2010*) atraktivan izvor ADSC. Iz izolovanog masnog tkiva se enzimskom digestijom, filtracijom i centrifugiranjem prvo dobija SVF, koja sadrži heterogene populacije ćelija. Kao izvor ADSC, SVF može da se koristi direktno ili se ćelije ekspandiraju u kulturi kroz nekoliko pasaža (*Tapp i sar., 2009*). Zbog enzimske digestije masnog tkiva kolagenazom, što je presudan korak u izolaciji ADSC, parametri poput vremena digestije i aktivnosti enzima takođe značajno mogu uticati na prinos, vijabilnost, fenotip i potencijal diferencijacije ovih ćelija (*Williams i sar., 1995*).

Postoje dve hipoteze o poreklu ADSC. Po jednoj, jedna populacija MSC je tokom ranih faza ontogenetskog razvoja formirala kost i kostnu srž, dok je druga obrazovala masno tkivo i ostala u mezenhimskim tkivima. Prema drugoj hipotezi, poreklom su iz kostne srži iz koje su dospеле u masno tkivo (*Ogawa, 2006*). Na to upućuju i sličnosti u fenotipu ADSC i BMSCs (*Tobita i sar., 2011*). Naime, BMSC i ADSC imaju sličnu stopu proliferacije i obrasce genske ekspresije (*Katz i sar., 2005; Tapp i sar., 2009*), slične karakteristike vezane za kinetiku rasta, starenje ćelija i efikasnost genske transdukcije (*De Ugarte, 2003*) i ekspimiraju slične CD markere (*Katz i sar., 2005; Strem 2005*).

Fenotipska karakterizacija ADSC je kompleksna, kao i fenotipizacija MSC uopšte. Ekspresija antigenskih markera se razlikuje i u odnosu na to iz kog dela tela je masno tkivo dobijeno, kolike starosti i kog pola su jedinke i, kada su životinje u pitanju, kom soju pripadaju. U opsežnom pregledu, *Tapp* i saradnici (2009) su predstavili sličnosti i razlike u ekspresiji CD markera kultivisanih ADSC i BMSC miša i čoveka, sveže izolovane SVF iz masnog tkiva čoveka i fibroblasta čoveka (Tabela 1.1.). Značajne podatke dobili su i *Sung* i njegov tim (2008), koji su poredili ekspresiju antigenskih markera kultivisanih MSC dobijenih iz kostne srži, kompaktne kosti i masnog tkiva miša muškog pola, sojeva BALB/c, C3H i C57BL/6. Pokazano je da, bez obzira na to iz kog su soja miševa, od navedena tri, izolovane, ADSC miševa ekspresiraju anti-Integrin β 1 (CD29), receptor hijaluronata i osteopontina (CD44), endoglin (CD105), antigen matičnih ćelija 1 (Sca-1 – *Stem cells antigen-1*, engl.) i molekul I klase glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC – *Major Histocompatibility Complex*, engl.) H-2kk/b (Tabela 1.2.). Kada je u pitanju ekspresija CD29 i CD44, visoku ekspresiju ovih CD markera našli su i *Taha* i *Hedayati* (2010) u tri puta pasažiranim ADSC miševa BALB/c soja iz regiona prepona.

S obzirom na neraskidivu vezu između vaskularnog i koštanog sistema, za tkivno inženjerstvo kosti jako je bitan potencijal diferencijacije ADSC u osteoblaste i endotelske ćelije. Nađeno je da ADSC koje ekspresiraju pozitivne markere MSC, a ne ekspresiraju hematopoetske markere, mogu biti diferencirane u *in vitro* uslovima u osteoblaste (*Gimble i Gullak, 2003; Arrigoni i sar., 2009; Cvetković i sar., 2015*) ili endotelske ćelije (*Planat-Benard i sar., 2004; Madonna i De Caterina, 2008; Fischer i sar., 2009; Najdanović i sar., 2015*), pa dalje implantirane na ortotopskim i ektopičnim mestima, nanete na biomaterijal tipa koštanog zamenika koji služi kao nosač ćelija.

Tabela 1.1. Ekspresija CD markera u kultivisanim ADSC i BMSC miša i čoveka, sveže izolovanim SVF iz masnog tkiva čoveka i fibroblasta čoveka.

Tip CD markera	ADSCs	BMSCs	ADSCs ili BMSCs	SVF masnog tkiva	Fibroblasti	
	Čovek	Čovek	Miš	Čovek	Čovek	
Pozitivni markeri	CD13	+	+	+/-	+	+
	CD29	+	+	+	+	+
	CD44	+	+/-	+/-	+	+
	CD49e	+	+		+	
	CD54	+	+		+	
	CD55	+	+		+	
	CD63	+	+		+	
	CD73	+	+		+	+
	CD90	+	+/-	+/-	+	+
	CD105	+	+	+	+/-	+
	CD106	-	+/-	+	+/-	
	CD144	+	+		+	
	CD146	+	+		+	
	CD166	+	+		+/-	+
	HLA ABC	+	+			+
	MHC1					
	Negativni markeri	CD11b	-	-	+/-	
CD14		-			+/-	-
CD19		-			-	-
CD31		+/-	-	-	+	-
CD34		+/-	+/-	+/-	+	-
CD45		-	-	-		-
CD79 α		-				-
HLA-DR		-			+	-
Stro-1		+/-	+/-		-	
CD3		-	-			
CD117		-	-	-	+	
CD62L		-	-			
CD95L		-	-			

“+“ označava imunoekspresiju CD markera u svim citiranim referencama, “+/- “ da je nađena i pozitivna i negativna ekspresija, a “-“ da ekspresija u citiranim referencama nije nađena. Preuzeto i izmenjeno iz *Tapp i sar., 2009.*

Tabela 1.2. Uporedni prikaz ekspresije CD markera u ADSC miševa sojeva BALB/c, C3H i C57BL/6.

	BALB/c	C3H	C57BL/6
CD3	-	-	-
CD11b	-	-	-
CD19	-	-	-
CD29	+	+	+
CD34	-	-	-
CD44	+	+	+
CD45	-	-	-
CD86	-	-	-
CD105	+	+	+
CD117	-	-	-
TER-119	-	-	-
Sca-1	+	+	+
H-2k ^(d/k/b)	+	-	-
I-A ^(d/k/b)	-	-	-

“+“ označava imunoekspresiju CD markera u svim citiranim referencama, a “-“ da ekspresija u citiranim referencama nije nađena. Preuzeto i izmenjeno iz *Sung i sar., 2008.*

2. PREDMET I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Predmet istraživanja, predložen u okviru ove disertacije, je ispitivanje uticaja ADSC miša, indukovanih *in vitro* ka endotelskim i osteogenim ćelijama, na vaskularizovanost ektopičnih osteogenih implanata. Predložena istraživanja su zasnovana na hipotezi da su endotelske ćelije, same ili u kombinaciji sa osteogeno indukovanim ćelijama, izuzetno značajan faktor koji utiče na vaskularizovanost subkutanih implanata koja je uslov za početak rane faze osteogeneze. Motiv istraživanja je pronalaženje mogućnosti, uslova i načina da se postigne što bolji biološki kvalitet vaskularizovanih tkivnih matriksa pomoću ADSC. Dobijeni rezultati će imati i fundamentalni naučni i praktičan klinički značaj, jer će dati nove podatke o ćelijskim i molekularnim mehanizmima vaskulogenog i angiogenog procesa u osteogenezi, a takođe i ukazati na nove mogućnosti za uspešno tkivno inženjerstvo kosti i klinički tretman oboljenja i povreda koštano-zglobnog sistema.

Planirana su *in vitro* istraživanja na ćelijskim kulturama i istraživanja na animalnim modelima koja se mogu definisati kroz sledećih nekoliko ciljeva:

1) dobijanje mezenhimskih matičnih ćelija, koje će se postići:

- *in vitro* ekspanzijom mezenhimskih matičnih ćelija stromalne vaskularne frakcije izolovane iz epididimalnog belog masnog tkiva BALB/c miševa;
- utvrđivanjem imunoekspresije proteinskih markera mezenhimskih matičnih ćelija pre i nakon ekspanzije ćelija.

2) diferenciranje mezenhimskih matičnih ćelija ka endotelskim i osteogenim ćelijama, koje će se postići:

- *in vitro* indukcijom diferenciranja mezenhimskih matičnih ćelija;
- praćenjem dinamike ekspresije genskih i proteinskih markera ćelija tokom indukcije.

3) procena vaskularizovanosti i stepena osteogenog procesa na modelu subkutanih implanata BALB/c miševa, koja će se vršiti primenom:

- subkutane implantacije implanata sa ekspaniranim ADSC, neindukovanim, indukovanim u endotelske i osteogene ili kombinaciju endotelskih i osteogenih ćelija, nanetim na nosač od mineralnog matriksa kosti i plazme obogaćene trombocitima kao inicijalnim izvorom faktora rasta;
- ekstrakcije implanata iz eksperimentalnih životinja posle različitih vremenskih perioda od implantacije;
- analize vaskularizovanosti i stepena napredovanja osteogenog procesa u implantima, na osnovu ekspresije proteina i gena, histološke slike i histomorfometrijskih parametara.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

Istraživanja u okviru ove disertacije izvedena su na singenim miševima BALB/c soja, muškog pola, starosti 8 nedelja, mase 22 ± 2 g. Miševi su nabavljeni sa Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Tokom pripreme za eksperiment, miševi su čuvani u standardnim laboratorijskim uslovima, na temperaturi od $25 \pm 1^\circ\text{C}$, u dvanaestočasovnom ciklusu svetla i mraka, a hranjeni su i pojeni *ad libitum*. Sve procedure na životinjama izvedene su u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja Republike Srbije ("Sl. glasnik RD, br. 41/2009") i u skladu sa regulativom "Evropske Konvencije za zaštitu kičmenjaka koji se koriste za eksperimentalne i druge namene (ETS no. 123 Appendix A)." U skladu sa zakonom, Etički komitet Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu odobrio je rad na životinjama, broj odluke 01-2857-8 (rešenje dostavljeno prilikom prijave teze).

3.2. Metode istraživanja *in vitro*

Metode istraživanja *in vitro*, koje su izvedene u skladu sa ciljevima ove disertacije, obuhvatale su: dobijanje ADSC iz SVF belog masnog tkiva BALB/c miševa, kultivaciju ADSC, diferencijaciju ADSC u endotelske i osteogene ćelije, imunocitohemijske metode vizuelizacije proteina markera MSC, endotelskih i osteogenih ćelija i metode analize ekspresije gena markera endotelskih i osteogenih ćelija.

3.2.1. Dobijanje i zasejavanje mezenhimskih matičnih ćelija stromalne vaskularne frakcije belog masnog tkiva miša

Pre procedure izolacije SVF belog masnog tkiva, pripremljen je medijum. Priprema je podrazumevala obogaćivanje standardnog medijuma za ćelijske kulture (DMEM – *Dulbecco's Modified Eagles Minimal Essential Medium*, PAA Laboratories

GmbH, Pasching, Austria) 10% fetalnim telećim serumom (FCS – *Foetal calf serum*, engl., PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), 1% rastvorom antibiotika i antimikotika (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) i 2 mM L-glutaminom (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria).

ADSC su dobijene iz SVF belog masnog tkiva BALB/c miševa po ranije opisanim metodima (*Freshney, 2005; Sung i sar., 2008*), uz izvesne modifikacije (*Cvetković i sar., 2015; Najdanović i sar., 2015*). Tkivo je izolovano sterilnim hirurškim makazama i pincetom iz regiona oko epididimisa (Slika 3.1.a), dva puta isprano sterilnim fiziološkim rastvorom i izmereno. Jedno epididimalno masno tkivo mase 100 ± 10 mg predstavljalo je jedan uzorak tkiva. Izolovana tkiva su izmacerirana, isprana sterilnim fiziološkim rastvorom u petrijevoj posudi (Slika 3.1.b) i ubačena u sterilne plastične epruvete u kojima su podvrgnuta enzimskom razlaganju pomoću kolagenaze tipa I (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany). Rastvor kolagenaze I je pripremljen u koncentraciji od 2000 IU kolagenaze I/ml DMEM-a, pa je 37,5 μ l rastvorenog enzima dodavano po uzorku tkiva.



Slika 3.1. Izolacija belog masnog tkiva koje okružuje epididimis: a) Epididimis i masno tkivo koje ga okružuje; b) Ispiranje izolovanih masnih tkiva u petri posudi ispunjenoj fiziološkim rastvorom. Crna strelica - epididimis, crvena strelica - masno tkivo.

Enzimsko razlaganje je izvedeno u vodenom kupatilu podešenom na temperaturu od 37°C, uz povremeno protresanje sterilnih plastičnih epruveta koje su

sadržale kolagenazu I i masno tkivo (Slika 3.2.). Nakon 45 minuta od početka digestije, enzim je blokiran dodavanjem 375 μ l obogaćenog DMEM-a po uzorku tkiva, pa su uzorci vraćeni na još 10 minuta u vodeno kupatilo. Kako bi adherencija ćelija digestovanog tkiva za zidove epruveta bila izbegnuta, uzorci su premešteni u frižider (5 minuta, 4°C). U cilju uklanjanja ostataka tkiva, ćelije su, uz ispiranje hladnim DMEM-om, propuštene kroz sito pora 180 μ m. Tkivo je centrifugirano brzinom 300 \times g, 10 minuta, na 4°C. Po otklanjanju belog “masnog” prstena sa vrha epruveta i supernatanta, talog koji je sadržao SVF je resuspendovan u DMEM-u.

Za određivanje broja vijabilnih ćelija upotrebljena je metoda tripan-plavo (TBE – *Trypan blue dye exclusion*, engl.). Ova metoda je jedna od *dye exclusion* metoda za određivanje broja vijabilnih ćelija u suspenziji. Zasniva se na tome da žive ćelije imaju intaktne ćelijske membrane, pa tripan-plavo ne može prodrati u njih i njihova citoplazma ostaje svetla. Mrtve ćelije imaju narušen integritet ćelijske membrane, pa tripan-plavo prodire u njih i boji plavim citoplazmu (Strober, 2001). Ćelijska suspenzija i tripan-plavo su pomešani u odnosu 1:1, pa su ćelije izbrojane u *Neubaerovoj* komorici (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany).



Slika 3.2. Shematski prikaz izolacije masnog tkiva, izdvajanja SVF i zasejavanja ćelija u kulturi. Preuzeto i izmenjeno iz Jung i Kleinheinz, 2014. *InTech*, DOI: 10.5772/59219.

Nakon brojanja, ćelije su zasejane u sterilne ploče sa 24 mesta (bunara) u gustini $0,5 \times 10^4$ ćelija po bunaru i u polistirenske flaskove u gustini 1×10^6 po flasku površine 25 cm^2 . Sve ćelije su rasle u pripremljenom obogaćenom DMEM-u.

Jedna ploča za kultivaciju ćelija je u bunarima sadržala plastične pločice na kojima su ćelije zasejane, dok su u drugoj ploči ćelije zasejane direktno u bunare. Ćelije u pločama su inkubirane 24 sata, kako bi adherirale za plastiku, nakon čega je medijum izvučen. Potom su ćelije isprane u sterilnoj fosfatnoj puferisanoj soli (DPBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). U ploči u kojoj su ćelije zasejane direktno u bunare je, nakon ispiranja, u svaki bunar dodato po $300 \mu\text{l}$ rastvora RNAlater[®] (RNA Stabilization Solution, Ambion, Life Technologies, USA), u kome su ćelije čuvane do izolacije RNK, na -80°C . Plastične pločice su iz druge 24-bunarske ploče izvučene, fiksirane 10% neutralnim formalinom u trajanju od 20 minuta, a potom isprane i čuvane u DPBS-u do sprovođenja imunocitohemijske metode.

3.2.2. Postupak kultivacije mezenhimskih matičnih ćelija izolovanih iz stromalne vaskularne frakcije belog masnog tkiva

Ćelije u flaskovima su podvrgnute daljoj kultivaciji u obogaćenom DMEM-u. Flaskovi sa ćelijama su održavani u inkubatoru, u standardnim uslovima za kulture ćelija sisara ($5\% \text{ CO}_2$, 37°C).

Nakon 24 sata od izolacije, ćelijama u flaskovima je zamenjen medijum i, na taj način, otklonjeni su eritrociti i kapi masti. Medijum je menjan na svaka dva do tri dana. Vijabilnost ćelija potvrđena je njihovom kontinualnom proliferacijom. Promene u morfologiji ćelija su praćene na invertnom svetlosnom mikroskopu Axio Opserver Z1, (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), pod faznim kontrastom. Ćelije su fotografisane pomoću kamere AxioCam HR (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), uz upotrebu odgovarajućeg softvera Axiovision (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Kada su postigle konfluentnost od 80%, ćelije su pasažirane pomoću rastvora tripsina i etilendiamintetrasirćetne kiseline (EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic acid*, engl., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany).

Nakon trećeg pasaža, ćelije su zasejane u sterilne 24-bunarske ploče za kultivaciju, u gustini $0,5 \times 10^4$ ćelija po bunaru, direktno u bunare ili na plastične pločice ubačene u bunare.

U dve ploče su ćelije kultivisane 24 sata kako bi adherirale za plastiku. Posle toga je medijum izvučen i ćelije su isprane DPBS-om. U ploči, u kojoj su ćelije zasejane direktno u bunare, ćelijama je dodato 300 μ l RNAlater[®] po bunaru, kako bi ćelije bile čuvane na -80°C , do koraka izolacije RNK. Iz druge 24-bunarske ploče plastične pločice su izvučene, podvrgnute fiksaciji u 10% neutralnom formalinu u trajanju od 20 minuta, isprane DPBS-om i u njemu čuvane do sprovođenja imunocitohemijske metode.

U svim ostalim pločama ćelije su dalje paralelno kultivisane u obogaćenom DMEM-u, medijumu za indukciju endotelske diferencijacije i medijumu za indukciju osteogene diferencijacije.

3.2.3. Postupak endotelske diferencijacije mezenhimskih matičnih ćelija izolovanih iz stromalne vaskularne frakcije belog masnog tkiva

Indukcija diferencijacije ADSC ka endotelskim ćelijama izvedena je pomoću kita za endotelsku diferencijaciju (*EndoPrime Kit*, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) koji sadrži VEGF, EGF i endotelske suplemente: IGF, faktor rasta fibroblasta (FGF – *Fibroblast growth factor*, engl.), hidrokortizon, heparin i vitamin C. Induktivni medijum je suplementovan i 5% FCS-om, 2 mM L-glutaminom i 1% rastvorom antibiotika i antimikotika. ADSC su paralelno kultivisane u obogaćenom DMEM-u (neindukovane ADSC).

Nakon 3, 7, 12, 15 i 21 dan od početka indukcije diferencijacije ADSC ka endotelskim ćelijama, medijum je izvučen iz bunara, ćelije su isprane sterilnim DPBS-om i dodat im je RNAlater[®]. Ćelije koje su 7, 12 i 15 dana gajene u medijumu za indukciju endotelske diferencijacije i neindukovane ADSC su nakon ispiranja DPBS-om fiksirane 10% neutralnim formalinom.

3.2.4. Postupak osteogene diferencijacije mezenhimskih matičnih ćelija izolovanih iz stromalne vaskularne frakcije belog masnog tkiva

Medijum za indukciju osteogene diferencijacije je napravljen dodavanjem 10^{-8} M deksametazona, 50 µg/ml vitamina C i 10 mM β-glicerofosfata u DMEM suplementovan 10% FCS-om, 1% rastvorom antibiotika i antimikotika i 2 mM L-glutaminom. ADSC su paralelno kultivisane u obogaćenom DMEM-u (neindukovane ADSC).

Posle 3, 7, 12 i 15 dana od podvrgavanja osteogenoj diferencijaciji, ćelije su isprane DPBS-om i dodat im je RNAlater[®]. Nakon 7, 12 i 15 dana, ćelije indukovane ka osteogenim i neindukovane ADSC su fiksirane 10% neutralnim formalinom.

3.2.5. Imunocitohemijske metode vizuelizacije proteina markera mezenhimskih matičnih, endotelskih i osteogenih ćelija

Fenotip ćelija SVF fiksiranih jedan dan po izolaciji i ćelija koje su nakon trećeg pasaža kultivisane jedan dan, određivan je imunocitohemijski. Za pozitivne markere mišjih MSC, odabrani su CD29 i CD44, dok je marker monocita i makrofaga CD14 služio kao negativan marker MSC. ADSC indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama i neindukovane ADSC su nakon 7, 12 i 15 dana od početka indukcije diferencijacije bojene imunocitohemijskim metodom na proteinske markere specifičnih funkcija endotelskih ćelija, VEGFR-2 i VCAM-1, i specifični marker funkcije osteoblasta, osteokalcin.

Primarna antitela za navedene antigene su primenjena u sledećim koncentracijama: anti-Integrin β1 (ab52971, Abcam, Cambridge, USA) 1:400, anti-CD44 (ab65829, Abcam, Cambridge, USA) 1:500, anti-CD14 (ab106285, Abcam, Cambridge, USA) 1:1000, anti-VEGFR-2 (ab2349, Abcam, Cambridge, USA) 1:100, anti-VCAM-1 (ab106777, Abcam, Cambridge, USA) 1:200 i anti-osteokalcin (ab9386, Abcam, Cambridge, USA), 1:200. Kao kit za vizuelizaciju korišćen je *Horse raddish peroxidase/3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride* (HRP/DAB, ab64261, Abcam, Cambridge, USA) kit, čije su komponente 3% vodonik-peroksid (*Hydrogen Peroxide Block, engl.*), blokirajući serum (*Protein Block, engl.*), biotinizirano anti-kozje

sekundarno antitelo (*Biotinylated goat anti-rabbit IgG, engl.*), streptavidin-peroksidaza, DAB supstrat i DAB hromogen.

Uzorci ćelija fiksiranih 10% neutralnim formalinom su isprani DPBS-om i inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi u 3% rastvoru vodonik-peroksida u cilju blokiranja endogenih peroksidaza. Potom su uzorci inkubirani 5 minuta u blokirajućem serumu, na sobnoj temperaturi, kako bi se izbeglo nespecifično (*background, engl.*) bojenje, posle čega su preko noći inkubirani sa primarnim antitelima, u vlažnoj komori, na 4°C.

Nakon inkubacije sa primarnim antitelima i ispiranja u DPBS-u, dodato je biotinizirano sekundarno antitelo u trajanju od 10 minuta, na sobnoj temperaturi. Uzorci su potom inkubirani sa streptavidin peroksidazom (10 minuta, sobna temperatura), kako bi se kompleks streptavidina i peroksidaze vezao za biotin sekundarnog antitela. Poslednji korak bila je inkubacija uzoraka (10 minuta, sobna temperatura) u rastvoru DAB supstrata i DAB hromogena (supstrat:hromogen=1:50), sa ciljem dobijanja obojenog signala. Pločice sa uzorcima su kontrastirane Mayer-ovim hematoksilinom (1 minut, sobna temperatura), isprane 7-8 puta u tekućoj vodi i uklapane u permanentni, bezvodni medijum (VectaMount™, Vector laboratories, Burlingame, CA). Uzorci ćelija tretiranih po istom protokolu, ali bez primarnih antitela, služili su kao negativne kontrole.

3.2.6. Metode analize ekspresije gena markera endotelskih i osteogenih ćelija

Metode analize ekspresije gena markera endotelskih i osteogenih ćelija obuhvatale su izolaciju RNK, reverznu transkripciju izolovane RNK u komplementarnu DNK (cDNK) i kvantitativnu lančanu reakciju polimeraze u realnom vremenu (quantitative real-time PCR; qRT-PCR).

3.2.6.1. Metoda izolacije RNK iz ćelija

U cilju određivanja ekspresije gena markera endotelskih i osteogenih ćelija, prvi korak je bila izolacija totalne RNK iz ćelija sačuvanih u RNAlater® rastvoru. Totalna RNK iz ćelija je izolovana pomoću RNeasy Mini Kit®-a (Qiagen, Hilden, Germany), u skladu sa preporukom proizvođača. U toku postupka izolacije RNK, Dnase I, Rnase-

free set (Qiagen, Hilden, Germany) korišćen je za digestiju ostataka DNK sa kolonica za izolaciju. Nakon izolacije, određena je koncentracija RNK u uzorcima pomoću fluorimetra Qubit[®] 2.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) i Qubit[®] RNA assay kit-a (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Alikvoti RNK čuvani su na temperaturi -80°C.

3.2.6.2. Metoda reverzne transkripcije izolovane RNK u komplementarnu DNK

Izolovana totalna RNK je metodom reverzne transkripcije prevedena u jednolančanu cDNK. U tu svrhu, korišćen je kit za reverznu transkripciju High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems, Life Technologies, USA). U svakoj reakciji volumena 20 µl bilo je 2,0 µl 10 × koncentrovanog pufera za reverznu transkripciju (RT buffer); 0,8 µl 25 × koncentrovane smeše nukleotida (dNTP miks); 2,0 µl 10 × koncentrovanih Random Primer-a; 1,0 µl MultiScribe[™] reverzne transkriptaze; 1,0 µl inhibitora ribonukleaze, a količina dH₂O i RNK uzorka varirala je u zavisnosti od izmerene koncentracije RNK. Upotrebljena RNK nije prelazila koncentraciju od 2 µg, prema preporuci proizvođača. Reakcija reverzne transkripcije je izvedena u aparatu SureCycler8800 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), u tri koraka: 10 minuta na 25°C, 120 minuta na 37°C i 5 minuta na 85°C. Uzorci cDNK su čuvani na temperaturi od -80°C do dalje analize.

3.2.6.3. Metoda kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (quantitative real-time PCR; qRT-PCR)

Analiza relativne ekspresije gena markera endotelskih i osteogenih ćelija rađena je metodom qRT-PCR. Metoda qRT-PCR je rađena u aparatu RealTime thermal cycler Stratagene MxPro-Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), kroz 40 ciklusa. Svaki ciklus obuhvata faze aktivacije enzima (3 minuta, 95°C), denaturacije (3 sekunde, 95°C), vezivanja prajmera (20 sekundi, 55°C) i ekstenzije (1 sekunda, 72°C). Reakcije su pripremljene korišćenjem Kapa Sybr[®] Fast Universal 2xqPCR Master Mix-a (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) i prajmera (Qiagen, Hilden, Germany). Specifičnost proizvoda reakcije proveravana je analizom krive topljenja i

elektroforezom na agaroznom gelu. Svaka reakcija sadržala je 50% Kapa Sybr® Fast DNA Polymerase, 2% Rox Low, 27% dH₂O, 10% uzorka i 11% prajmera.

Relativna ekspresija gena markera endotelskih ćelija je sagledavana 3, 7, 12, 15 i 21 dan od početka diferencijacije. Kao genski markeri endotelskih ćelija, odabrani su *Vwf*, *Flt-1*, *Vcam-1* i *Egr-1*. Osteogena diferencijacija procenjuvana je nakon 3, 7, 12 i 15 dana od indukcije diferencijacije određivanjem relativne ekspresije gena za osteokalcin (*Bglap* – *Bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein, engl.*), alfa lanac kolagena I (*Colla1* – *Collagen type I $\alpha 1$ chain, engl.*), tkivno-nespecifične alkalne fosfataze koja se eksprimira u jetri, kostima i bubrezima (*Alpl* – *Alkaline phosphatase liver/bone/kidney, engl.*) i gena za transkripcioni faktor Osteriks (*Sp7*). Za navedene gene korišćeni su odgovarajući prajmeri i “housekeeping” gen za β -actin (*Actb*) kao gen normalizator (Tabela 3.1.).

Rezultati su prikazani relativno, kao promena u odnosu na ekspresiju gena u kalibratoru za logaritamsku osnovu 2. Relativna ekspresija gena markera endotelskih ćelija određivana je u odnosu na ekspresiju ovih gena u dva tipa kalibratora – jedan kalibrator su bile ćelije iz trećeg pasaža, a drugi ćelije iz sveže izolovane SVF. Relativna ekspresija gena svojstvenih osteogenim ćelijama je sagledavana u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža. Referentne vrednosti ekspresije gena markera endotelskih i osteogenih ćelija u kalibratoru bile su "0".

Tabela 3.1. Prajmeri korišćeni za qRT-PCR analizu ćelija

Ime gena	QuantiTect Primer esej	ID detektovanog transkripta i dužina	ID gena
<i>Actb</i>	Mm_Actb_2_SG, QT01136772	NM_007393 (1889bp)	11461
<i>Vwf</i>	Mm_Vwf_1_SG, QT00116795	NM_011708 (8834 bp)	22371
<i>Flt-1</i>	Mm_Flt1_1_SG, QT00096292	NM_010228 (6280 bp)	14254
<i>Egr-1</i>	Mm_Egr1_1_SG, QT00265846	NM_007913 (3072 bp)	13653
<i>Vcam-1</i>	Mm_Vcam1_1_SG, QT00128793	NM_011693 (3398 bp)	22329
<i>Sp7</i>	Mm_Sp7_1_SG, QT00293181	NM_130458 (2284bp)	170574
<i>Bglap</i>	Mm_Bglap1_va. 1_SG, QT01057049	NM_001037939 (351bp)	12096
<i>Colla1</i>	Mm_Coll1a1_1_SG, QT00162204	NM_007742 (4709bp)	12842
<i>Alpl</i>	Mm_Alpl_2_SG, QT01740221	NM_007431 (2521bp)	11647

3.3. Metode istraživanja *in vivo*

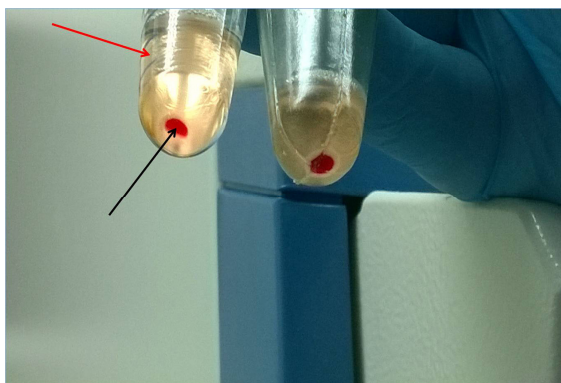
Metode istraživanja *in vivo*, koje su izvedene u skladu sa ciljevima ove disertacije, obuhvatale su pripremu MMK, PRP i ADSC za postupak implantacije, formiranje implanata i postupak implantacije, obradu implanata za svetlosno-mikroskopsku analizu, metode histomorfološke i histomorfometrijske analize implanata, imunohistohemijske metode vizuelizacije proteina markera endotelskih i osteogenih ćelija u implantima i metode analize vaskularizovanosti i stepena napredovanja osteogenog procesa u implantima na osnovu ekspresije markerskih gena.

3.3.1. Priprema mineralnog matriksa kosti za postupak implantacije

Svi implanti sadržali su MMK u vidu komercijalnog preparata Bio-Oss[®]-a, granula veličine 0,25-1 mm (S veličina), koji je imao funkciju nosača ćelija. Bio-Oss[®] ima dobru biokompatibilnost i osteokonduktivnost (*Piattelli i sar., 1999*) čime zadovoljava zahteve koje nosač ADSC treba da poseduje. Za konstrukciju svakog implanta, izmereno je po 10 mg ovog MMK.

3.3.2. Priprema plazme obogaćene trombocitima za postupak implantacije

PRP je dobijena u skladu sa opisanim protokolima (*Intini i sar., 2007*). Krv, uzeta iz orbitalnog sinusa miša, sakupljana je u epruvete koje su sadržale antikoagulant natrijum citrat i centrifugirana na $134 \times g$, 10 minuta, na sobnoj temperaturi (Slika 3.3.). Supernatant sa plazmom koja sadrži trombocite korišćen je u drugom koraku centrifugiranja ($840 \times g$, 10 minuta, sobna temperatura). Nakon drugog centrifugiranja, talog sa trombocitima je resuspendovan u malom volumenu plazme iz supernatanta kako bi bila dobijena PRP. Aktivacija PRP-a je izvedena pomoću 2% CaCl_2 neposredno pre procedure implantacije. Po implantu je korišćeno 10% PRP-a, budući da je pokazano da je ova koncentracija optimalna za kombinovanje sa ADSC (*Liu i sar., 2008; Murphy i sar., 2011; Man i sar., 2012*). Trombociti su brojani manuelno, u komorici Malassez (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Germany) i ustanovljen broj je bio $1,89 \pm 0,5 \times 10^6$ trombocita/ μl .



Slika 3.3. PRP nakon prvog centrifugiranja. Legenda: Crna strelica - PRP; crvena strelica - supernatant.

3.3.3. Priprema mezenhimskih matičnih ćelija masnog tkiva za postupak implantacije

Nakon 12 dana od indukcije endotelne diferencijacije i 15 dana od indukcije osteogene diferencijacije, ADSC su pasažirane paralelno sa ćelijama koje su 12 dana nakon trećeg pasaža rasle u obogaćenom DMEM-u bez dodavanja induktivnih faktora. Ćelije su posle pasaža prebrojane, gustina je podešena na $3 \times 10^5/\text{ml}$ za svaku od kultura. Iz ove suspenzije, uzimano je 1×10^4 ćelija za svaki implant.

3.3.4. Formiranje implanata i postupak implantacije

Implanti su pripremani u sterilnim staklenim pločama (Slika 3.4.a). Svaki implant sačinjen je od 10 mg ($\sim 0.02 \text{ cm}^3$) MMK i 20 μl tečne komponente. U svim implantima koji su sadržali ćelije kao jednu od komponenti, ćelije su ostavljene da adheriraju za MMK 10-15 minuta pre implantacija (*Jurgens i sar., 2011*). Za pripremu implanata korišćen je DMEM koji nije bio obogaćen i kome nisu dodati induktivni faktori.

Formirani su sledeći tipovi implanata:

MM: 10 mg MMK + 20 μl DMEM;

MP: 10 mg MMK + 2 μl PRP (10% v/v PRP) + 18 μl DMEM;

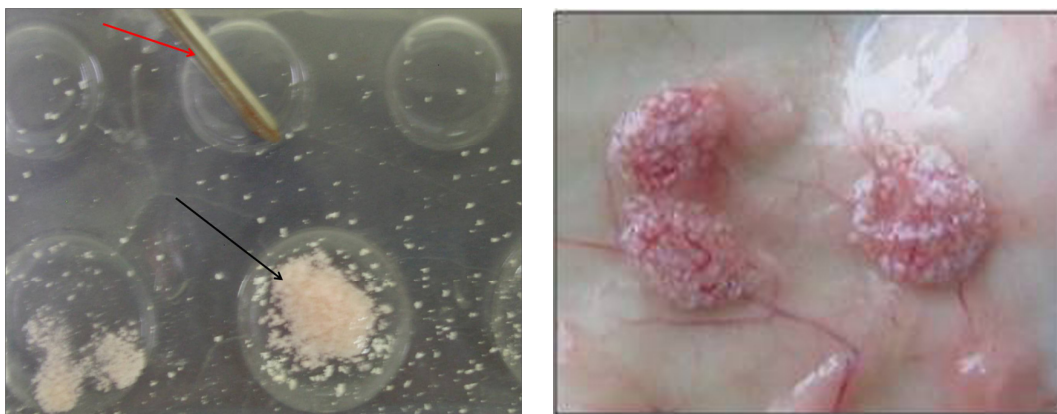
MPD: 10 mg MMK + 2 μl PRP (10% v/v PRP) + 1×10^4 ekspanziranih, neindukovanih ADSC u 18 μl DMEM-a;

MPE: 10 mg MMK + 2 μ l PRP (10% v/v PRP) + 1×10^4 ADSC *in vitro* indukovanih ka endotelskim ćelijama u 18 μ l DMEM-a;

MPO: 10 mg MMK + 2 μ l PRP (10% v/v PRP) + 1×10^4 ADSC *in vitro* indukovanih ka osteogenim ćelijama u 18 μ l DMEM-a;

MPEO: 10 mg MMK + 2 μ l PRP (10% v/v PRP) + 1×10^4 ADSC *in vitro* indukovanih ka endotelskim ćelijama u 9 μ l DMEM-a + 1×10^4 ADSC *in vitro* indukovanih ka osteogenim ćelijama u 9 μ l DMEM-a.

Pre procedure implantacije, životinje su anestezirane intraperitonealnom injekcijom ketamina u dozi od 2 mg/ml. Implantacije su rađene subkutano, između lopatica BALB/c miševa. Biopsijske igle su napunjene materijalom za implantaciju, a mesto ubadanja igle je obrijano i dezinfikovano 10% rastvorom povidon joda. Napravljen je rez dužine oko 2 mm, igla je ubodena, pa su potkožno ubačena četiri implanta po životinji pod uglom od 90° jedan u odnosu na drugi. Svaka grupa implanata sadržala je po dvadeset životinja. Po pet životinja iz svake grupe je žrtvovano posle jedne, dve, četiri i osam nedelja od implantacija. Ekstrahovani implantati (Slika 3.4.b) korišćeni su za histomorfološku, histomorfometrijsku, imunohistohemijsku i analizu relativne ekspresije gena.



Slika 3.4. a) MMK nakon nanošenja PRP i ADSC, pripremljen za implantaciju; b) Izgled implanata nakon inkubacije u životinjama. Crna strelica - pripremljen implant; crvena strelica - biopsijska igla.

3.3.5. Obrada implanata za svetlosno-mikroskopsku analizu

Implanti izvučeni dve i osam nedelja nakon postupka implantacije su fiksirani u 10% neutralnom puferovanom formalinu i dekalcifikovani u 10% rastvoru (PH 7,4) EDTA. Dehidratacija je rađena u rastućoj seriji etanola (50%, 70%, 95%, Merck, Darmstadt, Germany) od kojih je svaki držan po 120 minuta, a u apsolutnom etanolu su uzorci inkubirani preko noći. Nakon toga, implantati su 240 minuta stajali u toluolu, uklopljeni su u paraplast i isečeni na mikrotomu Leica RM2235 (Leica Microsystems, Solms, Germany). Dobijeni isečci debljine 4 μm su korišćeni za histološka i imunohistohemijska bojenja i histomorfometrijsku analizu.

3.3.6. Metoda histomorfološke analize implanata

Histomorfološka analiza implanata rađena je na isečcima obojenim jednim od osnovnih histoloških bojenja – Hematoksilin-eozin (HE) koje omogućava definisanje različitih ćelijskih struktura. Za HE bojenje korišćeni su *Harris-ov* hematoksilin i eozin. *Harris-ov* hematoksilin je bazna boja koja kisele strukture u tkivu, poput jedra, boji plavo. Eozin je kisela boja koja bazne strukture, kao što je citoplazma, boji crveno ili ružičasto (*Avwioro, 2011*).

Nakon deparafinizacije (termostat preko noći, ksilol 15 minuta) isečaka implanata uklopljenih u paraplast, rađeno je ispiranje u opadajućoj seriji etanola (100%, 96%, 70%) od kojih je svaki držan na pločicama sa isečcima dva puta po tri minuta. Isečci su ispirani u destilovanoj vodi (dH_2O) u trajanju od pet minuta, na sobnoj temperaturi.

Usledilo je bojenje *Harris-ovim* hematoksilinom (10 minuta, sobna temperatura), ispiranje 5 minuta u tekućoj vodi i kontrastiranje eozinom 1 minut (sobna temperatura). Pločice sa isečcima isprane u dH_2O i provučene kroz rastuću seriju etanola (70%, 96%, 100%) su potopljene u kivetu sa ksilolom i sušene u termostatu 10 minuta. Obojeni isečci su pokriveni Kanada balsamom, te su napravljeni trajni mikroskopski preparati posmatrani i analizirani na svetlosnom mikroskopu Leica DMLS (Leica Microsystems, Solms, Germany).

3.3.7. Metoda histomorfometrijske analize implanata

Histomorfometrijska analiza vaskularizovanosti implanata rađena je na isečcima obojenim HE metodom, uz pomoć programskog paketa NIS-Elements software version 3.2 (Nikon, Tokyo, Japan). Fotografije obojenih isečaka su napravljene na mikroskopu *Axio Observer.Z1* opremljenim kamerom *AxioCam HR* na uvećanju od 100×. Ukupna površina implanata i ukupna površina krvnih sudova u implantima merene su korišćenjem softverskog alata *Annotations and Measurements* u pomenutom programu. Procenat vaskularizacije računat je po formuli: (ukupna površina krvnih sudova/ukupna površina implanata) × 100.

3.3.8. Imunohistohemijske metode vizuelizacije proteina markera endotelskih i osteogenih ćelija u implantima

Isečci implanata, prethodno uklopljenih u paraplast, su deparafinisani (termostat preko noći, ksilol 15 minuta) i ispirani u seriji etanola opadajuće koncentracije (100%, 96%, 70%), pri čemu je svaki stajao na isečcima dva puta po 3 minuta. Isečci implanata su nakon toga ispirani u dH₂O pet minuta i podvrgnuti toplotom indukovanom demaskiranju antigena.

Razlog za uključivanje procedure toplotnog demaskiranja antigena leži u hemijskoj prirodi formaldehida, fiksativa koji je primenjen u ovom istraživanju. Dobra strana fiksacije u formalinu je što morfološki detalji tako ostaju dobro očuvani. Međutim, ovaj fiksativ indukuje stvaranje hidrosimetilenskih mostova između aminokiselinskih ostataka u tkivu (*Pearse, 1980*), pa dolazi do maskiranja epitopa što smanjuje ili potpuno onemogućava vezivanje odgovarajućih antitela. Kako bi se maskiranje epitopa izbeglo, metoda koja se može primeniti je toplotom indukovano demaskiranje antigena u citratnom puferu (*Pilleri i sar., 1997*). Svrha primene pufera, u koje se uzorci uranjaju, je ta što soli u njima pri zagrevanju potpomažu rasplitanje tercijarne struktura antigena, dok toplota pruža energiju za raskidanje hidrosimetilenskih mostova između kalcijumovih jona i ostalih divalentnih metalnih katjona i proteina (*Morgan i sar., 1994*).

Pločice sa isečcima su uronjene u kivetu ispunjenu 10 mM natrijum citratnim puferom i ostavljene 30 minuta u mikrotalasnu pećnicu prethodno zagrejanu na 96°C. Nakon toga, pločice su hlađene na sobnoj temperaturi 30 minuta, te su primenjivana primarna antitela i komponente HRP/DAB kita za vizuelizaciju: 3% vodonik-peroksid, blokirajući serum, biotinizirano anti-kozje sekundarno antitelo, streptavidin-peroksidaza, DAB supstrat i DAB hromogen.

Pločice su prvo inkubirane u 3% rastvoru vodonik-peroksida (10 minuta, sobna temperatura) radi blokiranja endogenih peroksidaza, a zatim u blokirajućem serumu (5 minuta, sobna temperatura) u cilju izbegavanja *background* bojenja. Primarna antitela su na pločicama sa isečcima stajala preko noći, a inkubacija je izvedena u vlažnoj komori, na 4°C. Primarna antitela su primenjena u sledećim koncentracijama: anti-VEGFR-2 (ab2349, Abcam, Cambridge, USA) 1:200, anti-VCAM-1 (ab106777, Abcam, Cambridge, USA) 1:1000, anti-osteokalcin (ab93876, Abcam, Cambridge, USA) 1:200. Pločice koje su tretirane po istom protokolu, ali bez primarnih antitela bile su negativne kontrole.

Narednog jutra su DPBS-om isprana primarna i dodata biotinizirana sekundarna antitela (10 minuta, sobna temperatura). Zatim su isecci inkubirani sa streptavidin peroksidazom (10 minuta, sobna temperatura) i još 10 minuta (sobna temperatura) u rastvoru DAB supstrata i DAB hromogena (supstrat:hromogen=1:50). Kontrastno bojenje je rađeno *Mayer*-ovim hematoksilinom (1 minut, sobna temperatura), a posle ispiranja ove boje (7-8 puta u tekućoj vodi), pločice su uklapane u VectaMount™ medijum.

3.3.9. Metode analize vaskularizovanosti i stepena osteogenog procesa u implantima na osnovu ekspresije markerskih gena

Implanti izvučeni 1, 2, 4 i 8 nedelja nakon implantacije su čuvani u RNAlater®, na -80°C, radi sprovođenja metoda analize vaskularizovanosti i stepena osteogenog procesa na osnovu ekspresije markerskih gena. Metode su obuhvatale izolaciju RNK iz implanata, reverznu transkripciju izolovane RNK u cDNK i qRT-PCR analizu.

3.3.9.1. Metoda izolacije RNK iz implanata

Iz implanata sačuvanih u RNAlater[®] je prvo izolovana totalna RNK. Izolacija i merenje koncentracije RNK izvedeni su po napred opisanoj metodi (videti u 3.2.6.1.).

3.3.9.2. Metoda reverzne transkripcije izolovane RNK u komplementarnu DNK

Jednolančana cDNK je dobijena metodom opisanom u delu 3.2.6.2.

3.3.9.3. Metoda kvantitativne lančane reakcije polimeraze (PCR) u realnom vremenu (quantitative real-time PCR; qRT-PCR)

Relativna ekspresija gena u uzorcima dobijenim iz implanata je određena po istom postupku kao što je opisano u 3.2.6.3. Analizirana je ekspresija gena *Vwf*, *Flt-1*, *Egr-1* i *Vcam-1* i gena za osteopontin (*Spp1* – *Secreted phosphoprotein 1*, engl.), koja je normalizovana u odnosu na gen *Actb* (Tabela 3.2.).

Rezultati su prikazani relativno, kao promena u odnosu na ekspresiju gena u kalibratoru za logaritamsku osnovu 2. Kalibrator su bile ili ćelije iz trećeg pasaža ili PRP ili ćelije iz trećeg pasaža i PRP zajedno (objedinjen kalibrator). Referentne vrednosti ekspresije gena markera endotelskih i osteogenih ćelija u kalibratoru bile su "0". Specifičnost proizvoda reakcije proveravana je analizom krive topljenja.

Tabela 3.2. Prajmeri korišćeni za qRT-PCR analizu implanata

Ime gena	QuantiTect Primer esej	ID detektovanog transkripta i dužina	ID gena
<i>Actb</i>	Mm_Actb_2_SG, QT01136772	NM_007393 (1889bp)	11461
<i>Vwf</i>	Mm_Vwf_1_SG, QT00116795	NM_011708 (8834 bp)	22371
<i>Flt-1</i>	Mm_Flt1_1_SG , QT00096292	NM_010228 (6280 bp)	14254
<i>Egr-1</i>	Mm_Egr1_1_SG, QT00265846	NM_007913 (3072 bp)	13653
<i>Vcam-1</i>	Mm_Vcam1_1_SG, QT00128793	NM_011693 (3398 bp)	22329
<i>Spp1</i>	Mm_Spp1_1_SG, QT00157724	NM_009263 (1428bp)	20750

3.3.10. Provera kvaliteta i specifičnosti produkata qRT-PCR reakcije

Pored provere kvaliteta i specifičnosti produkata qRT-PCR reakcije analizom krive topljenja, primenjena je i metoda elektroforeze. U tu svrhu, korišćen je 2% agarozni gel pripremljen pomoću 1xTAE (Tris, acetat, EDTA) pufera, koji je korišćen i za čitavu proceduru elektroforeze. Za vizuelizaciju fragmenata na agaroznom gelu upotrebljen je etidijum bromid, čija je koncentracija u 1xTAE puferu bila 0,5 µg/ml. Svaki qRT-PCR produkt je u volumenu od 5 µl pomešan sa 1,5 µl bromfenol plavog i ubacivan u bunarčice gela, u okviru sistema za elektroforezu (Serva, Heidelberg, Germany). Elektroforeza je rađena u trajanju od jednog sata, pri intenzitetu struje od 100 mA, posle čega su fragmenti na gelu posmatrani na UV transiluminatoru (Vilber Lourmat, Marne La Vallee, France). Dužina fragmenata qRT-PCR produkata (Tabela 3.3.) je analizirana i upoređivana u odnosu na DNK standard za dužinu fragmenata (Serva, Heidelberg, Germany).

Tabela 3.3. Dužina fragmenata qRT-PCR produkata

Ime gena	ID detektovanog transkripta i dužina
<i>Actb</i>	NM_007393 (77 bp)
<i>Vwf</i>	NM_011708 (79 bp)
<i>Flt-1</i>	NM_010228 (78 bp)
<i>Egr-1</i>	NM_007913 (119 bp)
<i>Vcam-1</i>	NM_011693 (130 bp)
<i>Spp1</i>	NM_009263 (92 bp)

3.4. Statistička obrada rezultata istraživanja

Sve statističke analize rađene su u programu *Microsoft Office Excel*. Rezultati su prikazani u vidu srednjih vrednosti \pm standardna devijacija. Za poredenje srednjih vrednosti je korišćen *Student*-ov t-test. Razlike su smatrane značajnim za $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati *in vitro* istraživanja

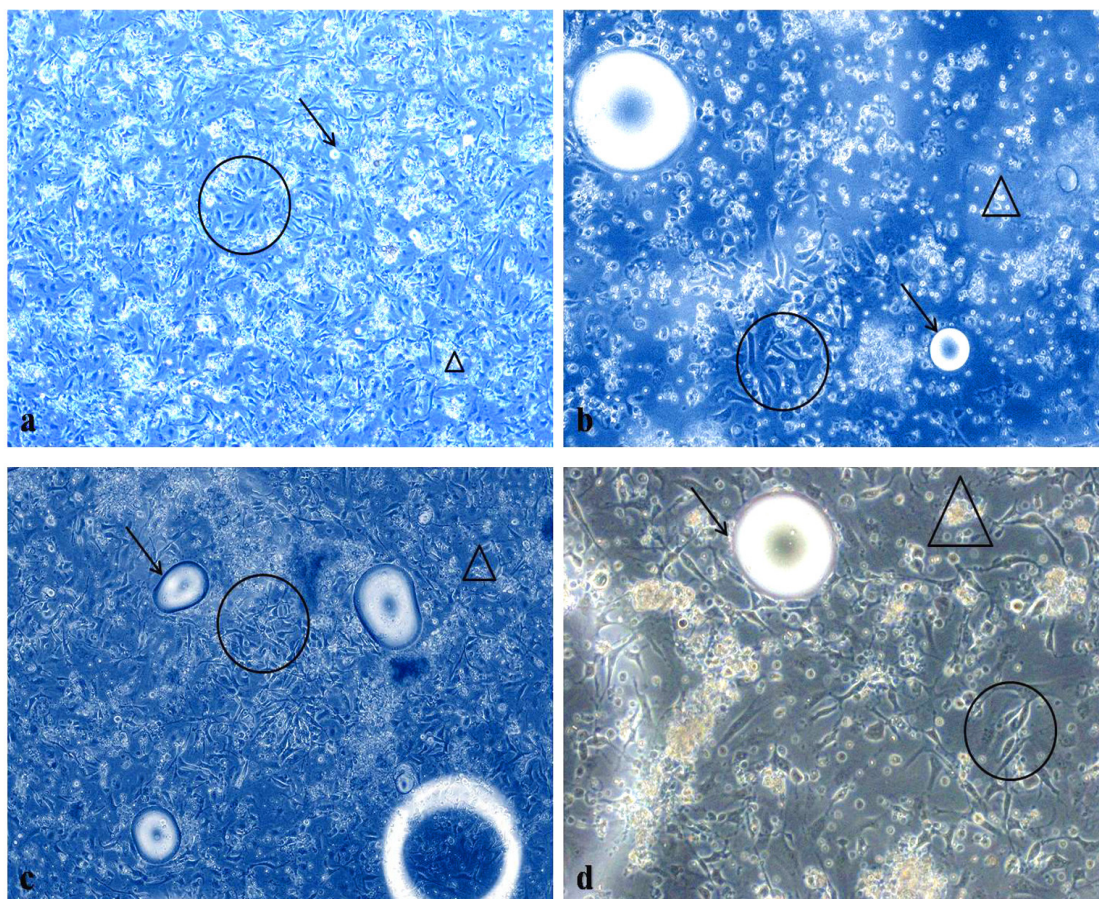
Rezultati *in vitro* istraživanja obuhvataju morfološku i imunocitohemijsku analizu sveže izolovanih ćelija SVF belog masnog tkiva BALB/c miševa i kultura ADSC, morfološku, imunocitohemijsku i analizu ekspresije markerskih gena endotelskih ćelija u ADSC podvrgnutim *in vitro* endotelskoj diferencijaciji kao i morfološku, imunocitohemijsku i analizu ekspresije markerskih gena osteogenih ćelija u ADSC podvrgnutim *in vitro* osteogenoj diferencijaciji.

4.1.1. Morfološka analiza sveže izolovanih ćelija stromalne vaskularne frakcije i kultura ADSC

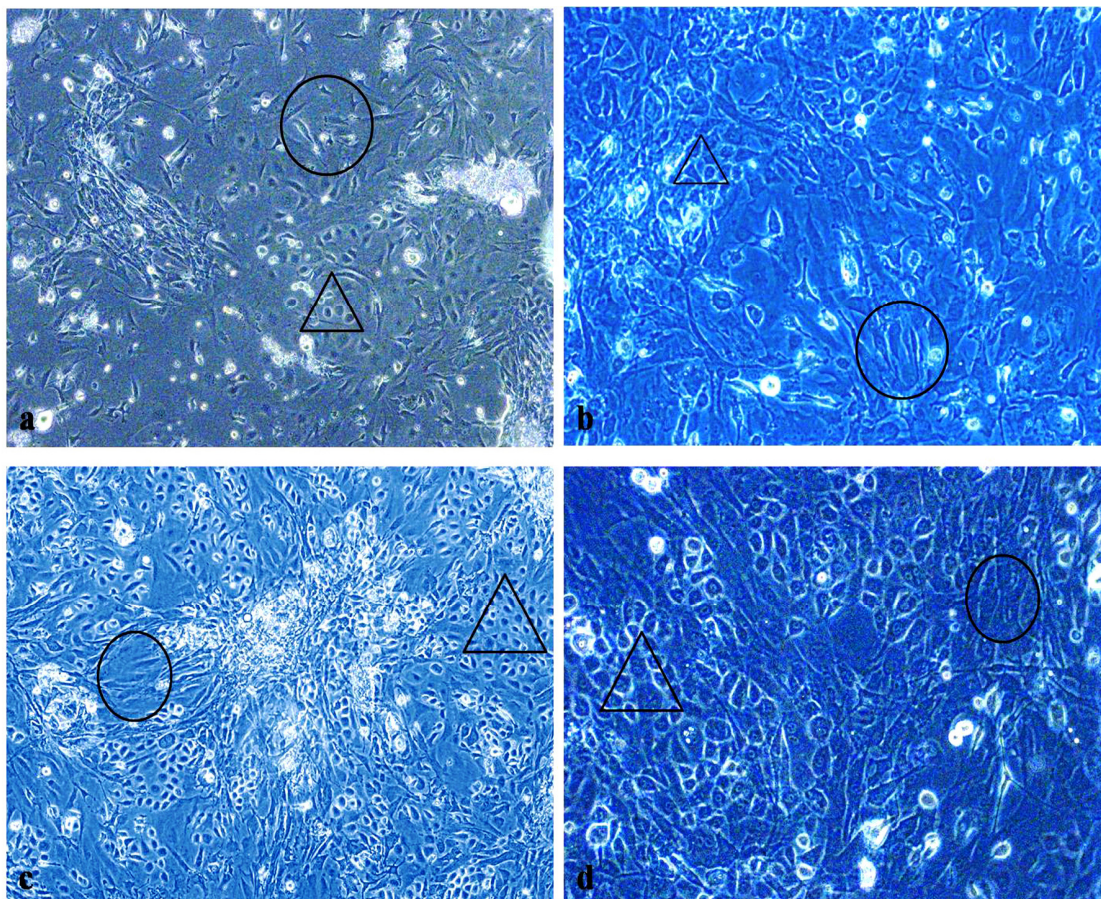
Nakon 24 sata od zasejavanja ćelija SVF, sitne, vretenaste, uglavnom pojedinačne ćelije adheriraju za plastiku (Slike 4.1.a i b), a u medijumu se uočavaju i eritrociti (Slike 4.1.a i b) i kapi masti (Slike 4.1.a i b). Nakon 48 sati kultivacije, ćelije su brojnije, a one koje nalikuju fibroblastima se izdužuju (Slike 4.1.c i d).

Tri dana nakon zasejavanja, primarna ćelijska kultura je skoro potpuno očišćena od eritrocita i kapi masti (Slike 4.2.a i b). Petog dana kultivacije se, osim ćelija koje liče na fibroblaste udruženih u snopove, uočavaju i adherirane ćelije koje liče na epitelne organizovane u strukture koje podsećaju na epitelne ploče (Slike 4.2.c i d).

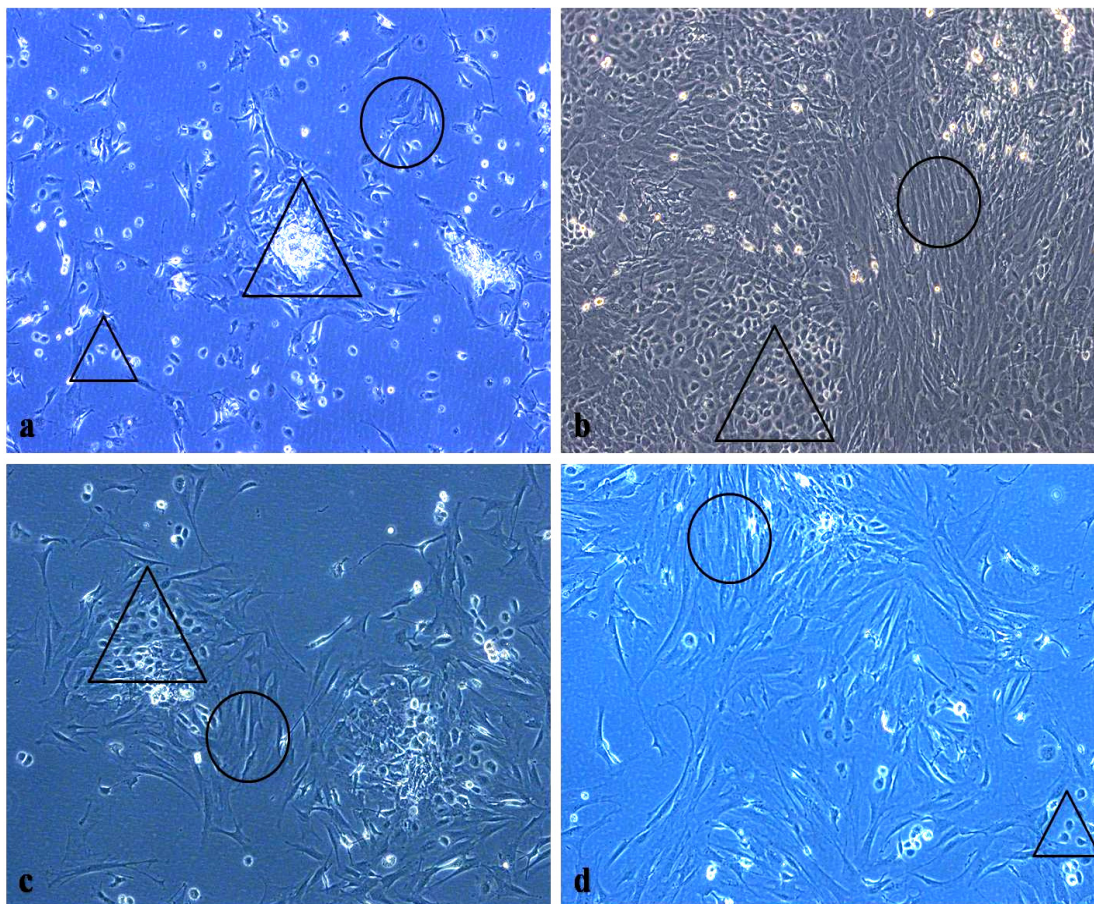
Ćelije nakon prvog pasaža zadržavaju morfologiju koja odgovara ili fibroblastima ili epitelnim ćelijama (Slike 4.3.a i b). Ove ćelije pokazuju veliki proliferativni potencijal tri do pet dana posle prvog (Slike 4.3.a i b), kao i tri do pet dana nakon drugog pasaža (Slike 4.3.c i d).



Slika 4.1. Morfološke karakteristike ćelija SVF 24 i 48 sati nakon izolacije iz masnog tkiva, fazni kontrast: a) 24 sata nakon izolacije, 100×; b) 24 sata nakon izolacije, 200×; c) 48 sati nakon izolacije, 100×; d) 48 sati nakon izolacije, 200×. Krug - vretenaste ćelije koje liče na fibroblaste, strelica - masne kapi, trougao - eritrociti. U kulturama se 24 i 48 sati nakon zasejavanja ćelija SVF opažaju uglavnom sitne vretenaste ćelije koje liče na fibroblaste.



Slika 4.2. Morfološke karakteristike ćelija SVF tri i pet dana nakon izolacije iz masnog tkiva, fazni kontrast: a) tri dana nakon izolacije, 100×; b) tri dana nakon izolacije, 200×; c) pet dana nakon izolacije, pred prvi pasaž, 100×; d) pet dana nakon izolacije, pred prvi pasaž, 200×. Krug - vretenaste ćelije koje liče na fibroblaste, trougao - ćelije koje liče na epitelne. Tri dana nakon zasejavanja ćelija SVF dominiraju ćelije koje liče na fibroblaste, a uočavaju se pojedine ćelije koje liče na epitelne. Pred prvi pasaž su ćelije koje liče na fibroblaste udružene u snopove, a one koje liče na epitelne organizovane u ploče.



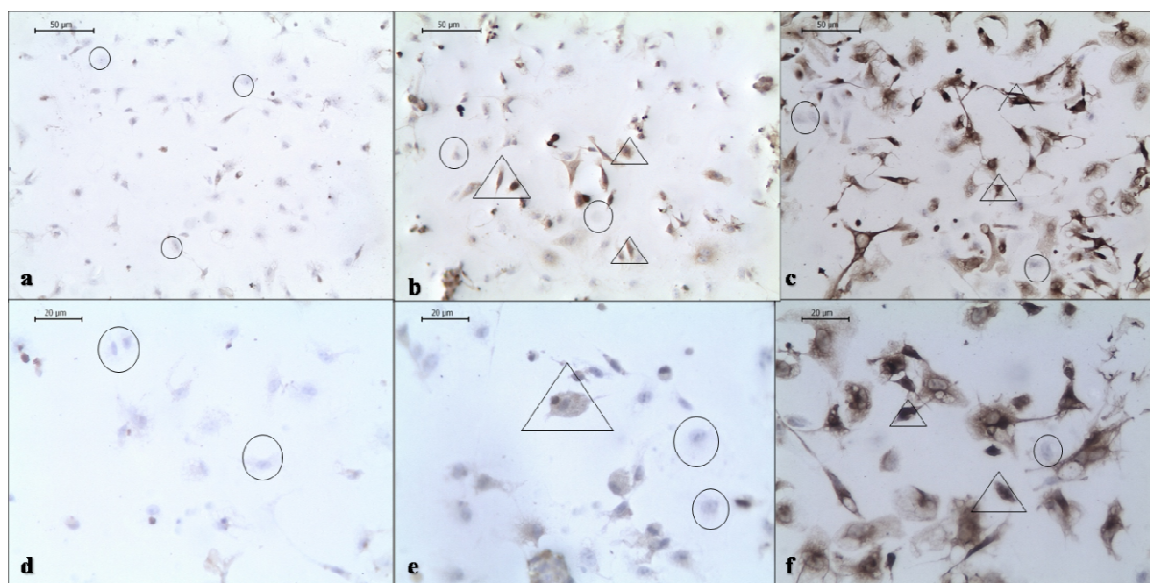
Slika 4.3. Morfološke karakteristike ćelija SVF nakon prvog i drugog pasaža, fazni kontrast, 100 \times : a) 24 sata nakon prvog pasaža; b) pet dana nakon prvog pasaža, neposredno pre drugog pasaža; c) 24 sata posle drugog pasaža; d) 72 h posle drugog pasaža, neposredno pre trećeg pasaža. Krug - vretenaste ćelije koje liče na fibroblaste, trougao - ćelije koje liče na epitelne. Ćelije i nakon prvog i nakon drugog pasaža zadržavaju morfologiju koja odgovara ili fibroblastima ili epitelnim ćelijama.

4.1.2. Imunocitohemijska analiza izolovanih ćelija stromalne vaskularne frakcije i kultura ADSC

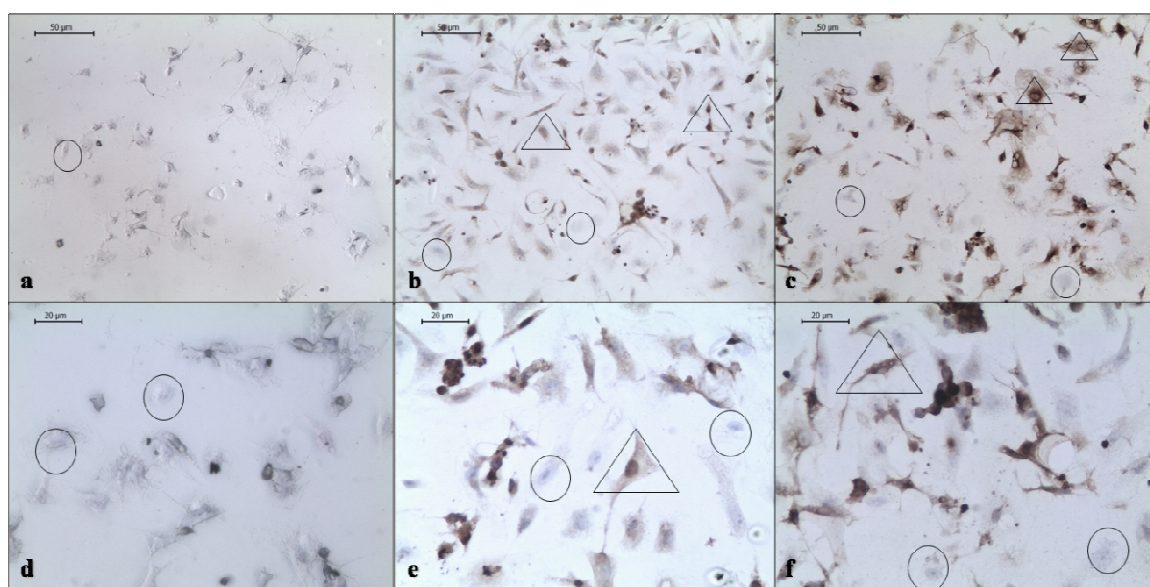
Među adheriranim ćelijama sveže izolovane SVF dominiraju one koje su pozitivne na markere ADSC, CD29 (Slike 4.4.b i e) i CD44 (Slike 4.4.c i f), a negativne na marker svojstven ćelijama monocito-makrofagne linije, CD14 (Slike 4.5.a i d). Uočava se i značajna imunoekspresija VEGFR-a 2 (Slike 4.5.b i e) i VCAM-a 1 (Slike 4.5.c i f), a u negativnim kontrolama nema lažno pozitivnog bojenja (Slike 4.4.a i d).

Jedan dan nakon trećeg pasaža, ADSC su uglavnom pozitivne na CD29 (Slike 4.6.b i e), CD44 (Slike 4.6.c i f) i VEGFR-2 (Slike 4.7.b i e), pojedine ćelije

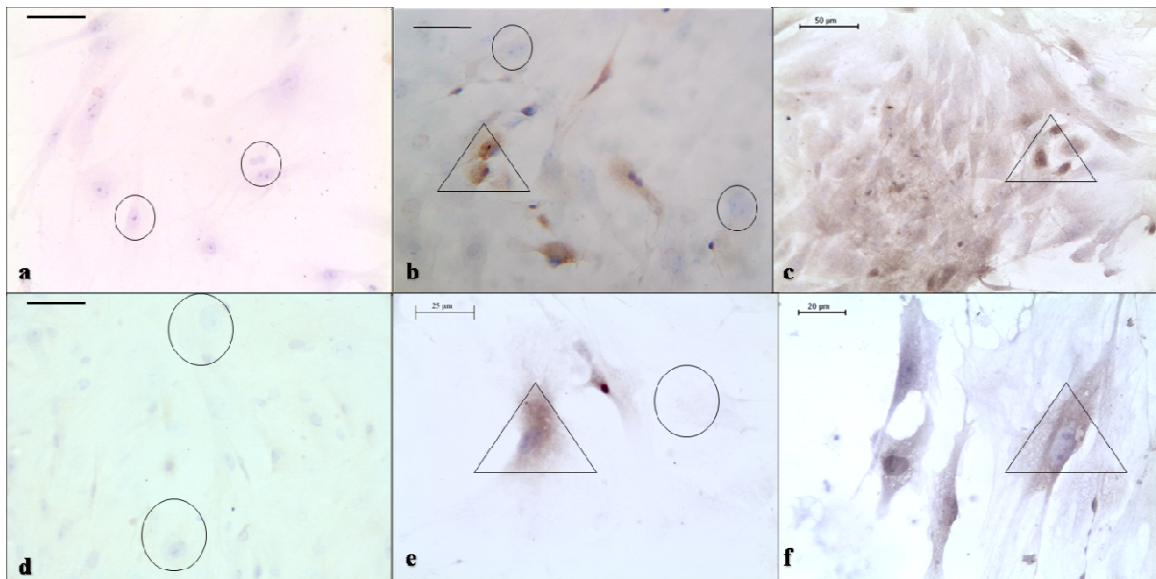
ekspimiraju i VCAM-1 (Slike 4.7.c i f), dok se imunoekspresija proteina CD14 ne uočava (Slike 4.7.a i d).



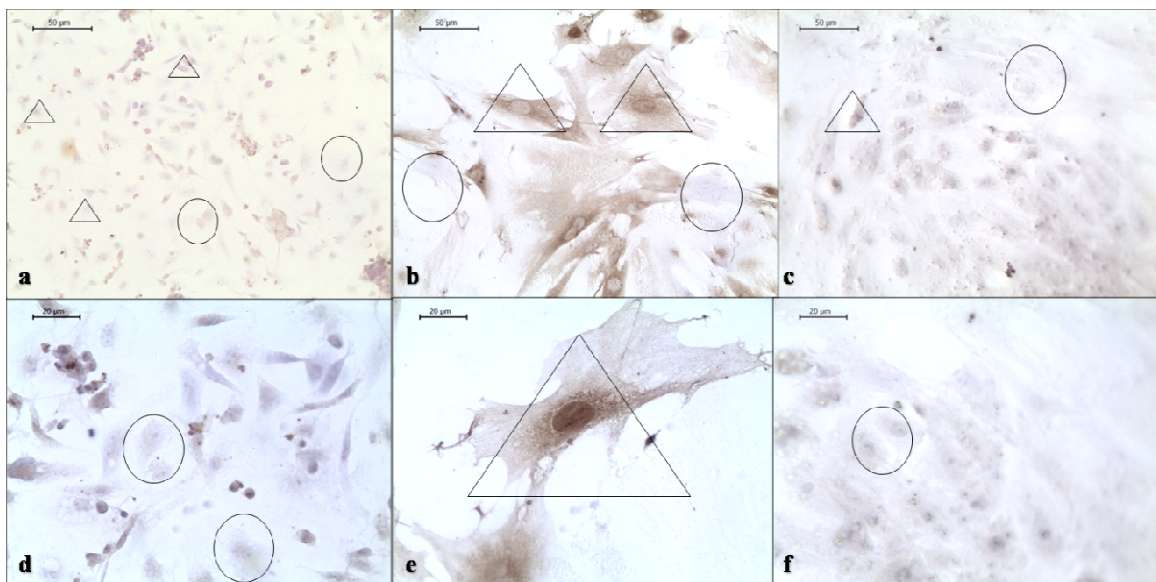
Slika 4.4. Imunoekspresija CD29 i CD44 u ćelijama sveže izolovane SVF: a) negativna kontrola, 200×; b) CD29, 200×; c) CD44, 200×; d) negativna kontrola, 400×; e) CD29, 400×; f) CD44, 400×. Trougao - pozitivne ćelije, krug - negativne ćelije. Među adheriranim ćelijama iz SVF dominiraju one koje ekspimiraju pozitivne markere ADSC, CD29 i CD44.



Slika 4.5. Imunoekspresija CD14, VEGFR-a 2 i VCAM-a 1 u sveže izolovanoj SVF: a) CD14, 200×; b) VEGFR-2, 200×; c) VCAM-1, 200×; d) CD14, 400×; e) VEGFR-2, 400×; f) VCAM-1, 400×. Trougao - pozitivne ćelije, krug - negativne ćelije. Značajna imunoekspresija endotelskih markera VEGFR-a 2 i VCAM-a 1 u ćelijama sveže izolovane SVF.



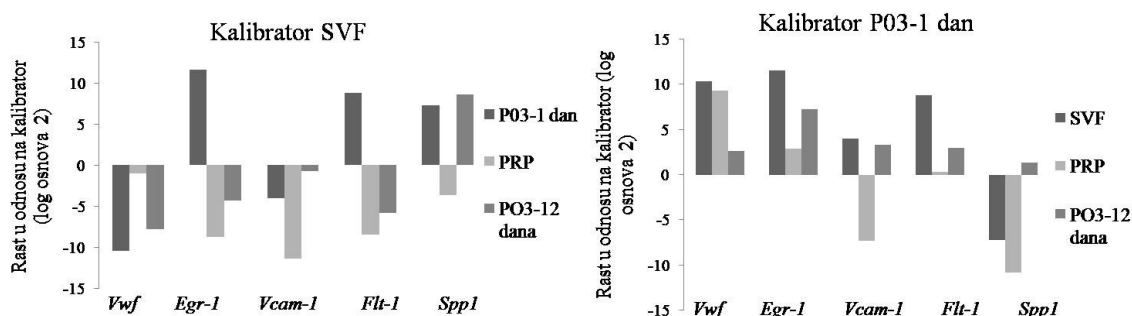
Slika 4.6. Imunoekspresija CD29 i CD44 u ADSC 24 sata nakon trećeg pasaža: a) negativna kontrola, 200×; b) CD29, 200×; c) CD44, 200×; d) negativna kontrola, 400×; e) CD29 a, 400×; f) CD44, 400×. Trougao - pozitivne ćelije, krug - negativne ćelije. Jedan dan nakon trećeg pasaža, ADSC uglavnom ekspimiraju CD29 i CD44.



Slika 4.7. Imunoekspresija CD14, VEGFR-a 2 i VCAM-a 1 u ADSC 24 sata nakon trećeg pasaža: a) CD14, 200×; b) VEGFR-2, 200×; c) VCAM-1, 200×; d) CD14, 400×; e) VEGFR-2, 400×; f) VCAM-1, 400×. Trougao - pozitivne ćelije, krug - negativne ćelije. Jedan dan nakon trećeg pasaža, ADSC uglavnom pozitivne na VEGFR-2 pojedine ekspimiraju i VCAM-1, a imunoekspresija CD14 se ne uočava.

4.1.3. qRT-PCR analiza ekspresije gena markera endoteljskih ćelija i *Spp-a 1* u sveže izolovanim ćelijama stromalne vaskularne frakcije i kultura ADSC

Ćelije SVF imaju višu ekspresiju *Vwf*-a i *Vcam*-a 1 u odnosu na PRP, ćelije koje su do prvog dana nakon trećeg pasaža rasle u DMEM-u i ćelije koje su ekspandirane 12 dana nakon trećeg pasaža u DMEM-u (Grafikoni 4.1.a i b). Ekspresija *Egr*-a 1 i *Flt*-a 1 je najviša u ćelijama koje su jedan dan nakon trećeg pasaža rasle u DMEM-u, dok je najviša ekspresija *Spp*-a 1 u ćelijama koje su ekspandirane 12 dana nakon trećeg pasaža u DMEM-u (Grafikoni 4.1.a i b).



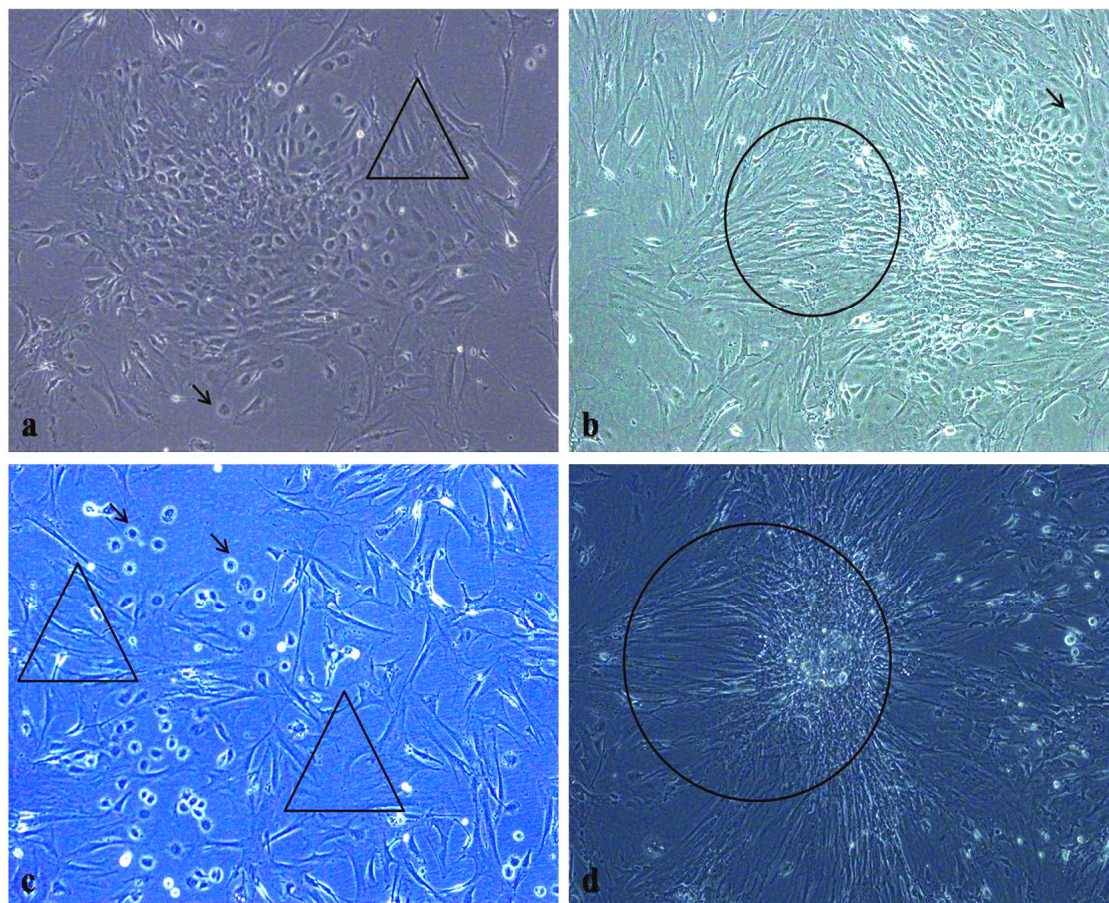
Grafikon 4.1. Dinamika relativne ekspresije gena markera endoteljskih ćelija i gena *Spp1* u kalibratorima korišćenim za qRT-PCR analizu. SVF - stromalna vaskularna frakcija, P03-1 dan - ćelije koje su 1 dan nakon trećeg pasaža rasle u DMEM-u, PRP - plazma obogaćena trombocitima, P03-12 dana - ćelije koje su 12 dana nakon trećeg pasaža rasle u DMEM-u.

4.1.4. Morfološka analiza kultura ADSC indukovanih ka endoteljskim ćelijama

Tri dana nakon trećeg pasaža, neindukovane ADSC se nasumično raspoređuju i nalik su na fibroblaste ili epitelne ćelije (Slika 4.8.a). Ćelije podvrgnute endoteljskoj diferencijaciji se organizuju u grupacije, a na pojedinim mestima se između ćelija koje pripadaju susednim grupacijama zapaža formiranje anastomoza (Slika 4.8.b).

Neindukovane ADSC nakon sedam dana rasta u DMEM-u su uglavnom pojedinačne, bez određenog, organizovanog rasporeda (Slika 4.8.c). Na pojedinim mestima ćelije su organizovane u snopove, a uočavaju i pojedinačne ćelije nalik na epitelne (Slika 4.8.c). Sedam dana od indukcije endoteljske diferencijacije, usled anastomoziranja ćelija iz susednih grupacija, kulture indukovanih ADSC poprimaju

izgled mreže kapilara (Slika 4.8.d). Čelije koje tu mrežu sačinjavaju rastu u jednom sloju i imaju morfologiju nalik na oblutke kaldrme (*cobblestone*, engl.).

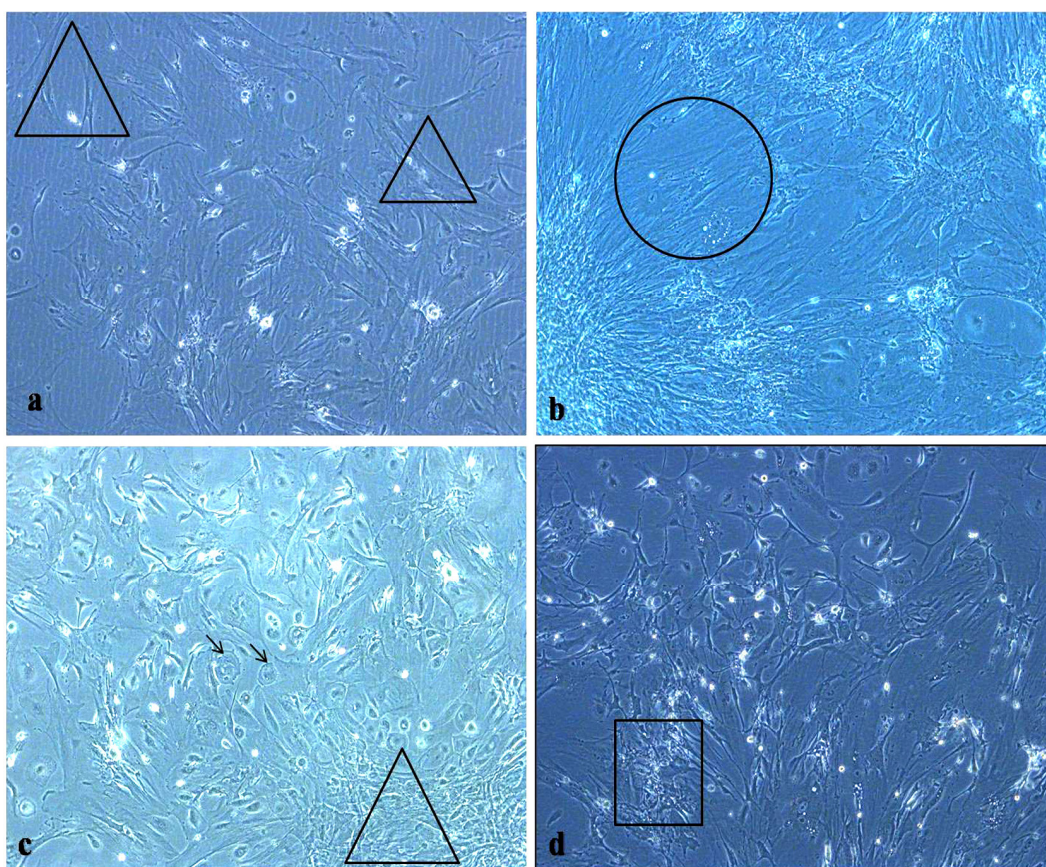


Slika 4.8. Endotelska diferencijacija ADSC, 3. i 7. dan, fazni kontrast, 100×: a) ADSC u standardnom medijumu, 3. dan nakon trećeg pasaža (kontrola); b) ADSC u medijumu za endotelsku diferencijaciju, 3. dan indukcije endotelske diferencijacije; c) ADSC u standardnom medijumu 7. dan nakon trećeg pasaža (kontrola); d) ADSC u medijumu za endotelsku diferencijaciju, 7. dan indukcije endotelske diferencijacije. Trougao - ćelije koje liče na fibroblaste, strelica - pojedinačne ćelije koje liče na epitelne, krug - anastomoziranje ćelija koje liče na endotelske iz susednih grupacija. ADSC podvrgnute endotelskoj diferencijaciji se 3. dana od indukcije diferencijacije organizuju u grupacije, a 7. dana ćelije iz susednih grupacija anastomoziraju, dok neindukovane ADSC u oba termina zadržavaju morfologiju nalik fibroblastima.

Dvanaest dana nakon trećeg pasaža, neindukovane ADSC imaju izgled fibroblasta (Slika 4.9.a). Čelije koje dvanaest dana rastu u medijumu za endotelsku diferencijaciju su mehurasto proširene u središnjem delu, a veze između ćelija iz susednih grupacija su još izraženije nego u prethodnoj tački posmatranja. Tako

povezane ćelije formiraju mrežu čija se okca jasno uočavaju i podsećaju na lumen krvnih sudova, što kulturi ADSC indukovanih ka endotelskim daje izgled razgranate kapilarne mreže (Slika 4.9.b).

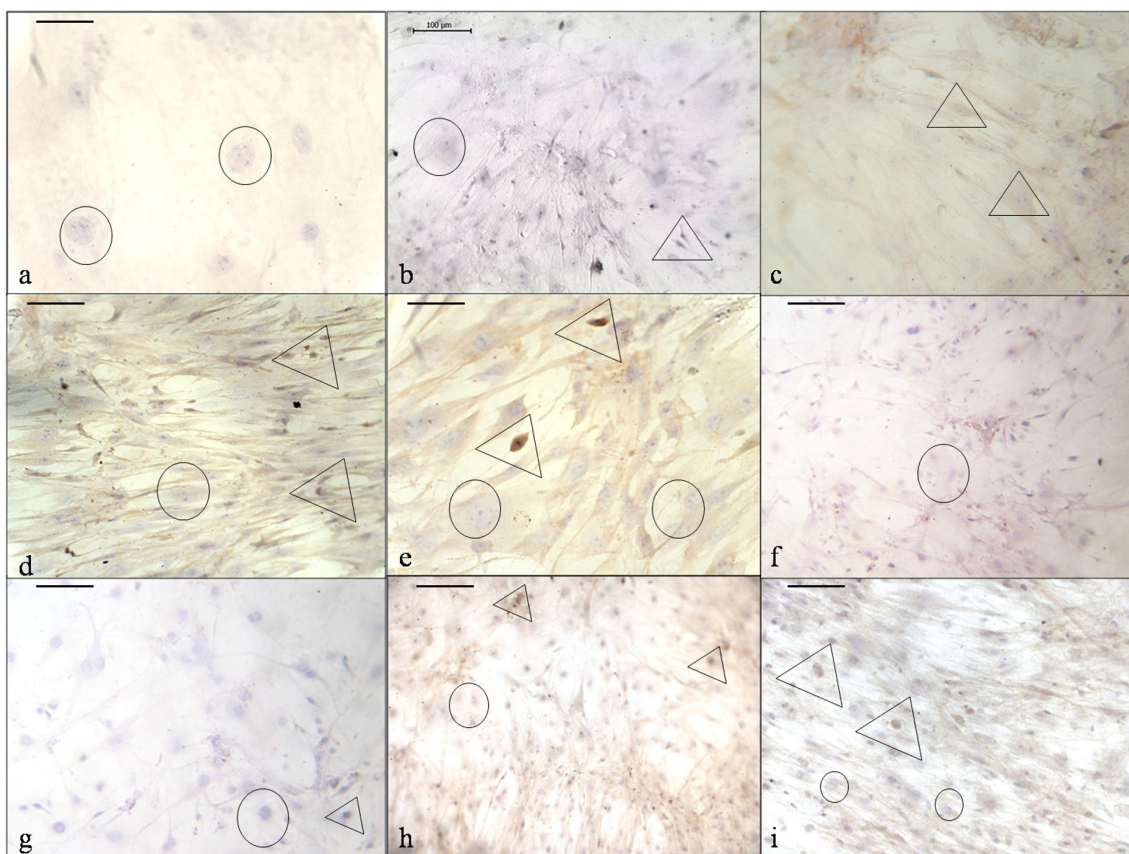
Posle petnaest dana od trećeg pasaža, ADSC u standardnom medijumu se i dalje intenzivno dele, a promene morfologije nema (Slika 4.9.c). U medijumu za endotelsku diferencijaciju, grupacije vijabilnih ćelija se dezintegrišu, te se više ne uočava mreža nalik kapilarnoj (Slika 4.9.d).



Slika 4.9. Endotelska diferencijacija ADSC, 12. i 15. dan, fazni kontrast, 100×: a) ADSC u standardnom medijumu, 12. dan nakon trećeg pasaža (kontrola); b) ADSC u medijumu za endotelsku diferencijaciju, 12. dan indukcije endotelske diferencijacije; c) ADSC u standardnom medijumu 15. dan nakon trećeg pasaža (kontrola); d) ADSC u medijumu za endotelsku diferencijaciju, 15. dan indukcije endotelske diferencijacije. Trougao - ćelije koje liče na fibroblaste, strelica - pojedinačne ćelije koje liče na epitelne, krug - anastomoziranje ćelija koje liče na endotelske iz susednih grupacija, pravougaonik - dezintegracija mreže nalik kapilarnoj. Izgled kapilarne mreže u ADSC indukovanim u endotelske 12. dana od indukcije diferencijacije i dezintegracija mreže 15. dana nakon indukcije, dok neindukovane ADSC u oba termina zadržaju morfologiju nalik fibroblastima.

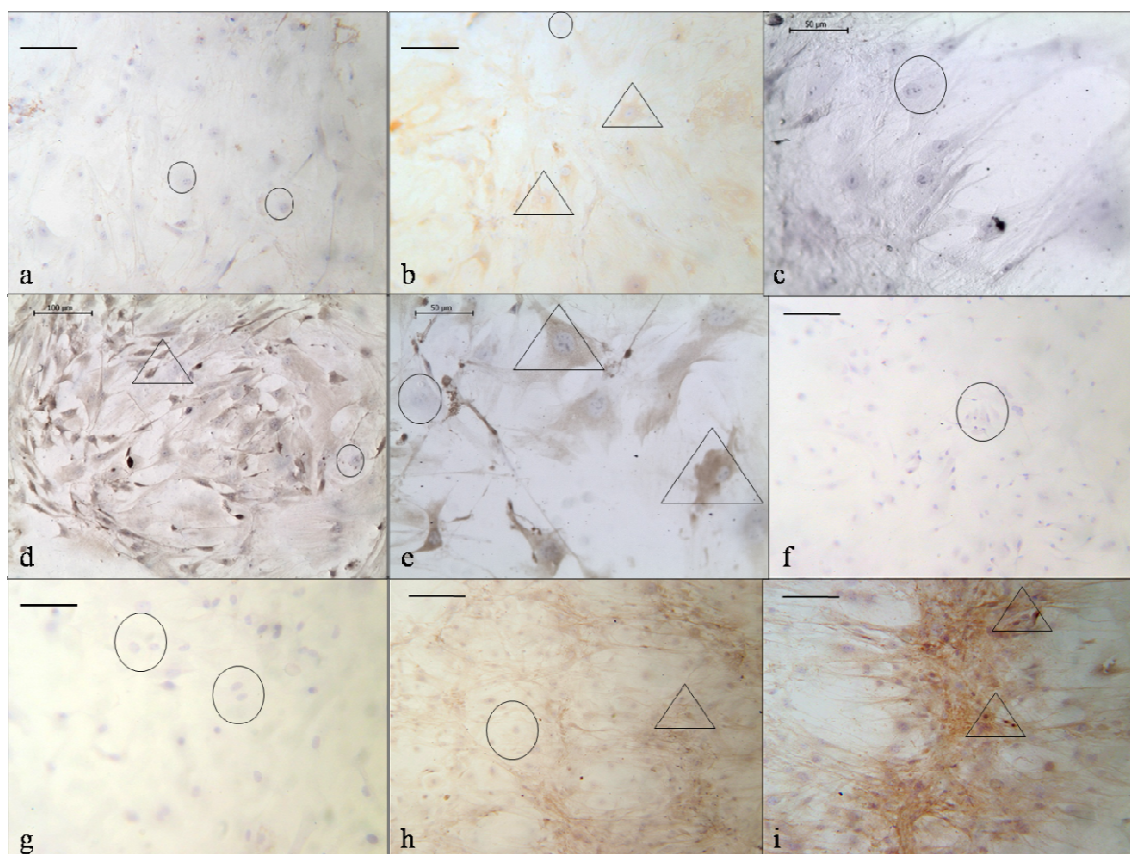
4.1.5. Imunocitohemijska analiza kultura ADSC indukovanih ka endotelskim ćelijama

Sedam dana nakon trećeg pasaža, neindukovane ADSC su uglavnom VCAM-1 negativne (Slike 4.10.b i c).



Slika 4.10. Imunoekspresija VEGFR-a 2 i VCAM-a 1 u ADSC koje su rasle 7 dana u standardnom ili 7 dana u medijumu za endotelsku diferencijaciju: a) negativna kontrola, 200×; b) ADSC u standardnom medijumu, VCAM-1, 100×; c) ADSC u standardnom medijumu, VCAM-1, 200×; d) ADSC u medijumu za endotelsku diferencijaciju, VCAM-1, 100×; e) ADSC u medijumu za endotelsku diferencijaciju, VCAM-1, 200×; f) ADSC u standardnom medijumu, VEGFR-2, 100×; g) ADSC u standardnom medijumu, VEGFR-2, 200×; h) ADSC u medijumu za endotelsku diferencijaciju, VEGFR-2, 100×; i) ADSC u medijumu za endotelsku diferencijaciju, VEGFR-2, 200×. Trougao - pozitivne ćelije, krug - negativne ćelije. ADSC indukovane u endotelske ćelije eksprimiraju VEGFR-2 i VCAM-1, a neindukovane ADSC su mahom VEGFR-2 i VCAM-1 negativne.

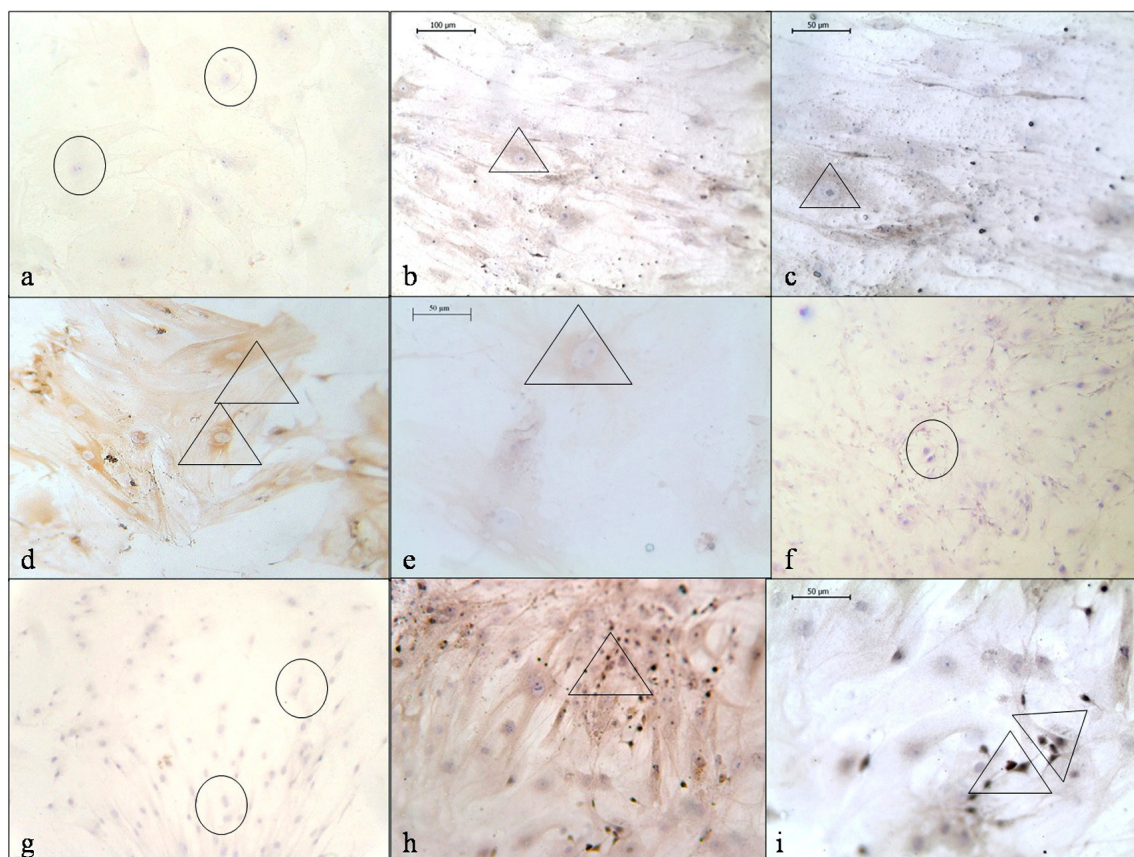
ADSC koje su podvrgnute endotelnoj diferencijaciji sedam dana nakon indukcije diferencijacije poseduju imunoekspresiju VCAM-a 1 (Slike 4.10.d i e). U istoj tački posmatranja, imunoekspresija VEGFR-a 2 je slabo izražena u neindukovanim ADSC (Slike 4.10.f i g), a u ADSC podvrgnutim endotelnoj diferencijaciji je blago intenzivnija (Slike 4.10.h i i). Akumulacija braon boje uočava se oko jedara ćelija i kao i u ćelijskoj membrani VCAM-1 i VEGFR-2 pozitivnih ćelija (Slike 4.10.b, d, e, g, h i i).



Slika 4.11. Imunoekspresija VEGFR-a 2 i VCAM-a 1 u ADSC koje su rasle 12 dana u standardnom ili 12 dana u medijumu za endotelnu diferencijaciju: a) negativna kontrola, 200 \times ; b) ADSC u standardnom medijumu, VCAM-1, 100 \times ; c) ADSC u standardnom medijumu, VCAM-1, 200 \times ; d) ADSC u medijumu za endotelnu diferencijaciju, VCAM-1, 100 \times ; e) ADSC u medijumu za endotelnu diferencijaciju, VCAM-1, 200 \times ; f) ADSC u standardnom medijumu, VEGFR-2, 100 \times ; g) ADSC u standardnom medijumu, VEGFR-2, 200 \times ; h) ADSC u medijumu za endotelnu diferencijaciju, VEGFR-2, 100 \times ; i) ADSC u medijumu za endotelnu diferencijaciju, VEGFR-2, 200 \times . Trougao - pozitivne ćelije, krug - negativne ćelije. Jaka imunoekspresija VEGFR-a 2 i VCAM-a 1 u indukovanim ADSC, odsustvo imunoekspresije VEGFR-a 2 i blaga pozitivnost na VCAM-1 u neindukovanim ADSC.

Dvanaest dana posle trećeg pasaža, imunoekspresija VCAM-a 1 je intenzivnija i u neindukovanim (Slike 4.11.b i c) i u indukovanim (Slike 4.11.d i e) ADSC nego u

prethodnoj tački posmatranja. U standardnom medijumu nema ćelija pozitivnih na imunomarker VEGFR-2 (Slike 4.11.f i g). Ćelije u kulturama u kojima je indukovana endotelska diferencijacija imaju jako izraženu imunoekspresiju VEGFR-a 2. Membrane indukovanih ćelija su obojene tamno braon, a granule braon boje vide se i u vanćelijskom matriksu kao i oko jedara ćelija u regionu koji odgovara granulisanom endoplazminom retikulumu (Slike 4.11.h i i).

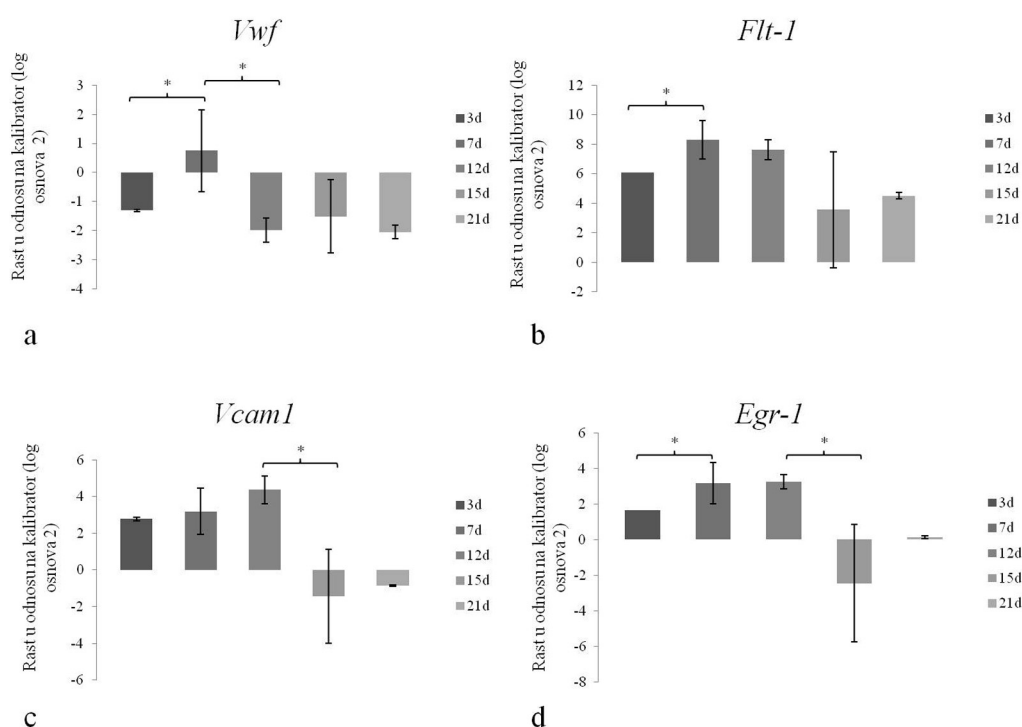


Slika 4.12. Imunoekspresija VEGFR-a 2 i VCAM-a 1 u ADSC koje su rasle 15 dana u standardnom ili 15 dana u medijumu za endotelsku diferencijaciju: a) negativna kontrola, 200 \times ; b) ADSC u standardnom medijumu, VCAM-1, 100 \times ; c) ADSC u standardnom medijumu, VCAM-1, 200 \times ; d) ADSC u medijumu za endotelsku diferencijaciju, VCAM-1, 100 \times ; e) ADSC u medijumu za endotelsku diferencijaciju, VCAM-1, 200 \times ; f) ADSC u medijumu za endotelsku diferencijaciju, VEGFR-2, 100 \times ; g) ADSC u medijumu za endotelsku diferencijaciju, VEGFR-2, 200 \times ; h) ADSC u medijumu za endotelsku diferencijaciju, VEGFR-2, 100 \times ; i) ADSC u medijumu za endotelsku diferencijaciju, VEGFR-2, 200 \times . Trougao - pozitivne ćelije, krug - negativne ćelije. Umerena imunoekspresija VEGFR-a 2 i VCAM-a 1 u ADSC indukovanim u endotelske ćelije, a slaba u neindukovanim ADSC.

Petnaestog dana nakon trećeg pasaža, imunoekspresija VCAM-a 1 (Slike 4.12.b i c) i VEGFR-a 2 (Slike 4.12.f i g) u neindukovanim ADSC je nepromenjena u odnosu na dvanaesti dan kultivacije u DMEM-u. U indukovanim ADSC je VCAM-1 slabije eksprimiran nego nakon dvanaest dana od indukcije endotelne diferencijacije (Slike 4.12.d i e). Imunoekspresija VEGFR-a 2 u indukovanim ADSC je takođe blago smanjena u odnosu na prethodnu tačku posmatranja (Slike 4.12.h i i).

4.1.6. qRT-PCR analiza ekspresije gena markera endotelne ćelije u kulturama ADSC indukovanim ka endotelne ćelijama u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža

Trećeg dana endotelne diferencijacije ekspresija *Vwf*-a (Grafikon 4.2.a) je negativno, a ekspresija *Flt-1* (Grafikon 4.2.b), *Vcam-1* (Grafikon 4.2.c) i *Egr-1* (Grafikon 4.2.d) su pozitivno regulisane u ADSC indukovanim u endotelne ćelije ćelijama u odnosu na ADSC iz trećeg pasaža.



Grafikon 4.2. Dinamika relativne ekspresije gena markera endotelne ćelije u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža: a) *Vwf*; b) *Flt-1*; c) *Vcam-1*; d) *Egr-1*. “*” značajna razlika za $p < 0,05$, d - dan.

Ekspresija *Vwf* je pozitivno regulisana sedmog dana endotelske diferencijacije i značajno viša ($p < 0,05$) u odnosu na treći dan endotelske diferencijacije (Grafikon 4.2.a). U naredne tri tačke posmatranja, ekspresija *Vwf* opada i negativno je regulisana (Grafikon 4.2.a). Smanjenje ekspresije ovog gena je značajno ($p < 0,05$) dvanaestog u odnosu na sedmi dan endotelske diferencijacije (Grafikon 4.2.a).

Ekspresija *Flt-a 1* (Grafikon 4.2.b) raste sedmog u odnosu na treći dan endotelske diferencijacije što je značajno ($p < 0,05$). Sedmog dana diferencijacije, ekspresija *Flt-a 1* se smanjuje, ali je i dalje pozitivno regulisana u svim tačkama posmatranja. Blag porast u ekspresiji *Flt-a 1* postoji 21. dana u odnosu na 15. dan od početka indukcije endotelske diferencijacije (Grafikon 4.2.b).

Gen *Vcam-1* je pozitivno regulisan trećeg, sedmog i dvanaestog dana endotelske diferencijacije, a ekspresija ovog gena je značajno niža ($p < 0,05$) petnaestog u odnosu na dvanaesti dan od početka endotelske diferencijacije (Grafikon 4.2.c). Dvadeset prvog dana diferencijacije, ekspresija *Vcam-a 1* ostaje negativno regulisana (Grafikon 4.2.c).

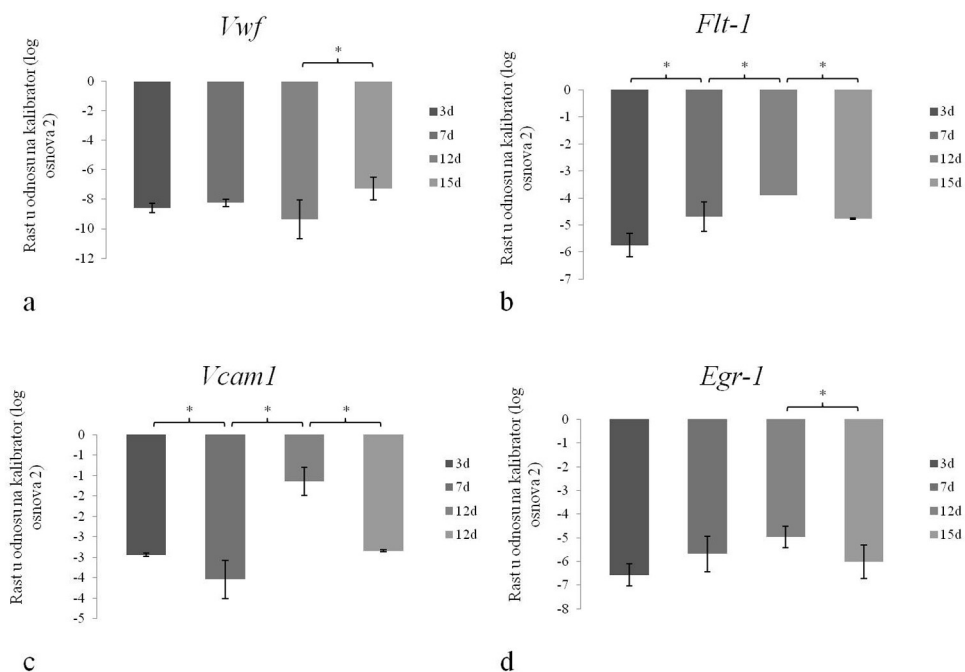
Ekspresija *Egr-a 1* je pozitivno regulisana u prve tri tačke posmatranja, negativna petnaestog dana od indukcije endotelske diferencijacije, a dvadeset prvog dana diferencijacije blago raste u odnosu na petnaesti dan (Grafikon 4.2.d). Sedmog dana endotelske diferencijacije je značajno porasla ($p < 0,05$) ekspresija *Egr-a 1* u odnosu na treći dan. Pad ekspresije ovog gena petnaestog dana diferencijacije bio je statistički značajan u odnosu na dvanaesti dan (Grafikon 4.2.d).

4.1.7. qRT-PCR analiza ekspresije gena markera endotelskih ćelija u kulturama ADSC indukovanim ka endotelskim ćelijama u odnosu na stromalnu vaskularnu frakciju

Ekspresija svih gena markera endotelskih ćelija je negativna u odnosu na ćelije iz sveže izolovane SVF (Grafikon 4.3.), u svim tačkama posmatranja.

Ekspresija *Vwf-a* je najviša petnaestog dana od indukcije endotelske diferencijacije (Grafikon 4.3.a), dok je ekspresija *Flt-a 1* (Grafikon 4.3.b), *Vcam-a 1* (Grafikon 4.3.c) i *Egr-a 1* (Grafikon 4.3.d) najviša dvanaestog dana od podvrgavanja endotelskoj diferencijaciji. Rast ekspresije *Vwf-a* (Grafikon 4.3.a) i *Egr-a 1* (Grafikon 4.3.d) je značajan ($p < 0,05$) petnaestog u odnosu na dvanaesti dan endotelske

diferencijacije. Dinamika ekspresije *Flt-a 1* (Grafikon 4.3.b) i *Vcam-a 1* (Grafikon 4.3.c), je takva da ($p < 0,05$) značajne razlike postoje između svake dve susedne tačke posmatranja.

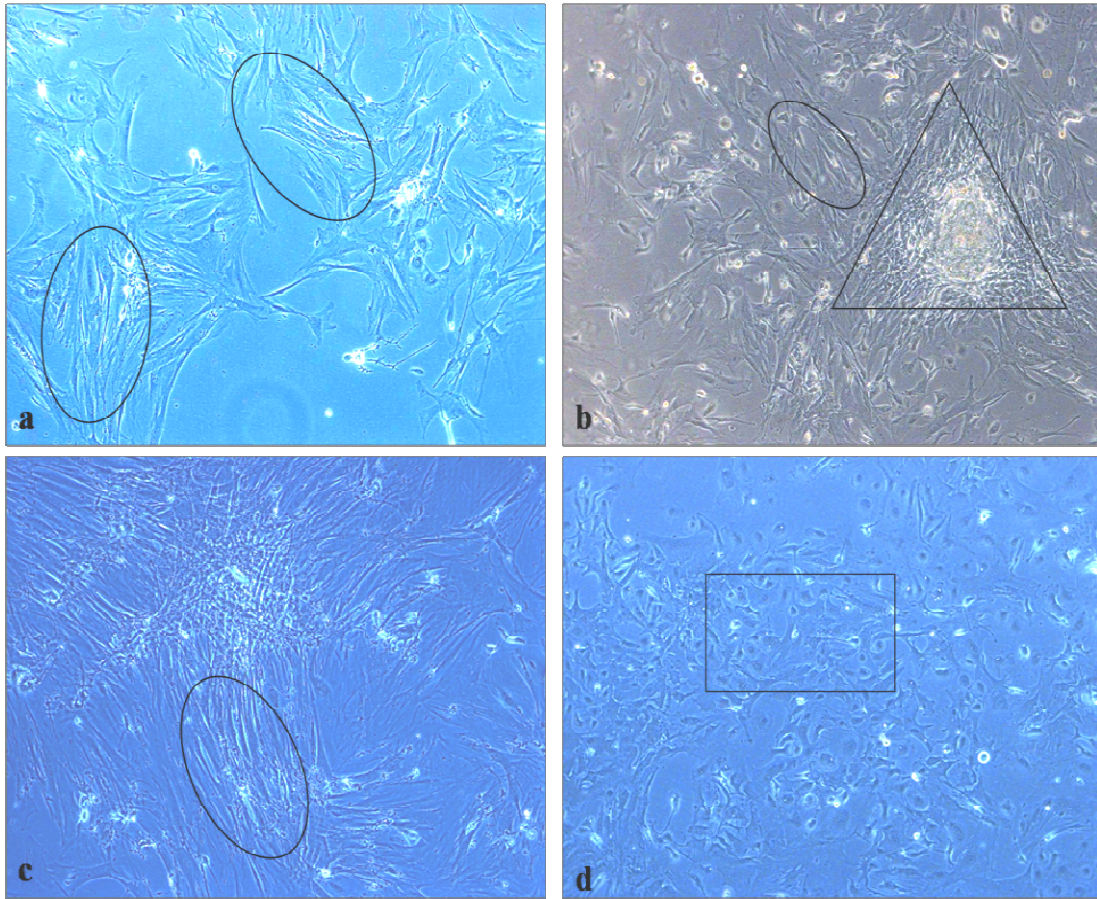


Grafikon 4.3. Dinamika relativne ekspresije gena markera endotelskih ćelija u odnosu na SVF: a) *Vwf*; b) *Flt-1*; c) *Vcam-1*; d) *Egr-1*. “*” značajna razlika za $p < 0,05$, d - dan.

4.1.8. Morfološka analiza kultura ADSC indukovanih ka osteogenim ćelijama

Nakon tri dana od trećeg pasaža, nema velikih razlika u morfologiji ADSC koje su rasle u standardnom medijumu i onih koje su rasle u medijumu induktivnom za osteogenu diferencijaciju (Slike 4.13.a i b). U obe kulture, ADSC liče na fibroblaste, ali u standardnom medijumu rastu bez uređenog rasporeda (Slika 4.13.a), dok deo indukovanih ADSC obrazuje grupacije (Slika 4.13.b).

Sedam dana od indukcije osteogene diferencijacije, uočavaju se ćelije koje liče na osteoblaste u medijumu za osteogenu diferencijaciju (Slika 4.13.d), dok ADSC u standardnom medijumu zadržavaju izgled koji odgovara fibroblastima i rastu organizovane u snopove (Slika 4.13.c).



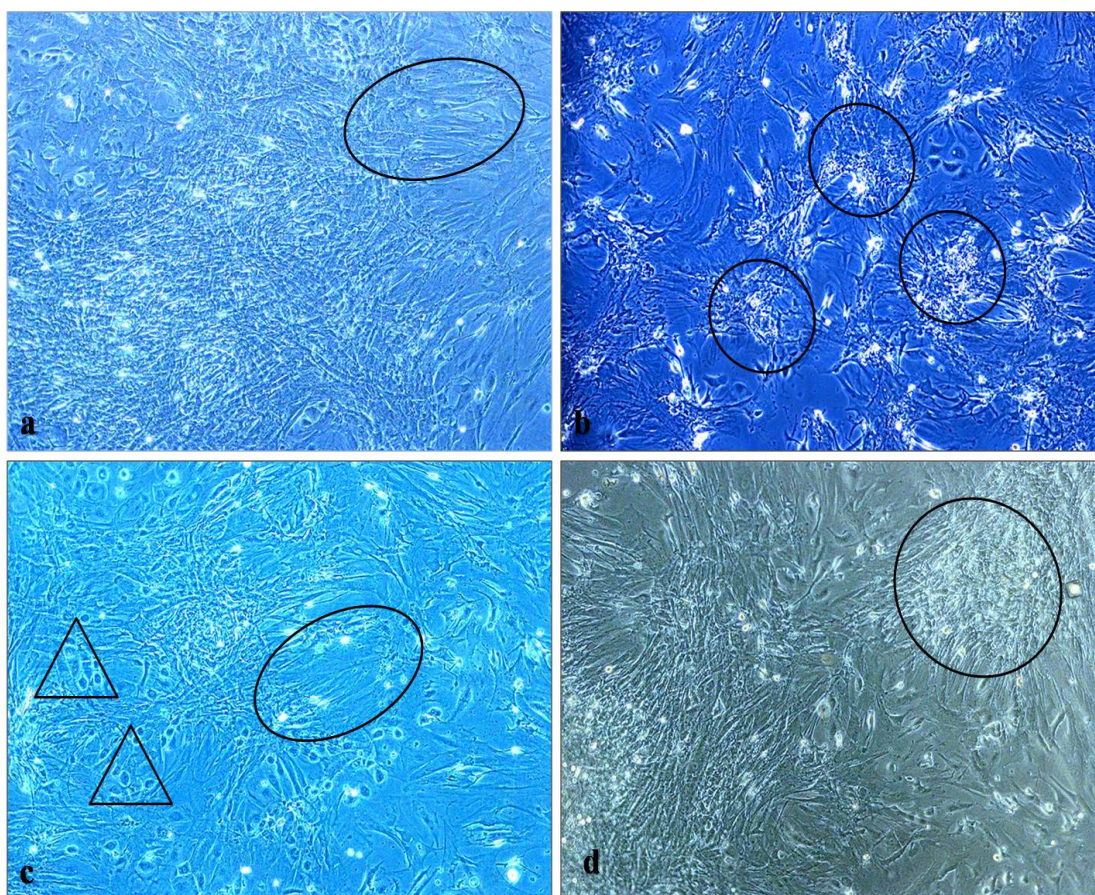
Slika 4.13. Osteogena diferencijacija ADSC, 3. i 7. dan, fazni kontrast, 100×: a) ADSC u standardnom medijumu 3. dan nakon trećeg pasaža (kontrola); b) ADSC u medijumu za osteogenu diferencijaciju 3. dan indukcije osteogene diferencijacije; c) ADSC u standardnom medijumu 7. dan nakon trećeg pasaža (kontrola); d) ADSC u medijumu za osteogenu diferencijaciju, 7. dan indukcije osteogene diferencijacije. Elipsa - snopovi ćelija koje liče na fibroblaste, pravougaonik - ćelije koje liče na osteoblaste, trougao – grupacija ćelija koje liče na fibroblaste. Trećeg dana od početka indukcije osteogene diferencijacije ADSC obrazuju grupacije, a sedmog dana od početka indukcije se mogu zapaziti ćelije koje liče na osteoblaste.

Dvanaestog dana od indukcije diferencijacije ADSC ka osteogenim ćelijama, dno flaska prekrivaju grupisane, koncentrično raspoređene ćelije koje rastu u jednom sloju i imaju organizaciju koja podseća na organizaciju osteona (Slika 4.14.b). Za razliku od njih, ćelije u standardnom medijumu i dalje liče na fibroblaste, i rastu grupisane u snopove (Slika 4.14.a).

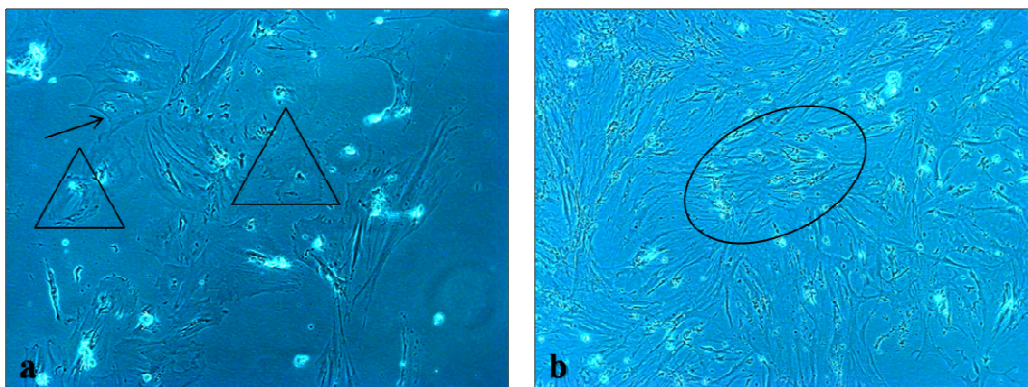
Posle petnaest dana od trećeg pasaža, neke od ćelija koje liče na fibroblaste i rastu u DMEM-u formiraju lamelipodične nastavke, a uočavaju se i ćelije epitelnog tipa (Slika 4.14.c). ADSC u medijumu za osteogenu diferencijaciju i dalje rastu

organizovane u grupacije. Čelije koje obrazuju ove grupacije nalikuju osteoblastima, rastu u više slojeva i krupnije su nego nedelju dana ranije (Slika 4.14.d).

ADSC koje rastu u DMEM-u posle tri nedelje ulaze u apoptozu, a vijabilne ćelije imaju krpast izgled (Slika 4.15.a). Među ADSC diferenciranim u osteogene ćelije ima onih koje su ušle u apoptozu, a grupacije ćelija se više ne uočavaju (Slika 4.15.b).



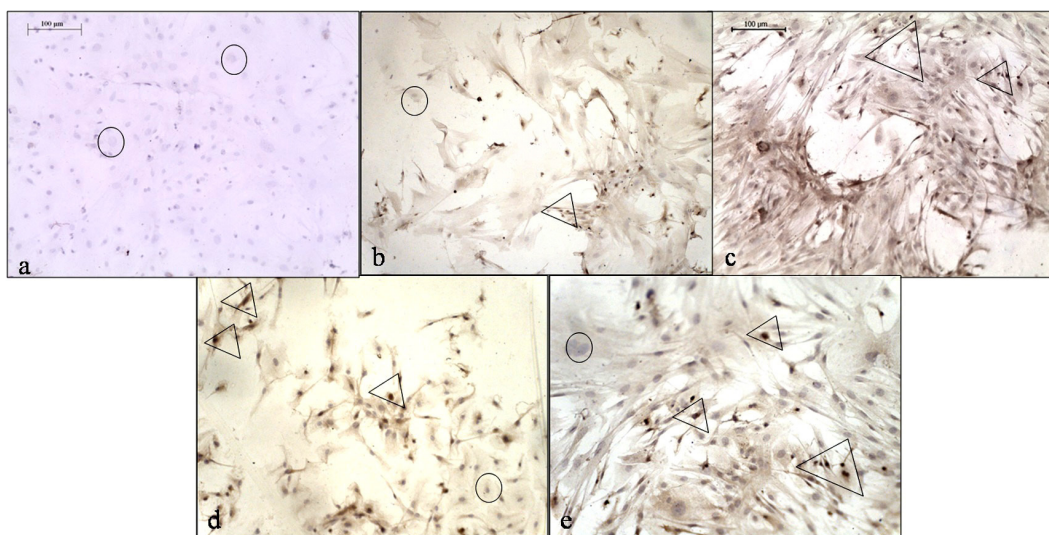
Slika 4.14. Osteogena diferencijacija ADSC, 12. i 15. dan, fazni kontrast, 100×: a) ADSC u standardnom medijumu 12. dan nakon trećeg pasaža (kontrola); b) ADSC u medijumu za osteogenu diferencijaciju 12. dan indukcije osteogene diferencijacije; c) ADSC u standardnom medijumu 15. dan nakon trećeg pasaža (kontrola); d) ADSC u medijumu za osteogenu diferencijaciju, 15. dan indukcije osteogene diferencijacije. Elipsa - snopovi ćelija koje liče na fibroblaste, pravougaonik - ćelije koje liče na osteoblaste, krug - ćelije koje liče na osteoblaste, organizovane u grupacije, elipsa - ćelije koje liče na fibroblaste, trougao - pojedinačne ćelije koje liče na epitelne. Grupisane, koncentrično raspoređene ćelije rastu u jednom sloju i imaju organizaciju koja podseća na organizaciju osteona 12. dana od indukcije osteogene diferencijacije, a 15. dana diferencijacije ćelije koje obrazuju ove grupacije liče na osteoblaste i rastu u više slojeva.



Slika 4.15. Osteogena diferencijacija ADSC, 21. dan, fazni kontrast, 100×: a) ADSC u standardnom medijumu 21. dan nakon trećeg pasaža (kontrola); b) ADSC u medijumu za osteogenu diferencijaciju 21. dan indukcije osteogene diferencijacije. Trougao - krpaste ćelije, strelica - lamelipodični nastavci, elipsa - raspadanje grupacija ćelija. Indukovane ćelije ulaze u apoptozu i grupacije se više ne uočavaju.

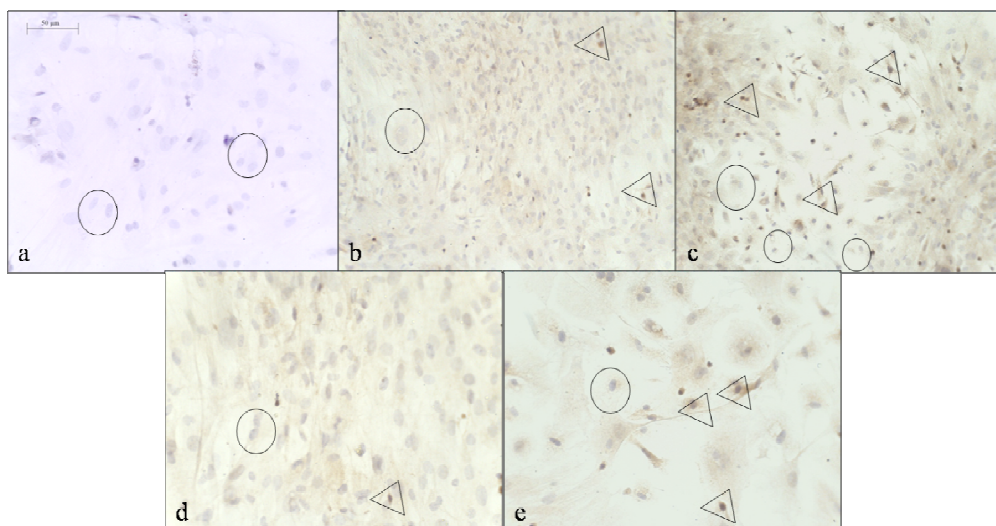
4.1.9. Imunocitohemijska analiza kultura ADSC indukovanih ka osteogenim ćelijama

ADSC podvrgnute osteogenoj diferencijaciji nakon sedam dana od indukcije su jako pozitivne na osteokalcin (Slike 4.16.c i e). Imunoekspresija osteokalcina u kulturama koje su sedam dana rasle u DMEM-u je manja (Slike 4.16.b i d), a lažno pozitivnog bojenja nema (Slika 4.16.a).

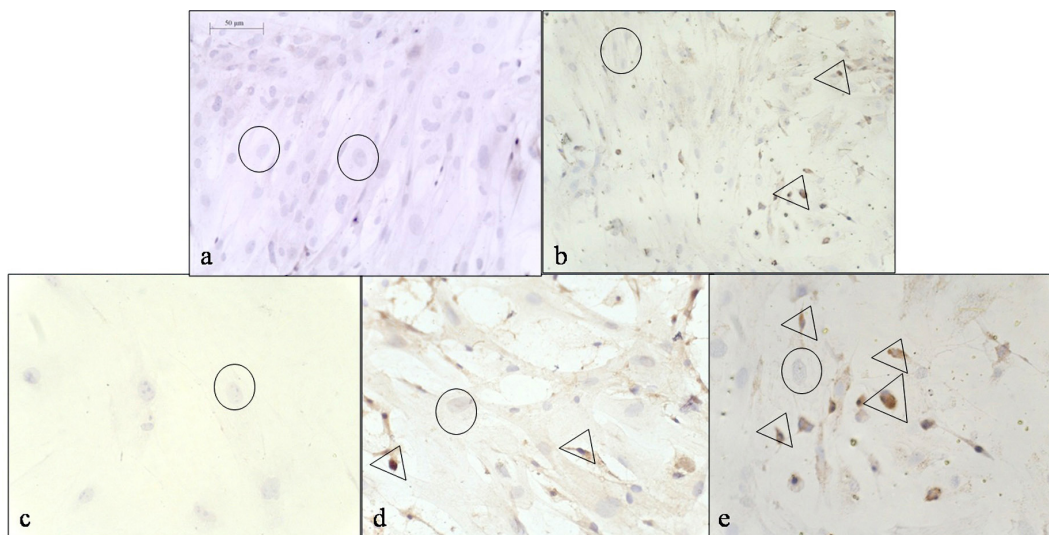


Slika 4.16. Imunoekspresija osteokalcina u ADSC koje su rasle 7 dana u standardnom ili 7 dana medijumu za osteogenu diferencijaciju: a) negativna kontrola, 100×; b) ADSC u standardnom medijumu, 100×; c) ADSC u medijumu za osteogenu diferencijaciju, 100×; d) ADSC u standardnom medijumu, 200×; e) ADSC u medijumu za osteogenu diferencijaciju, 200×. Trougao - pozitivne ćelije, krug - negativne ćelije. Uočava se umerena imunoekspresija osteokalcina u ADSC inukovanim u osteogene ćelije i slaba u neindukovanim ADSC.

Dvanaest dana od trećeg pasaža, imunoekspresija osteokalcina je približno jednaka u indukovanim i neindukovanim ADSC (Slika 4.17.), a nakon petnaest dana od trećeg pasaža je intenzivnija u ADSC indukovanim ka osteogenim u odnosu na onu u neindukovanim ADSC (Slika 4.18.).



Slika 4.17. Imunoekspresija osteokalcina u ADSC koje su rasle 12 dana u standardnom ili 12 dana u medijumu za osteogenu diferencijaciju: a) negativna kontrola, 200 \times ; b) ADSC u standardnom medijumu, 100 \times ; c) ADSC u medijumu za osteogenu diferencijaciju, 100 \times ; d) ADSC u standardnom medijumu, 200 \times ; e) ADSC u medijumu za osteogenu diferencijaciju, 200 \times . Trougao - pozitivne ćelije, krug - negativne ćelije. Imunoekspresija osteokalcina približno jednaka u indukovanim i neindukovanim ADSC.



Slika 4.18. Imunoekspresija osteokalcina u ADSC koje su rasle 15 dana u standardnom ili 15 dana u medijumu za osteogenu diferencijaciju: a) ADSC u standardnom medijumu, 200 \times ; b) ADSC u medijumu za osteogenu diferencijaciju, 200 \times ; c) Negativna kontrola, 400 \times ; d) ADSC u standardnom medijumu, 400 \times ; e) ADSC u medijumu za osteogenu diferencijaciju, 400 \times . Trougao - pozitivne ćelije, krug - negativne ćelije. Jaća imunoekspresija osteokalcina u ADSC indukovanim u osteogene ćelije nego u neindukovanim ADSC.

4.1.10. qRT-PCR analiza ekspresije gena markera osteogenih ćelija u ADSC indukovanim ka osteogenim ćelijama u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža

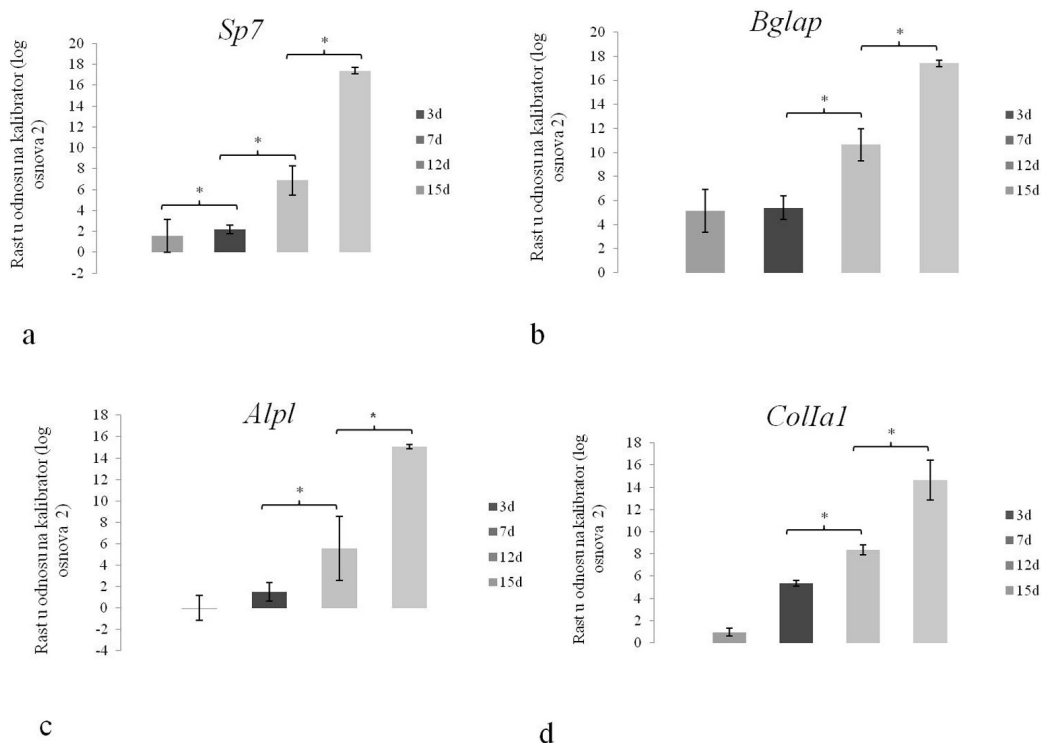
Ekspresija gena markera osteogenih ćelija (Grafikon 4.4.) je pozitivno regulisana u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža i postepeno raste od prve ka poslednjoj tački posmatranja određenoj za analizu. (Grafikon 4.4.a).

U ekspresiji gena za transkripcioni faktor osteriks, *Sp7*, značajne ($p < 0,05$) razlike postoje između svake dve susedne tačke posmatranja (Grafikon 4.4.a).

Značajne razlike ($p < 0,05$) u ekspresiji *Bglap*-a postoje između sedmog i dvanaestog kao i između dvanaestog i petnaestog dana od indukcije osteogene diferencijacije (Grafikon 4.4.b).

Razlike u ekspresiji *Alpl*-a su značajne ($p < 0,05$) između sedmog i dvanaestog i između dvanaestog i petnaestog dana osteogene diferencijacije (Grafikon 4.4.c).

Između sedmog i dvanaestog, kao i između dvanaestog i petnaestog dana osteogene diferencijacije, značajan je porast ($p < 0,05$) ekspresije *Coll1a1* (Grafikon 4.4.d).



Grafikon 4.4. Dinamika relativne ekspresije gena markera osteogenih ćelija u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža: a) *Sp7*; b) *Bglap*; c) *Alpl*; d) *Coll1a1*. “*” značajna razlika za $p < 0,05$, d - dan.

4.2. Rezultati *in vivo* istraživanja

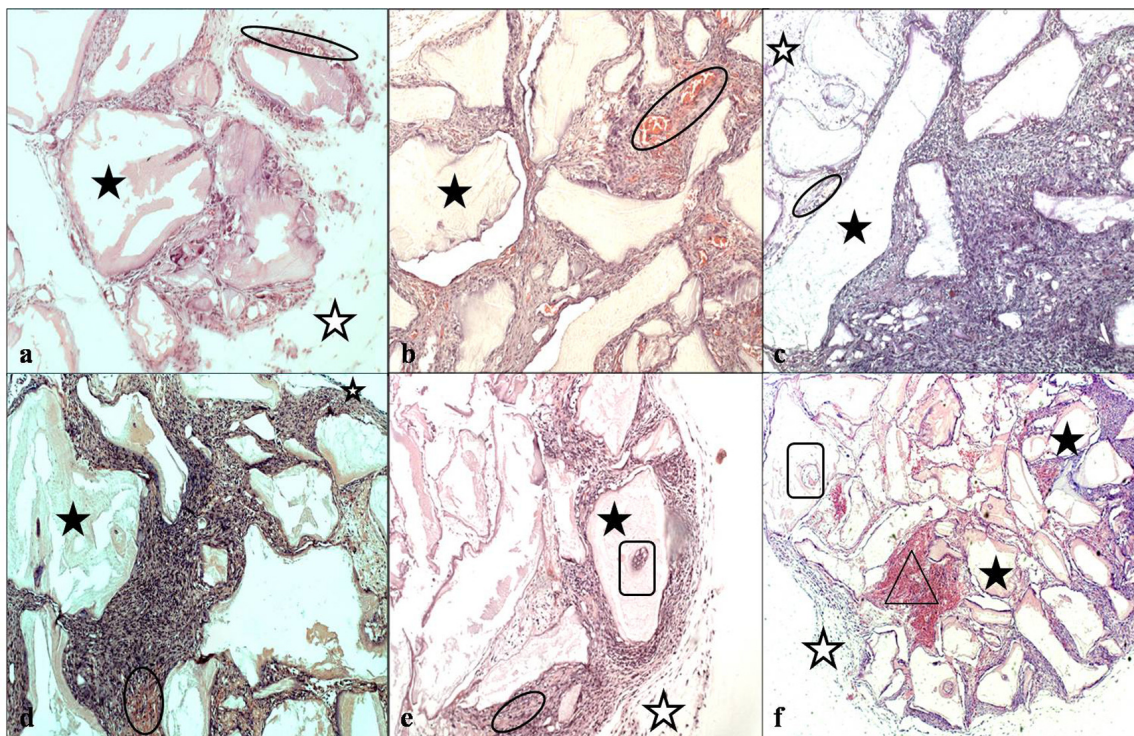
Rezultati *in vivo* istraživanja sprovedenih u okviru ove disertacije, obuhvataju histomorfološku i histomorfometrijsku analizu implanata, analizu ekspresije proteina i gena markera vaskularizovanosti i stepena osteogenog procesa, kao i statističku obradu kvantitativnih rezultata.

4.2.1. Histomorfološka analiza implanata

4.2.1.1. Dve nedelje nakon implantacija

Dve nedelje nakon implantacija, implanti MM tipa, koji su sadržali samo MMK i služili kao kontrola, okruženi su višeslojnom vezivnom kapsulom u kojoj su ćelije malobrojne (Slika 4.19.a). Granule MMK su krupne i dobro integrisane u okolno tkivo (Slike 4.19.a, 4.20.a i c), a u prostorima između njih se na pojedinim mestima primećuju krupne višejedarne ćelije. Takve ćelije, na nekoliko mesta, prijanjaju uz granule MMK (Slika 4.20.b). Na tim mestima se uočava početak resorpcije granula MMK (Slika 4.20.b). Nezrelo vezivno tkivo ispunjava prostor oko granula MMK i periferiju implanata (Slika 4.20.a), a bogato je ćelijama koje liče na fibroblaste (Slike 4.20.a i c) i krvnim sudovima (Slike 4.20.a i c). Na pojedinim mestima, krvni sudovi osvajaju prostor delom resorbovanih granula MMK (Slika 4.19.a).

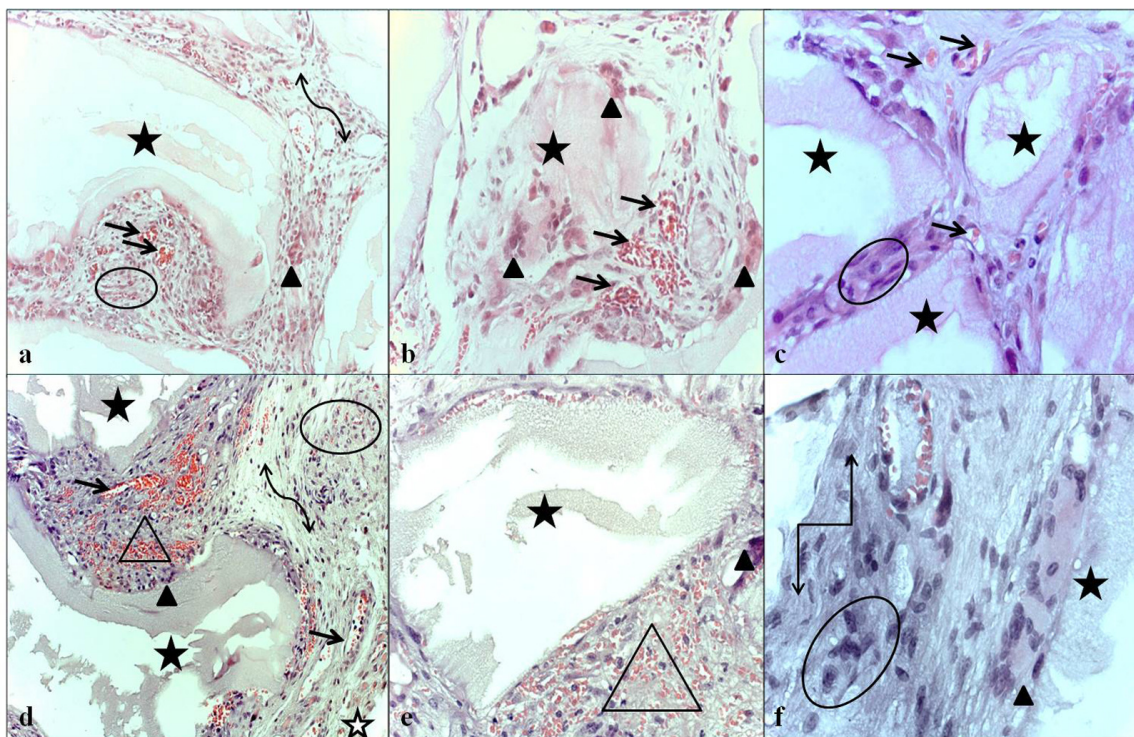
Oko implanata sačinjenih od MMK i PRP, dve nedelje nakon implantacija postoji tanka, ćelijama siromašna, vezivna kapsula (Slika 4.20.d). Granule MMK su uglavnom krupne i dobro integrisane u okolno tkivo (Slike 4.19.b, 4.20.e), ali se na mnogim mestima uočava i početak resorpcije granula (Slike 4.19.b, 4.20.d i f). Uz same granule (Slike 4.20.d i f) i u matriksu (Slika 4.20.e) se nalaze krupne višejedarne ćelije koje liče na osteoklaste. Vezivno tkivo je uglavnom nezrelo (Slika 4.20.d), ali su na pojedinim mestima uz same granule MMK vlakna kolagena usnopljena, što podseća na građu zrelog vezivnog tkiva (Slika 4.20.f). Ćelije uglavnom okupiraju periferiju implanata (Slike 4.20.d i f). Krvni sudovi uz same granule MMK su razvijeni dobro, dok je na periferiji implanata vaskularizovanost slaba (Slika 4.20.d). Uz MMK granule se mogu uočiti i polja sa rasutim eritrocitima (Slika 4.20.e).



Slika 4.19. Uporedni prikaz izabranih histoloških slika ispitivanih grupa implanata dve nedelje nakon implantacija, HE, 100×: a) MM tip - višeslojna vezivna kapsula sa malobrojnim ćelijama oko implanta i dobra vaskularizovanost oko granula MMK; b) MP tip - granule MMK u resorpciji i polja bogata krvnim sudovima; c) MPD tip - višeslojna vezivna kapsula bogata ćelijama oko implanta; d) MPE tip - dobra vaskularizovanost u implantu; e) MPO tip - rastresita i ćelijama prožeta vezivna kapsula oko implanta i struktura nalik osteonu u granuli MMK; f) MPEO tip - višeslojna, ćelijama ispunjena, vezivna kapsula oko implanta i struktura nalik osteonu koja prožima granulu MMK. Bela zvezdica - vezivna kapsula, crna zvezdica - granula MMK, elipsa - polje bogato krvnim sudovima, zaobljen pravougaonik - struktura nalik osteonu, trougao - polje sa rasutim eritrocitima.

Implanti sačinjeni od MMK, PRP i neindukovanih ADSC su oivičeni višeslojnom, ćelijama bogatom, vezivnom kapsulom (Slika 4.19.c). Integracija MMK granula u okolni tkivni matriks je dobra (Slike 4.19.c, 4.21.a i c). Retke višejedarne ćelije se opažaju samo uz granule MMK (Slike 4.21.a i c), a na pojedinim mestima zapažaju se znaci resorpcije granula. Između granula MMK, vlakna kolagena su usnopljena (Slike 4.21.a i b), dok su periferno ova vlakna rastresita, te tkivo ima izgled nezrelog vezivnog tkiva (Slika 4.21.a). Ovo tkivo je bogato ćelijama (Slike 4.21.a i c), a vaskularizovanost je slaba. Uz granule MMK (Slike 4.19.c i 4.21.a) i intergranularno (Slike 4.21.b i c) se mogu primetiti, retki krvni sudovi manjeg dijametra. Kockaste

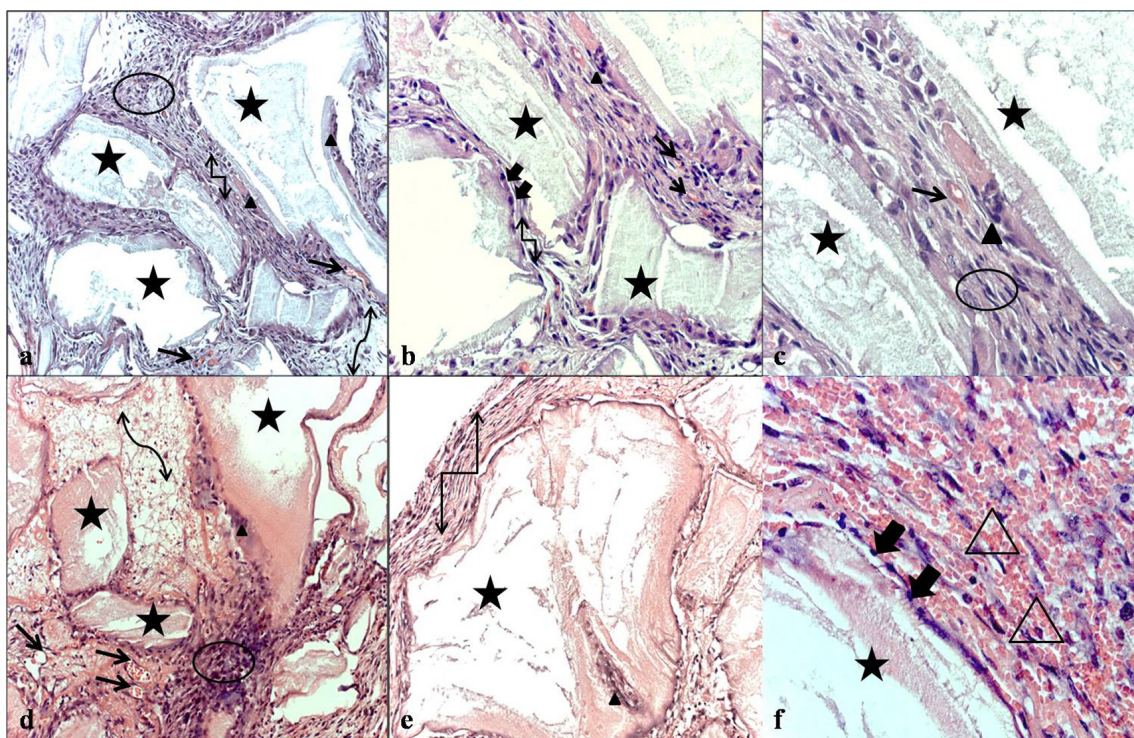
ćelije koje liče na osteoblaste na pojedinim mestima prijanjaju uz granule MMK (Slika 4.21.b).



Slika 4.20. Histomorfološke karakteristike implanata MM i MP tipa dve nedelje nakon implantacija: a) MM tip - dobra vaskularizovanost i celularizovanost u implantu i nezrelo vezivno tkivo između granula MMK, HE, 200×; b) MM tip - prodor krupnih višejedarnih ćelija u granule MMK i krvni sudovi u intergranularnom prostoru, HE, 400×; c) MM tip - brojni krvni sudovi i ćelije koje liče na fibroblaste, HE, 630×; d) MP tip - dobro razvijeni krvni sudovi uz same MMK granule i nezrelo vezivno tkivo bogato ćelijama na periferiji implanta, HE, 200×; e) MP tip - polja sa rasutim eritrocitima oko MMK granule, HE, 400×; f) MP tip - krupne višejedarne ćelije i usnopljen kolagen oko MMK granula, HE, 630×. Bela zvezdica - vezivna kapsula, crna zvezdica - granula MMK, zakrivljena dupla strelica - nezrelo vezivno tkivo, uglasta dupla strelica - zrelo vezivno tkivo, elipsa - polje bogato ćelijama, tanka strelica - krvni sud, vrh strelice - krupna višejedarna ćelija, trougao - polje sa rasutim eritrocitima.

U implantima koje čine MMK, PRP i ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama, izvučenim dve nedelje nakon implantacija, vezivna kapsula je tanka i bogata ćelijama (Slika 4.19.d). Granule MMK su dobro integrisane u okolni tkivni matriks (Slike 4.19.d, 4.21.d, e i f). Višejedarne ćelije sa fagocitnom aktivnošću su retke, prijanjaju uz granule MMK (Slika 4.21.d), a neke od njih i prodiru u same granule (Slika 4.21.e). Nezrelo vezivno tkivo ispunjava prostore između granula MMK (Slika

4.21.d), a mestimično se u tim prostorima nalaze usnopljena, dobro organizovana vlakna kolagena (Slika 4.21.e). Krvni sudovi su veoma razvijeni, razgranati i zauzimaju veliki deo površine implanata (Slike 4.19.d, 4.21.d), a mogu se videti i polja sa rasutim eritrocitima (Slika 4.21.f). Čelije nalik prekursorima osteoblasta “naležu” na granule MMK u implantima MPE tipa (Slika 4.21.f).



Slika 4.21. Histomorfološke karakteristike implanata MPD i MPE tipa dve nedelje nakon implantacija: a) MPD tip - usnopljena vlakna kolagena u intergranularnom prostoru implanta i polje bogato ćelijama u perifernom delu implanta, HE, 200×; b) MPD tip - prijanjanje kockastih ćelija koje liče na osteoblaste uz MMK granulu i prisustvo krvnih sudova manjeg dijametra u intergranularnom prostoru, HE, 400×; c) MPD tip - prijanjanje krupne višejedarne ćelije uz MMK granulu u blizini polja bogatog ćelijama i krvnog suda, HE, 630×; d) MPE tip - nezrelo vezivno tkivo bogato krvnim sudovima i ćelijama u intergranularnom prostoru implanta, HE, 200×; e) MPE tip - prodor krupne višejedarne ćelije u MMK granulu i usnopljena vlakna kolagena između dve MMK granule, HE, 400×; f) MPE tip - ćelije nalik osteoblastima “naležu” na granulu MMK i polja sa rasutim eritrocitima u intergranularnom prostoru implanta, HE, 630×. Crna zvezdica - granula MMK, zakrivljena dupla strelica - nezrelo vezivno tkivo, uglasta dupla strelica - zrelo vezivno tkivo, elipsa - polje bogato ćelijama, tanka strelica - krvni sud, vrh strelice - krupna višejedarna ćelija, debela strelica - ćelija nalik osteoblastu, trougao - polje sa rasutim eritrocitima.

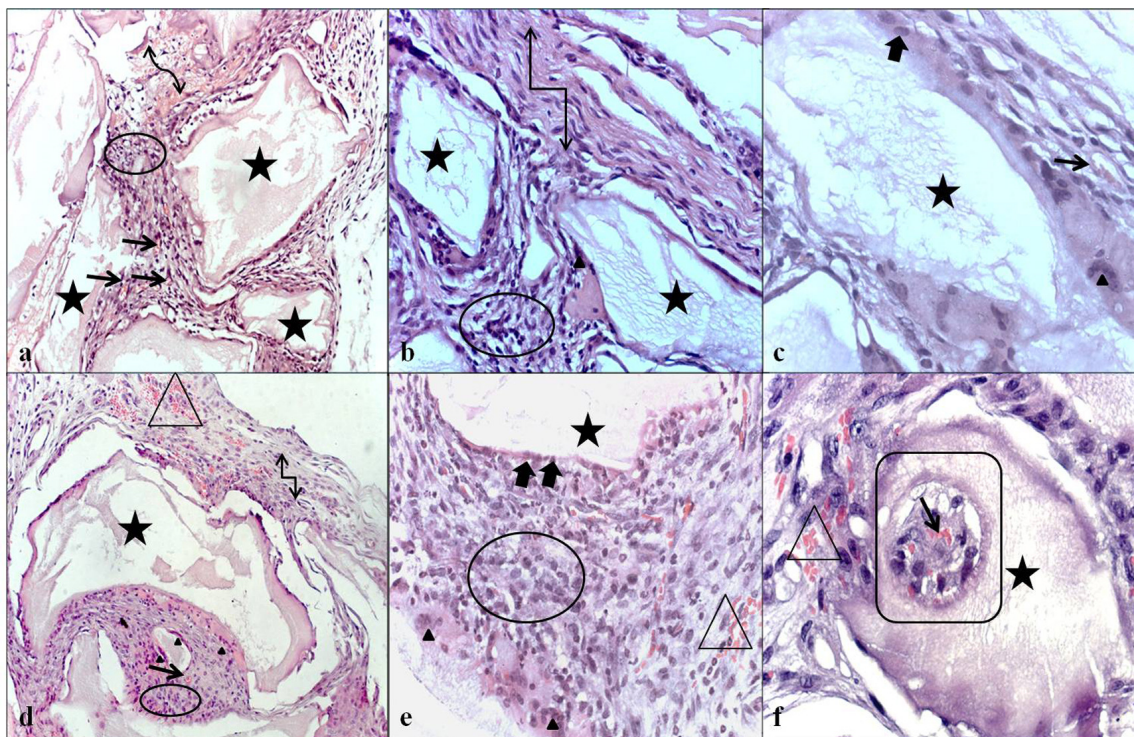
Dve nedelje nakon implantacija, vezivna kapsula formirana oko implanata čije su komponente MMK, PRP i ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama je uglavnom rastresita i prožeta ćelijama, a na pojedinim mestima je tanka (Slika 4.19.e). Granule MMK su dobro integrisane u okolni tkivni matriks (Slike 4.22.a i c), a na pojedinim mestima se uz granule MMK uočavaju višejedarne ćelije (Slika 4.22.c). Vezivno tkivo je manjim delom rastresito (Slika 4.22.a), a većim delom su vlakna kolagena dobro organizovana, usnopljena (Slika 4.22.b). Regioni nezrelog vezivnog tkiva su bogato celularizovani (Slike 4.22.a i b) i sadrže krvne sudove manjeg dijametra (Slike 4.22.a i c). Ćelije koje liče na osteoblaste nalaze se uz same granule MMK (Slika 4.22.c), a strukture koje liče na osteone prožimaju pojedine granule MMK (Slika 4.19.e).

Dve nedelje posle implantacija, oko implanata sačinjenih od MMK, PRP i ADSC indukovanih *in vitro* ka endotelskim i osteogenim ćelijama nalazi se višeslojna, ćelijama ispunjena, vezivna kapsula (Slika 4.19.f). Granule MMK su okružene višejedarnim ćelijama naglašene fagocitne aktivnosti (Slike 4.22.d i e). Vlakna kolagena u prostorima između granula MMK su usnopljena (Slika 4.22.d), a tkivni matriks je bogat ćelijama koje liče na fibroblaste i polimorfonukleare (Slika 4.22.d i e). Krvni sudovi u implantima MPEO tipa su retki (Slike 4.22.d i f), ali je veliki broj polja u MPEO implantima ispunjen rasutim eritrocitima (Slike 4.22.d, e i f). Ćelije nalik osteoblastima su palisadno raspoređene uz granule MMK (Slika 4.22.e), a u granulama MMK se mogu uočiti brojne strukture koje liče na osteone (Slika 4.19.f i 4.22.f).

4.2.1.2. Osam nedelja nakon implantacija

Osam nedelja nakon implantacija, vezivna kapsula oko implanata grupe koji su sadržali samo MMK je višeslojna i prožeta ćelijama (Slika 4.23.a). Granule MMK su sitnije nego dve nedelje nakon implantacija (Slike 4.23.a i 4.24.a) i okružuju ih brojne višejedarne ćelije (Slike 4.24.a i c). Vlakna kolagena su uz same granule MMK usnopljena, dok su u prostorima udaljenijim od granula i dalje rastresita (Slike 4.24.a, b i c). Celularizovanost ovog tipa implanata je slaba, a sreću se ćelije polimorfonuklearnog izgleda (Slika 4.24.c). Krvni sudovi su brojni, uglavnom pojedinačni i manjeg dijametra, te mreža krvnih sudova u MM implantima nakon osam

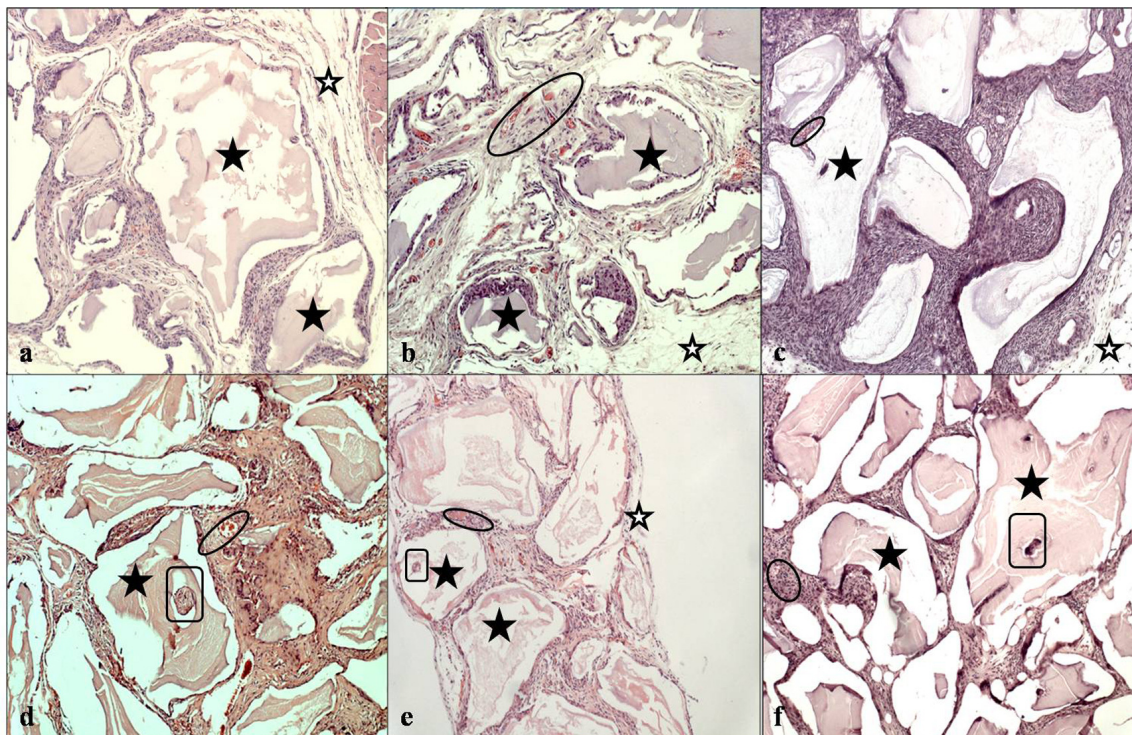
nedelja od implantacija nije razvijena (Slike 4.24.a i c). Čelije koje prijanjaju uz granule MMK svojim izgledom podsećaju na osteoblaste (Slika 4.24.c).



Slika 4.22. Histomorfološke karakteristike implanata MPO i MPEO tipa dve nedelje nakon implantacija: a) MPO tip - brojne ćelije i krvni sudovi u nezrelom vezivnom tkivu između MMK granula, HE, 200×; b) MPO tip - zrelo vezivno tkivo uz granule MMK, HE, 400×; c) MPO tip - prijanjanje ćelija koje liče na osteoblaste i krupne višejedarne ćelije uz MMK granulu, HE, 630×; d) MPEO tip - granule MMK okružene višejedarnim ćelijama naglašene fagocitne aktivnosti, HE, 200×; e) MPEO tip - ćelije koje liče na osteoblaste naležu na MMK granule i polja bogata ćelijama i rasutim eritrocitima između MMK granula, HE, 400×; f) MPEO tip - struktura nalik osteonu u MMK granuli, HE, 630×. Crna zvezdica - granula MMK, zakrivljena dupla strelica - nezrelo vezivno tkivo, uglasta dupla strelica - zrelo vezivno tkivo, elipsa - polje bogato ćelijama, tanka strelica - krvni sud, vrh strelice - krupna višejedarna ćelija, debela strelica - ćelija nalik osteoblastu, zaobljen pravougaonik - struktura nalik osteonu; trougao - polje sa rasutim eritrocitima.

U vezivnoj kapsuli oko implanata koji su sadržali dve komponente, MMK i PRP, zapažaju se ćelije (Slika 4.23.b). Na pojedinim mestima, kapsula je jako debela (Slika 4.23.b). Krupne višejedarne ćelije okružuju, prodiru i degradiraju granule MMK (Slike 4.24.d, e i f), a na mestima gde su granule resorbovane prodire okolno tkivo (Slika 4.23.b). MP implanti su slabo celularizovani (Slika 4.24.f), uz granule MMK su

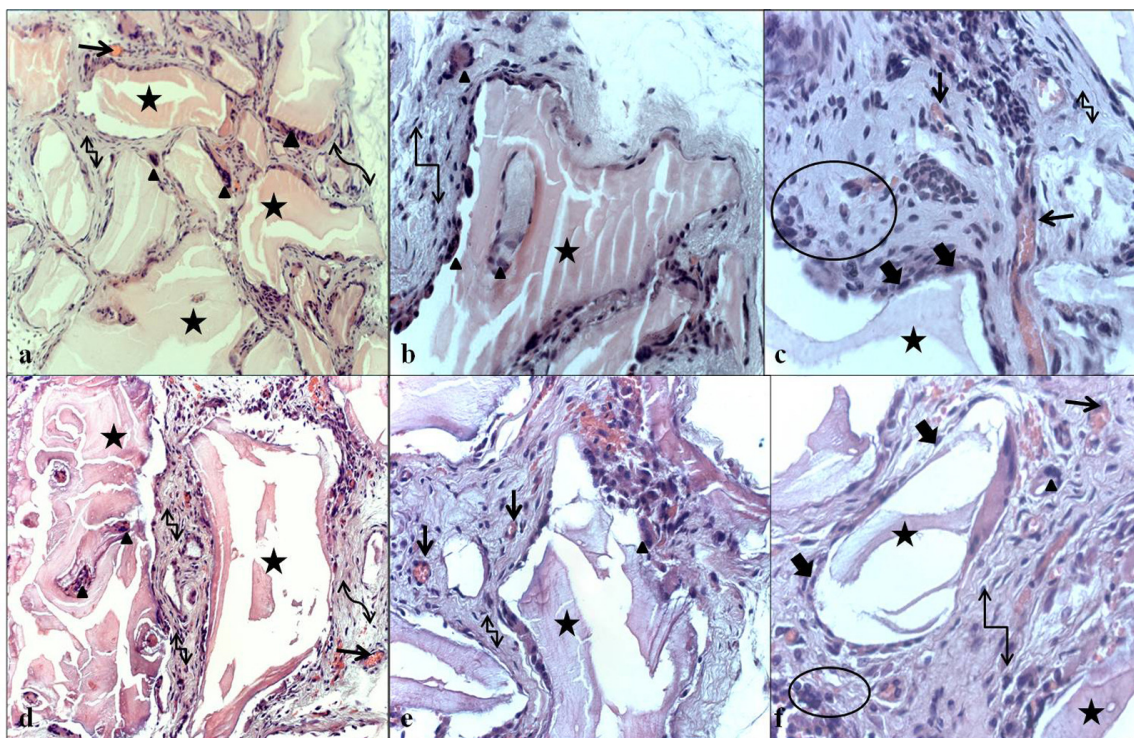
snopovi vlakana kolagena, dok na periferiji još uvek postoji rastresito vezivno tkivo (Slike 4.24.d i f). Krvni sudovi su brojni, ali nemaju izgled dobro razvijene vaskularne mreže (Slike 4.24.d i f). Uočava se i poneka ćelija koja liči na osteoblast (Slika 4.24.f).



Slika 4.23. Upporedni prikaz izabranih histoloških slika ispitivanih grupa implanata osam nedelja nakon implantacija, HE, 100 \times : a) MM tip - višeslojna vezivna kapsula bogata ćelijama oko implanta; b) MP tip - vezivna kapsula oko implanta bogata ćelijama i na pojedinim mestima jako debela; c) MPD tip - krupne granule MMK dobro integrisane u okolno tkivo; d) MPE tip - struktura koja liči na osteon u MMK granuli; e) MPO tip - tanka, ćelijama siromašna, vezivna kapsula oivičava implant i struktura koje liče na osteon u MMK granuli; f) MPEO tip - jako resorbovane MMK granule i struktura nalik osteonu u jednoj od njih. Bela zvezdica - vezivna kapsula, crna zvezdica - granula MMK, elipsa - polje bogato krvnim sudovima, zaobljen pravougaonik - struktura nalik osteonu.

Osam nedelja nakon implantacija, razvijena je višeslojna vezivna kapsula oko implanata koji sadrže MMK, PRP i neindukovane ADSC, a ćelije u njoj su retke. Granule MMK su krupne, dobro integrisane u okolno tkivo (Slika 4.23.c). Višejedarne ćelije su brojnije, i uz granule MMK i između njih (Slika 4.25.b), nego dve nedelje nakon implantacija, a uočavaju se i znaci resorpcije granula MMK. Usnopljena vlakna kolagena nalaze se na pojedinim mestima između granula MMK (Slika 4.25.a), a tkivo između granula je bogato različitim tipovima ćelija (Slika 4.25.c). Krvni sudovi su

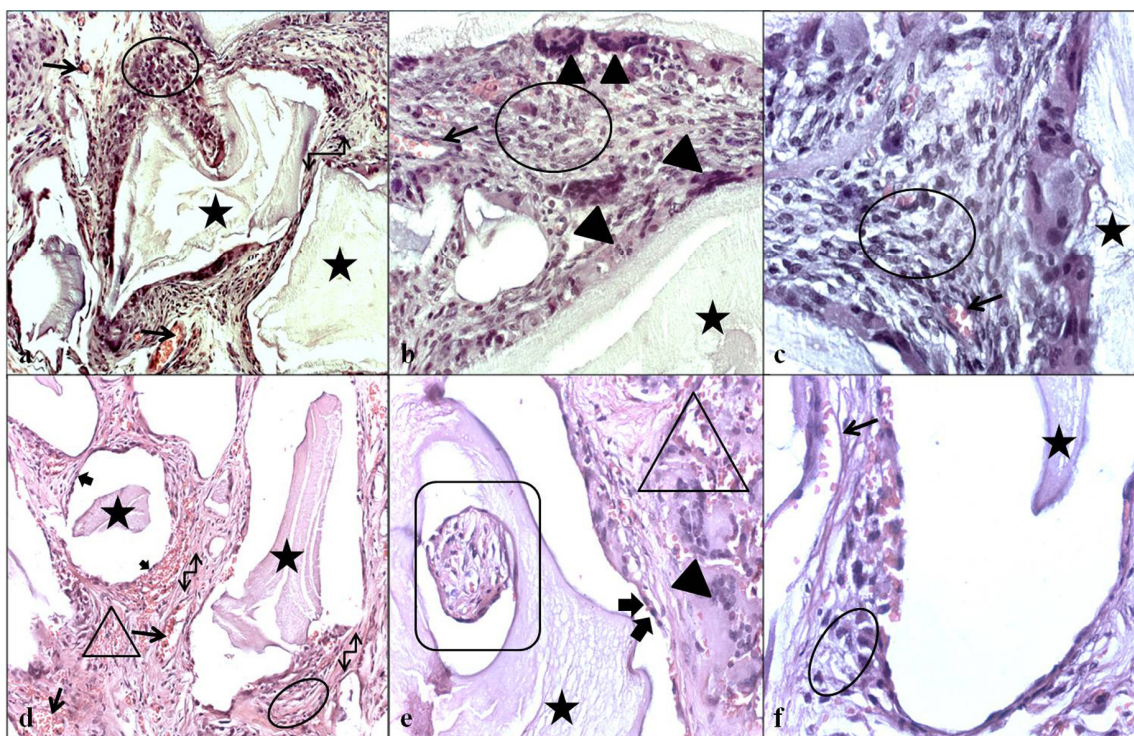
većeg ili manjeg dijametra, pojedinačni, retki (Slika 4.25.a i c), a nalaze se i malobrojne ćelije koje liče na osteoblaste.



Slika 4.24. Histomorfološke karakteristike implanata MM i MP tipa osam nedelja nakon implantacija: a) MM tip- MMK granule okružene krupnim višejedrnim ćelijama, HE, 200×; b) MM tip - zrelo vezivno tkivo oko MMK granula, HE, 400×; c) MM tip - ćelije koje liče na osteoblaste uz MMK granulu i polje bogata ćelijama oko granule, HE, 630×; d) MP tip - prodor krupnih, višejedrnih ćelija u MMK granule, HE, 200×; e) MP tip - krvni sudovi manjeg dijametra između MMK granula, HE, 400×; f) MP tip - ćelije koje liče na osteoblaste naležu na MMK granulu, HE, 630×. Crna zvezdica - granula MMK, zakrivljena dupla strelica - nezrelo vezivno tkivo, uglasta dupla strelica - zrelo vezivno tkivo, elipsa - polje bogato ćelijama, tanka strelica - krvni sud, vrh strelice - krupna višejedarna ćelija, debela strelica - ćelija nalik osteoblastu.

Oko implanata sačinjenih od MMK, PRP i ADSC indukovanih *in vitro* ka endotelskim ćelijama se posle osam nedelja od implantacija opaža uska vezivna kapsula. Tkivni matriks sačinjavaju usnopljena vlakna kolagena, čija organizacija odgovara izgledu zrelog vezivnog tkiva (Slika 4.25.d). U tkivu se opaža umerena gustina ćelija (Slike 4.25.d i f). Krupne višejedarne ćelije, u kojima se nalaze delimično razgrađene granule MMK, uočavaju se u vezivnom tkivu, a resorpcija granula MMK je u ovom tipu implanata jako izražena (Slika 4.25.d i e). Uz same granule MMK, krvni

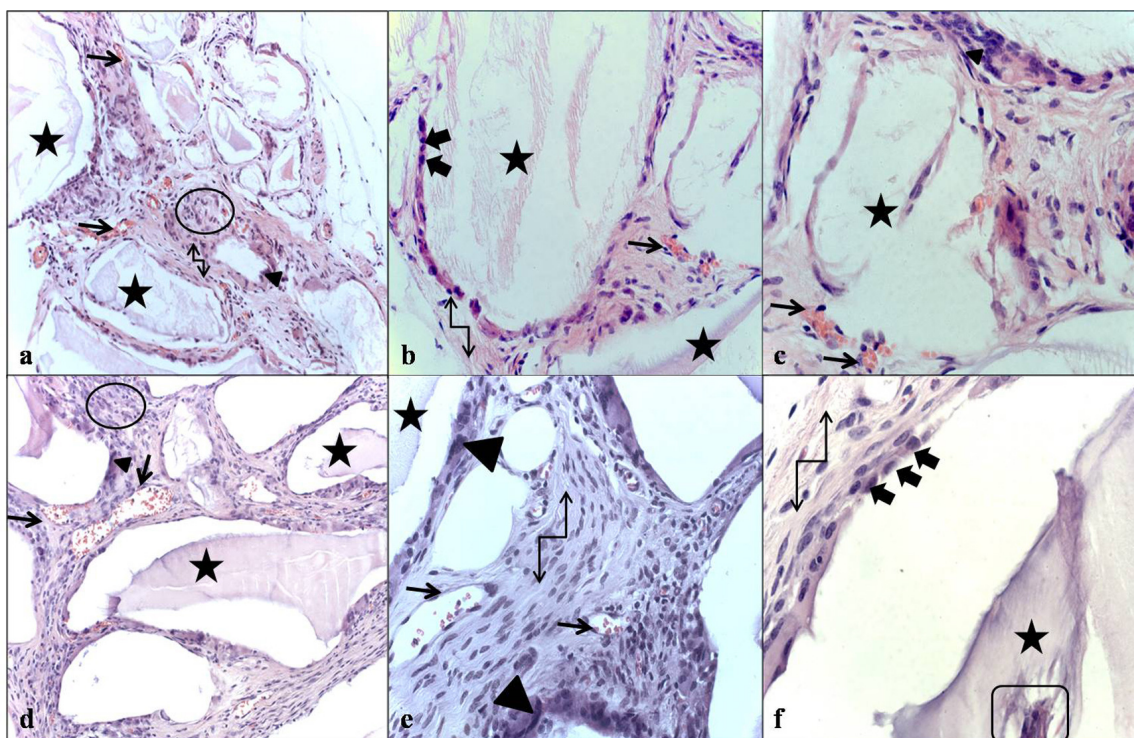
sudovi su razgranati, većeg dijametra, a bogata vaskularizacija i polja sa rasutim eritrocitima su odličje i tkivnog matriksa udaljenog od granula (Slike 4.25.d i f). Brojne ćelije okruglih jedara, koje liče na osteoblaste, naležu na granule MMK (Slika 4.25.d) u koje prodiru okolno tkivo i krvni sudovi dajući čitavoj strukturi izgled osteona (Slika 4.23. e).



Slika 4.25. Histomorfološke karakteristike implanata MPD i MPE tipa osam nedelja nakon implantacija: a) MPD tip - zrelo vezivno tkivo i dobra celularizovanost u implantu, HE, 200×; b) MPD tip - izraženo prisustvo krupnih višejedarnih ćelija uz granule MMK, HE, 400×; c) MPD tip - ćelije u intergranularnom prostoru implanta, HE 630×; d) MPE tip - intergranularni prostor implanta bogat krvnim sudovima i zrelo vezivno tkivo uz MMK granule, HE, 200×; e) MPE tip - struktura koja liči na osteon u MMK granuli i prijanjanje ćelija koje liče na osteoblaste uz granulu MMK, HE, 400×; f) MPE tip - dobra celularizovanost uz MMK granulu, HE, 630×. Crna zvezdica - granula MMK, zakrivljena dupla strelica - nezrelo vezivno tkivo, uglasta dupla strelica - zrelo vezivno tkivo, elipsa - polje bogato ćelijama, tanka strelica - krvni sud, vrh strelice - krupna višejedarna ćelija, debela strelica - ćelija nalik osteoblastu, zaobljen pravougaonik - struktura nalik osteonu, trougao - polje sa rasutim eritrocitima

Tanka, ćelijama siromašna, vezivna kapsula oivičava implante čije su komponente MMK, PRP i ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama (Slika 4.23.e). Zahvaljujući aktivnosti višejedarnih ćelija, granule MMK su usitnjene (Slika

4.23.e), ali u ovoj tački posmatranja broj ovakvih ćelija nije veliki (Slike 4.26.a i c). U uzanim prostorima između granula MMK, vlakna kolagena su usnopljena (Slike 4.26.a i b). Celularizovanost tkiva je umerena (Slika 4.26.a), a brojni krvni sudovi manjeg dijametra se nakupljaju oko granula MMK (Slike 4.26.a, b i c). Po površini granula MMK, u jednom sloju, raspoređuju se ćelije okruglih jedara koje liče na osteoblaste (Slika 4.26.b), a zapažaju se i strukture čiji izgled odgovara osteonima (Slika 4.23.e).



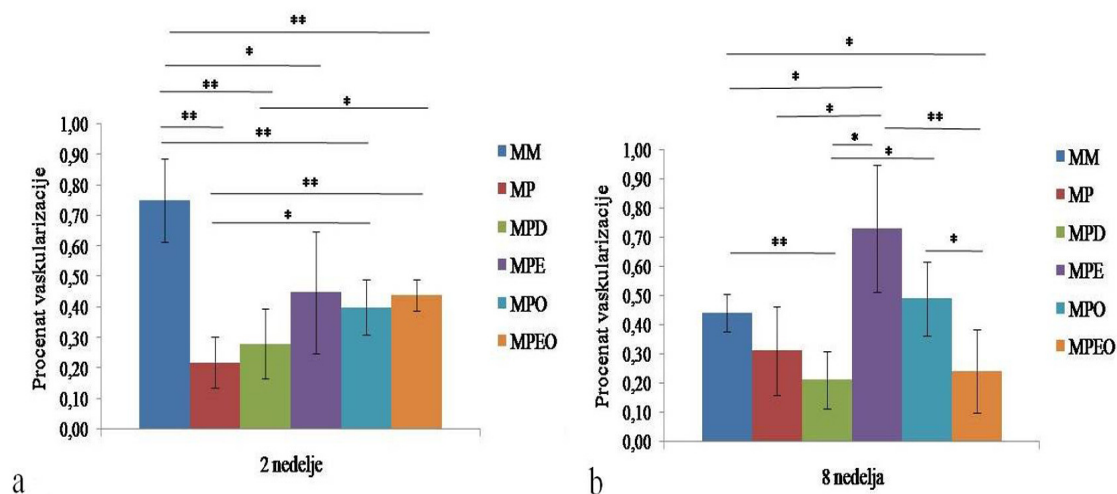
Slika 4.26. Histomorfološke karakteristike implanata MPO i MPEO osam nedelja nakon implantacija: a) MPO tip - prisustvo krvnih sudova manjeg dijametra i ćelija u zreloom vezivnom tkivu implanata, HE, 200×; b) MPO tip - naglašeno prisustvo ćelija koje liče na osteoblaste uz MMK granule, HE, 400×; c) MPO tip - krupne višejedarne ćelije uz granule MMK i u intergranularnom prostoru imlanata, HE, 630×; d) MPEO tip - krvni sudovi većeg dijametra uz MMK granule, HE, 200×; e) MPEO tip - brojne krupne višejedarne ćelije oko MMK granula i zreloom vezivno tkivo u intergranularnom prostoru, HE, 400×; f) MPEO tip - ćelije koje liče na osteoblaste naležu na MMK granulu, HE, 630×. Crna zvezdica - granula MMK, uglasta dupla strelica - zreloom vezivno tkivo, elipsa - polje bogato ćelijama, tanka strelica - krvni sud, vrh strelice - krupna višejedarna ćelija, debela strelica - ćelija nalik osteoplastu, zaobljen pravougaonik - struktura nalik osteonu.

Implanti sačinjeni od MMK, PRP i ADSC indukovanih *in vitro* ka endotelskim i osteogenim ćelijama su nakon osam nedelja od implantacija uokvireni tankom vezivnom kapsulom, u kojoj su ćelije malobrojne. Između granula MMK uočava se jaka

regresija tkiva (Slika 4.36.d). Pojedinačne višejedarne ćelije zapažaju se između (Slika 4.26.e) ili uz granule MMK (Slike 4.26.d i e) koje su jako resorbovane (Slike 4.23.f, 4.26.d i e). Uski prostori između granula MMK ispunjeni su usnopljenim vlaknima kolagena (Slike 4.26.e i f), a izvesna polja su jako bogata ćelijama (Slika 4.26.d). U vezivnom tkivu se uočavaju retki krvni sudovi većeg dijametra (Slike 4.26.d i e). Na osteogeni proces ukazuju ćelije okruglih jedara priljubljene uz granule MMK i strukture koje liče na osteone, koje prodiru u granule MMK (Slika 4.26.f).

4.2.2. Histomorfometrijska analiza implanata

Dve nedelje nakon implantacija (Grafikon 4.5.a), procenat vaskularizacije je najviši u implantima MM tipa što je značajno ($p < 0,05$) u odnosu na MPE implante i u odnosu na ostale tipove implanata ($p < 0,01$). U implantima MPO tipa, značajno je viši procenat vaskularizacije nego u MP implantima ($p < 0,05$). Procenat vaskularizacije u MPEO implantima je značajno viši u odnosu na MPD ($p < 0,05$) i u odnosu na MP tip implanata ($p < 0,01$).



Grafikon 4.5. Procenat vaskularizacije u ispitivanim grupama implanata MM, MP, MPD, MPE, MPO i MPEO: a) dve nedelje nakon implantacija; b) osam nedelja nakon implantacija. MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama. “*” značajna razlika za $p < 0,05$; “**” značajna razlika za $p < 0,01$.

Osam nedelja nakon implantacija (Grafikon 4.5.b), u MPE implantima je procenat vaskularizacije viši u odnosu na sve ostale tipove implanata, što je značajno u odnosu na MPEO tip implanata ($p < 0,01$) i u odnosu na MM, MP i MPD tip implanata ($p < 0,05$). U istoj tački posmatranja, u MM implantima je procenat vaskularizacije značajno viši u odnosu na MPEO ($p < 0,05$) i u odnosu na MPD implante ($p < 0,01$). Procenat vaskularizacije u MPO implantima značajno je viši u poređenju sa MPD i MPEO implantima ($p < 0,05$).

4.2.3. Imunohistohemijska analiza implanata

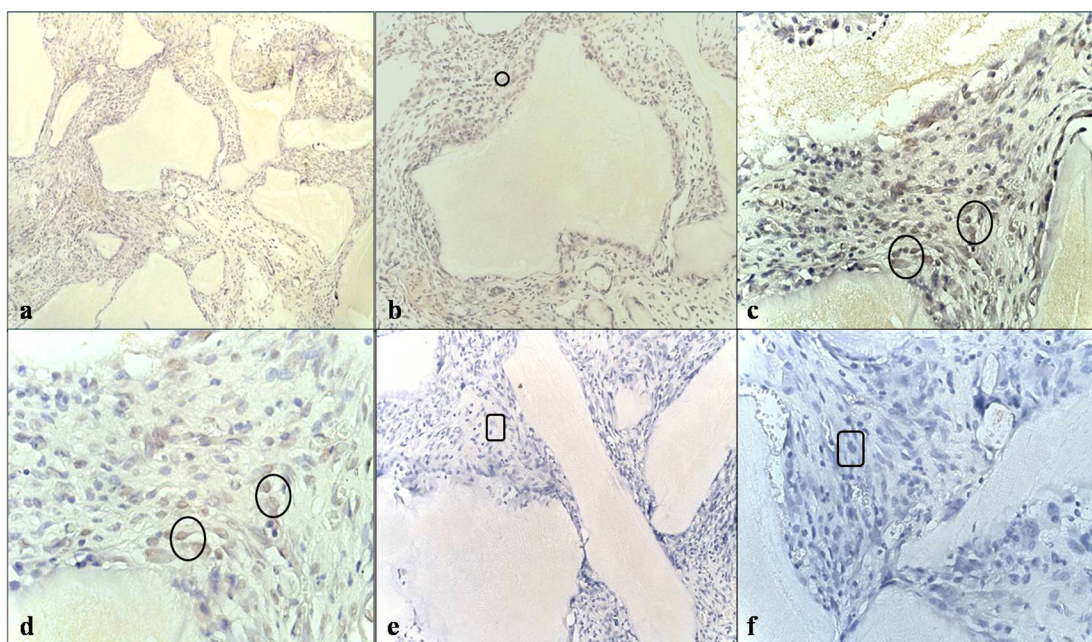
4.2.3.1. Imunoekspresija VEGFR-a 2

Imunoekspresija VEGFR-a 2 u grupi implanata koji su sadržali samo MMK je slaba, i dve i osam nedelja nakon implantacija (Slike 4.27.a i b, 4.28.a, b, c i d), ali je obrazac distribucije VEGFR-2 pozitivnih ćelija drugačiji. Pojedinačne pozitivne ćelije mogu se uočiti uz same granule MMK i u pojedinim ćelijama u prostoru između granula nakon dve nedelje od implantacija (Slike 4.27.c i d). Nakon osam nedelja od implantacija, pozitivne ćelije se nalaze uglavnom samo uz granule MMK (Slike 4.28.a, b, c i d).

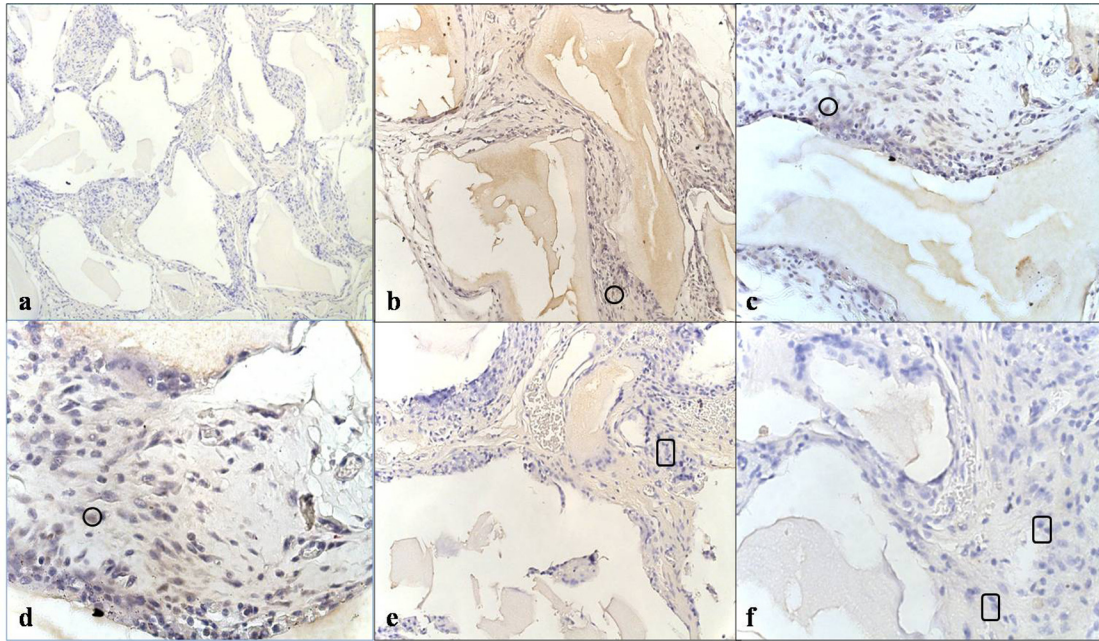
U implantima sa MMK i PRP, nakon dve nedelje od implantacija su pojedine ćelije, koje se nalaze između MMK granula, pozitivne na VEGFR-2 (Slike 4.29.a, b, c i d). Ovakve ćelije postoje i u zidu krvnih sudova (Slika 4.29.d). Osam nedelja nakon implantacija, u implantima MP tipa, broj VEGFR-2 pozitivnih ćelija je manji nego dve nedelje posle implantacija (Slike 4.30.a, b, c i d).

Jaka imunoekspresija VEGFR-a 2 postoji u implantima MPD tipa nakon dve nedelje od implantacija (Slike 4.31.a, b, c i d). Pozitivne ćelije su uglavnom prisutne uz MMK granule (Slika 4.31.c), ali i ih ima i u delovima implanta udaljenim od granula (Slika 4.31.d). Nakon osam nedelja od implantacija, i dalje postoji imunoekspresija VEGFR-a 2 u MPD implantima, ali su polja pozitivnih ćelija manja nego dve nedelje nakon implantacija (Slike 4.32.a, b, c i d). Imunoekspresija ovog proteina se uočava i u ćelijama zida krvnih sudova (Slika 4.32.c).

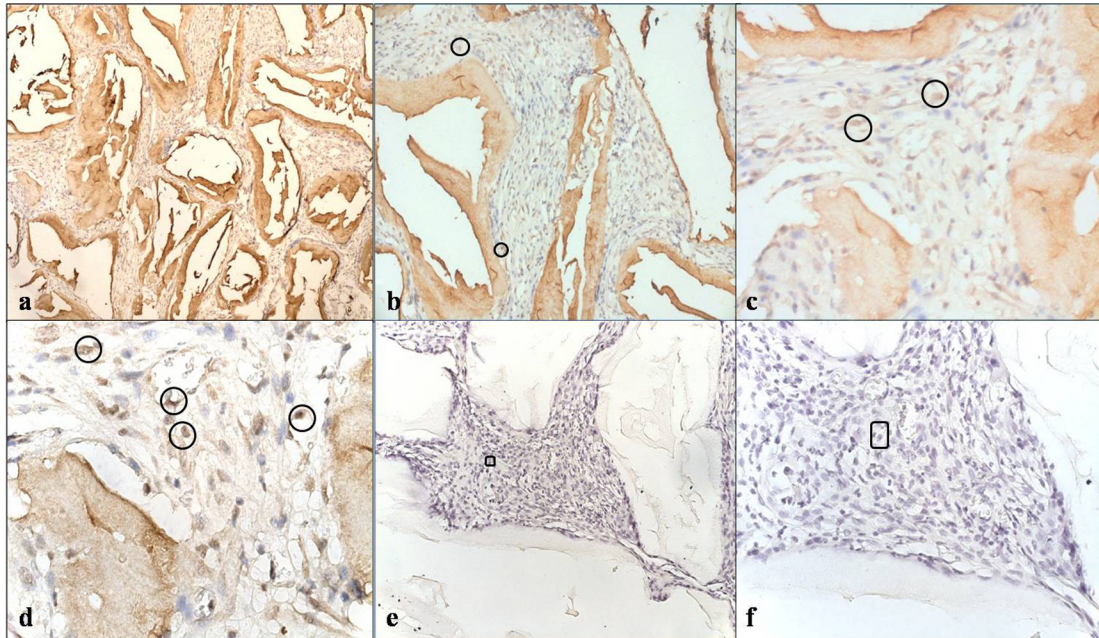
Dve nedelje nakon implantacija u implantima koji su sačinjeni od MMK, PRP i ADSC indukovanih *in vitro* ka endotelskim ćelijama, veliki broj VEGFR-2 pozitivnih ćelija nalazi se u prostoru uz granule MMK kao i u prostoru između njih (Slike 4.33.a, b, c i d). Nakon osam nedelja od implantacija, imunoekspresija VEGFR-a 2 u intergranularnim prostorima je slabija nego dve nedelje nakon implantacija (Slike 4.34.a, b, c i d), ali se uočava u ćelijama koje se nalaze uz granule MMK (Slike 4.34.a i c) i u ćelijama zida krvnog suda (Slika 4.34.b).



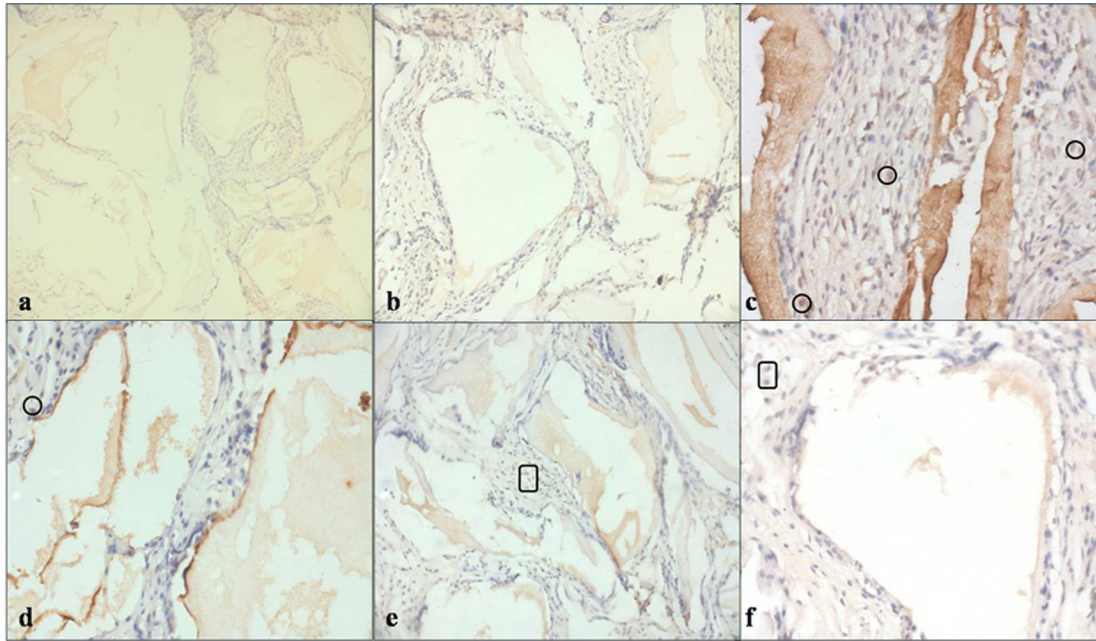
Slika 4.27. Imunoekspresija VEGFR-a 2 u implantima MM tipa dve nedelje nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 630×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije pozitivne na VEGFR-2, pravougaonik - ćelije negativne na VEGFR-2. VEGFR-2 pozitivne ćelije se mogu uočiti uz granule MMK i u pojedinim ćelijama udaljenim od MMK granula.



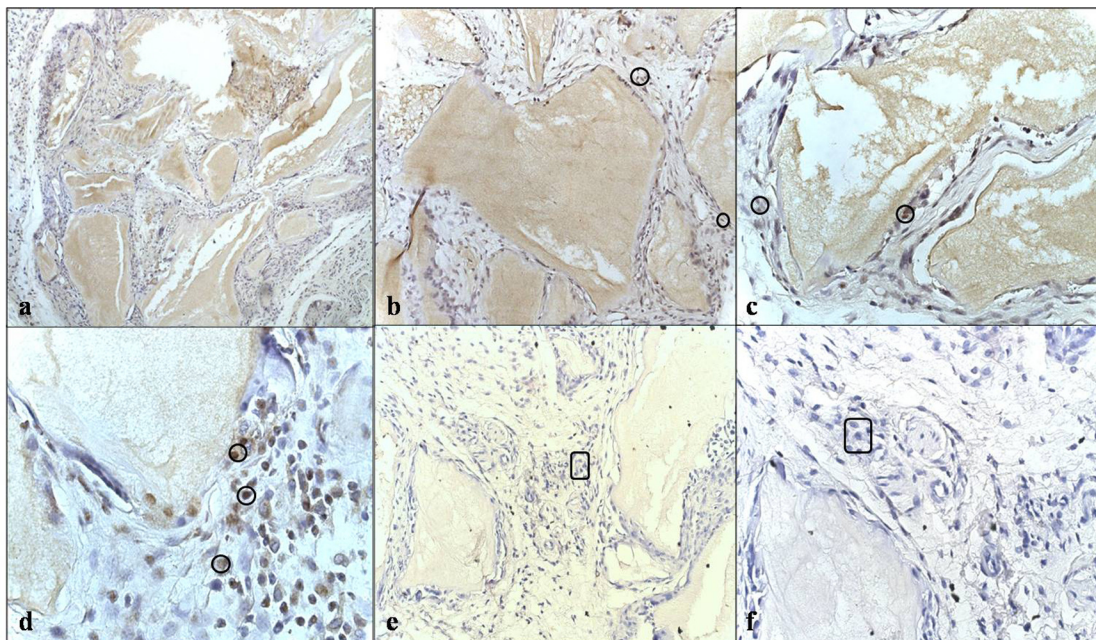
Slika 4.28. Imunoekspresija VEGFR-a 2 u implantima MM tipa osam nedelja nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 630×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije pozitivne na VEGFR-2, pravougaonik - ćelije negativne na VEGFR-2. VEGFR-2 pozitivne ćelije se nalaze uglavnom samo uz granule MMK.



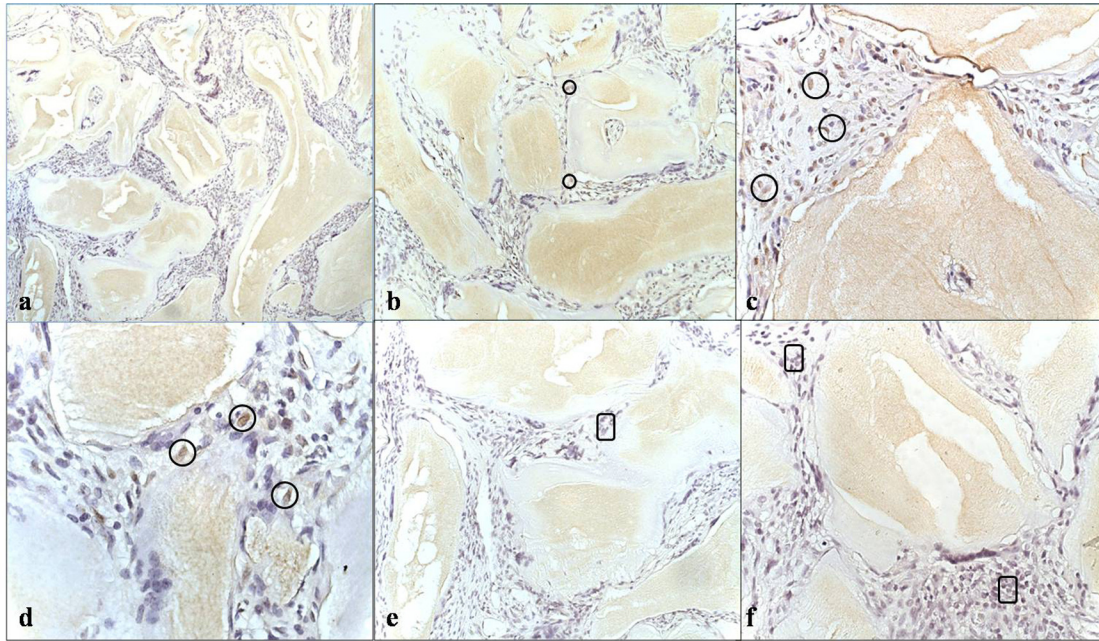
Slika 4.29. Imunoekspresija VEGFR-a 2 u implantima MP tipa dve nedelje nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 630×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije pozitivne na VEGFR-2, pravougaonik - ćelije negativne na VEGFR-2. VEGFR-2 pozitivne ćelije se mogu uočiti između granula MMK i u zidu krvnog suda.



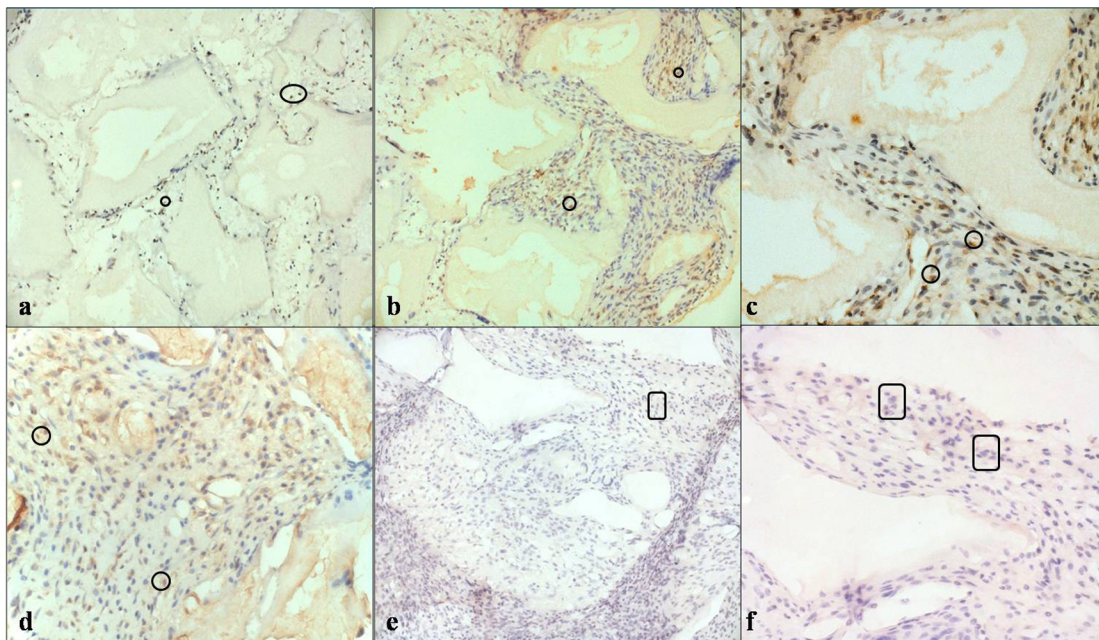
Slika 4.30. Imunoekspresija VEGFR-a 2 u implantima MP tipa osam nedelja nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 400×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije pozitivne na VEGFR-2, pravougaonik - ćelije negativne na VEGFR-2. VEGFR-2 pozitivne ćelije sreću se uglavnom u tkivu između MMK granula, ali se mogu uočiti i uz MMK granule.



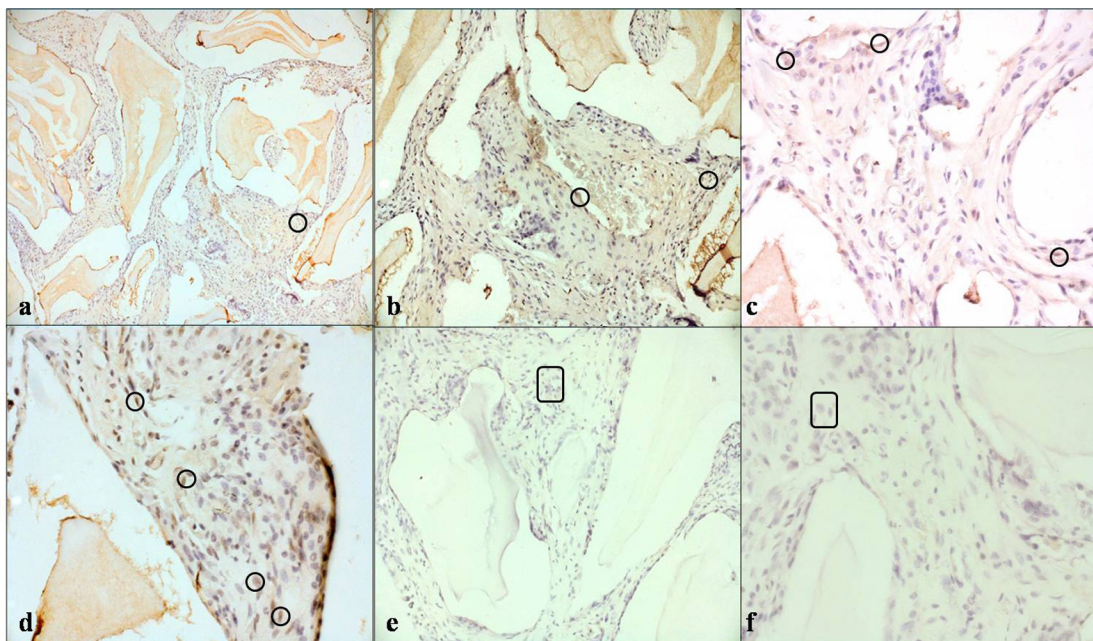
Slika 4.31. Imunoekspresija VEGFR-a 2 u implantima MPD tipa dve nedelje nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 630×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije pozitivne na VEGFR-2, pravougaonik - ćelije negativne na VEGFR-2. VEGFR-2 pozitivne ćelije se mogu uočiti i uz MMK granule i u tkivu udaljenom od MMK granula.



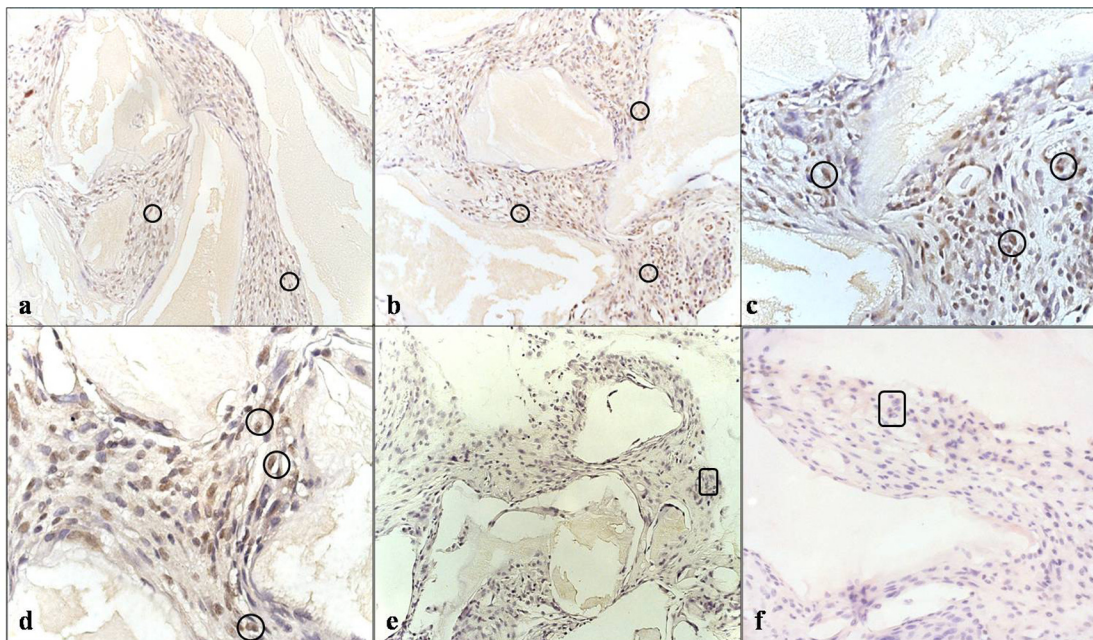
Slika 4.32. Imunoekspresija VEGFR-a 2 u implantima MPD tipa osam nedelja nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 630×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije pozitivne na VEGFR-2, pravougaonik - ćelije negativne na VEGFR-2. VEGFR-2 pozitivne ćelije nalaze se uz MMK granule, u tkivu udaljenom od MMK granula i u ćelijama zida krvnog suda.



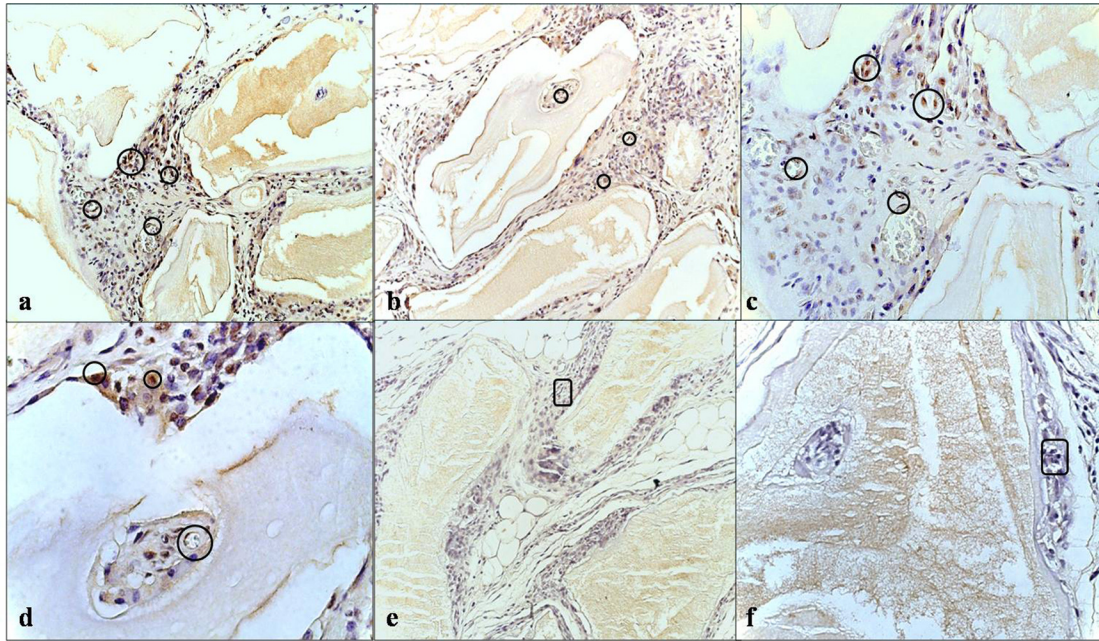
Slika 4.33. Imunoekspresija VEGFR-a 2 u implantima MPE tipa dve nedelje nakon implantacija. IHC: a) 200×; b) 200×; c) 400×; d) 400×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije pozitivne na VEGFR-2, pravougaonik - ćelije negativne na VEGFR-2. Tkivo između MMK granula i uz granule bogato VEGFR-2 pozitivnim ćelijama.



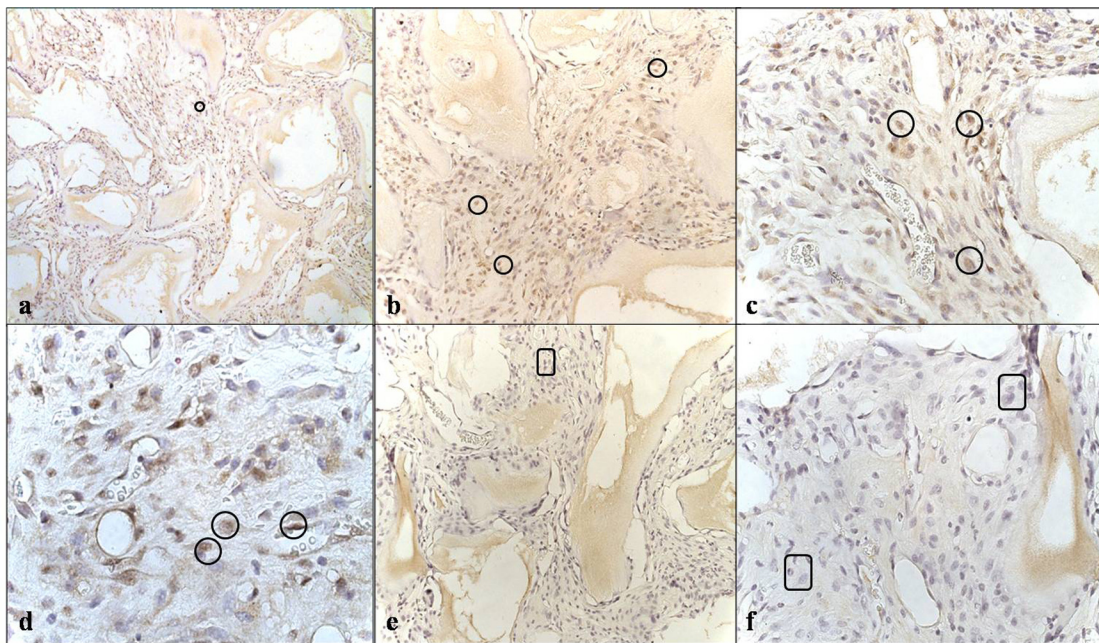
Slika 4.34. Imunoekspresija VEGFR-a 2 u implantima MPE tipa osam nedelja nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 400×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije pozitivne na VEGFR-2, pravougaonik - ćelije negativne na VEGFR-2. VEGFR-2 pozitivne ćelije prisutne su uz MMK granule, u tkivu udaljenom od MMK granula i u ćelijama zida krvnog suda.



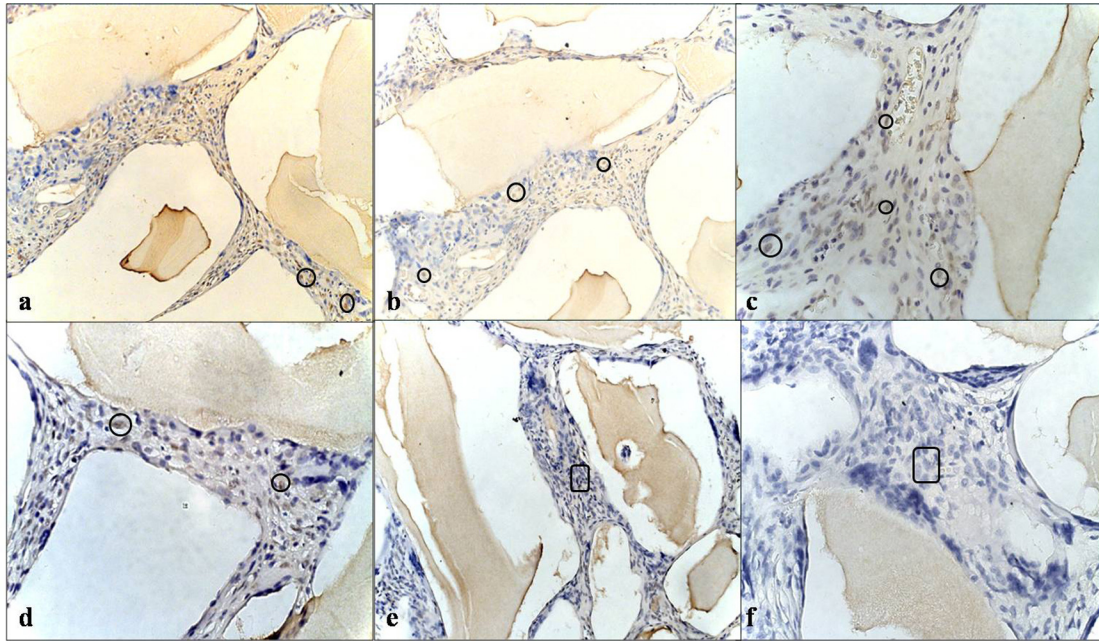
Slika 4.35. Imunoekspresija VEGFR-a 2 u implantima MPO tipa dve nedelje nakon implantacija. IHC: a) 200×; b) 200×; c) 400×; d) 630×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije pozitivne na VEGFR-2, pravougaonik - ćelije negativne na VEGFR-2. Veliki broj VEGFR-2 pozitivnih ćelija u intergranularnom prostoru implanata.



Slika 4.36. Imunoekspresija VEGFR-a 2 u implantima MPO tipa osam nedelja nakon implantacija. IHC: a) 200×; b) 200×; c) 400×; d) 630×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije pozitivne na VEGFR-2, pravougaonik - ćelije negativne na VEGFR-2. Jaka imunoekspresija VEGFR-a 2 uz granule MMK i između njih, u ćelijama zida krvnih sudova koji se nalaze u intergranularnom prostoru i u okviru struktura koje liče na osteone.



Slika 4.37. Imunoekspresija VEGFR-a 2 u implantima MPEO tipa dve nedelje nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 630×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije pozitivne na VEGFR-2, pravougaonik - ćelije negativne na VEGFR-2. VEGFR-2 pozitivne ćelije se zapažaju u intergranularnim prostorima implanata i u ćelijama zida krvnih sudova.



Slika 4.38. Imunoekspresija VEGFR-a 2 u implantima MPEO tipa osam nedelja nakon implantacija. IHC: a) 200×; b) 200×; c) 400×; d) 400×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije pozitivne na VEGFR-2, pravougaonik - ćelije negativne na VEGFR-2. VEGFR-2 pozitivne ćelije najprisutnije u zidu krvnih sudova, ali se mogu zapaziti i u intergranularnom prostoru.

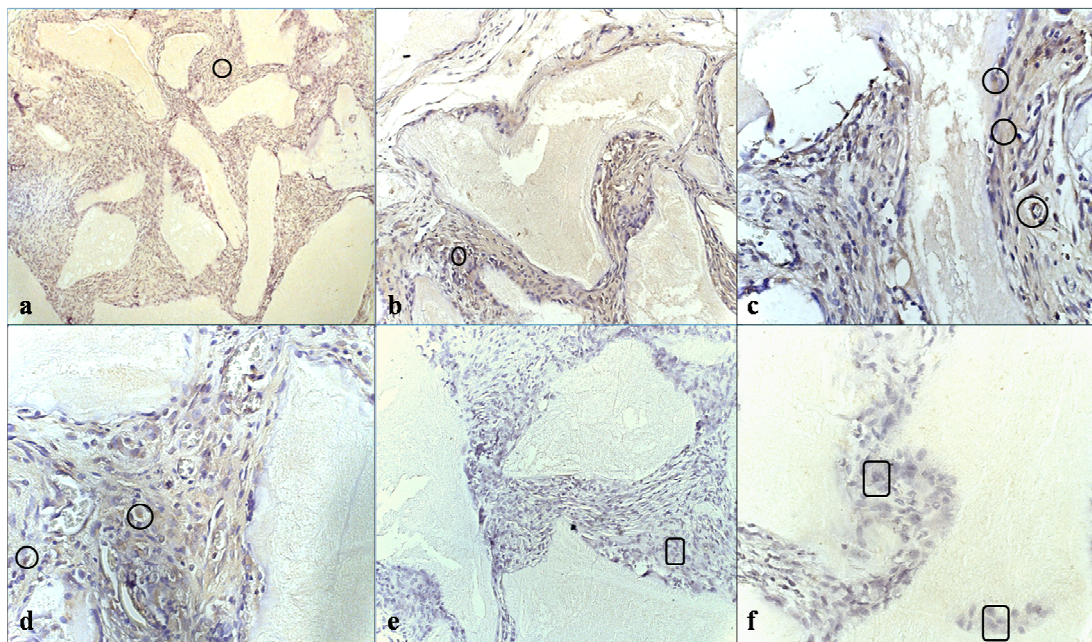
U implantima MPO tipa, dve nedelje posle implantacija se može uočiti veliki broj VEGFR-2 pozitivnih ćelija, kojima je skoro svako polje isečka implanta ispunjeno (Slika 4.35.a, b, c i d). Nakon osam nedelja od implantacija, imunoekspresija VEGFR-a 2 u MPO implantima ne jenjava ni uz granule MMK (Slika 4.36.a), niti između njih (Slike 4.36.b i c), niti u zidu krvnih sudova (Slika 4.36.c). Na prisustvo krvnih sudova u strukturama koje liče na osteone, koje prožimaju granule MMK, ukazuju VEGFR-2 pozitivne ćelije zida krvnih sudova (Slike 4.36.b i d).

Posle dve nedelje od implantacija, u implantima MPEO tipa, tkivni prostori su bogati VEGFR-2 pozitivnim ćelijama, a pozitivnih ćelija ima i u zidu krvnih sudova (Slike 4.37.a, b, c i d). Osam nedelja nakon implantacija, ćelije pozitivne na VEGFR-2 su najbrojnije u zidu krvnih sudova, dok je u tkivu između MMK granula nešto slabija ekspresija ovog proteina, nego dve nedelje nakon implantacija (Slike 4.38.a, b, c i d).

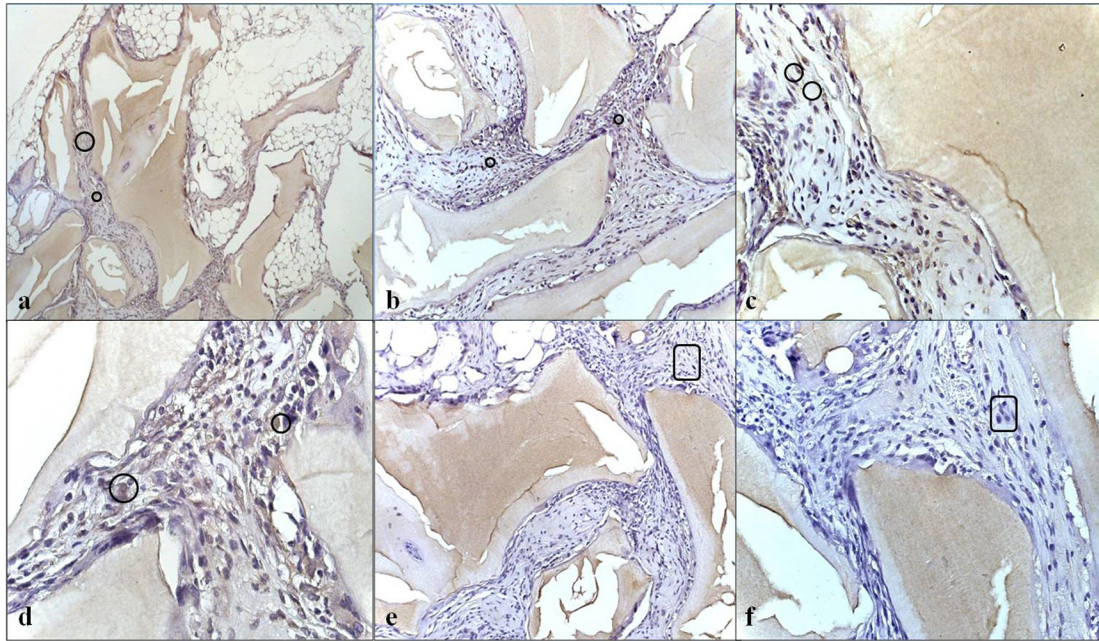
4.2.3.2. Imunoekspresija VCAM-a 1

Nakon dve nedelje od implantacija, tkivni matriks i pojedinačne ćelije u implantima sačinjenim samo od MMK su VCAM-1 pozitivni (Slike 4.39.a, b, c i d). Posle osam nedelja od implantacija, imunoekspresija VCAM-a 1 u tkivu je slabija nego na dve nedelje od implantacija, ali pojedinačne ćelije zadržavaju imunoekspresiju VCAM-a 1 (Slike 4.40.a, b, c i d).

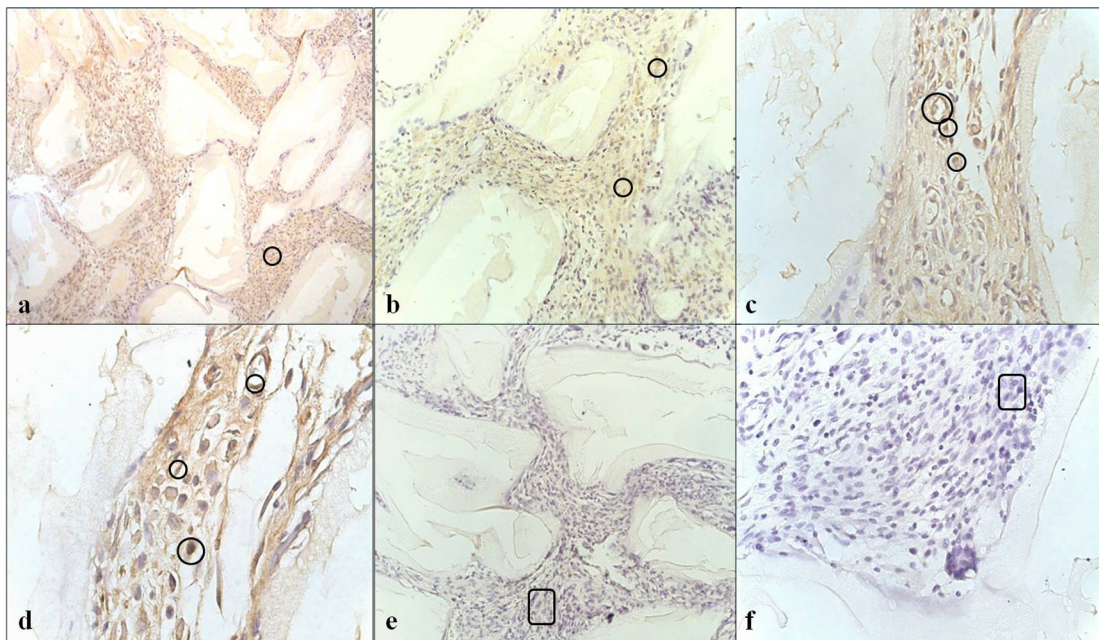
Dve nedelje nakon implantacija, VCAM-1 pozitivne ćelije uočavaju se u intergranularnom prostoru grupe implanata koja je sadržala samo MMK i PRP (Slike 4.41.a, b, c i d). Slična distribucija VCAM-1 pozitivnih ćelija u ovom tipu implanata postoji i osam nedelja nakon implantacija, ali je sada imunoekspresija VCAM-a 1 izraženija u tkivu između MMK granula u odnosu na prethodnu tačku posmatranja (Slike 4.42.a, b, c i d).



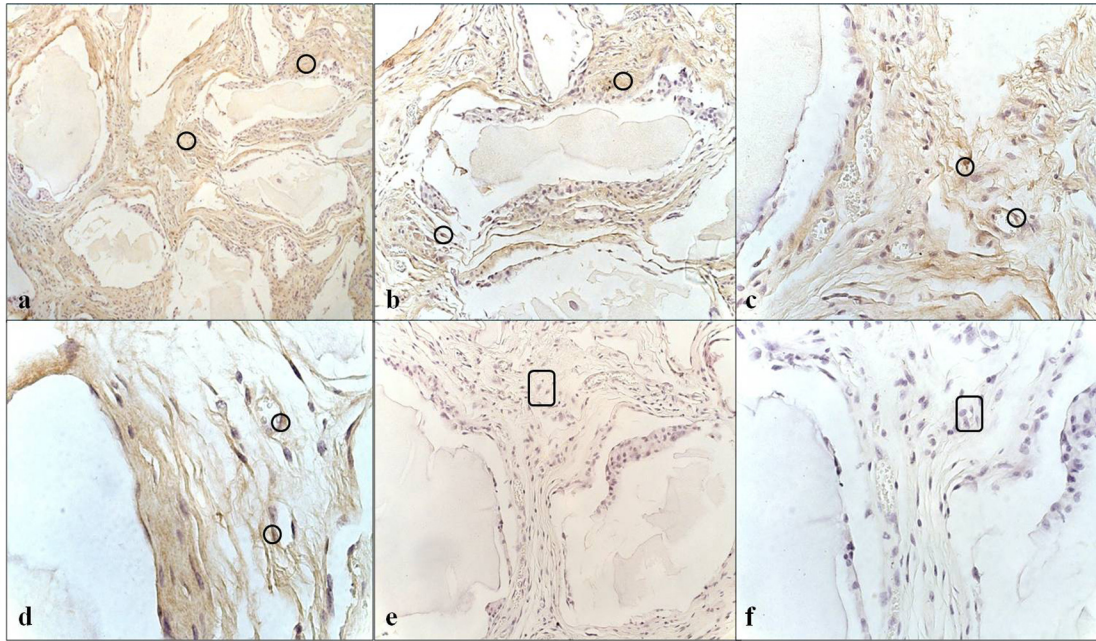
Slika 4.39. Imunoekspresija VCAM-a 1 u implantima MM tipa dve nedelje nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 400×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije i tkivni matriks pozitivni na VCAM-1, pravougaonik - ćelije i tkivni matriks negativni na VCAM-1. Intenzivna imunoekspresija VCAM-a 1 u tkivnom matriksu i pojedinačnim ćelijama.



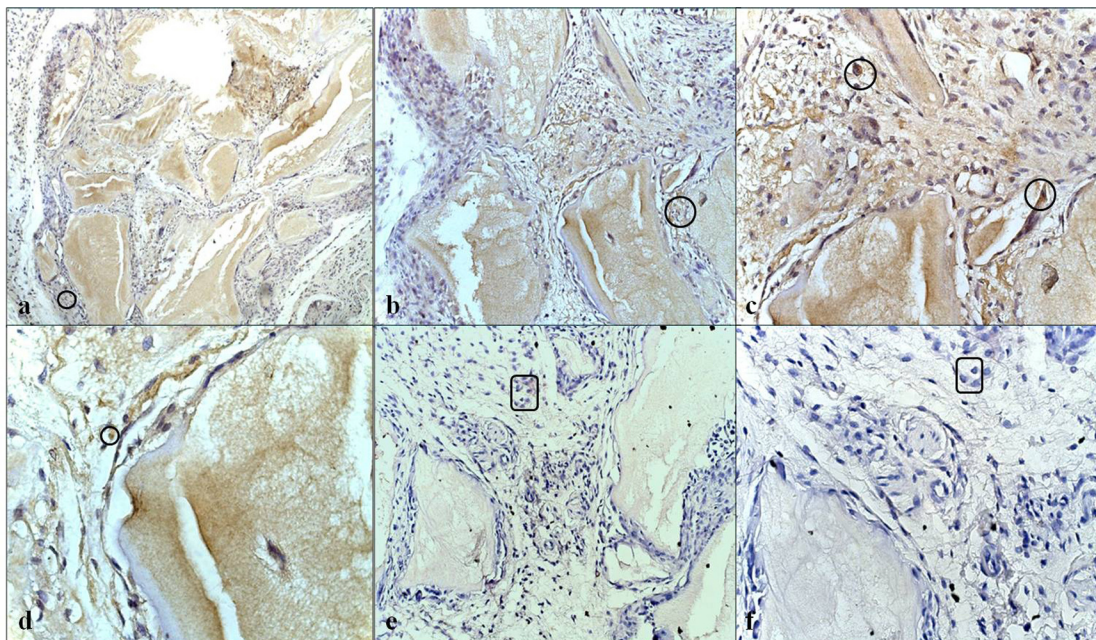
Slika 4.40. Imunoekspresija VCAM-a 1 u implantima MM tipa osam nedelja nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 400×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije i tkivni matriks pozitivni na VCAM-1, pravougaonik - ćelije i tkivni matriks negativni na VCAM-1. Uočava se slaba imunoekspresija VCAM-a 1 u tkivnom matriksu, ali pojedinačne ćelije pokazuju jaku imunoekspresiju ovog proteina.



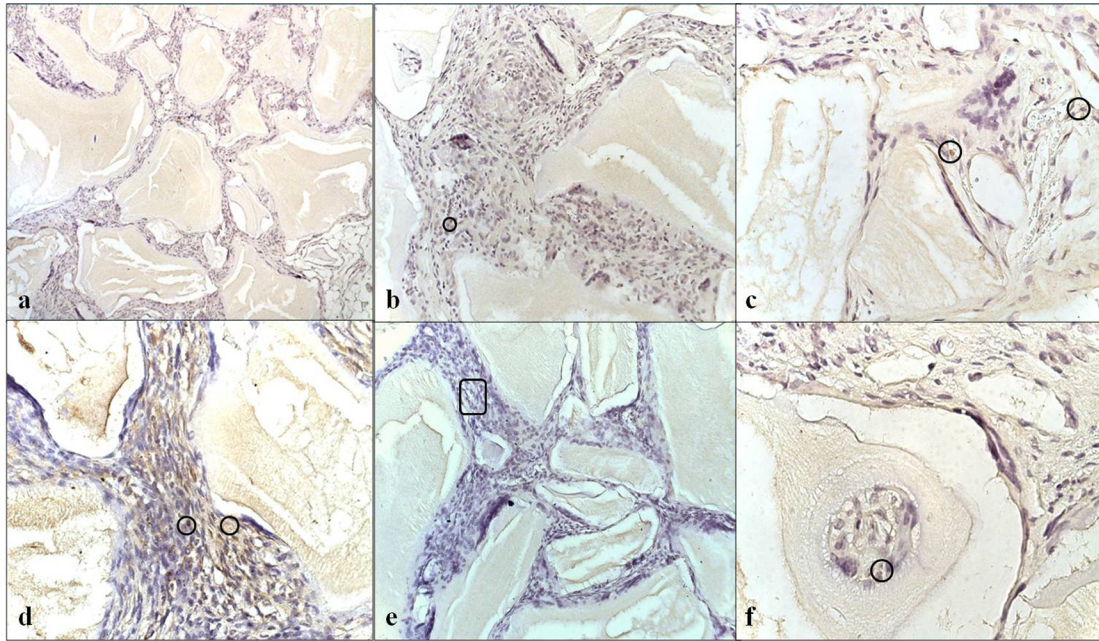
Slika 4.41. Imunoekspresija VCAM-a 1 u implantima MP tipa dve nedelje nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 400×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije i tkivni matriks pozitivni na VCAM-1, pravougaonik - ćelije i tkivni matriks negativni na VCAM-1. VCAM-1 pozitivne ćelije najprisutnije su u intergranularnom prostoru.



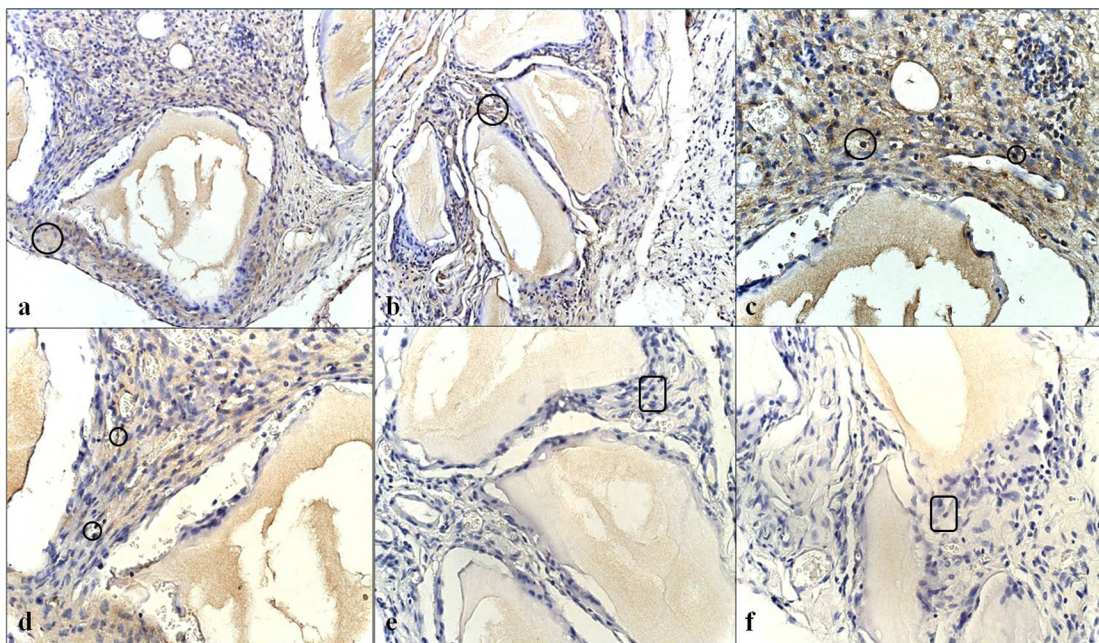
Slika 4.42. Imunoekspresija VCAM-a 1 u implantima MP tipa osam nedelja nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 400×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije i tkivni matriks pozitivni na VCAM-1, pravougaonik - ćelije i tkivni matriks negativni na VCAM-1. Imunoekspresija VCAM-a 1 najizraženija u tkivu između MMK granula.



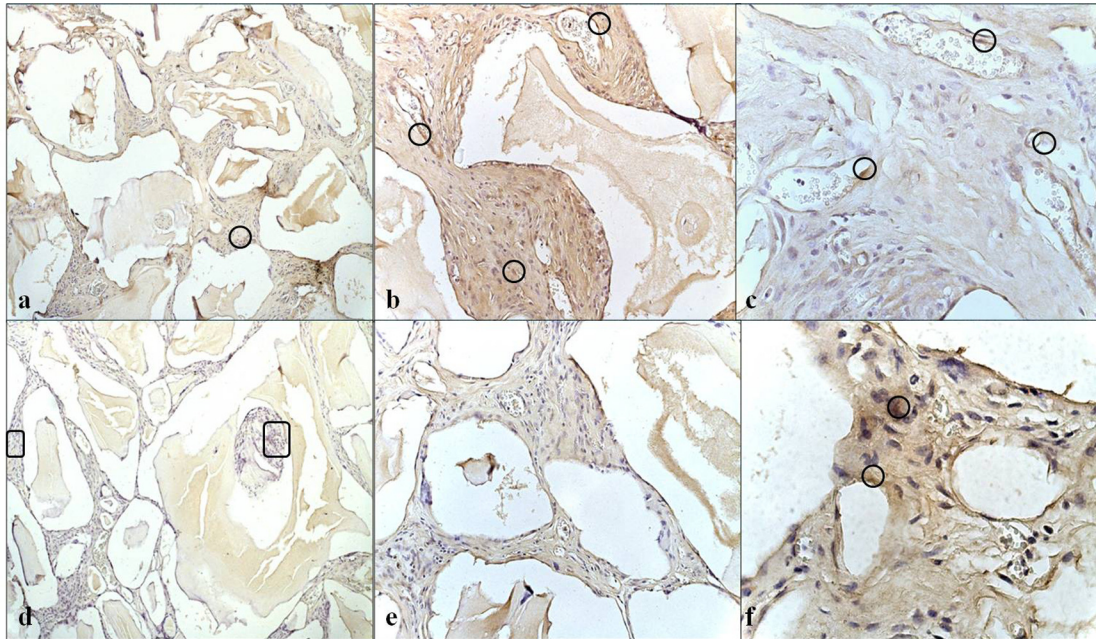
Slika 4.43. Imunoekspresija VCAM-a 1 u implantima MPD tipa dve nedelje nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 630×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije i tkivni matriks pozitivni na VCAM-1, pravougaonik - ćelije i tkivni matriks negativni na VCAM-1. Imunoekspresija VCAM-a 1 izražena je u tkivu između MMK granula.



Slika 4.44. Imunoekspresija VCAM-a 1 u implantima MPD tipa osam nedelja nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 400×; e) negativna kontrola, 200×; f) 630×. Krug - ćelije i tkivni matriks pozitivni na VCAM-1, pravougaonik - ćelije i tkivni matriks negativni na VCAM-1. Imunoekspresija VCAM-a 1 je slaba, ali je intenzivnija u matriksu, nego u pojedinačnim ćelijama, a zapaža se i u strukturama koje liče na osteone.



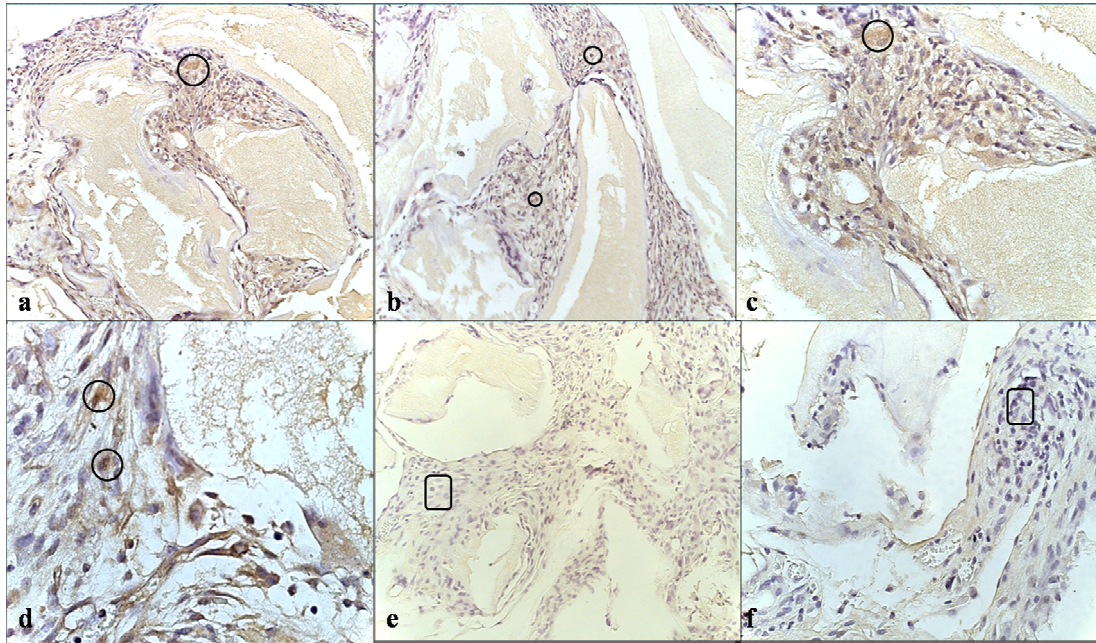
Slika 4.45. Imunoekspresija VCAM-a 1 u implantima MPE tipa dve nedelje nakon implantacija. IHC: a) 200×; b) 200×; c) 400×; d) 400×; e) negativna kontrola, 400×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije i tkivni matriks pozitivni na VCAM-1, pravougaonik - ćelije i tkivni matriks negativni na VCAM-1. Umerena imunoekspresija VCAM-a 1 zapaža se uz granule MMK i između njih.



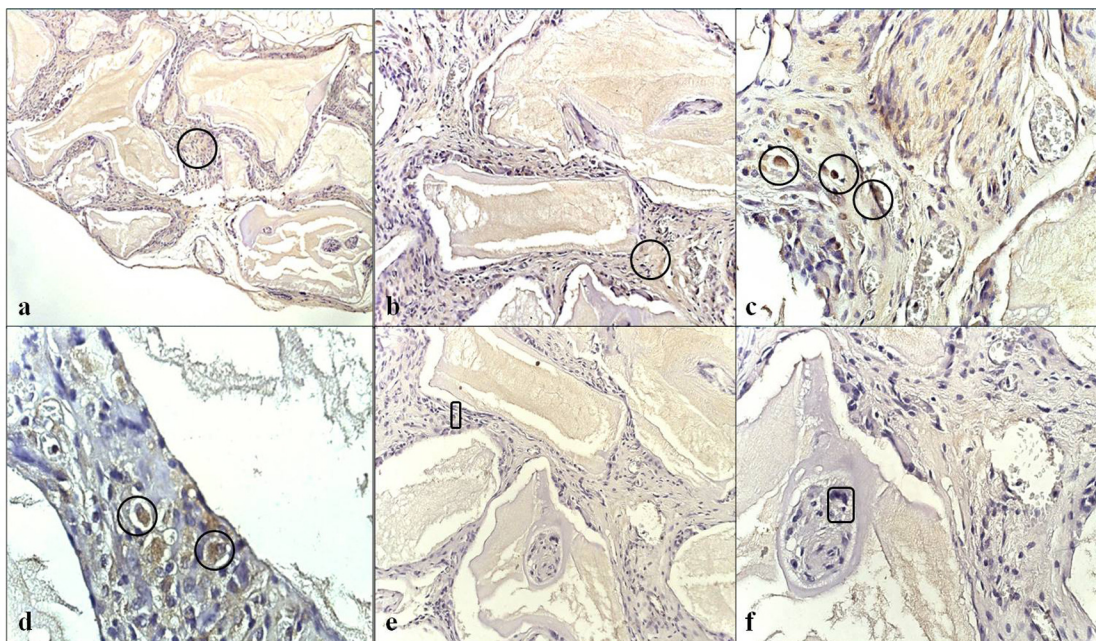
Slika 4.46. Imunoekspresija VCAM-a 1 u implantima MPE tipa osam nedelja nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) negativna kontrola, 100×; e) 200×; f) 630×. Krug - ćelije i tkivni matriks pozitivni na VCAM-1, pravougaonik - ćelije i tkivni matriks negativni na VCAM-1. VCAM-1 pozitivni matriks, ćelije zida krvnih sudova i ćelije u okviru struktura koje liče na osteone.

Imunoekspresija VCAM-a 1 u implantima sa MMK, PRP i neindukovanim ADSC je nakon dve nedelje od implantacija intenzivna u intergranularnom prostoru (Slike 4.43.a, b, c i d). U implantima MPD tipa ekstrahovanim osam nedelja nakon implantacija, mali je broj VCAM-1 pozitivnih ćelija u tkivu između granula MMK (Slike 4.44.c i d), dok je obojenost blago intenzivnija uz same granule (Slika 4.44.d). Pozitivne ćelije nalaze se i u strukturama koje liče na osteone (Slika 4.44.f).

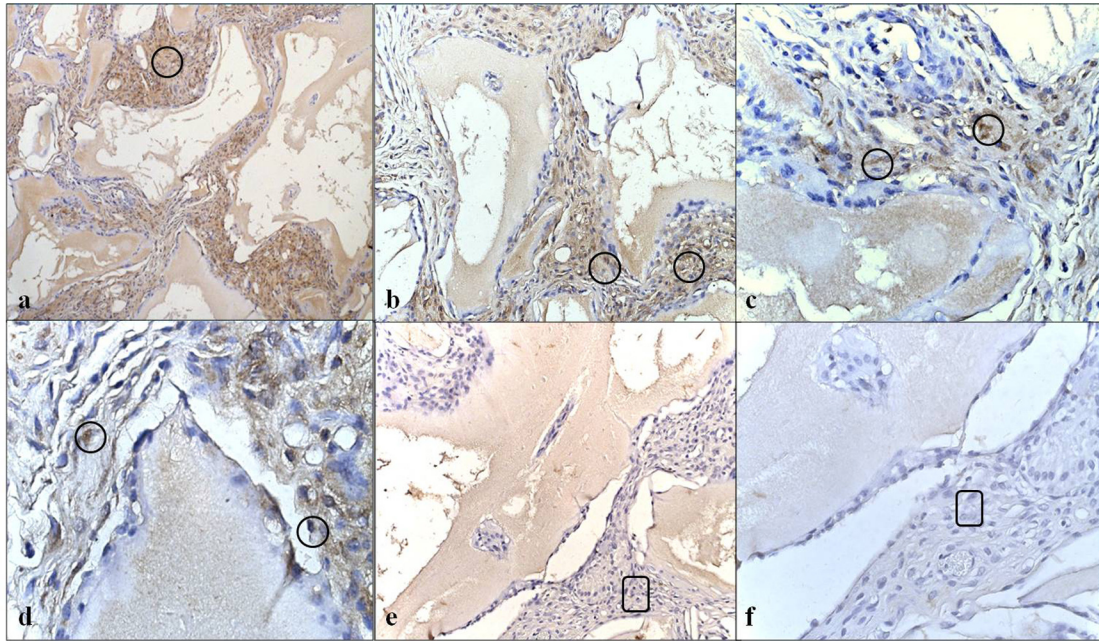
Posle dve nedelje od implantacija implanata sa MMK, PRP i ADSC indukovanim *in vitro* ka endotelskim ćelijama, umerena imunoekspresija VCAM-a 1 primećuje se uz granule MMK (Slike 4.45.a i b) i između njih (Slike 4.45.c i d). Nakon osam nedelja od implantacija, VCAM-1 pozitivnost prožima tkivo između granula MMK (Slike 4.46.a i b), a pozitivne su i ćelije zida krvnih sudova (Slika 4.46.c) i ćelije u okviru struktura koje liče na osteone (Slika 4.46.d).



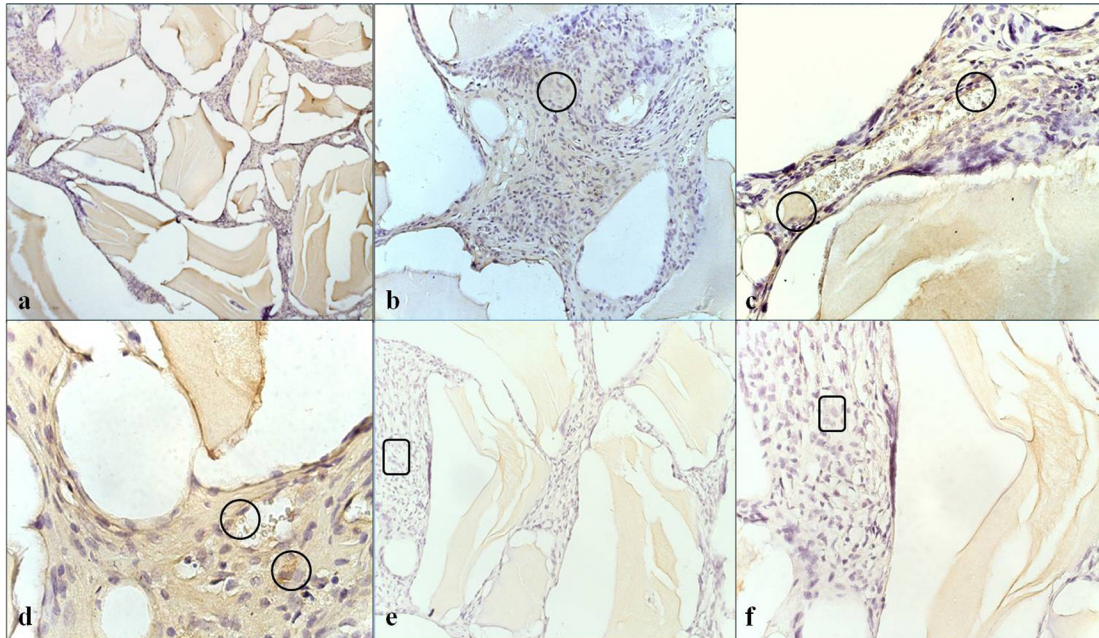
Slika 4.47. Imunoekspresija VCAM-a 1 u implantima MPO tipa dve nedelje nakon implantacija. IHC: a) 200×; b) 200×; c) 400×; d) 630×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije i tkivni matriks pozitivni na VCAM-1, pravougaonik - ćelije i tkivni matriks negativni na VCAM-1. Imunoekspresija VCAM-a 1 zapaža se i u matriksu i u samim ćelijama.



Slika 4.48. Imunoekspresija VCAM-a 1 u implantima MPO tipa osam nedelja nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 630×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije i tkivni matriks pozitivni na VCAM-1, pravougaonik - ćelije i tkivni matriks negativni na VCAM-1. Brojne VCAM-1 pozitivne ćelije u intergranularnim prostorima.



Slika 4.49. Imunoekspresija VCAM-a 1 u implantima MPEO tipa dve nedelje nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 630×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije i tkivni matiks pozitivni na VCAM-1, pravougaonik - ćelije i tkivni matiks negativni na VCAM-1. Jaka imunoekspresija VCAM-a 1 u matiksu implanata.



Slika 4.50. Imunoekspresija VCAM-a 1 u implantima MPEO tipa osam nedelja nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 630×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - ćelije i tkivni matiks pozitivni na VCAM-1, pravougaonik - ćelije i tkivni matiks negativni na VCAM-1. Imunoekspresija VCAM-a 1 u intergranularnom prostoru i u ćelijama zida krvnih sudova.

Imunoekspresija VCAM-a 1 u grupi implanata sa MMK, PRP i ADSC koje su *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama, nakon dve nedelje od implantacija postoji i u matriksu (Slika 4.47.a, b i c) i u pojedinačnim ćelijama (Slika 4.47.d). VCAM-1 pozitivne ćelije su još brojnije u implantima MPO tipa osam nedelja posle implantacija u odnosu na prethodnu tačku posmatranja (Slika 4.48.a, b, c i d).

Intenzivna obojenost tkivnog matriksa, kao pokazatelj VCAM-1 imunoekspresije, uočava se u implantima sa MMK, PRP i ADSC indukovanim *in vitro* ka endotelskim i osteogenim ćelijama nakon dve nedelje od implantacija (Slike 4.49.a, b, c i d). U ovim implantima, osam nedelja posle implantacija, pozitivni su tkivni matriks uz same granule MMK (Slika 4.50.a), deo matriksa udaljen od granula (Slika 4.50.b) i ćelije zida krvnih sudova (Slike 4.50.c i d).

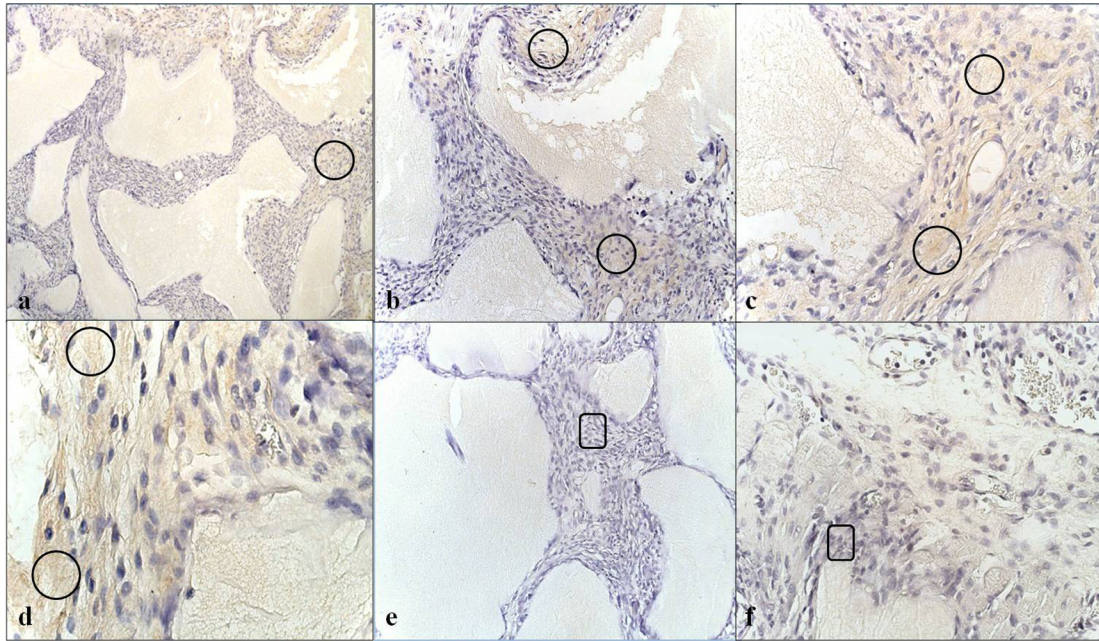
4.2.3.3. Imunoekspresija osteokalcina

Između granula MMK, u grupi implanata koji su sadržali samo MMK, nakon dve nedelje od implantacija se sporadično uočavaju osteokalcin-pozitivna polja (Slike 4.51.a, b, c i d). Distribucija ovog proteina u MM implantima je ista i nakon osam nedelja od implantacija, ali je intenzitet imunoekspresije slabiji (Slike 4.52.a, b, c i d).

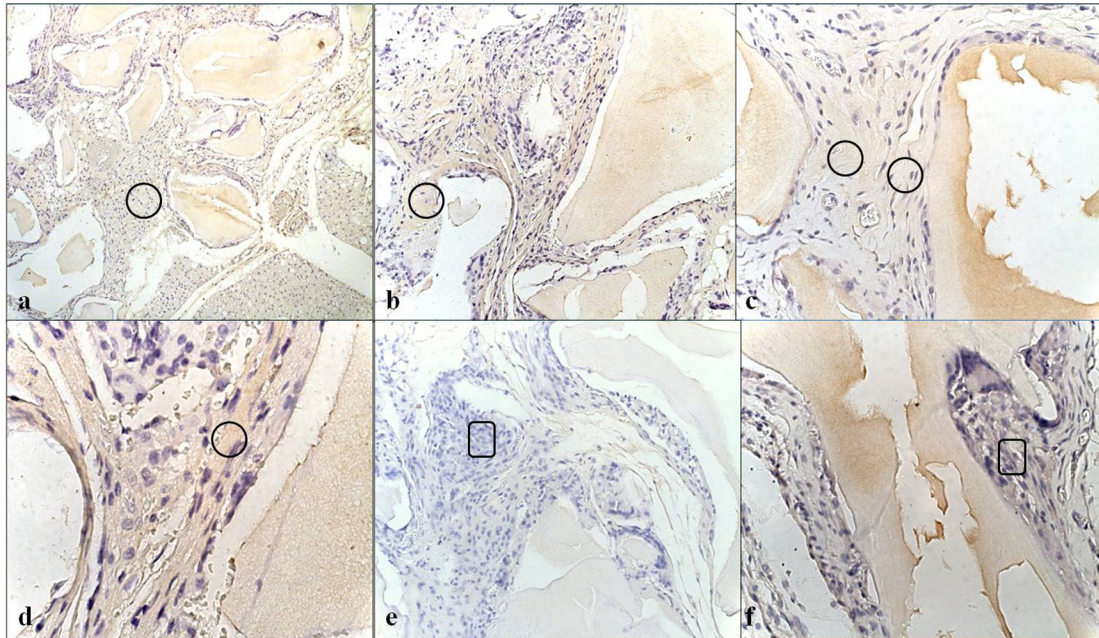
Slaba imunoekspresija osteokalcina zapaža se dve nedelje nakon implantacija u grupi implanata čije su komponente samo MMK i PRP (Slike 4.53.a, b, c, d). Osam nedelja nakon implantacija, mesta uz granule MMK sadrže više depozita osteokalcina nego mesta udaljena od granula (Slike 4.54.a, b, c, d).

Depoziti osteokalcina u MPD implantima, dve nedelje od implantacija se mogu uočiti uz granule MMK (Slike 4.55.a, b, c i d). Posle osam nedelja od implantacija, u MPD implantima je ekspresija osteokalcina slabija nego dve nedelje nakon implantacija i ograničena je na diskretne oblasti između i uz granule MMK (Slike 4.56.a, b, c i d).

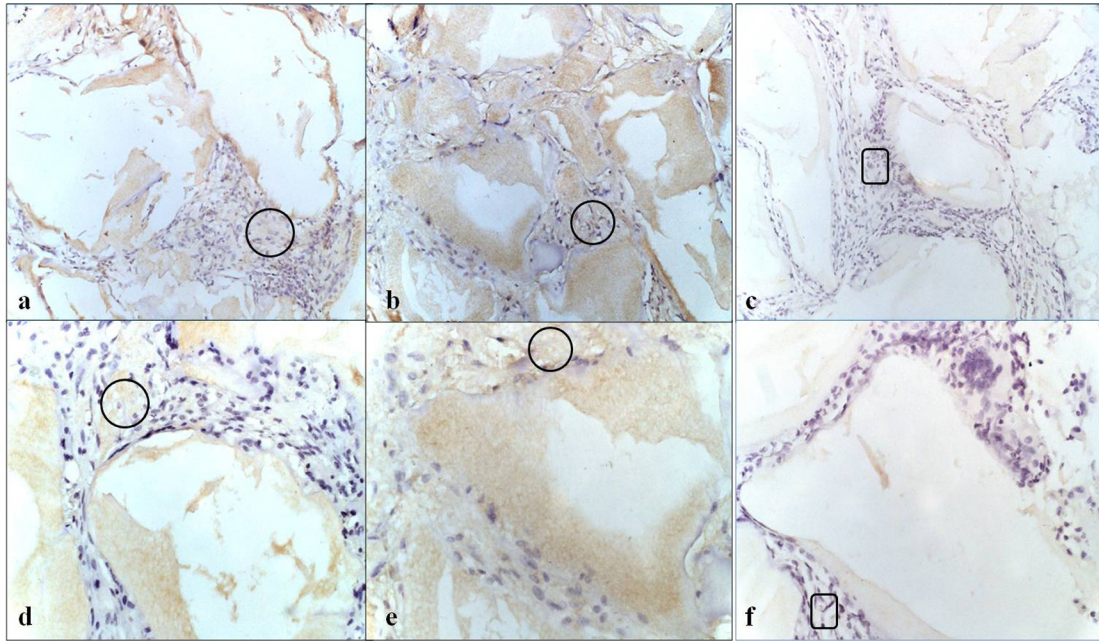
Imunoekspresija osteokalcina u matriksu implanata MPE tipa je nakon dve nedelje od implantacija umerena, kako periferno (Slika 4.57.a), tako i u prostorima uz granule MMK (Slike 4.57.b, c i d). Nakon osam nedelja od implantacija, imunoekspresija osteokalcina je izraženija nego dve nedelje nakon implantacija, a intergranularni prostori u MPE implantima su naročito bogati ovim proteinom (Slike 4.58.a, b, c i d).



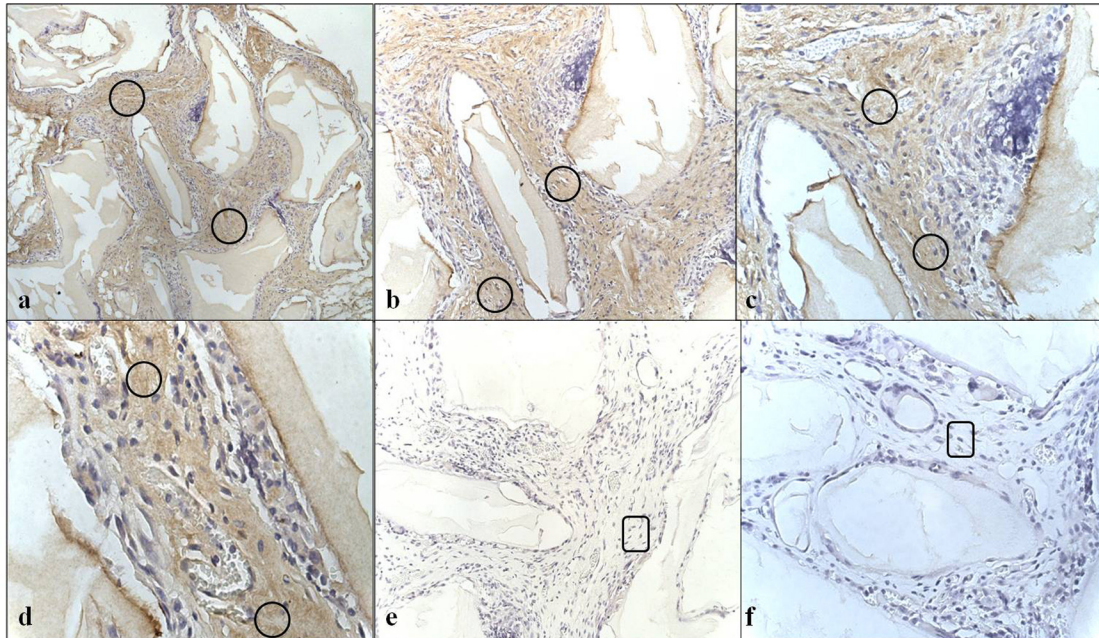
Slika 4.51. Imunoekspresija osteokalcina u implantima MM tipa dve nedelje nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 400×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - tkivni matriks pozitivan na osteokalcin, pravougaonik - tkivni matriks negativan na osteokalcin. Slaba imunoekspresija osteokalcina u matriksu.



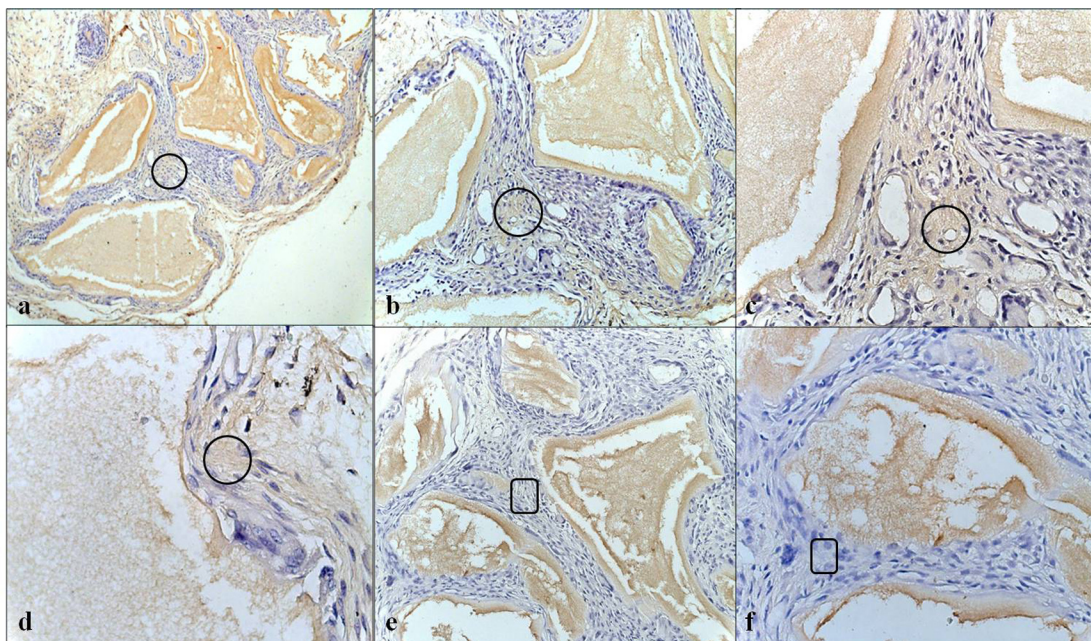
Slika 4.52. Imunoekspresija osteokalcina u implantima MM tipa osam nedelja nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 400×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - tkivni matriks pozitivan na osteokalcin, pravougaonik - tkivni matriks negativan na osteokalcin. Imunoekspresija osteokalcina u matriksu implanata je slaba.



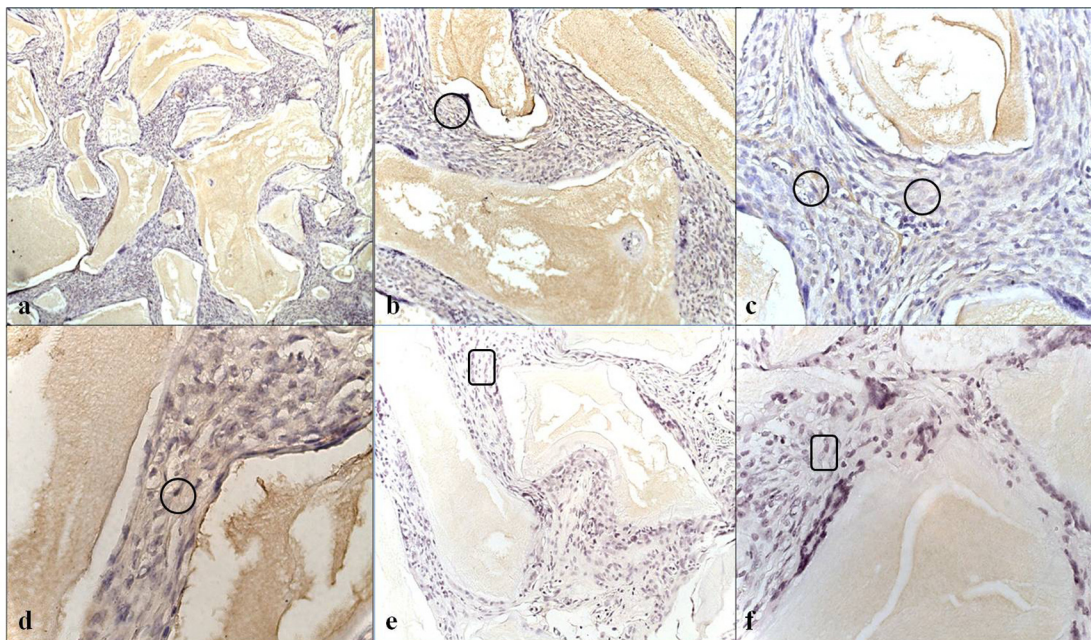
Slika 4.53. Imunoekspresija osteokalcina u implantima MP tipa dve nedelje nakon implantacija. IHC: a) 200 \times ; b) 200 \times ; c) negativna kontrola, 200 \times ; d) 400 \times ; e) 400 \times ; f) negativna kontrola, 400 \times . Krug - tkivni matriks pozitivan na osteokalcin, pravougaonik - tkivni matriks negativan na osteokalcin. Jaka imunoekspresija osteokalcina u intergranularnom prostoru.



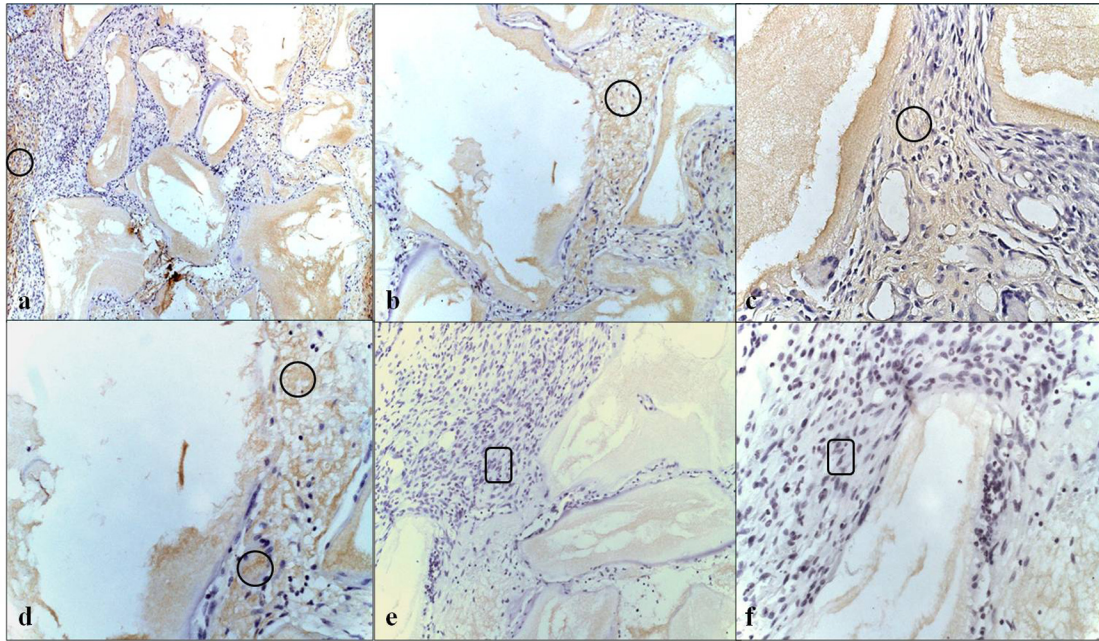
Slika 4.54. Imunoekspresija osteokalcina u implantima MP tipa osam nedelja nakon implantacija. IHC: a) 100 \times ; b) 200 \times ; c) 400 \times ; d) 630 \times ; e) negativna kontrola, 200 \times ; f) negativna kontrola, 400 \times . Krug - tkivni matriks pozitivan na osteokalcin, pravougaonik - tkivni matriks negativan na osteokalcin. Imunoekspresija osteokalcina u implantima je najintenzivnija uz MMK granule.



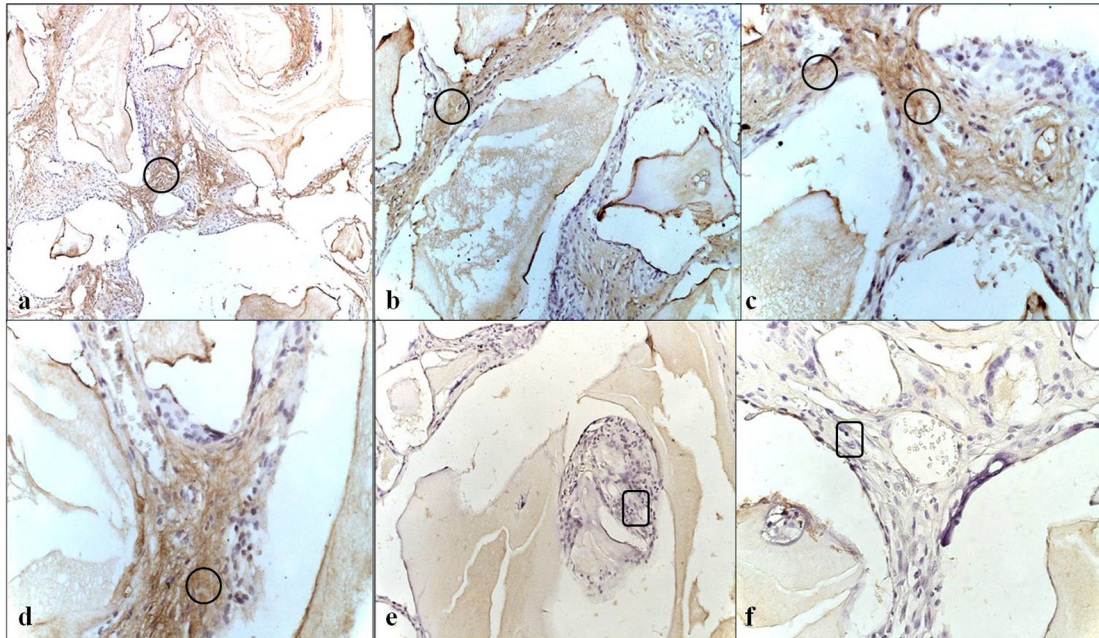
Slika 4.55. Imunoekspresija osteokalcina u implantima MPD tipa dve nedelje nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 630×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - tkivni matriks pozitivan na osteokalcin, pravougaonik - tkivni matriks negativan na osteokalcin. Tkivni matriks pozitivan na osteokalcin uz MMK granule.



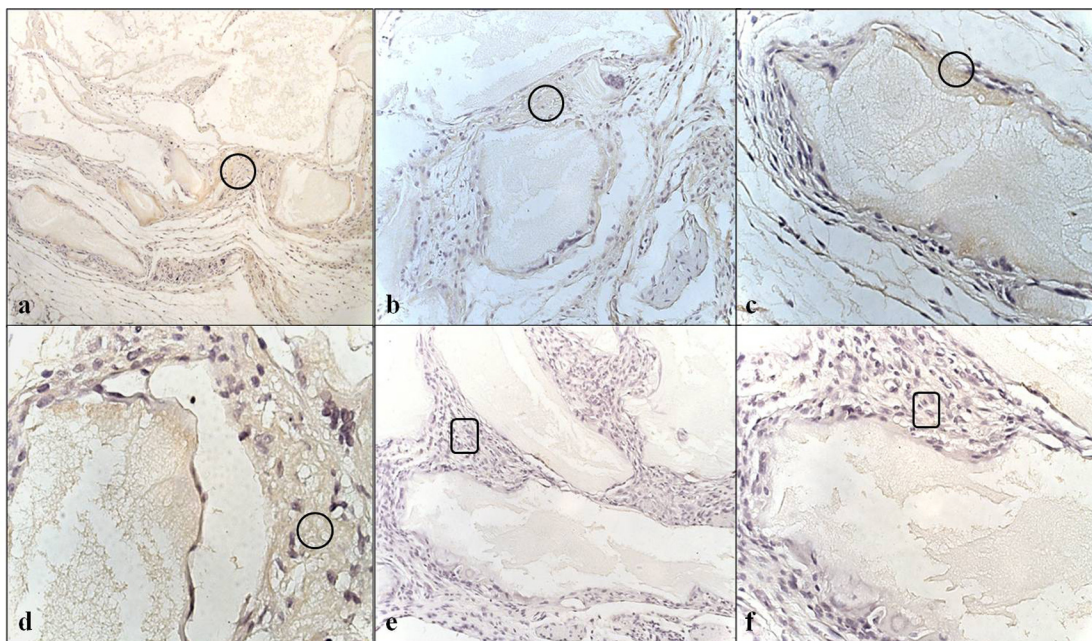
Slika 4.56. Imunoekspresija osteokalcina u implantima MPD tipa osam nedelja nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 630×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - tkivni matriks pozitivan na osteokalcin, pravougaonik - tkivni matriks negativan na osteokalcin. Slaba imunoekspresija osteokalcina uočava se pretežno uz MMK granule.



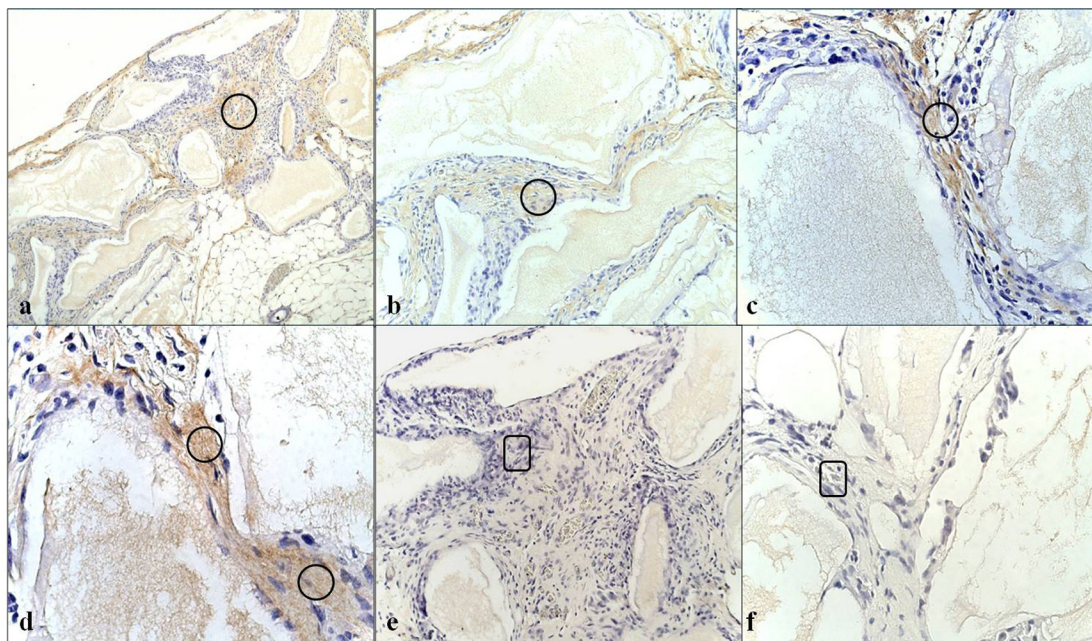
Slika 4.57. Imunoekspresija osteokalcina u implantima MPE tipa dve nedelje nakon implantacija. IHC: a) 100 \times ; b) 200 \times ; c) 400 \times ; d) 400 \times ; e) negativna kontrola, 200 \times ; f) negativna kontrola, 400 \times . Krug - tkivni matriks pozitivan na osteokalcin, pravougaonik - tkivni matriks negativan na osteokalcin. Umerena imunoekspresija osteokalcina zapaža se u unutrašnjosti i na periferiji implanata.



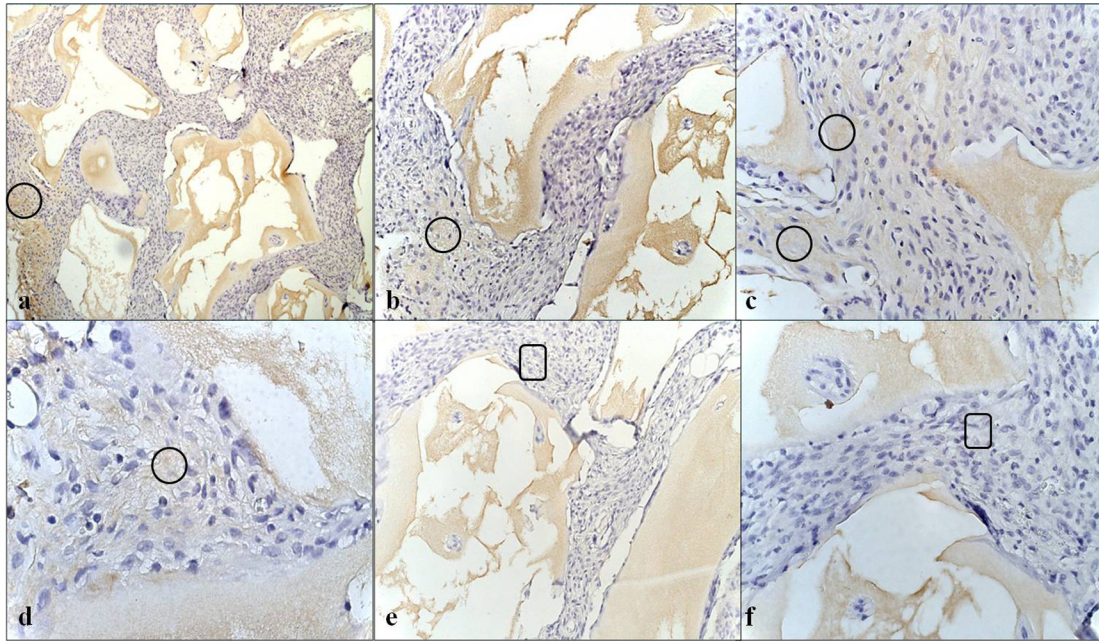
Slika 4.58. Imunoekspresija osteokalcina u implantima MPE tipa osam nedelja nakon implantacija. IHC: a) 100 \times ; b) 200 \times ; c) 400 \times ; d) 400 \times ; e) negativna kontrola, 200 \times ; f) negativna kontrola, 400 \times . Krug - tkivni matriks pozitivan na osteokalcin, pravougaonik - tkivni matriks negativan na osteokalcin. Izražena imunoekspresija osteokalcina u intergranularnim prostorima.



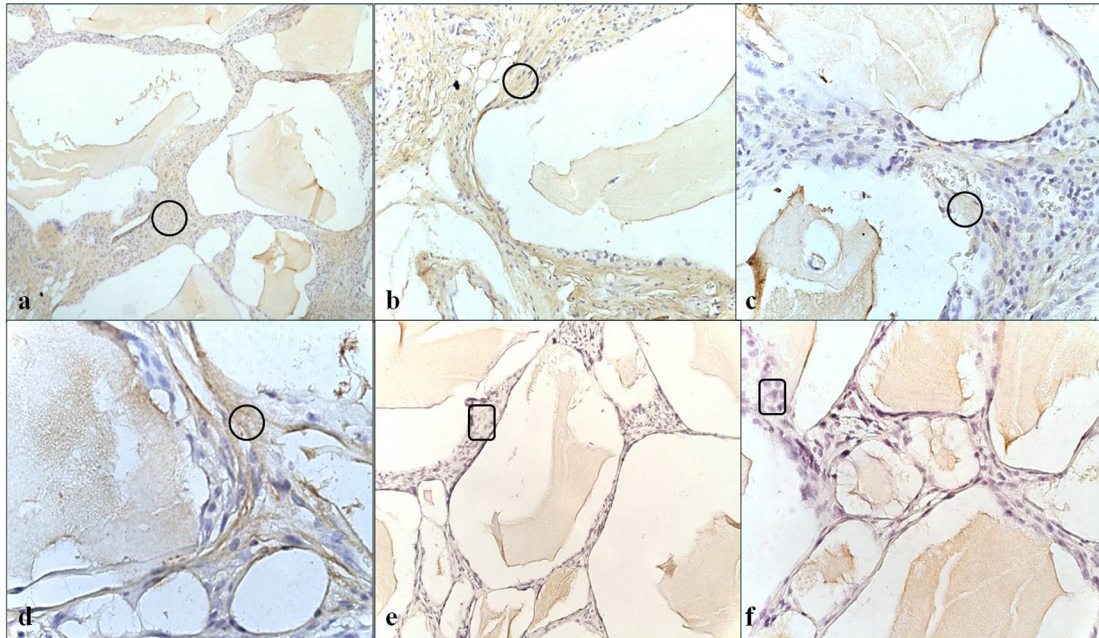
Slika 4.59. Imunoekspresija osteokalcina u implantima MPO tipa dve nedelje nakon implantacija. IHC: a) 100 \times ; b) 200 \times ; c) 400 \times ; d) 400 \times ; e) negativna kontrola, 200 \times ; f) negativna kontrola, 400 \times . Krug - tkivni matriks pozitivan na osteokalcin, pravougaonik - tkivni matriks negativan na osteokalcin. Diskretni depoziti osteokalcina u matriksu implanata i nešto intenzivnija imunoekspresija ovog proteina uz MMK granule.



Slika 4.60. Imunoekspresija osteokalcina u implantima MPO tipa osam nedelja nakon implantacija. IHC: a) 100 \times ; b) 200 \times ; c) 400 \times ; d) 630 \times ; e) negativna kontrola, 200 \times ; f) negativna kontrola, 400 \times . Krug - tkivni matriks pozitivan na osteokalcin, pravougaonik - tkivni matriks negativan na osteokalcin. Intenzivna imunoekspresija osteokalcina, posebno uz same MMK granule.



Slika 4.61. Imunoekspresija osteokalcina u implantima MPEO tipa dve nedelje nakon implantacija. IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) 400×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - tkivni matriks pozitivan na osteokalcin, pravougaonik - tkivni matriks negativan na osteokalcin. Umerena imunoekspresija osteokalcina prisutna i periferno i intergranularno u implantima.



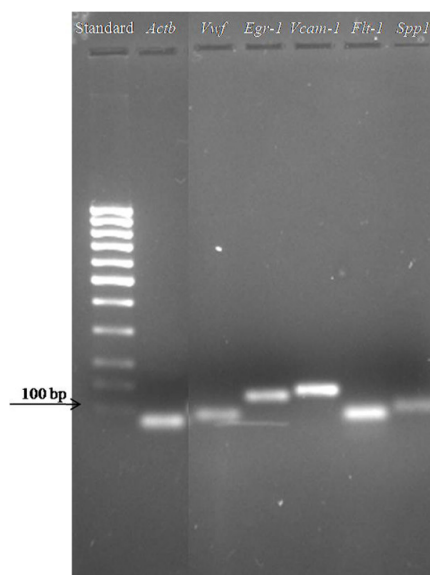
Slika 4.62. Imunoekspresija osteokalcina u implantima MPEO tipa osam nedelja nakon implantacija IHC: a) 100×; b) 200×; c) 400×; d) -, 400×; e) negativna kontrola, 200×; f) negativna kontrola, 400×. Krug - tkivni matriks pozitivan na osteokalcin, pravougaonik - tkivni matriks negativan na osteokalcin. Imunoekspresija osteokalcina u diskretnim delovima matriksa implanata.

Depoziti osteokalcina diskretni su u matriksu implanata MPO tipa ekstrahovanim dve nedelje nakon implantacija (Slike 4.59.a, b, c i d). Intenzivnija imunoekspresija osteokalcina zapaža se nakon osam nedelja od implantacija, posebno uz same granule MMK (Slike 4.60.a, b, c i d).

Posle dve nedelje od implantacija, u implantima sačinjenim od MMK, PRP i ADSC indukovanih *in vitro* ka endotelskim i osteogenim ćelijama, nalaze se depoziti osteokalcina koji prožimaju čitav tkivni matriks (Slike 4.61.a, b, c i d). Osam nedelja nakon implantacija, imunoekspresija osteokalcina se i dalje može uočiti u MPEO tipu implanata, ali je slabija nego dve nedelje posle implantacija (Slike 4.62.a, b, c i d).

4.2.4. Analiza kvaliteta i specifičnosti produkata qRT-PCR reakcije

Rezultat elektroforeze je prikazan na slici 4.63. Produkti qRT-PCR reakcije, u odnosu na fragmente iz standarda, zauzimaju položaj na gelu u zavisnosti od svoje veličine. Pokazano je da postoji potpuna podudarnost razdvojenih fragmenata qRT-PCR produkata na gelu i dužine amplicona navedene u specifikaciji proizvođača prajmera.



Slika 4.63. Analiza qRT-PCR produkata elektroforezom na gelu: prva kolona standard za dužinu fragmenata (standard), traka u standardu dužine 100 bp, druga kolona *Actb*, treća kolona *Vwf*, četvrta kolona *Egr-1*, peta kolona *Vcam-1*, šesta kolona *Flt-1*, sedma kolona *Spp1*.

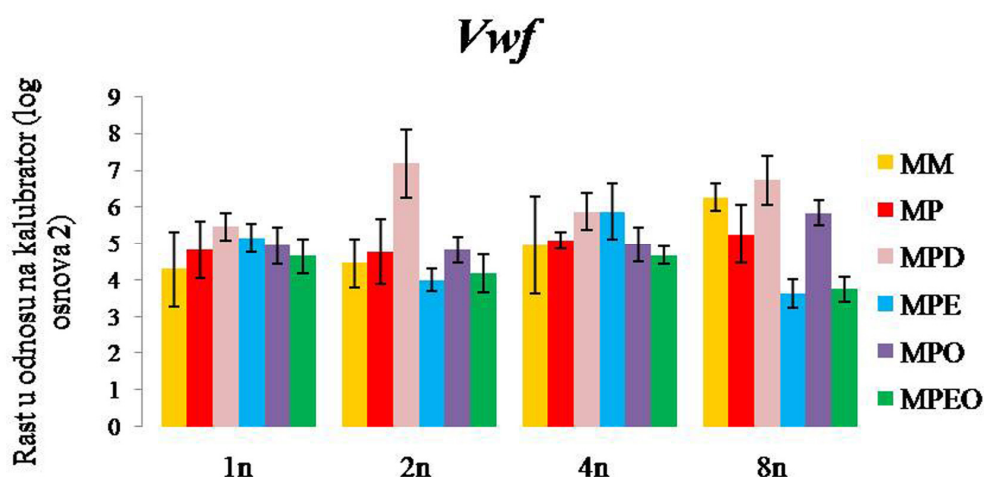
4.2.5. qRT-PCR analiza ekspresije gena markera endotelskih ćelija u implantima

4.2.5.1. Ekspresija gena markera endotelskih ćelija u implantima u odnosu na ADSC iz trećeg pasaža

Vwf gen

U odnosu na ADSC iz trećeg pasaža, ekspresija *Vwf*-a je u svim tipovima implanata pozitivno regulisana (Grafikon 4.6.). Nedelju dana nakon implantacija, ekspresija *Vwf* je najviša u implantima MPD tipa, a najniža u MM implantima. Posle dve nedelje od implantacija, takođe je najviša ekspresija *Vwf*-a u MPD, najniža u MPE tipu implanata. Ekspresija *Vwf*-a je nakon četiri nedelje od implantacija najviša u implantima grupa MPD i MPE, a najniža u MPEO grupi. U grupi MPD je i osam nedelja nakon imlantacija ekspresija *Vwf*-a viša nego u ostalim tipovima implanata, a najniža je u MPE grupi.

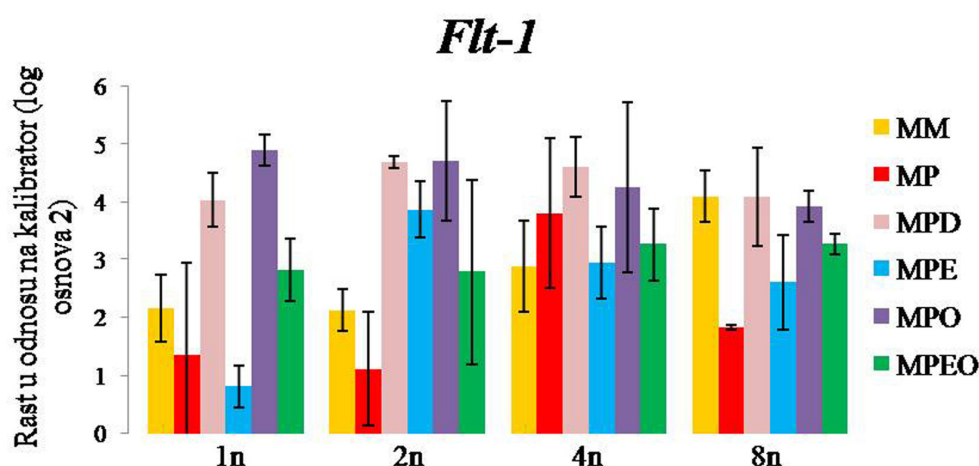
Ekspresija *Vwf*-a u grupi implanata u čijem sastavu je bio jedino MMK približno je na istom nivou jednu, dve i četiri nedelje nakon implantacija, a rast ekspresije *Vwf*-a u ovoj grupi postoji posle osam nedelja od implantacija. U implantima sa kombinacijom MMK i PRP, ekspresija *Vwf*-a je najviša osam nedelja nakon implantacija, iako ni u njoj nema velikih razlika u ekspresiji ovog gena između različitih tačaka posmatranja. Ekspresija *Vwf*-a u okviru MPD grupe implanata je najviša dve nedelje nakon implantacija. U implantima sačinjenim od MMK, PRP i ADSC koje su *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama, ekspresija *Vwf*-a je najviša četiri nedelje posle implantacija, a osam nedelja nakon implantacija opada. U implantima koji sadrže MMK, PRP i ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama, ekspresija *Vwf*-a raste od prve do osme nedelje nakon imlantacija. Ekspresija *Vwf*-a u implantima sa MMK, PRP i ADSC *in vitro* indukovanim ka endotelskim i osteogenim ćelijama je najviša jednu nedelju nakon implantacija, a na osam nedelja od implantacija je niža nego u ostalim tačkama posmatranja.



Grafikon 4.6. Dinamika relativne ekspresije *Vwf* gena u ispitivanim grupama implanata MM, MP, MPD, MPE, MPO i MPEO, u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija. MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama; n - nedelja.

Flt-1 gen

Ekspresija *Flt-1* gena je u svim tipovima implanata pozitivno regulisana (Grafikon 4.7.). Nakon jedne i nakon dve nedelje od implantacija, MPO grupa ima višu ekspresiju *Flt-a 1* u odnosu na sve ostale grupe implanata. Jednu nedelju nakon implantacija, u MPE implantima je ekspresija ovog gena najniža, a nakon dve nedelje od impantacija tu ulogu preuzimaju MP implanti. Ekspresija *Flt-a 1* je u implantima MPD tipa najviša četiri nedelje od implantacija, a u istoj tački posmatranja je u MM implantima najniža. Posle osam nedelja od implantacija, MM i MPD implanti poseduju najvišu ekspresiju *Flt-a 1*, a MP implanti najnižu.

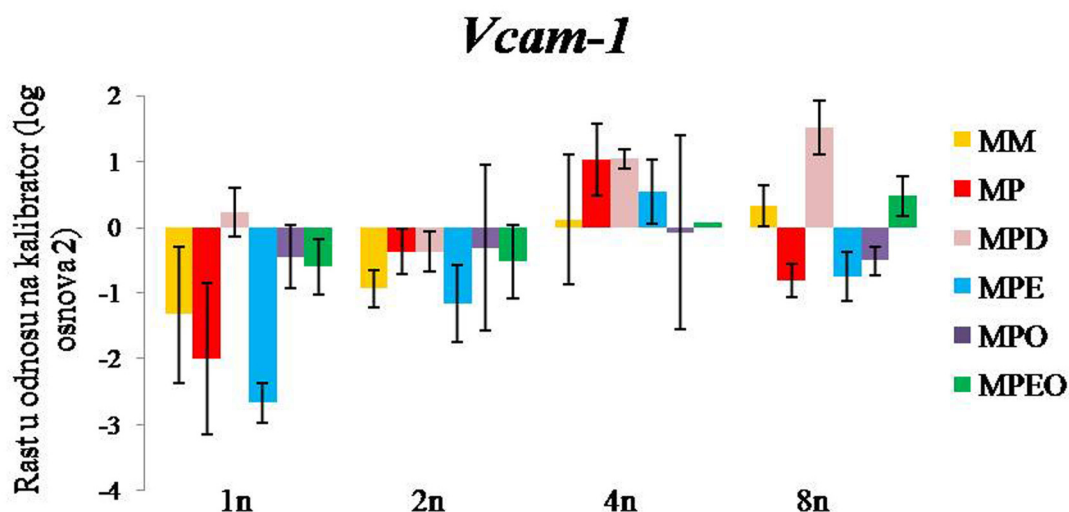


Grafikon 4.7. Dinamika relativne ekspresije *Flt-1* gena u ispitivanim grupama implanata MM, MP, MPD, MPE, MPO i MPEO, u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija. MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama; n - nedelja.

U implantima čija je jedina komponenta MMK, ekspresija *Flt-a 1* je na istom nivou nakon jedne i nakon dve nedelje od implantacija, a u narednim tačkama posmatranja raste. Gen za *Flt-1* u implantima MP tipa ima najvišu ekspresiju nakon četiri nedelje od implantacija, a osam nedelja nakon implantacija ekspresija ovog gena opada. U implantima dobijenim kombinacijom MMK, PRP i neindukovanih ADSC, nema velikih razlika u ekspresiji ovog gena između tačaka posmatranja, ali je tokom čitavog *in vivo* eksperimentalnog perioda visoka. U implantima MPE tipa, ekspresija *Flt-a 1* raste nakon dve nedelje od implantacija u odnosu na jednu nedelju nakon implantacija, da bi u naredne dve tačke posmatranja došlo do postepenog, blagog pada nivoa ekspresije ovog gena. U implantima MPO tipa je ekspresija *Flt-a 1* najviša nedelju dana od implantacija, u svakoj od narednih tačaka posmatranja u odnosu na prethodnu ekspresija ovog gena opada. U implantima MPEO tipa nema velike razlike u ekspresiji *Flt-a 1* između tačaka posmatranja, a najviša ekspresija ovog gena je postignuta četiri nedelje nakon implantacija.

Vcam-1 gen

Ekspresija *Vcam-a 1* je jednu nedelju nakon implantacija pozitivno regulisana samo u MPD tipu implanata (Grafikon 4.8.). Dve nedelje od implantacija, ekspresija *Vcam-a 1* je najviša u implantima MPO tipa, ali je u ovim i svim ostalim tipovima implanata negativno regulisana. Četiri nedelje posle implantacija, u grupi implanata MP tipa, ekspresija ovog gena je najviša, ali je i u grupama implanata MPD i MPE tipa, takođe pozitivno regulisana. Nakon osam nedelja od implantacija ekspresija *Vcam-a 1* je najviša u MPD grupi.



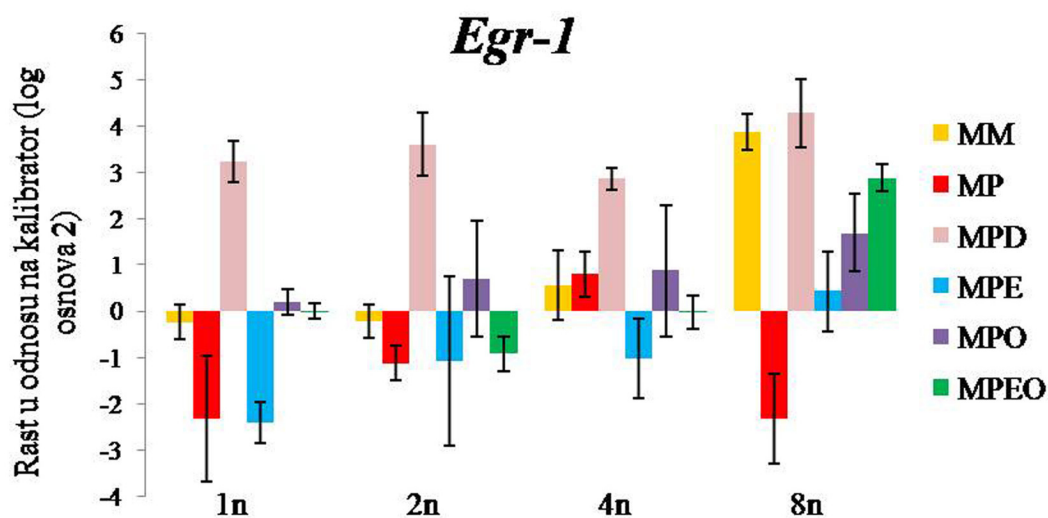
Grafikon 4.8. Dinamika relativne ekspresije *Vcam-1* gena u ispitivanim grupama implanata MM, MP, MPD, MPE, MPO i MPEO u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija. MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama; n - nedelja.

U implantima MM tipa, ekspresija *Vcam-a 1* raste od prve do osme nedelje nakon implantacija, dok je u implantima MP tipa ekspresija *Vcam-a 1* najviša četiri nedelje od implantacija. U grupi implanata sa neindukovanim ADSC, ekspresija *Vcam-a 1* je pozitivno regulisana jednu nedelju nakon implantacija, negativno je regulisana dve nedelje posle implantacija, te ponovo raste nakon četiri nedelje od implantacija i najviša je osam nedelja posle implantacija. Ekspresija *Vcam-a 1* je u implantima sa ćelijama

indukovanim u endotelske (MPE) pozitivno regulisana jedino četiri nedelje nakon implantacija, dok je u grupi sa osteogeno indukovanim ćelijama najviša ekspresija ovog gena u istom terminu, ali je i tada kao i u ostalim terminima negativno regulisana. Stalni rast, od prve do poslednje tačke posmatranja, zabeležen je u implantima koji sadrže kombinaciju ADSC *in vitro* indukovanih u endotelske i osteogene ćelije.

Egr-1 gen

U implantima MPD tipa, u svakoj tački posmatranja je ekspresija *Egr-1* gena viša od one u ostalim grupama implanata (Grafikon 4.9.). Jedino je u ovoj grupi ekspresija *Egr-a 1* pozitivno regulisana jednu nedelju posle implantacija, dok je dve nedelje posle implantacija, osim u ovoj, i u MPO grupi ekspresija ovog gena pozitivno regulisana. U pomenutim grupama, kao i u implantima grupa MM i MP, četiri nedelje nakon implantacija je ekspresija *Egr-a 1* pozitivno regulisana. U MP grupi, ekspresija *Egr-a 1* opada osam nedelja nakon implantacija, dok je u grupama MPE i MPEO najviša ekspresija *Egr-a 1* postignuta upravo u ovoj tački posmatranja.



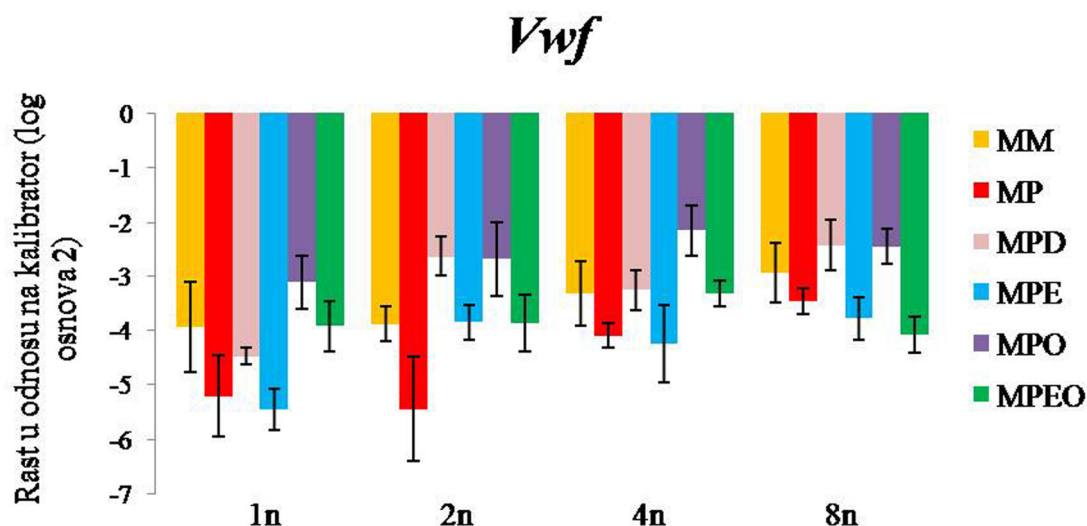
Grafikon 4.9. Dinamika relativne ekspresije *Egr-1* gena u ispitivanim grupama implanata MM, MP, MPD, MPE, MPO i MPEO u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija. MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama; n - nedelja.

4.2.5.2. Ekspresija gena markera endotelskih ćelija u implantima u odnosu na plazmu obogaćenu trombocitima

Vwf gen

Ekspresija *Vwf*-a je u svim tipovima implanata negativno regulisana (Grafikon 4.10.). Jednu i četiri nedelje nakon implantacija, ekspresija *Vwf* je najviša u MPO grupi, a dve i osam nedelja posle implantacija u grupi MPD.

Ekspresija *Vwf*-a u MM grupi raste od prve ka osmoj nedelji nakon implantacija. U grupama MP, MPD i MPE ekspresija *Vwf*-a je takođe najviša osam nedelja od implantacija. U implantima MPO i MPEO tipa, ekspresija *Vwf* je najviša nakon četiri nedelje od implantacija, dok osam nedelja nakon implantacija blago opada.



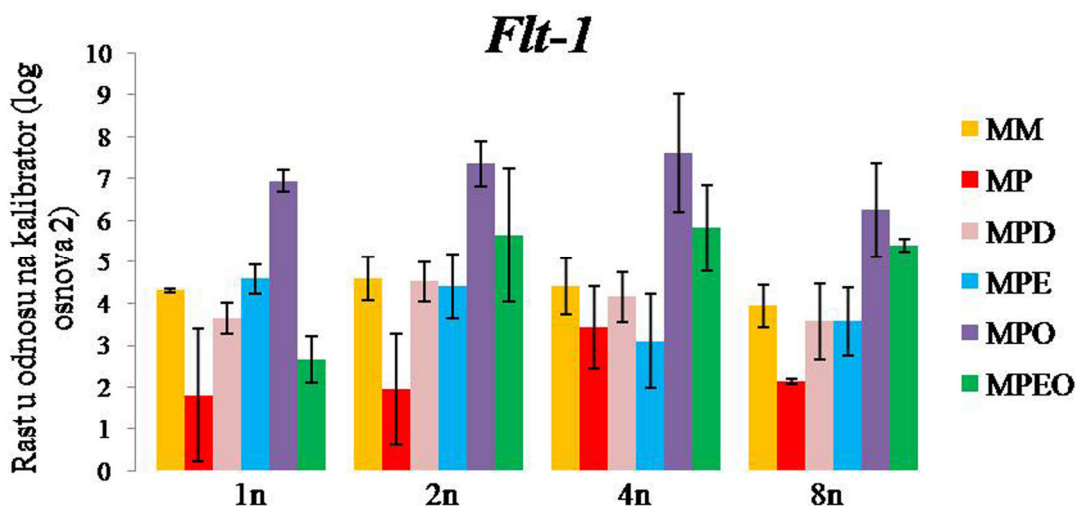
Grafikon 4.10. Dinamika relativne ekspresije *Vwf* gena u ispitivanim grupama implanata MM, MP, MPD, MPE, MPO i MPEO u odnosu na plazmu obogaćenu trombocitima jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija. MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama; n - nedelja.

Flt-1 gen

U svim grupama i svim terminima, ekspresija *Flt-a 1* je pozitivno regulisana (Grafikon 4.11.). Najvišu ekspresiju *Flt-a 1*, u svim tačkama posmatranja, imaju

implanti MPO tipa, a potom implanti MPEO tipa. Ekspresija *Flt-a 1* je najniža u MP grupi implanata.

U implantima MM tipa, ekspresija *Flt-a 1* je na približno istom nivou u svim tačkama posmatranja, a u implantima MP tipa je najviša četiri nedelje posle implantacija. Ekspresija *Flt-a 1* je bez velikih varijacija između tačaka posmatranja i u grupi sa neindukovanim ADSC, a najviša u toj grupi je dve nedelje od implantacija. Ekspresija *Flt-a 1* u MPE grupi opada od prve ka trećoj tački posmatranja, a ponovni rast postoji osam nedelja posle implantacija. Slična dinamika ekspresije ovog gena postoji u MPO i MPEO implantima, pa tako ekspresija *Flt-a 1* raste od prve ka četvrtoj nedelji od imlantacija, a potom blago opada osam nedelja nakon implantacija.

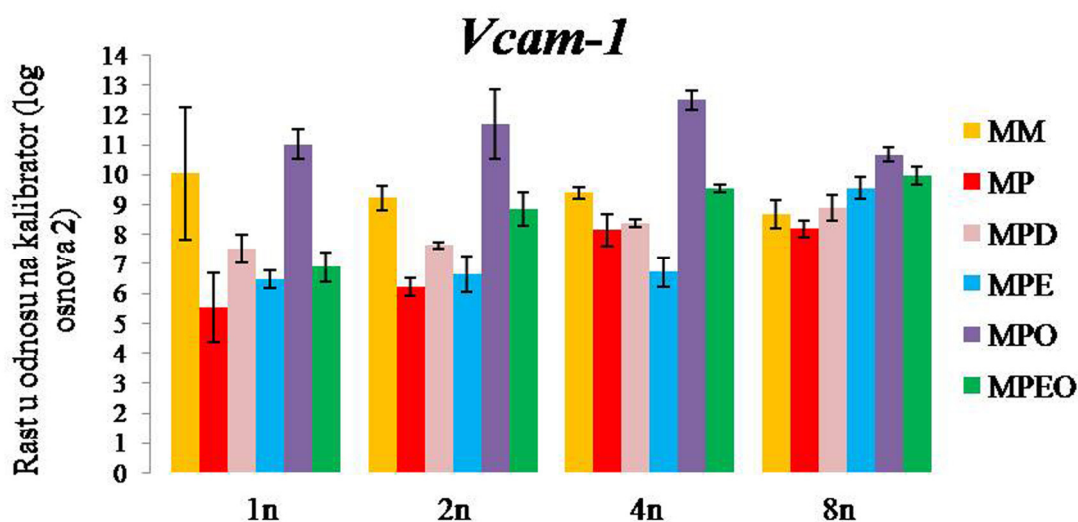


Grafikon 4.11. Dinamika relativne ekspresije *Flt-1* gena u ispitivanim grupama implanata MM, MP, MPD, MPE, MPO i MPEO, u odnosu na plazmu obogaćenu trombocitima jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija. MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama; n - nedelja.

Vcam-1 gen

Ekspresija *Vcam-a 1* u svim grupama i u svakoj tački posmatranja je pozitivno regulisana (Grafikon 4.12.). Grupa sa ćelijama indukovanim u osteogene ima najvišu, a MP grupa najnižu ekspresiju ovog gena.

U implantima sačinjenim samo od MMK, ekspresija *Vcam-a 1* je najviša na jednu nedelju od implantacija, nakon čega opada, ali većih razlika u ekspresiji ovog gena između različitih tačaka posmatranja nema. U MP grupi, od prve do četvrte nedelje nakon implantacija raste, a osam nedelja nakon implantacija ekspresija *Vcam-a 1* opada. Ekspresija *Vcam-a 1* u grupi sa neindukovanim ćelijama najviša je osam nedelja nakon implantacija. U implantima sa endotelskim ćelijama upadljiv skok u ekspresiji *Vcam-a 1* postoji osam nedelja posle implantacija. U grupi sa osteogenim ćelijama u svim terminima je ekspresija *Vcam-a 1* visoka, a najviša je četiri nedelje nakon implantacija. Ekspresija ovog gena je u implantima MPEO tipa najviša osam nedelja nakon implantacija.

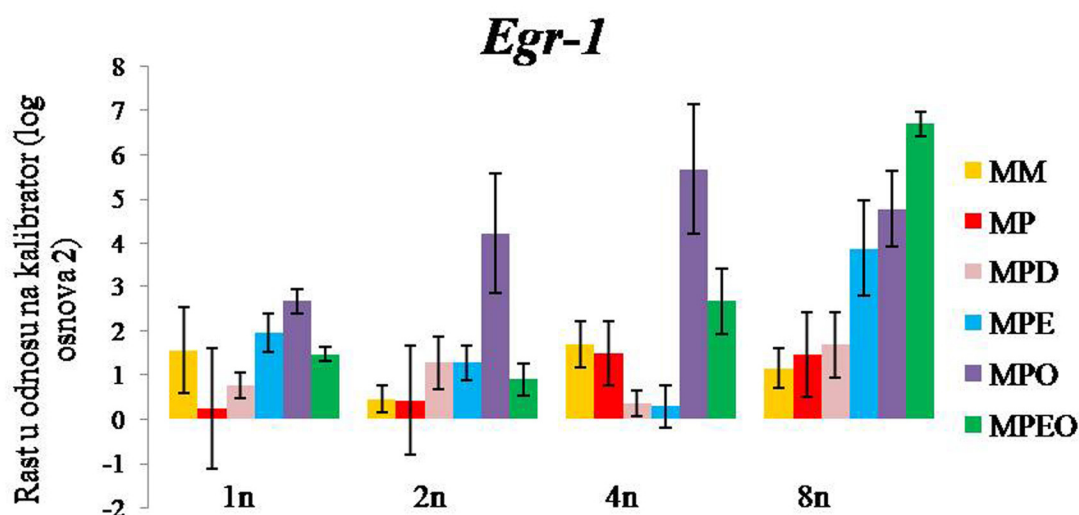


Grafikon 4.12. Dinamika relativne ekspresije *Vcam-1* gena u ispitivanim grupama implanata u odnosu na plazmu obogaćenu trombocitima jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija. MM - MMK; MP - MMK/PRP; MPD - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama;. n - nedelja.

Egr-1 gen

Ekspresija gena za transkripcioni faktor ranog odgovora (*Egr-1*) je pozitivno regulisana u svim grupama i svim tačkama posmatranja (Grafikon 4.13.). Najviša ekspresija *Egr-a 1* je u implantima tipa MPO i MPEO.

U implantima MM i MP tipa, ekspresija *Egr-a 1* je najviša četiri nedelje od implantacija. Promene u ekspresiji *Egr-a 1* u MPD implantima su tokom čitavog *in vivo* eksperimentalnog perioda minimalne. U MPE grupi implanata, ekspresija *Egr-a 1* se smanjuje od prve ka četvrtoj nedelji od implantacija, a skok je zabeležen nakon osam nedelja od implantacija u odnosu na njoj prethodnu tačku. U implantima MPO tipa, ekspresija *Egr-a 1* postepeno raste od prve do treće tačke posmatranja, a potom sledi blagi pad, zabeležen osam nedelja nakon implantacija. U MPEO implantima, ekspresija *Egr-a 1* opada posle dve nedelje od implantacija u odnosu na jednu nedelju od implantacija, raste četiri nedelje od implantacija, a najviša je osam nedelja posle implantacija.



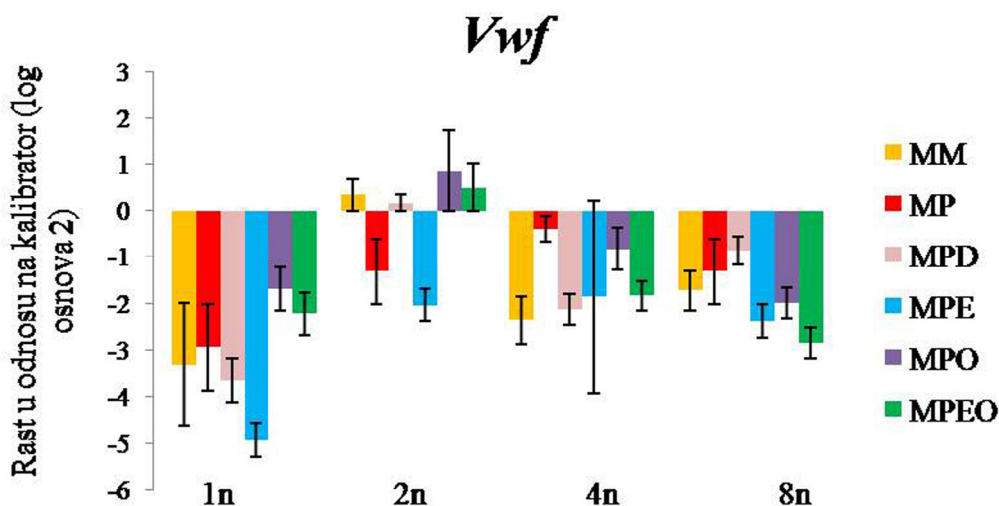
Grafikon 4.13. Dinamika relativne ekspresije *Egr-1* gena u ispitivanim grupama implanata u odnosu na plazmu obogaćenu trombocitima jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija. MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama; n - nedelja.

4.2.5.3. Ekspresija gena markera endotelskih ćelija u implantima u odnosu na objedinjen kalibrator

Vwf gen

Ekspresija *Vwf*-a je jednu nedelju nakon implantacija negativno regulisana u svim tipovima implanata (Grafikon 4.14.). Dve nedelje od implantacija, ekspresija *Vwf*-a je pozitivno regulisana u svim osim u MP i MPE implantima, a četiri i osam nedelja od implantacija je ponovo negativno regulisana u svim tipovima implanata. U svim tačkama posmatranja, ekspresija *Vwf*-a je najviša u grupama MPO i MPEO.

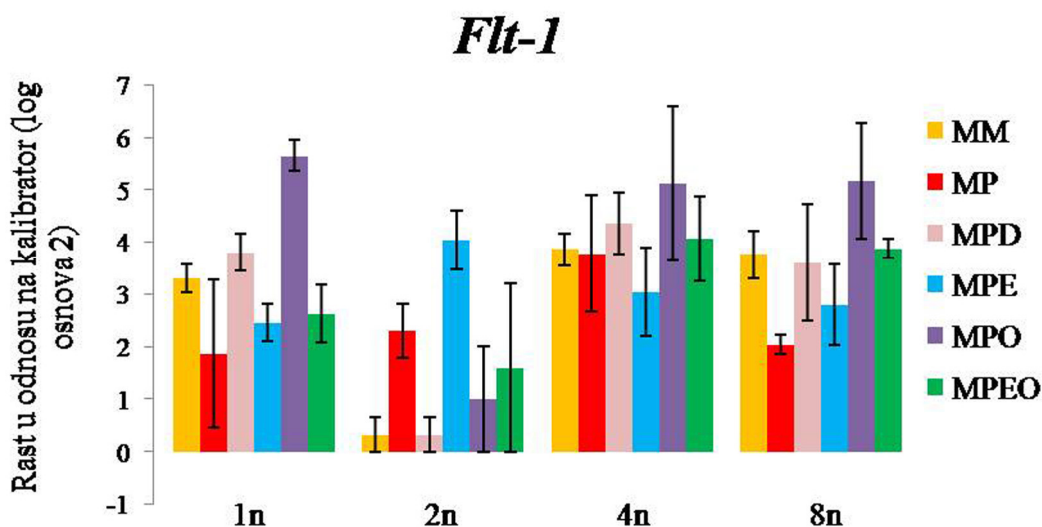
U MM tipu implanata, najviša ekspresija *Vwf*-a je nakon dve nedelje od implantacija, a u naredne dve tačke posmatranja je negativno regulisana. U MP implantima, ekspresija *Vwf*-a raste od prve do treće tačke posmatranja, posle čega ekspresija ovog gena jenjava. U MPD implantima, najviša ekspresija *Vwf*-a je dve nedelje nakon implantacija. Ekspresija *Vwf*-a u MPE grupi je najviša četiri nedelje nakon implantacija, a u grupama MPO i MPEO dve nedelje nakon implantacija.



Grafikon 4.14. Dinamika relativne ekspresije *Vwf* gena u ispitivanim grupama implanata u odnosu na objedinjen kalibrator jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija. MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama; n - nedelja.

Flt 1 gen

U svim tačkama posmatranja, u svim tipovima implanata, ekspresija *Flt-a 1* je pozitivno regulisana. Najviša ekspresija ovog gena je zabeležena u MPO tipu implanata i to u svim tačkama posmatranja osim dve nedelje nakon implantacije, kada je ekspresija *Flt-a 1* najviša u MPE implantima (Grafikon 4.15.).



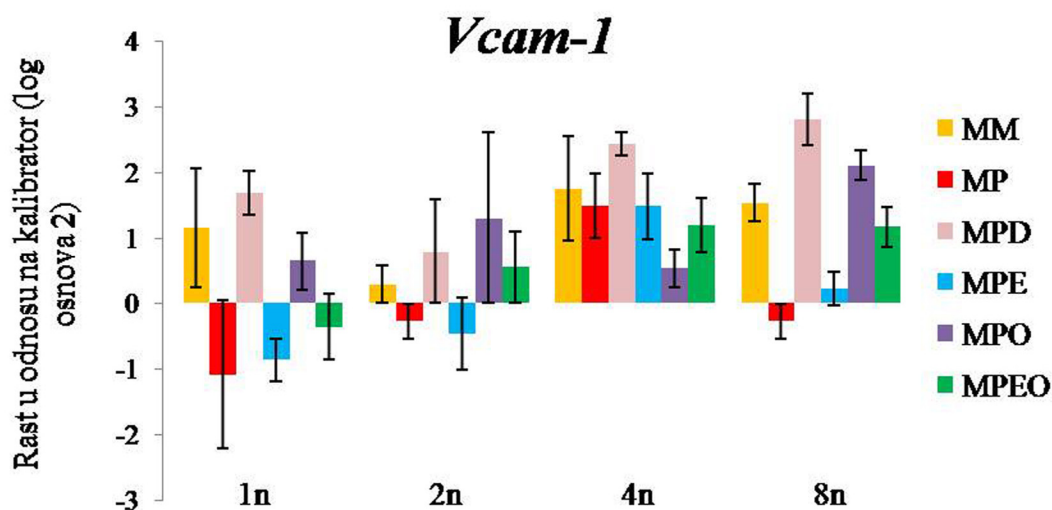
Grafikon 4.15. Dinamika relativne ekspresije *Flt-1* gena u ispitivanim grupama implanata u odnosu na objedinjen kalibrator jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija. MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama; n - nedelja.

U MM implantima, ekspresija *Flt-a 1* opada dve nedelje od implantacija u odnosu na jednu nedelju nakon implantacija, raste četiri nedelje nakon implantacija, a osam nedelja od implantacija ostaje na istom nivou. Ekspresija *Flt-a 1* u MP implantima postepeno raste od jedne nedelje posle implantacija do četiri nedelje posle implantacija, a osam nedelja od implantacija opada. U MPD grupi, nagli pad ekspresije *Flt-a 1* dešava se nakon dve nedelje od implantacija u odnosu na jednu nedelju nakon implantacija, zatim ekspresija *Flt-a 1* ponovo raste četiri nedelje nakon implantacija i opada osam nedelja nakon implantacija. U MPE implantima, ekspresija *Flt-a 1* je porasla dve nedelje posle implantacija u odnosu na jednu nedelju nakon implantacija, a zatim blago

opada. U MPO i MPEO tipu implanata, ekspresija *Flt-a 1* opada dve nedelje od implantacija u odnosu na jednu nedelju nakon implantacija, zatim raste i ostaje na približno istom nivou četiri i osam nedelja od implantacija.

Vcam-1 gen

Kao što se može uočiti na Grafikonu 4.16., ekspresija *Vcam-a 1* je u svim grupama pozitivno regulisana četiri nedelje nakon implantacija, a generalno je najviša u grupi sa neindukovanim ADSC.



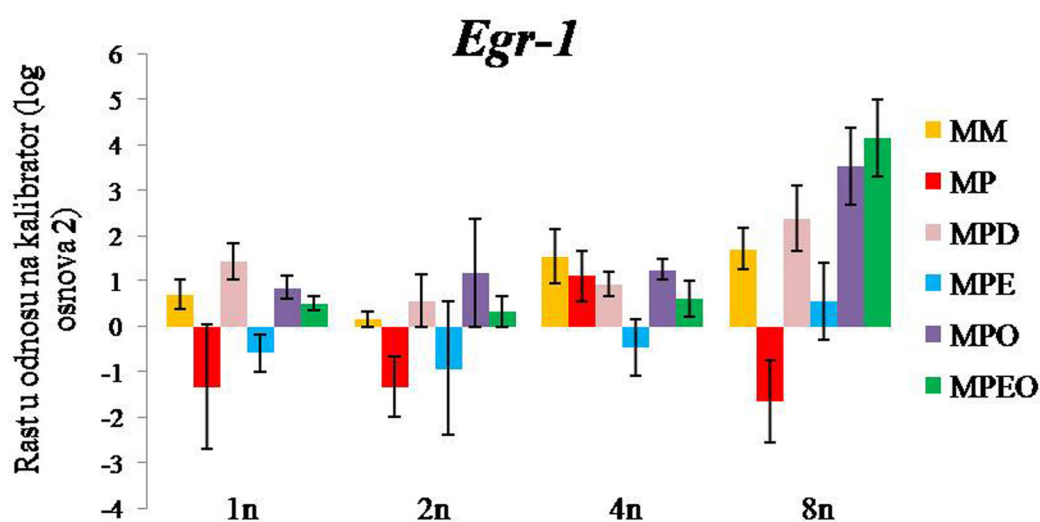
Grafikon 4.16. Dinamika relativne ekspresije *Vcam-1* gena u ispitivanim grupama implanata u odnosu na objedinjen kalibrator jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija. MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama; n - nedelja.

U MM grupi ekspresija *Vcam-a 1* se smanjuje od jedne nedelje nakon implantacija do dve nedelje od implantacija, raste nakon četiri nedelje od implantacija i ostaje približno ista u poslednjoj tački posmatranja. Od prve do četvrte nedelje nakon implantacija, ekspresija *Vcam-a 1* raste u MP grupi, a potom osam nedelja posle implantacija opada. U grupi MPD, ekspresija *Vcam-a 1* opada nakon dve nedelje od implantacija u odnosu na tačku posmatranja nakon jedne nedelje od implantacija, potom

raste u naredne dve tačke posmatranja. Ekspresija *Vcam-a 1* u MPE grupi raste od prve ka četvrtoj nedelji od implantacija kada je jedino pozitivno regulisana, a nakon osam nedelja od implantacija opada . U grupama MPO i MPEO, ekspresija *Vcam-a 1* raste idući od prve nedelje ka osmoj nedelji nakon implantacija.

Egr-1 gen

Ekspresija gena za transkripcioni faktor ranog odgovora (*Egr-1*) je najviša u implantima MPO i MPEO tipa, a najniža u MP implantima (Grafikon 4.17.). U implantima MM tipa, ekspresija *Egr-a 1* opada od prve do druge nedelje, a zatim raste četiri nedelje posle implantacija i, još jednom, osam nedelja nakon implantacija. U MP implantima ekspresija *Egr-a 1* je jedino četiri nedelje posle implantacija pozitivno regulisana, a u MPE grupi osam nedelja od implantacija. U MPO grupi, ekspresija *Egr-a 1* je približno na istom nivou u prve tri tačke posmatranja, a osam nedelja nakon implantacija nivo ekspresije ovog gena je visok. U MPEO implantima je ekspresija *Egr-a 1* niska zaključno sa četvrtom nedeljom nakon implantacija, a na osam nedelja od implantacija, ekspresija *Egr-a 1* naglo raste.

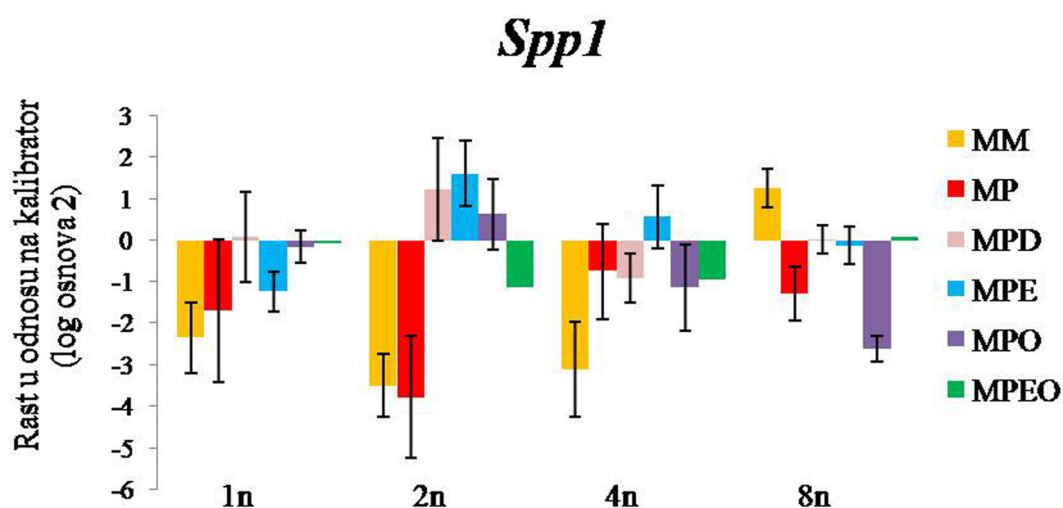


Grafikon 4.17. Dinamika relativne ekspresije *Egr-1* gena u ispitivanim grupama implanata u odnosu na objedinjen kalibrator jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija. MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama; n - nedelja.

4.2.6. qRT-PCR analiza ekspresije *Spp1* gena u implantima

4.2.6.1. Ekspresija *Spp1* gena u implantima u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža

Na grafikonu 4.18. se zapaža da je, nakon jedne nedelje od implantacija, ekspresija *Spp1* gena negativno regulisana u svim tipovima implanata osim u MPD tipu. Dve nedelje nakon implantacija, osim u ovoj, i u grupama MPE i MPO je ekspresija *Spp-a 1* pozitivno regulisana. Četiri nedelje posle implantacija, ekspresija *Spp-a 1* je pozitivno regulisana jedino u MPE grupi, dok je osam nedelja posle implantacija ekspresija *Spp-a 1* pozitivno regulisana samo u grupama MM i MPEO.



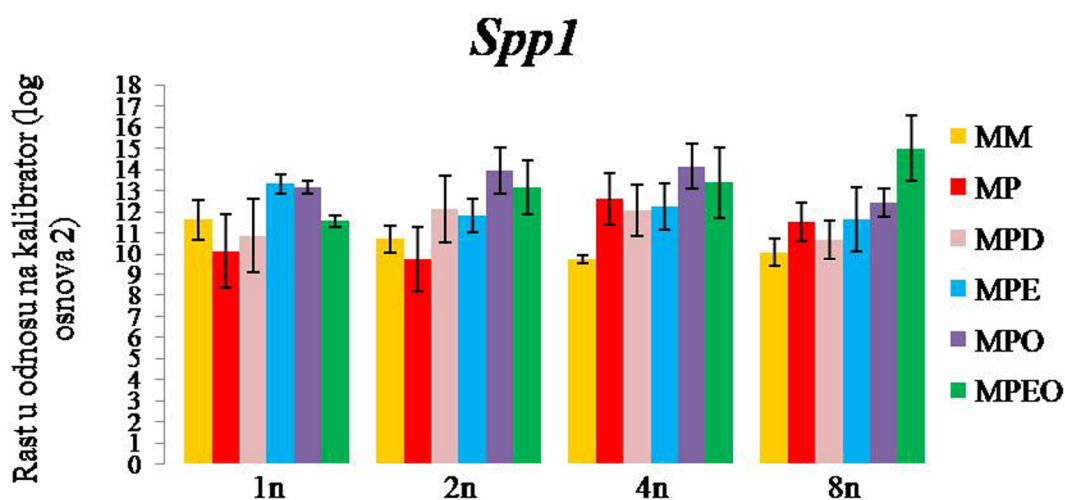
Grafikon 4.18. Dinamika relativne ekspresije *Spp1* gena u ispitivanim grupama implanata u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija. MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama; n - nedelja.

U implantima MM tipa je ekspresija *Spp-a 1* negativno regulisana do tačke posmatranja osam nedelja od implantacija (Grafikon 4.18.). U MP implantima, ekspresija *Spp-a 1* je u svim tačkama posmatranja negativno regulisana, najviša je četiri nedelje nakon implantacija, a osam nedelja nakon implantacija ponovo opada. U implantima MPD tipa je ekspresija ovog gena najviša na dve nedelje od implantacija,

posle čega ekspresija *Spp-a 1* u ovoj grupi opada. U MPE grupi, ekspresija *Spp-a 1* je najviša dve nedelje nakon implantacija, potom postepeno opada do tačke posmatranja nakon osam nedelja od implantacija. Ekspresija *Spp-a 1* je u grupi MPO pozitivno regulisana jedino nakon dve nedelje od implantacija, a u MPEO implantima posle osam nedelja od implantacija.

4.2.6.2. Ekspresija *Spp1* gena u implantima u odnosu na plazmu obogaćenu trombocitima

Posmatrajući ekspresiju *Spp1* gena za osteopontin u odnosu na PRP, zapaža se da je u svim nedeljama i u svim grupama ekspresija ovog gena pozitivno regulisana (Grafikon 4.19.). Generalno, najviša ekspresija *Spp-a 1* je u grupama sa *in vitro* diferenciranim ADSC, bilo zajedno ili pojedinačno implantiranim.



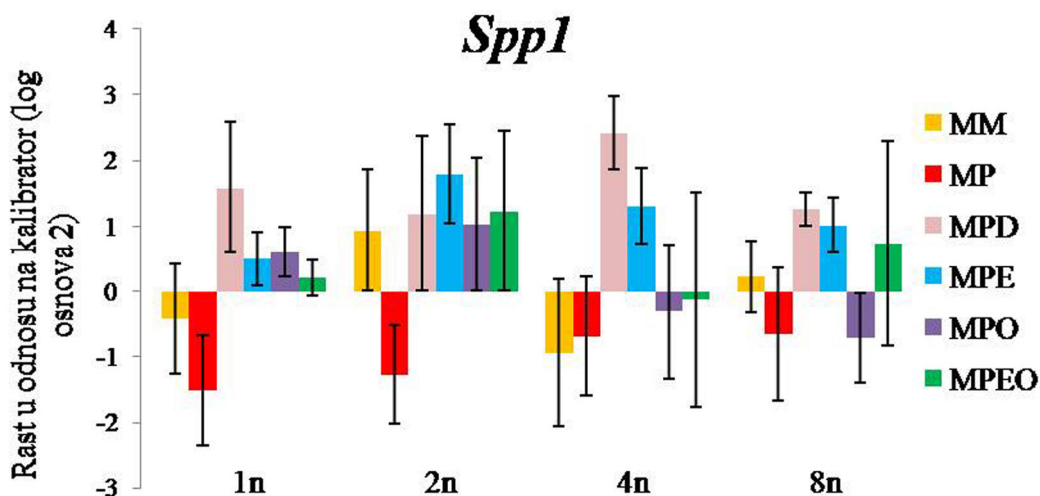
Grafikon 4.19. Dinamika relativne ekspresije *Spp1* gena u ispitivanim grupama implanata u odnosu na plazmu obogaćenu trombocitima jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija. MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama; n - nedelja.

U MM grupi, ekspresija *Spp-a 1* opada od prve ka osmoj nedelji nakon implantacija, dok je u implantima MP grupe najviša četiri nedelje posle implantacija

(Grafikon 4.19.). U implantima sa neindukovanim ADSC, ekspresija ovog gena je na skoro istom nivou u svim tačkama posmatranja, dok je u implantima MPE tipa, ekspresija *Spp-a 1* najviša jednu nedelju od implantacija. U implantima MPO tipa je u drugoj i četvrtoj nedelji nakon implantacija zabeležena najviša ekspresija ovog gena, a u implantima sa koimplantiranim ćelijama osam nedelja nakon implantacija.

4.2.6.3. Ekspresija *Spp1* gena u implantima u odnosu na objedinjen kalibrator

U odnosu na objedinjen kalibrator, ekspresija *Spp-a 1* u MM implantima raste od prve do druge nedelje nakon implantacija, potom opada četiri nedelje nakon implantacija i ponovo raste osam nedelja posle implantacija (Grafikon 4.20.). Ekspresija *Spp-a 1* je u svim tačkama posmatranja u implantima MP tipa negativno regulisana, a najviša je nakon osam nedelja od implantacija, dok je u MPD implantima ekspresija *Spp-a 1* najviša četiri nedelje od implantacija.



Grafikon 4.20. Dinamika relativne ekspresije *Spp1* gena u ispitivanim grupama implanata u odnosu na objedinjen kalibrator jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija. MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama; n - nedelja.

U MPE i MPO implantima je ekspresija *Spp-a 1* najviša dve nedelje posle implantacija, nakon čega postepeno opada. U MPEO implantima, ekspresija *Spp-a 1* raste posle dve nedelje od implantacija, opada četiri nedelje nakon implantacije, a potom ponovo raste u poslednjoj tački posmatranja.

4.2.7. Statistička analiza ekspresije gena u implantima

4.2.7.1. Statistička analiza ekspresije gena markera endotelskih ćelija u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža

Vwf gen

Jednu nedelju posle implantacija, ekspresija *Vwf*-a je značajno viša ($p < 0.05$) u MPD nego u MPEO implantima (Tabela 4.1.). Ekspresija *Vwf*-a je značajno viša ($p < 0.05$) u MPD grupi u odnosu na sve druge tipove implanata dve nedelje nakon implantacija (Tabela 4.1.). U ovoj tački posmatranja, ekspresija *Vwf*-a je značajno viša ($p < 0.05$) i u MPO u poređenju sa MPE tipom implanata. Četiri nedelje posle implantacija, u implantima MP tipa je ekspresija *Vwf*-a značajno viša ($p < 0.05$) od one u implantima MM, MPO i MPEO tipa. Značajna razlika ($p < 0.05$) postoji u istoj tački posmatranja kada je u MPD implantima viša ekspresija ovog gena nego u MP, MPO i MPEO tipu implanata. U MPE implantima, ekspresija *Vwf*-a je viša u odnosu na MPEO implante ($p < 0.05$) (Tabela 4.1.). Osam nedelja posle implantacija, u MM, MP i MPD implantima je značajno viša ekspresija ovog gena ($p < 0.05$) nego u MPE i MPEO tipu implanata (Tabela 4.1.). U istoj tački posmatranja, značajno je viša ekspresija *Vwf*-a u MPD implantima nego u MP tipu implanata ($p < 0.05$), kao i u MPO implantima u poređenju sa MPE i MPEO tipom implanata.

Flt-1 gen

Jednu nedelju posle implantacija, ekspresija *Flt-a 1* je značajno viša ($p < 0.05$) u MPO u odnosu na ostale tipove implanata (Tabela 4.1.). U tabeli 3 je prikazano da je i u MPD grupi ekspresija ovog gena značajno viša ($p < 0.05$) nego u ostalim implantima izuzev MPO tipa. U MPEO implantima je ekspresija *Flt-a 1* značajno viša ($p < 0.05$) u

poređenju sa MPE implantima, a u MM implantima u odnosu na MP i MPE grupu implanata (Tabela 4.1.). Dve nedelje nakon implantacija, ekspresija *Flt-a 1* je značajno viša ($p < 0.05$) u MPD, MPE i MPO implantima nego u grupama MM i MP (Tabela 4.1.). U tabeli 3 se uočava i da je ekspresija ovog gena značajno viša ($p < 0.05$) u MPD tipu implanata nego u MPE i MPO implantima. Posle četiri nedelje od implantacija, ekspresija *Flt-a 1* je značajno niža ($p < 0.05$) u MM, MPE i MPEO implantima u odnosu na MPD implante (Tabela 4.1.). Osam nedelja od implantacija, u svim grupama implanata je ekspresija *Flt-a 1* značajno viša ($p < 0.05$) u odnosu na MP implante, a u MM implantima ($p < 0.05$) u odnosu na implante MPE i MPEO tipa (Tabela 4.1.). Ekspresija *Flt-a 1* je značajno viša ($p < 0.05$) u MPD i MPO implantima nego u implantima MPE tipa, kao i u MPO u poređenju sa MPEO grupom implanata ($p < 0.05$).

Vcam-1 gen

Jednu nedelju nakon implantacija, u MPD grupi je ekspresija *Vcam-a 1* značajno viša ($p < 0.05$) nego u grupama MM, MP, MPE i MPEO (Tabela 4.1.), dok je u MPO i MPEO implantima značajno viša ekspresija ovog gena ($p < 0.05$) od one u MP i MPE implantima. U MM tipu implanata je ekspresija ovog gena značajno viša ($p < 0.05$) nego u MPE implantima (Tabela 4.1.). Ekspresija *Vcam-a 1* je značajno viša ($p < 0.05$) dve nedelje posle implantacija u grupama MP i MPD nego u MM grupi, a između MP i MPD implanata takođe postoji značajna razlika ($p < 0.05$), takva da je ekspresija *Vcam-a 1* viša u MPD grupi (Tabela 4.1.). U MPE grupi je ekspresija *Vcam-a 1* značajno niža ($p < 0.05$) nego u MP i MPD implantima, a u MPD grupi ekspresija ovog gena je značajno viša ($p < 0.05$) nego u MPEO grupi (Tabela 4.1.).

Četiri nedelje posle implantacija, u MP i MPD implantima je značajno viša ekspresija *Vcam-a 1* ($p < 0.05$) nego u grupama MPO i MPEO (Tabela 4.1.). Osam nedelja od implantacija, ekspresija *Vcam-a 1* je značajno viša ($p < 0.05$) u MPD implantima u odnosu na ostale tipove implanata, a u MM grupi ($p < 0.05$) u odnosu na MP, MPE i MPO implante (Tabela 4.1.). U ovoj tački posmatranja, MPEO implanti poseduju značajno višu ($p < 0.05$) ekspresiju *Vcam-a 1* nego implanti MP, MPE i MPO tipa.

Tabela 4.1. Vrednosti *Student*-ovog t-testa i značajnost razlika ($p < 0.05$) u relativnoj ekspresiji gena markera endotelskih ćelija u ispitivanim grupama implanata MM, MP, MPD, MPE, MPO i MPEO, u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža, jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija.

I NEDELJA					II NEDELJA				
gen	<i>Vwf</i>	<i>Flt-1</i>	<i>Vcam-1</i>	<i>Egr-1</i>	gen	<i>Vwf</i>	<i>Flt-1</i>	<i>Vcam-1</i>	<i>Egr-1</i>
MM1/MP1	0.44	0.01	0.41	0.03	MM2/MP2	0.58	0.09	0.05	0.01
MM1/MPD1	0.07	0.002	0.03	0.00002	MM2/MPD2	0.003	0.00001	0.001	0.0001
MM1/MPE1	0.17	0.01	0.05	0.00002	MM2/MPE2	0.27	0.0003	0.50	0.39
MM1/MPO1	0.29	0.0001	0.18	0.11	MM2/MPO2	0.35	0.003	0.37	0.21
MM1/MPEO1	0.54	0.14	0.25	0.32	MM2/MPEO2	0.56	0.45	0.77	0.04
MP1/MPD1	0.18	0.02	0.01	0.0002	MP2/MPD2	0.01	0.01	0.02	0.000001
MP1/MPE1	0.48	0.53	0.31	0.90	MP2/MPE2	0.08	0.0001	0.04	0.94
MP1/MPO1	0.80	0.004	0.05	0.01	MP2/MPO2	0.90	0.001	0.92	0.01
MP1/MPEO1	0.72	0.13	0.06	0.01	MP2/MPEO2	0.29	0.07	0.68	0.39
MPD1/MPD1	0.28	0.00003	0.00002	0.000002	MPD2/MPE2	0.001	0.01	0.003	0.001
MPD1/MPD1	0.14	0.02	0.07	0.0002	MPD2/MPD2	0.003	0.97	0.34	0.01
MPD1/MPD1	0.03	0.01	0.03	0.0000	MPD2/MPEO2	0.001	0.05	0.03	0.00002
MPE1/MPD1	0.55	0.000002	0.0002	0.00006	MPE2/MPO2	0.01	0.11	0.27	0.13
MPE1/MPEO1	0.16	0.001	0.0002	0.0001	MPE2/MPEO2	0.56	0.15	0.16	0.87
MPO1/MPD1	0.43	0.0005	0.65	0.25	MPO2/MPEO2	0.09	0.09	0.77	0.05

IV NEDELJA					VIII NEDELJA				
gen	<i>Vwf</i>	<i>Flt-1</i>	<i>Vcam-1</i>	<i>Egr-1</i>	gen	<i>Vwf</i>	<i>Flt-1</i>	<i>Vcam-1</i>	<i>Egr-1</i>
MM4/MP4	0.0001	0.25	0.15	0.58	MM8/MP8	0.06	0.0001	0.001	0.00002
MM4/MPD4	0.25	0.01	0.11	0.001	MM8/MPD8	0.28	0.98	0.004	0.35
MM4/MPE4	0.27	0.89	0.47	0.02	MM8/MPE8	0.0001	0.01	0.00	0.001
MM4/MPO4	0.97	0.15	0.73	0.70	MM8/MPO8	0.15	0.60	0.00	0.003
MM4/MPEO4	0.70	0.48	0.95	0.22	MM8/MPEO8	0.0001	0.01	0.52	0.01
MP4/MPD4	0.03	0.28	0.97	0.0001	MP8/MPD8	0.03	0.002	0.0001	0.00004
MP4/MPE4	0.09	0.18	0.288	0.002	MP8/MPE8	0.01	0.01	0.68	0.01
MP4/MPO4	0.001	0.64	0.02	0.91	MP8/MPO8	0.22	0.00002	0.11	0.001
MP4/MPEO4	0.05	0.47	0.01	0.03	MP8/MPEO8	0.01	0.00001	0.001	0.00005
MPD4/MPE4	0.99	0.002	0.09	0.00003	MPD8/MPE8	0.0002	0.05	0.0002	0.001
MPD4/MPO4	0.04	0.66	0.002	0.03	MPD8/MPO8	0.06	0.78	0.0001	0.004
MPD4/MPEO4	0.01	0.02	0.00003	0.00001	MPD8/MPEO8	0.0002	0.11	0.01	0.01
MPE4/MPO4	0.09	0.09	0.09	0.03	MPE8/MPO8	0.0001	0.03	0.33	0.12
MPE4/MPEO4	0.02	0.46	0.11	0.06	MPE8/MPEO8	0.65	0.10	0.003	0.005
MPO4/MPEO4	0.30	0.26	0.44	0.27	MPO8/MPEO8	0.0001	0.01	0.002	0.04

MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama; n - nedelja.; sivo polje - značajna razlika ($p < 0.05$).

Egr-1 gen

Jednu nedelju nakon implantacija, ekspresija *Egr-a 1* je najviša u MPD grupi što je značajno ($p < 0.05$) u odnosu na ostale tipove implanata (Tabela 4.1.). U MM, MPO i MPEO implantima, značajno je viša ($p < 0.05$) ekspresija ovog gena od one u grupama MP i MPE (Tabela 4.1.). Dve nedelje od implantacija, MPD implanti zadržavaju

značajno višu ($p < 0.05$) ekspresiju *Egr-a 1* u odnosu na sve ostale tipove implanata (Tabela 4.1.). U odnosu na MP i MPEO grupe, u grupama MM i MPO je ekspresija *Egr-a 1* značajno viša ($p < 0.05$). Četiri nedelje posle implantacija, u MPD implantima je još uvek ekspresija *Egr-a 1* značajno viša ($p < 0.05$) nego u ostalim grupama, a značajno viša ($p < 0.05$) ekspresija postoji i u MM, MP i MPO grupama u odnosu na grupu MPE (Tabela 4.1.), kao i u MP grupi u poređenju sa grupom MPEO. Osam nedelja posle implantacija, ekspresija *Egr-a 1* je značajno viša ($p < 0.05$) u MM i MPD implantima nego u MP, MPE, MPO i MPEO grupama implanata (Tabela 4.1.), a u MPEO implantima u poređenju sa MP, MPE i MPO tipom implanata. U MPE i MPO grupi, ekspresija *Egr-a 1* je značajno viša ($p < 0.05$) nego u grupi MP.

4.2.7.2. Statistička analiza ekspresije gena markera endotelskih ćelija u odnosu na plazmu obogaćenu trombocitima

Vwf gen

Na jednu nedelje od implantacija, ekspresija *Vwf-a* je značajno viša ($p < 0.05$) u MPO nego u MP, MPD i MPE implantima, kao i u MPEO implantima u odnosu na MP i MPE implante (Tabela 4.2.). U MM i MPD implantima, ekspresija *Vwf-a* je značajno viša ($p < 0.05$) u poređenju sa MPE implantima. Dve nedelje posle implantacija, ekspresija *Vwf-a* je značajno viša ($p < 0.05$) u MPD i MPO u odnosu na MM, MP, MPE i MPEO implante, a u MM, MPE i MPEO grupama je ekspresija *Vwf-a* značajno viša ($p < 0.05$) u odnosu na MP grupu (Tabela 4.2.). Posle četiri nedelje od implantacija, ekspresija *Vwf-a* je značajno viša ($p < 0.05$) u MPO nego u ostalim implantima, kao i u MPD i MPEO grupama u poređenju sa ekspresijom u MP i MPE tipu implanata (Tabela 4.2.). U MM implantima je ekspresija *Vwf-a* značajno viša ($p < 0.05$) u odnosu na onu u MP tipu implanata. U implantima MPO tipa je, posle osam nedelja od implantacija, zabeležena značajno viša ($p < 0.05$) ekspresija *Vwf-a* u odnosu na MP, MPE i MPEO grupe. U istoj tački posmatranja je u MM i MPD implantima značajno viša ekspresija ($p < 0.05$) ovog gena u poređenju sa MPE i MPEO grupama implanata (Tabela 4.2.).

Flt-1 gen

Ekspresija *Flt-a 1* je jednu nedelju od implantacija značajno viša ($p < 0.05$) u MPO grupi u poređenju sa ostalim eksperimentalnim grupama (Tabela 4.2.). U grupama MP, MPD i MPEO je značajno niža ($p < 0.05$) ekspresija ovog gena od one u MM i MPE grupama, a u MPD implantima je značajno viša ($p < 0.05$) ekspresija *Flt-a 1* nego u implantima tipa MPEO (Tabela 4.2.). Dve nedelje od implantacijama, ekspresija *Flt-a 1* je značajno viša ($p < 0.05$) u MPO nego u MM i MPD implantima, kao i u MM, MPD, MPE i MPEO implantima nego u MP implantima (Tabela 4.2.). Četiri nedelje od implantacija, u MPO grupi je ekspresija *Flt-a 1* značajno viša ($p < 0.05$), nego u grupama MM, MP, MPD i MPE, a u MPEO grupi je značajno viša ($p < 0.05$) ekspresija *Flt-a 1* odnosu na MP, MPD i MPE grupe (Tabela 4.2.). Osam nedelja nakon implantacija, ekspresija *Flt-a 1* je značajno viša ($p < 0.05$) u MPO i MPEO nego u MM, MP, MPD i MPE implantima (Tabela 4.2.), a u MM, MPD i MPE implantima ekspresija *Flt-a 1* je značajno viša ($p < 0.05$) nego u MP tipu implanata.

Vcam-1 gen

Jednu nedelju nakon implantacija, ekspresija *Vcam-a 1* je značajno viša ($p < 0.05$) u MPO tipu nego u ostalim tipovima implanata, izuzev MM tipa. U MM grupi, ekspresija ovog gena je značajno viša ($p < 0.05$) u poređenju sa grupama MP, MPE i MPEO (Tabela 4.2.). U MPD grupi, ekspresija *Vcam-a 1* je značajno viša ($p < 0.05$) nego u grupama MP i MPE (Tabela 4.2.). Posle dve nedelje od implantacija, ekspresija *Vcam-a 1* je značajno viša ($p < 0.05$) u MPO nego u ostalim eksperimentalnim grupama, a u MM i MPEO implantima je značajno viša ($p < 0.05$) nego u MP, MPD i MPE tipu implanata (Tabela 4.2.). Ekspresija *Vcam-a 1* je značajno viša ($p < 0.05$) u implantima MPD tipa u odnosu na ekspresiju u grupama MP i MPE (Tabela 4.2.). Četiri nedelje od implantacija, ekspresija *Vcam-a 1* je u MPO implantima značajno viša ($p < 0.05$) u odnosu na druge grupe implanata, dok je u grupama MM i MPEO značajno viša ($p < 0.05$) ekspresija ovog gena u odnosu na MP, MPD i MPE grupe (Tabela 4.2.). U MP i MPD implantima je ekspresija *Vcam-a 1* viša nego u MPE implantima, što je značajno ($p < 0.05$) i može se uočiti u tabeli 4.2. Osam nedelja nakon implanatacija, u svim grupama je ekspresija *Vcam-a 1* značajno niža ($p < 0.05$) nego u MPO grupi, dok je u

MM, MP i MPD implantima ekspresija ovog gena značajno niža ($p < 0.05$) nego u implantima MPEO tipa (Tabela 4.2.). U MPE implantima je ekspresija *Vcam-a 1* značajno viša ($p < 0.05$) od one u grupama MM i MP, a u MM i MPD grupama od ekspresije u implantima MP tipa ($p < 0.05$).

Tabela 4.2. Vrednosti *Student*-ovog t-testa i značajnost razlika ($p < 0.05$) u relativnoj ekspresiji gena markera endotelskih ćelija u ispitivanim grupama implanata MM, MP, MPD, MPE, MPO i MPEO, u odnosu na plazmu obogaćenu trombocitima, jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija.

I NEDELJA				
gen	<i>Vwf</i>	<i>Flt-1</i>	<i>Vcam-1</i>	<i>Egr-1</i>
MM1/MP1	0.06	0.02	0.01	0.17
MM1/MPD1	0.25	0.01	0.07	0.17
MM1/MPE1	0.02	0.18	0.02	0.49
MM1/MPO1	0.14	0.000001	0.42	0.07
MM1/MPE01	0.97	0.001	0.03	0.88
MP1/MPD1	0.10	0.07	0.02	0.49
MP1/MPE1	0.58	0.01	0.178	0.06
MP1/MPO1	0.003	0.001	0.0001	0.13
MP1/MPEO1	0.03	0.36	0.08	0.13
MPD1/MPE1	0.003	0.01	0.01	0.004
MPD1/MPO1	0.002	0.00001	0.0000	0.0001
MPD1/MPE01	0.07	0.02	0.12	0.00
MPE1/MPO1	0.0003	0.00004	0.000004	0.09
MPE1/MPE01	0.002	0.001	0.18	0.09
MPO1/MPE01	0.06	0.00001	0.00002	0.0003

II NEDELJA				
gen	<i>Vwf</i>	<i>Flt-1</i>	<i>Vcam-1</i>	<i>Egr-1</i>
MM2/MP2	0.02	0.01	0.00002	0.97
MM2/MPD2	0.002	0.84	0.0003	0.05
MM2/MPE2	0.90	0.69	0.0004	0.01
MM2/MPO2	0.02	0.0003	0.01	0.002
MM2/MPEO2	0.98	0.26	0.29	0.10
MP2/MPD2	0.002	0.01	0.0001	0.24
MP2/MPE2	0.02	0.003	0.22	0.14
MP2/MPO2	0.003	0.09	0.0001	0.002
MP2/MPEO2	0.03	0.004	0.0002	0.48
MPD2/MPE2	0.002	0.81	0.02	1.00
MPD2/MPO2	0.91	0.0002	0.0004	0.01
MPD2/MPE02	0.01	0.23	0.01	0.32
MPE2/MPO2	0.02	0.09	0.0002	0.001
MPE2/MPE02	0.94	0.14	0.002	0.18
MPO2/MPE02	0.03	0.09	0.004	0.003

IV NEDELJA				
gen	<i>Vwf</i>	<i>Flt-1</i>	<i>Vcam-1</i>	<i>Egr-1</i>
MM4/MP4	0.05	0.13	0.01	0.64
MM4/MPD4	0.87	0.59	0.0001	0.01
MM4/MPE4	0.09	0.07	0.0001	0.002
MM4/MPO4	0.02	0.01	0.000004	0.002
MM4/MPE04	0.98	0.06	0.25	0.07
MP4/MPD4	0.01	0.24	0.44	0.02
MP4/MPE4	0.68	0.63	0.01	0.01
MP4/MPO4	0.0003	0.001	0.00001	0.0003
MP4/MPEO4	0.003	0.01	0.003	0.04
MPD4/MPE4	0.05	0.13	0.001	0.79
MPD4/MPO4	0.01	0.004	0.0000004	0.0004
MPD4/MPE04	0.82	0.03	0.0001	0.001
MPE4/MPO4	0.003	0.001	0.000001	0.00003
MPE4/MPE04	0.05	0.01	0.00004	0.0002
MPO4/MPE04	0.004	0.09	0.000003	0.01

VIII NEDELJA				
gen	<i>Vwf</i>	<i>Flt-1</i>	<i>Vcam-1</i>	<i>Egr-1</i>
MM8/MP8	0.31	0.0004	0.03	0.90
MM8/MPD8	0.21	0.52	0.53	0.26
MM8/MPE8	0.05	0.47	0.03	0.004
MM8/MPO8	0.18	0.01	0.0003	0.0003
MM8/MPEO8	0.01	0.001	0.004	0.000001
MP8/MPD8	0.06	0.02	0.03	0.73
MP8/MPE8	0.49	0.01	0.00113	0.02
MP8/MPO8	0.05	0.0003	0.00001	0.002
MP8/MPEO8	0.19	0.00000002	0.0001	0.00004
MPD8/MPE8	0.004	0.98	0.06	0.02
MPD8/MPO8	0.95	0.01	0.0003	0.001
MPD8/MPE08	0.001	0.01	0.01	0.00001
MPES/MPO8	0.002	0.01	0.002	0.24
MPES/MPE08	0.29	0.005	0.14	0.002
MPOS/MPE08	0.001	0.18	0.01	0.01

MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama; n - nedelja.; sivo polje - značajna razlika ($p < 0.05$).

Egr-1 gen

Ekspresija *Egr-a 1* je jednu nedelju nakon implantacija značajno viša ($p < 0.05$) u grupi MPO u odnosu na grupe MPD i MPEO, a u MPE i MPEO implantima je značajno viša ($p < 0.05$) ekspresija ovog gena u poređenju sa MPD grupom implanata (Tabela 4.2.). Dve nedelje nakon implantacija, ekspresija *Egr-a 1* je značajno viša ($p < 0.05$) u MPO grupi u odnosu na sve ostale grupe implanata (Tabela 4.2.). U istoj tački posmatranja, značajno je viša ($p < 0.05$) ekspresija ovog gena u MPD i MPE nego u MM implantima (Tabela 4.2.). Nakon četiri nedelje od implantacija, ekspresija *Egr-a 1* je značajno viša ($p < 0.05$) u grupi MPO nego u ostalim grupama implanata (Tabela 4.2.). Značajnost je zabeležena ($p < 0.05$) i u MPEO grupi u kojoj je ekspresija *Egr-a 1* viša u odnosu na onu u grupama MP, MPD i MPE. Ekspresija *Egr-a 1* je značajno niža u ($p < 0.05$) grupama MPD i MPE u poređenju sa grupama MM i MP (Tabela 4.2.). Osam nedelja posle implantacija, u MPEO grupi je ekspresija *Egr-a 1* značajno viša ($p < 0.05$) nego u svim ostalim grupama implanata, dok je u grupama MPE i MPO ekspresija ovog gena značajno viša ($p < 0.05$) u odnosu na grupe MM, MP i MPD (Tabela 4.2.).

4.2.7.3. Statistička analiza ekspresije gena markera endotelskih ćelija u odnosu na objedinjen kalibrator

Vwf gen

Posle jedne nedelje od implantacija, ekspresija *Vwf-a* je značajno viša ($p < 0.05$) u MPO grupi u odnosu na MP, MPD i MPE grupe, a značajno viša ekspresija ($p < 0.05$) postoji i u MPEO implantima u odnosu na one iz grupa MPD i MPE (Tabela 4.3.). U MM, MP i MPD grupi je ekspresija ovog gena značajno viša ($p < 0.05$) nego u MPE grupi implanata. Dve nedelje posle implantacija, u MPEO grupi je značajno viša ekspresija *Vwf-a* ($p < 0.05$) nego u implantima grupa MM, MPD, MPE i MPEO, a MPO grupa ima značajno višu ($p < 0.05$) ekspresiju ovog gena u odnosu na MM implante (Tabela 4.3.). U istoj tački posmatranja, ekspresija *Vwf-a* je značajno viša ($p < 0.05$) u MM grupi u poređenju sa grupama MP, MPD i MPE, a i u MP implantima je značajno viša ($p < 0.05$) ekspresija *Vwf-a* od one u grupi MPE (Tabela 4.3.). U grupama MP i MPO, ekspresija ovog gena je značajno viša ($p < 0.05$) nego u grupama MM, MPD i

MPEO, posle četiri nedelje od implantacija (Tabela 4.3.). Osam nedelja nakon implantacija, u MPD grupi je zabeležna najviša ekspresija *Vwf*-a, što je značajno ($p < 0.05$) u odnosu na grupe MM, MPE, MPO i MPEO (Tabela 4.3.). U grupama MM i MP je ekspresija *Vwf*-a značajno viša ($p < 0.05$) nego u grupama MPE i MPEO. Ekspresija ovog gena je značajno niža ($p < 0.05$) u MPEO grupi u odnosu na ekspresiju u grupama MPE i MPO.

Flt-1 gen

Ekspresija *Flt-1* gena je jednu nedelju nakon implantacija najviša u MPO grupi, što je značajno ($p < 0.05$) u odnosu na grupe MPD, MPE i MPEO (Tabela 4.3.). U MPD grupi je značajno viša ($p < 0.05$) ekspresija ovog gena u istom terminu u odnosu na grupe MP, MPE i MPEO, a u MM i MPEO implantima je ekspresija *Flt-a 1* značajno viša ($p < 0.05$) u odnosu na implante MPE tipa. Dve nedelje nakon implantacija, ekspresija ovog gena je u MPE implantima najviša, što je značajno ($p < 0.05$) u poređenju sa grupama MM, MP i MPO. MP implanti imaju značajno višu ($p < 0.05$) ekspresiju *Flt-a 1* u odnosu na implante MM, MPD, MPO i MPEO tipa (Tabela 4.3.). U MPEO i MPO implantima, značajno je viša ekspresija ($p < 0.05$) ovog gena nego u MM tipu implanata, a u MM implantima značajno je viša ($p < 0.05$) u odnosu na implante MPD tipa.

Posle četiri nedelje od implantacija, u implantima MM, MPD, MPO i MPEO tipa je ekspresija ovog gena značajno viša ($p < 0.05$) u odnosu na onu u MPE implantima (Tabela 4.3.). Osam nedelja od implantacija, u MPO grupi je ekspresija *Flt-a 1* značajno viša ($p < 0.05$) u odnosu na MM, MP i MPE grupe implante, a u MM i MPEO implantima u odnosu na MP i MPE tip implanata (Tabela 4.3.). Ekspresija ovog gena je značajno viša ($p < 0.05$) u MPD i MPE grupama u odnosu na MP grupu implanata.

Vcam-1 gen

Jednu nedelju posle implantacija, ekspresija *Vcam-a 1* je značajno viša ($p < 0.05$) u implantima tipa MPD u poređenju sa implantama tipa MP, MPE, MPO i MPEO (Tabela 4.3.). U implantima MM i MPO tipa je ekspresija ovog gena značajno viša ($p < 0.05$) u odnosu na ekspresiju u MP, MPE i MPEO implantima, što je prikazano u tabeli 5. Dve nedelje nakon implantacija, ekspresija *Vcam-a 1* je u MPO grupi značajno viša ($p < 0.05$) u odnosu na grupu MPE, a u MPD grupi je ekspresija *Vcam-a 1* značajno

viša ($p < 0.05$) nego u implantima MM, MP i MPE tipa (Tabela 4.3.). U MM i MPEO implantima je viša ekspresija *Vcam-a 1* od one u grupama MP i MPE, što je značajno ($p < 0.05$). Četiri nedelje nakon implantacija, u implantima MPD tipa primećuje se značajno viša ($p < 0.05$) ekspresija *Vcam-a 1* od one u implantima MP, MPE, MPO i MPEO tipa, dok u odnosu na MPO implante grupe MM, MP, MPE i MPEO imaju značajno višu ($p < 0.05$) ekspresiju *Vcam-a 1* (Tabela 4.3.). U odnosu na sve druge tipove implanata, MPD grupa ima značajno višu ($p < 0.05$) ekspresiju *Vcam-a 1* posle osam nedelja od implantacija, a grupa MPO ima značajno višu ekspresiju *Vcam-a 1* ($p < 0.05$) u odnosu na sve grupe implanata osim MPD grupe (Tabela 4.3.). Implanti tipa MM i MPEO u istoj tački posmatranja poseduju značajno višu ($p < 0.05$) ekspresiju *Vcam-a 1* od MP i MPE implanata, a MPE grupa implanata u odnosu na implante MP tipa.

Egr -1 gen

Ekspresija *Egr-a 1* je jednu nedelju od implantacija značajno viša ($p < 0.05$) u grupi MPD u odnosu na ostale grupe implanata, a u MPO grupi je ekspresija *Egr-a 1* značajno viša ($p < 0.05$) nego u grupama MM, MP i MPE (Tabela 4.3.). Implanti MM i MPEO tipa imaju značajno višu ($p < 0.05$) ekspresiju ovog gena u odnosu na MP i MPE implante. Nakon dve nedelje od implantacija, u MPO tipu implanata je značajno viša ($p < 0.05$) ekspresija *Egr-a 1* u poređenju sa implantima tipa MM, MP i MPE, dok je u MPD implantima ekspresija ovog gena značajno viša ($p < 0.05$) nego u implantima MM, MP, MPE i MPEO tipa (Tabela 4.3.). U implantima MM i MPEO tipa je značajno viša ($p < 0.05$) ekspresija *Egr-a 1* u odnosu na MP implante. Na četiri nedelje od implantacija, ekspresija *Egr-a 1* je značajno ($p < 0.05$) viša u MM i MPO implantima nego u MPE i MPEO tipu implanata. U istoj tački posmatranja, zabeležena je značajno viša ($p < 0.05$) ekspresija ovog gena u MP, MPD i MPEO implantima nego u MPE tipu implanata (Tabela 4.3.). Osam nedelja posle implantacija u MPEO grupi je ekspresija *Egr-a 1* značajno viša ($p < 0.05$) u odnosu na implante grupa MM, MP, MPD i MPE, a u implantima MPO je ekspresija ovog gena značajno viša ($p < 0.05$) nego u grupama MM, MP i MPE. U istom terminu je značajno viša ($p < 0.05$) ekspresija *Egr-a 1* u MM i MPD implantima od one u grupama MP i MPE, ali je u MPE grupi ekspresija ovog gena značajno viša ($p < 0.05$) nego u MP grupi implanata (Tabela 4.3.).

Tabela 4.3. Vrednosti *Student*-ovog t-testa i značajnost razlika ($p < 0.05$) u relativnoj ekspresiji gena markera endotelskih ćelija u ispitivanim grupama implanata MM, MP, MPD, MPE, MPO i MPEO, u odnosu na objedinjen kalibrator, jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija.

I NEDELJA					II NEDELJA				
gen	<i>Vwf</i>	<i>Flt-1</i>	<i>Vcam-1</i>	<i>Egr-1</i>	gen	<i>Vwf</i>	<i>Flt-1</i>	<i>Vcam-1</i>	<i>Egr-1</i>
MM1/MP1	0.58	0.08	0.01	0.00002	MM2/MP2	0.0002	0.01	0.00001	0.0002
MM1/MPD1	0.65	0.07	0.32	0.03	MM2/MPD2	0.0003	0.0004	0.03	0.001
MM1/MPE1	0.01	0.002	0.0002	0.0003	MM2/MPE2	0.0001	0.01	0.0004	0.12
MM1/MPO1	0.06	0.00002	0.35	0.50	MM2/MPO2	0.004	0.001	0.54	0.04
MM1/MPEO1	0.17	0.07	0.03	0.17	MM2/MPEO2	0.51	0.0002	0.44	0.45
MP1/MPD1	0.19	0.03	0.001	0.003	MP2/MPD2	0.13	0.00004	0.00002	0.000002
MP1/MPE1	0.0001	0.28	0.59	0.16	MP2/MPE2	0.02	0.0000003	0.38	0.43
MP1/MPO1	0.03	0.34	0.02	0.01	MP2/MPO2	0.853	0.000003	0.13	0.0001
MP1/MPEO1	0.18	0.34	0.25	0.03	MP2/MPEO2	0.002	0.04	0.0001	0.001
MPD1/MPD1	0.0004	0.0001	0.0000001	0.00001	MPD2/MPE2	0.50	0.12	0.0001	0.004
MPD1/MPD1	0.001	0.0002	0.01	0.05	MPD2/MPO2	0.29	0.11	0.11	0.71
MPD1/MPD1	0.01	0.01	0.0005	0.01	MPD2/MPEO2	0.01	0.27	0.14	0.004
MPD1/MPD1	0.0000001	0.00000002	0.00005	0.0001	MPE2/MPO2	0.09	0.002	0.002	0.01
MPD1/MPD1	0.000001	0.001	0.06	0.001	MPE2/MPEO2	0.004	0.37	0.001	0.12
MPO1/MPD1	0.15	0.0001	0.02	0.06	MPO2/MPEO2	0.02	0.08	0.42	0.10

IV NEDELJA					VIII NEDELJA				
gen	<i>Vwf</i>	<i>Flt-1</i>	<i>Vcam-1</i>	<i>Egr-1</i>	gen	<i>Vwf</i>	<i>Flt-1</i>	<i>Vcam-1</i>	<i>Egr-1</i>
MM4/MP4	0.000001	0.86	0.44	0.17	MMS/MP8	0.25	0.000003	0.0000001	0.00001
MM4/MPD4	0.50	0.11	0.14	0.09	MMS/MPD8	0.01	0.78	0.0009	0.13
MM4/MPE4	0.59	0.04	0.45	0.00002	MMS/MPE8	0.01	0.03	0.004	0.02
MM4/MPO4	0.001	0.07	0.02	0.44	MMS/MPO8	0.33	0.04	0.01	0.004
MM4/MPEO4	0.12	0.59	0.24	0.03	MMS/MPEO8	0.004	0.68	0.11	0.00004
MP4/MPD4	0.000002	0.35	0.004	0.54	MPS/MP8	0.26	0.004	0.000003	0.00001
MP4/MPE4	0.07	0.09	0.99	0.00001	MPS/MPD8	0.002	0.02	0.004	0.001
MP4/MPO4	0.06	0.09	0.01	0.72	MPS/MPE8	0.09	0.00003	0.00000003	0.000002
MP4/MPEO4	0.00001	0.65	0.33	0.13	MPS/MPEO8	0.002	0.0000001	0.00001	0.002
MPD4/MPD4	0.80	0.01	0.005	0.001	MPD8/MPE8	0.00003	0.17	0.000001	1
MPD4/MPO4	0.003	0.37	0.00003	0.16	MPD8/MPO8	0.002	0.09	0.02	0.08
MPD4/MPEO4	0.24	0.58	0.001	0.22	MPD8/MPEO8	0.0001	0.66	0.001	0.004
MPE4/MPO4	0.36	0.003	0.01	0.001	MPES/MP8	0.11	0.001	0.000002	0.001
MPE4/MPEO4	0.98	0.05	0.34	0.009	MPES/MPD8	0.05	0.02	0.001	0.00004
MPO4/MPEO4	0.01	0.26	0.04	0.05	MPOS/MP8	0.01	0.06	0.003	0.21

MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama; n - nedelja.; sivo polje - značajna razlika ($p < 0.05$).

4.2.7.4. Statistička analiza ekspresije *Spp1* gena u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža

Jednu nedelju nakon implantacija, u grupi MPD je ekspresija *Spp*-a 1 značajno viša ($p < 0.05$) u odnosu na grupu MM, a u grupama MPO i MPEO ($p < 0.05$) u odnosu na grupe MM i MPE (Tabela 4.4.). Nakon dve nedelje od implantacija, u MPD i MPE implantima je ekspresija ovog gena značajno viša ($p < 0.05$) u poređenju sa implantima tipa MM, MP i MPEO, dok je u implantima MPO i MPEO tipa značajno viša ($p < 0.05$) ekspresija *Spp*-a 1 u odnosu na onu u grupama MM i MP (Tabela 4.4.).

Tabela 4.4. Vrednosti *Student*-ovog t-testa i značajnost razlika ($p < 0.05$) u relativnoj ekspresiji *Spp1* gena u ispitivanim grupama implanata MM, MP, MPD, MPE, MPO i MPEO, u odnosu na ćelije iz trećeg pasaža, jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija.

I NEDELJA		II NEDELJA		IV NEDELJA		VIII NEDELJA	
gen	<i>Spp1</i>	gen	<i>Spp1</i>	gen	<i>Spp1</i>	gen	<i>Spp1</i>
MM1/MP1	0.52	MM2/MP2	0.74	MM4/MP4	0.01	MMS/MP8	0.36
MM1/MPD1	0.01	MM2/MPD2	0.001	MM4/MPD4	0.001	MMS/MPD8	0.02
MM1/MPE1	0.06	MM2/MPE2	0.00002	MM4/MPE4	0.0003	MMS/MPES	0.03
MM1/MO1	0.003	MM2/MO2	0.0003	MM4/MO4	0.04	MMS/MPOS	0.001
MM1/MPEO1	0.002	MM2/MPEO2	0.02	MM4/MPEO4	0.07	MMS/MPEO8	0.27
MP1/MPD1	0.13	MP2/MPD2	0.001	MP4/MPD4	0.01	MP8/MPD8	0.01
MP1/MPE1	0.63	MP2/MPE2	0.00004	MP4/MPE4	0.04	MP8/MPES	0.01
MP1/MPO1	0.13	MP2/MPO2	0.001	MP4/MPO4	0.61	MP8/MPOS	0.01
MP1/MPEO1	0.11	MP2/MPEO2	0.02	MP4/MPEO4	0.81	MP8/MPEO8	0.09
MPD1/MPE1	0.07	MPD2/MPE2	0.601	MPD4/MPE4	0.17	MPD8/MPES	0.61
MPD1/MPO1	0.69	MPD2/MPO2	0.44	MPD4/MPO4	0.01	MPD8/MPOS	0.00003
MPD1/MPEO1	0.83	MPD2/MPEO2	0.03	MPD4/MPEO4	0.04	MPD8/MPEO8	0.95
MPE1/MPO1	0.01	MPE2/MPO2	0.11	MPE4/MPO4	0.02	MPES/MPOS	0.00002
MPE1/MPEO1	0.004	MPE2/MPEO2	0.004	MPE4/MPEO4	0.07	MPES/MPEO8	0.77
MPO1/MPEO1	0.65	MPO2/MPEO2	0.06	MPO4/MPEO4	0.86	MPOS/MPEO8	0.01

MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama; n - nedelja.; sivo polje - značajna razlika ($p < 0.05$).

Četiri nedelje posle implantacija je u MPE grupi značajno viša ekspresija *Spp*-a 1 od one u implantima grupa MM, MP i MPO, a kao i u implantima tipa MP u odnosu na implante MM i MPD tipa (Tabela 4.4.). U MPD grupi je ekspresija ovog gena

značajno viša ($p < 0.05$) nego u grupama MM, MPO i MPEO, a značajnost postoji ($p < 0.05$) i između grupa MM i MPO pri čemu je ekspresija *Spp-a 1* viša u MPO nego u MM implantima. Osam nedelja od implantacija se uočava (Tabela 4.4.) da je u MM implantima ekspresija *Spp-a 1* značajno viša ($p < 0.05$) u odnosu na ekspresiju ovog gena u grupama MPD, MPE i MPO, dok grupe MP, MPE i MPEO imaju značajno višu ($p < 0.05$) ekspresiju *Spp-a 1* u odnosu na MPO grupu. U MPD tipu implanata je ekspresija *Spp-a 1* značajno viša ($p < 0.05$) u odnosu na MM, MP i MPO implante.

4.2.7.5. Statistička analiza ekspresije *Spp1* gena u odnosu na plazmu obogaćenu trombocitima

Jednu nedelju nakon implantacija, ekspresija *Spp-a 1* je značajno viša ($p < 0.05$) u MPE grupi nego u grupama MM, MP i MPD, a u MPO grupi ($p < 0.05$) u odnosu na grupe MM, MP, MPD i MPEO (Tabela 4.5.).

Tabela 4.5. Vrednosti *Student*-ovog t-testa i značajnost razlika ($p < 0.05$) u relativnoj ekspresiji *Spp1* gena u ispitivanim grupama implanata MM, MP, MPD, MPE, MPO i MPEO, u odnosu na plazmu obogaćenu trombocitima, jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija.

I NEDELJA	<i>Spp1</i>	II NEDELJA	<i>Spp1</i>	IV NEDELJA	<i>Spp1</i>	VIII NEDELJA	<i>Spp1</i>
MM1/MP1	0.19	MM2/MP2	0.27	MM4/MP4	0.002	MMS/MP8	0.03
MM1/MPD1	0.24	MM2/MPD2	0.08	MM4/MPD4	0.0002	MMS/MPD8	0.06
MM1/MPE1	0.02	MM2/MPE2	0.21	MM4/MPE4	0.002	MMS/MPES	0.09
MM1/MPO1	0.02	MM2/MPO2	0.002	MM4/MPO4	0.0002	MMS/MPOS	0.002
MM1/MPEO1	0.92	MM2/MPEO2	0.01	MM4/MPEO4	0.01	MMS/MPEO8	0.001
MP1/MPD1	0.48	MP2/MPD2	0.03	MP4/MPD4	0.41	MP8/MPD8	0.22
MP1/MPE1	0.01	MP2/MPE2	0.04	MP4/MPE4	0.59	MP8/MPES	0.88
MP1/MPO1	0.02	MP2/MPO2	0.002	MP4/MPO4	0.07	MP8/MPOS	0.13
MP1/MPEO1	0.16	MP2/MPEO2	0.01	MP4/MPEO4	0.43	MP8/MPEO8	0.002
MPD1/MPE1	0.001	MPD/MPE2	0.75	MPD4/MPE4	0.73	MPD8/MPES	0.36
MPD1/MPO1	0.001	MPD2/MPO2	0.06	MPD4/MPO4	0.01	MPD8/MPOS	0.01
MPD1/MPEO1	0.11	MPD2/MPEO2	0.28	MPD4/MPEO4	0.0002	MPD8/MPEO8	0.002
MPE1/MPO1	0.54	MPE2/MPO2	0.04	MPE4/MPO4	0.02	MPES/MPOS	0.35
MPE1/MPEO1	0.16	MPE2/MPEO2	0.18	MPE4/MPEO4	0.23	MPES/MPEO8	0.01
MPO1/MPEO1	0.0002	MPO2/MPEO2	0.36	MPO4/MPEO4	0.46	MPOS/MPEO8	0.02

MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama; n - nedelja.; sivo polje - značajna razlika ($p < 0.05$).

Dve nedelje nakon implantacija, MPO tip implanata ima značajno višu ($p < 0.05$) ekspresiju *Spp-a 1* u odnosu na implante tipa MM, MP i MPE, a u MPEO implantima je ekspresija ovog gena značajno viša ($p < 0.05$) nego u implantima MM i MP tipa (Tabela 4.5.).

Četiri nedelje posle implantacija, MPO implanti imaju značajno višu ($p < 0.05$) ekspresiju *Spp-a 1* od implanata tipa MM, MPD i MPE, implanti MPEO tipa od implanata tipa MM i MPD, a implanti MP, MPD i MPE tipa od MM implanata (Tabela 4.5.). Osam nedelja posle implantacija, ekspresija *Spp-a 1* je najviša u MPEO implantima, što je značajno ($p < 0.05$) u odnosu na ostale tipove implanata. U MPO implantima je ekspresija *Spp-1* značajno viša ($p < 0.05$) u odnosu na ostale tipove implante, izuzev MPEO tipa. MP implanti imaju značajno višu ($p < 0.05$) ekspresiju *Spp-a 1* od MM implanata (Tabela 4.5.).

4.2.7.6. Statistička analiza ekspresije Spp1 gena u odnosu na objedinjen kalibrator

Posle jedne nedelje od implantacija, ekspresija *Spp-a 1* je značajno viša ($p < 0.05$) u grupi MPD u poređenju sa grupama MM, MP, MPE i MPEO, a u grupi MPE u odnosu na MM i MP grupe implanata (Tabela 4.6.). Jednu nedelju nakon implantacija, u grupama MPO i MPEO je značajno viša ($p < 0.05$) ekspresija *Spp-a 1* od one u MP implantima. Implanti MPE grupe imaju najvišu ekspresiju *Spp-a 1* dve nedelje posle implantacija što je značajno ($p < 0.05$) u poređenju sa svim ostalim eksperimentalnim grupama (Tabela 4.6.). MPEO implanti imaju značajno višu ($p < 0.05$) ekspresiju ovog gena u odnosu na MM i MPD implante, MPD implanti u odnosu na MM, MP i MPO implante, a MPO grupa u odnosu na MM i MP grupe implanata. Četiri nedelje nakon implantacija, u MPD tipu implanata je značajno viša ($p < 0.05$) ekspresija *Spp-a 1* nego u svim drugim implantima, a u MPE implantima je ekspresija ovog gena značajno viša ($p < 0.05$) nego u drugim grupama izuzev grupe MPD (Tabela 4.6.). Osam nedelja posle implantacija, u implantima MPD i MPE tipa je ekspresija *Spp-a 1* značajno viša ($p < 0.05$) od one u implantima tipa MM, MP i MPO (Tabela 4.6.).

Tabela 4.6. Vrednosti *Student*-ovog t-testa i značajnost razlika ($p < 0.05$) u relativnoj ekspresiji *Spp1* gena u ispitivanim grupama implanata MM, MP, MPD, MPE, MPO i MPEO, u odnosu na objedinjen kalibrator, jednu, dve, četiri i osam nedelja nakon implantacija.

I NEDELJA		II NEDELJA		IV NEDELJA		VIII NEDELJA	
gen	<i>Spp1</i>	gen	<i>Spp1</i>	gen	<i>Spp1</i>	gen	<i>Spp1</i>
MM1/MP1	0,08	MM2/MP2	0,07	MM4/MP4	0,61	MMS/MP8	0,09
MM1/MPD1	0,02	MM2/MPD2	0,0002	MM4/MPD4	0,001	MMS/MPD8	0,01
MM1/MPE1	0,03	MM2/MPE2	0,0000002	MM4/MPE4	0,00004	MMS/MPES	0,01
MM1/MPO1	0,07	MM2/MPO2	0,006	MM4/MPO4	0,39	MMS/MPOS	0,06
MM1/MPEO1	0,21	MM2/MPEO2	0,04	MM4/MPEO4	0,38	MMS/MPEO8	0,51
MP1/MPD1	0,001	MP2/MPD2	0,000002	MP4/MPD4	0,00002	MPS/MPD8	0,003
MP1/MPE1	0,0001	MP2/MPE2	0,00000003	MP4/MPE4	0,000002	MPS/MPES	0,0001
MP1/MPO1	0,002	MP2/MPO2	0,003	MP4/MPO4	0,09	MPS/MPOS	0,91
MP1/MPEO1	0,01	MP2/MPEO2	0,10	MP4/MPEO4	0,40	MPS/MPEO8	0,06
MPD1/MPE1	0,02	MPD/MPE2	0,04	MPD4/MPE4	0,01	MPDS/MPES	0,30
MPD1/MPO1	0,12	MPD2/MPO2	0,02	MPD4/MPO4	0,003	MPDS/MPOS	0,002
MPD1/MPEO1	0,04	MPD2/MPEO2	0,01	MPD4/MPEO4	0,03	MPDS/MPEO8	0,53
MPE1/MPO1	0,67	MPE2/MPO2	0,01	MPE4/MPO4	0,001	MPES/MPOS	0,0001
MPE1/MPEO1	0,23	MPE2/MPEO2	0,001	MPE4/MPEO4	0,02	MPES/MPEO8	0,59
MPO1/MPEO1	0,13	MPO2/MPEO2	0,34	MPO4/MPEO4	0,86	MPOS/MPEO8	0,14

MM tip - MMK; MP tip - MMK/PRP; MPD tip - MMK/PRP/neindukovane ADSC; MPE tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama; MPO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka osteogenim ćelijama; MPEO tip - MMK/PRP/ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama; n - nedelja.; sivo polje - značajna razlika ($p < 0.05$).

5. DISKUSIJA

Razvoj vaskularne mreže je preduslov za osteogeni proces (*Carano i Filvaroff, 2003*). Osteoblasti proizvode osteoid, diferenciraju se u osteocite i izgrađuju zdravu kost jedino kada je vaskularna mreža normalno razvijena (*Zhou i Dong, 2012*). Kost je izvanredno vaskularizovan organ visokog kapaciteta regeneracije (*Jin i sar., 2015*), zbog čega se većina fraktura može spontano zalečiti (*Stevens, 2008*). Hirurške intervencije su neophodne kada postoje koštani defekti kritične veličine (*Stevens, 2008*). Ovi defekti ili imaju takvu veličinu koja sprečava zalečenje putem spontane regeneracije ili u njima postoji patološki proces koji sprečava regeneraciju (*Allo i sar., 2012*). Vaskularizovana autologna kost je “zlatni standard” za zalečenje ovakvih defekata, jer sadrži osteogene ćelije, osteoinduktivne i osteokonduktivne faktore i adekvatno je snabdevena krvlju, što zajedno podržava vijabilnost grafta (*Schroeder i Mosheiff, 2011*). Budući da je uzimanje autologne kosti obično povezano sa zdravstvenim rizicima za pacijenta, a izvor tkiva ograničen, jedna od mogućih alternativa je upotreba obrađenih koštanih alografta (*Bishop i Pelzer, 2007*). Odsustvo vaskularne mreže ograničava vijabilnost implantiranog alografta, a uz to alograftima nedostaju osteogene ćelije i osteoinduktivni faktori rasta (*Cornejo i sar., 2012*). Problemi sa autograftima i alograftima su doveli do toga da istraživači potraže rešenje za regeneraciju kostiju u oblasti tkivnog inženjerstva. Uspešnost metode primenjene u oblasti tkivnog inženjerstva kosti procenjuje se na osnovu stepena infiltracije krvnih sudova u tkivne skafolde (*Patel i sar., 2008*).

Visoko vaskularizovana struktura kostiju omogućava da se zadovolji jaka potreba za nutrijentima, transferom jona i otpadnih produkata i da se održi normalan rast, razvoj i remodeliranje kosti (*Rao i Stegemann, 2013*). Međutim, difuzija kiseonika je ograničena na oko 150 µm udaljenosti od kapilara u aktivnim tkivima, što predstavlja veliki problem u tkivnom inženjerstvu kosti (*Sun i sar., 2007; Yu i sar., 2009; Jin i sar., 2015*). Ukoliko je vaskularizacija nedovoljna, osteoblasti lokalizovani u centru inženjerisanih implanata podležu nekrozi, pa dolazi do stvaranja nekrotičnih jezgara (*Yu i sar., 2009*).

Problem neadekvatne vaskularizacije u tkivnom inženjerstvu kosti rešavan je pomoću više različitih pristupa, uključujući menjanje arhitekture i međusobne

povezanosti pora biomaterijala nosača ćelija (*Druecke i sar., 2004*), kokultivaciju ćelija (*Wang i sar., 1997; Buschmann i sar., 2011; Gueven i sar., 2011*), mehaničku stimulaciju (*Azuma i sar., 2000; Von Offenberg Sweeney i sar., 2005*), dodavanje jednog (*Anderson i sar., 2011*) ili više različitih faktora rasta istovremeno u implante (*Patel i sar., 2008; Kanczler i sar., 2010; Sun i sar., 2011*) i prevaskularizaciju tkiva ili implanata intaktnim mikrokrvnim sudovima ili kultivisanim vaskularnim ćelijama (*Traktuev i sar., 2009*). Rađene su i implantacije u visoko vaskularizovana područja ili zasejavanja implanata ćelijama koje sekretuju hemoatraktante za privlačenje ćelija domaćina i krvnih sudova manjeg dijametra (*Soker i sar., 2000*), inkorporacija mikrovaskularnih fragmenata adipoznog tkiva (*Laschke i sar., 2012*), stvaranje pokretljivih delova tkiva (*flap*, engl.) delimično povezanih sa telom (*Warnke i sar., 2010*) kao i arterio-venskih vaskularnih čvorova (*Yang i sar., 2013*). Primenjivani su skafoldi od nano i mikro vlakana (*Tuzlakoglu i sar., 2005*) ili je rađena mikrofabrikacija skafolda (*Song i sar., 2015*). Novije strategije u tkivnom inženjerstvu kosti svakako uključuju interakcije između skafolda, bioloških signalnih molekula i ćelija. Ove interakcije mogu se postići oponašanjem nativnih tkiva koja su sačinjena iz biološke trijade – vanćelijskog matriksa, signalnih molekula i ćelija (*Partap i sar., 2010; Najdanović i sar., 2016*).

U cilju prevazilaženja problema neadekvatnog razvoja krvnih sudova i posledične nemogućnosti regeneracije koštanog tkiva, u našim istraživanjima je ispitivan uticaj ADSC belog masnog tkiva miša, indukovanih *in vitro* ka endotelskim i osteogenim ćelijama, na vaskularizovanost ektopičnih osteogenih implanata. Polazna pretpostavka bila je da su endotelske ćelije, bilo same ili implantirane u kombinaciji sa osteogeno indukovanim ćelijama, izuzetno značajan faktor koji utiče na vaskularizovanost subkutanih implanata, koja je uslov za početak rane faze osteogeneze. Istraživanje je rađeno na modelu ektopične osteogeneze, jer se na taj način mogu isključiti uticaji faktora iz same kosti i proceniti, nezavisno od kosti, uticaj ispitivanih faktora na stepen angiogenog i osteogenog procesa *in vivo* (*Scherberich i sar., 2010*).

Konstrukcija prevaskularizovanih skafolda, koji sadrže endotelske ćelije, može potencijalno da olakša anastomoziranje bioinženjerisanih vaskularnih struktura sa onima iz tkiva oko implanata (*Levenberg i sar., 2005*). U *in vitro* uslovima, endotelske ćelije mogu obrazovati vaskularne strukture (*Najdanović i sar., 2015*), a nakon implantacije

moгу anastomozirati sa krvnim sudovima domaćina (*Rouwkema i sar., 2006; Verseijden i sar., 2010*). Prisustvo funkcionalnih endotelskih ćelija poboljšava otvorenost sintetičkih vaskularnih graftova (*Meinhart i sar., 2001*), ali je ovakve graftove teško pripremiti, jer su autologni izvori endotelskih ćelija ograničeni (*Seifalian i sar., 2002*) i zato što zrele endotelske ćelije imaju ograničenu proliferativnu moć (*Kim i Von Recum 2008*). Usled toga su razvijene alternativne metode za dobijanje endotelskih ćelija, koje podrazumevaju indukciju diferencijacije MSC ka endotelskim.

BMSC su često primenjivane u tkivnom inženjerstvu kosti, a dobijeni rezultati su bili obećavajući (*Quarto i sar., 2001; Arinze i sar., 2003; Oswald i sar., 2004*). Pokazano je da su i ADSC i BMSC, prethodno *in vitro* diferencirane u endotelske ćelije, potpomogle neovaskularizaciju na modelu ishemije zadnjih nogu (*Planat-Benard i sar., 2004; Sumi i sar., 2007*). Međutim, masno tkivo je mnogo obilniji izvor matičnih ćelija od kostne srži, jer ima 100 do 1000 puta veći prinos ovih ćelija (*De Ugarte i sar., 2003; Fraser, 2002*). Uz to, masno tkivo može biti dobijeno minimalno invazivnim hirurškim tehnikama (*Hong i sar., 2010; Merfeld-Clauss i sar., 2010*), a nizak morbiditet tokom procedure uzimanja masnog tkiva (*Sandor i Suuronen, 2008*), čini ovo tkivo optimalnijim izvorom mezenhimskih matičnih ćelija u poređenju sa kostnom srži.

5.1. *In vitro* ispitivanja mezenhimskih matičnih ćelija stromalne vaskularne frakcije masnog tkiva

5.1.1. *In vitro* ekspanzija mezenhimskih matičnih ćelija stromalne vaskularne frakcije

U našem istraživanju, vretenaste, sitne i uglavnom pojedinačne ćelije iz SVF su adherirale za plastiku nakon 24 sata od zasejavanja, što je jedno od svojstava MSC (*Dominici i sar., 2006*). Rezultati imunocitohemijske analize pokazuju da više od polovine adheriranih ćelija eksprimira CD29 i CD44, pozitivne markere za ADSC (*Sung i sar., 2008; Taha i Hedayati 2010*). Ove ćelije su negativne na CD14, marker ćelija monocito-makrofagne linije (*Zuk i sar., 2002; Planat-Benard i sar., 2004; Dominici i sar., 2006*). Neke ćelije ekspimiraju i markere endotelskih ćelija, VEGFR-2 i VCAM-1, što se moglo očekivati, jer se brojne populacije ćelija nalaze u sveže izolovanoj SVF

(Yoshimura i sar., 2006; Tsuji i sar., 2014), kao i među ADSC tokom ranih pasaža (Konno i sar., 2010) uključujući i mikrovaskularne endotelske ćelije. U našem istraživanju je pokazano, analizom ekspresije gena markera endotelske diferencijacije, da je ekspresija *Vwf*-a i *Vcam*-a 1 viša u ćelijama SVF nego u ćelijama kultivisanim 24 sata nakon trećeg pasaža, ćelijama koje su ekspanzirane dvanaest dana nakon trećeg pasaža bez dodataka induktivnih medijuma i PRP. Uz to, ekspresija gena markera endotelskih ćelija u indukovanim ćelijama je negativno regulisana u odnosu na sveže izolovane ćelije SVF, u svim tačkama posmatranja. Ovakav rezultat potvrđuje vaskulogeni potencijal ćelija sadržanih u SVF. Ekspresija gena za osteopontin, *Spp*-a 1, viša je u ćelijama ekspanziranom dvanaest dana nakon trećeg pasaža bez dodataka induktivnih medijuma, nego u ćelijama SVF i ćelijama kultivisanim 24 sata nakon trećeg pasaža, što je u skladu sa podacima da ekspresija osteopontina u neindukovanim ADSC raste u kasnijim fazama kultivacije ovih ćelija (Man i sar., 2012).

Kako bi kulture bile prečišćene od vaskularnih i drugih diferentovanih ćelija, a u cilju održavanja homogene populacije MSC u kulturi (Tsuji i sar., 2014), u ovoj disertaciji su rađeni pasaži ćelija. Intenzivna proliferacija ćelija nalik na fibroblaste, koje su se izduživale i udruživale u snopove, zapažena je pre prvog pasaža (Slike 4.1. i 4.2.). Taléns-Visconti i saradnici (2006) su pokazali da ADSC liče na fibroblaste tokom *in vitro* kultivacije, a pre dodavanja faktora za diferencijaciju ka određenoj ćelijskoj liniji.

Nakon preliminarnih istraživanja u kojima su posle prvog, trećeg i petog pasaža rađene endotelska i osteogena diferencijacija, za diferencijaciju su odabrane tri puta pasažirane ćelije, što je u skladu sa najvećim brojem do sada objavljenih sličnih istraživanja (Taha i Hedayati, 2010; Man i sar., 2012; Culmes i sar., 2013). ADSC se umnožavaju kroz pasaže pri čemu njihova multipotentnost biva očuvana (Nakagami i sar., 2010). Imunofenotip ADSC se menja tokom adherencije ćelija u kulturi i kroz pasaže, pri čemu je ekspresija markera MSC inicijalno niska u SVF, a raste sa svakim narednim pasažom (Mitchell i sar., 2006). U našem istraživanju, endotelskoj i osteogenoj diferencijaciji podvrgli smo ADSC koje su jedan dan nakon trećeg pasaža eksprimirale CD29 i CD44 i bile negativne na CD14. Prema podacima iz literature, ekspresija CD29 raste u pasažiranim ćelijama u poređenju sa ćelijama iz sveže izolovane SVF (Traktuev i sar., 2006), a ADSC se smatraju CD14 negativnim (Cai i

sar., 2012). Na taj način, potvrdili smo da su ćelije koje smo koristili za endotelsku i osteogenu diferencijaciju poreklom iz masnog tkiva, kao i da te ćelije nisu cirkulišući endotelski progenitori (Fernandez Pujol i sar., 2000), koji imaju monocitno-makrofagno poreklo, pa ekspresiraju CD14 (Planat-Benard i sar., 2004). Posle 24 sata od trećeg pasaža, ekspresija VEGFR-a 2 i VCAM-a 1 u ADSC je smanjena u odnosu na ćelije iz sveže izolovane SVF, što bi značilo da je tokom subkultivacije došlo do eliminacije mikrovaskularnih endotelskih ćelija. Endotelska komponenta SVF se gubi brzo tokom kultivacije (Planat-Benard i sar., 2004; Nakagami i sar., 2006), ali ADSC mogu biti podvrgnute endotelskoj diferencijaciji kultivacijom u specifičnom inaktivnom medijumu (Planat-Benard i sar., 2004; Cao i sar., 2005; Najdanović i sar., 2015; Najdanović i sar., 2016).

5.1.2. *In vitro* endotelska diferencijacija mezenhimskih matičnih ćelija stromalne vaskularne frakcije

Za indukciju endotelske diferencijacije u našem istraživanju je korišćen kit za endotelsku diferencijaciju koji sadrži nekoliko faktora rasta, pri čemu su VEGF i EGF u višim koncentracijama od ostalih. Poznato je da je EGF moćni mitogeni polipeptid koji ubrzava angiogenezu *in vitro* i *in vivo* (Wakui, 1992), dok je VEGF ključni faktor rasta tokom embrionalnog razvoja i diferencijacije vaskularnog sistema (Carmeliet i sar., 1996; Ferrara i sar., 1996). Endotelske ćelije nastaju iz istih prekursora kao i ćelije hematopoetske linije, a VEGF je “prekidač” koji kontroliše diferencijaciju prekursora u jednu od ovih linija. Specifični receptori VEGF-a su VEGFR-1/*Flt-1* i VEGFR-2/*Kdr* (Yang i sar., 2012). Iz tog razloga, ispitivali smo njihovu gensku (*Flt-1*), odnosno imunoekspresiju (VEGFR-2) u ADSC indukovanim ka endotelskim ćelijama.

In vitro endotelska diferencijacija ADSC je procenjivana u odnosu na kulture koje su rasle u standardnom medijumu za ćelijske kulture, DMEM-u (neindukovane ADSC). Neindukovane ADSC su takođe korišćene i za konstrukciju implanata. Tri dana nakon trećeg pasaža, ove neindukovane CD29⁺/CD44⁺/CD14⁻ ADSC su ili fibroblastolike i usnopljene ili su nalik na epitelne ćelije (Slika 4.8.a). Fibroblastolik izgled i nasumičan raspored su neindukovane ADSC zadržale zaključno sa petnaestim danom nakon trećeg pasaža (Slika 4.9.c). Morfologija nalik na glatke mišićne ćelije

tipična je za ADSC koje rastu u medijumu kome nisu dodati induktivni faktori za diferencijaciju ka određenoj ćelijskoj liniji (*Fischer i sar., 2009*). Neindukovane ćelije imaju slabu imunoekspresiju VEGFR-a 2 i VCAM-a 1 (Slike 4.10., 4.11. i 4.12.), u svakoj tački posmatranja (sedam, dvanaest, petnaest dana od trećeg pasaža), što je u skladu sa istraživanjem *Culmes-a* i saradnika (*2013*) koji su pokazali da ADSC nakon trećeg pasaža ne eksprimiraju VCAM-1.

ADSC koje su u okviru istraživanja ove disertacije podvrgnute endoteljskoj diferencijaciji su nakon sedam dana od indukcije diferencijacije organizovane u grupacije tako da, pomoću svojih dugih nastavaka, anastomoziraju sa ćelijama iz susednih grupacija. Ove ćelije rastu u jednom sloju, imaju *cobblestone* morfologiju, svojstvenu endoteljskim ćelijama (*Wu i sar 2003; Boscolo i sar., 2011*) i blagu imunoekspresiju VEGFR-a 2 i VCAM-a 1. VEGFR-2 je rani marker angiogeneze (*Hoeben i sar., 2004*), a VCAM-1 protein čija je ekspresija karakteristična za endoteljske ćelije (*Culmes i sar., 2013*). Nakon dvanaest dana od *in vitro* indukcije endoteljske diferencijacije, povezane ćelije iz susednih grupacija formiraju mrežu čija se „okca” jasno uočavaju i podsećaju na lumen krvnih sudova, što kulturama ADSC daje izgled razgranate kapilarne mreže. Prema literaturnim podacima, endoteljske ćelije tokom kultivacije u prisustvu specifičnih faktora rasta, poput VEGF-a, obrazuju mreže krvnih sudova koje liče na mikrokapilare koji formiraju lumen (*Folkman i Haudenschild, 1980*). Imunoekspresija VEGFR-a 2 i VCAM-a 1 u našim kulturama je nakon dvanaest dana od endoteljske indukcije jako izražena, a petnaestog dana od indukcije endoteljske diferencijacije, imunoekspresija VEGFR-a 2 i VCAM-a 1 je smanjena u odnosu na 12. dan od indukcije endoteljske diferencijacije.

Ekspresija gena markera endoteljskih ćelija je najviša nakon sedmog ili dvanaestog dana od indukcije endoteljske diferencijacije. Trećeg dana endoteljske diferencijacije, ekspresija svih gena, osim *Vwf-a*, je pozitivno regulisana. Ekspresija gena *Vwf*, čija se pozitivna regulacija dovodi u vezu sa *in vitro* endoteljskom diferencijacijom (*Baer, 2011*), u našem eksperimentu je pozitivno regulisana sedmog dana od indukcije endoteljske diferencijacije, kada je ujedno zabeležena i najviša ekspresija ovog gena. *Konno* i saradnici (*2010*) su pokazali da, sedam dana nakon *in vitro* indukcije endoteljske diferencijacije, ADSC počinju da eksprimiraju *Vwf*, čija ekspresija deset dana od početka indukcije dostiže svoj približno najviši nivo. Moglo bi

se zaključiti da je sedmi dan od ključne važnosti za ekspresiju *Vwf*-a tokom *in vitro* endotelske diferencijacije. Interesantno je da *in vitro* indukcija angiogeneze preko VEGFR2-zavisnog puta može biti postignuta inhibicijom *Vwf*-a, kao i da je povezana sa pojačanim oslobađanjem angiopoetina 2 (Starke i sar., 2011). Prema podacima iz literature, porast ekspresije *Vwf*-a utiče na stabilizaciju endotelskih ćelija u kasnijim stadijumima razvoja mreže krvnih sudova, u smislu da smanjuje proliferaciju ovih ćelija (Pedersen i sar., 2012).

Gen *Egr-1* kodira sintezu transkripcionog faktora Egr-a 1 koji pozitivno reguliše ekspresiju *Flt-a 1* (Gashler i Sukhatme, 1995) i *Vcam-a 1* (Fu i sar., 2003). Ekspresija *Egr-a 1* u endotelskim ćelijama može biti indukovana različitim proangiogenim faktorima, uključujući FGF-2 i EGF (Tsai i sar., 2000), što je u našem istraživanju urađeno korišćenjem induktivnog medijuma. Aktiviran *Egr-1* značajno doprinosi angiopoetinom-1 (Ang-1) indukovanoj migraciji i proliferaciji endotelskih ćelija i formiranju struktura koje podsećaju na kapilare (Abdel-Malak i sar., 2009).

Naši rezultati dobijeni analizom ekspresije gena i proteina markera endotelskih ćelija bili su kriterijum za odabiranje ADSC nakon dvanaest dana od indukcije endotelske diferencijacije za konstrukciju implanata.

Pouzdanost naših rezultata ekspresije ispitivanih gena pokazali su rezultati elektroforeze na gelu prema kojima su svi produkti qRT-PCR reakcije specifični i dobrog su kvaliteta (Slika 4.63.). Ustanovljena podudarnost dužine razdvojenih fragmenata na gelu u potpunosti se poklapa sa dužinom produkata navedenom u specifikaciji proizvođača, što je uslov za uključivanje analiziranih produkata u analizu relativne ekspresije gena.

5.1.3. *In vitro* osteogena diferencijacija mezenhimskih matičnih ćelija stromalne vaskularne frakcije

In vitro osteogena diferencijacija CD29⁺/CD44⁺/CD14⁻ ADSC indukovana je pomoću deksametazona, β-glicerol fosfata i vitamina C. Deksametazon, primenjen u *in vitro* uslovima u niskoj dozi (10⁻⁸ M), ima pozitivan efekat na proliferaciju MSC i ujedno pojačava njihov osteogeni potencijal (Xiao i sar., 2010). β-glicerofosfat potpomaže formiranje minerala tako što ćelije koštanog tkiva dovode do njegove

hidrolize, nakon koje se oslobađaju joni fosfata (*Chung i sar., 1992*). Vitamin C je važan kofaktor u sintezi kolagena (*Choi i sar., 2008*). Uz sintezu kolagena, vitamin C utiče i na povećanu ekspresiju markera osteoblasta i mineralizaciju (*Jaiswal i sar., 1997*).

Ispitivani geni markeri osteoblasta su pozitivno regulisani u odnosu na ćelije ubačene u RNA later nakon trećeg pasaža, u svim tačkama posmatranja. Nivo ekspresije ovih gena postepeno raste od prve ka poslednjoj tački u kojoj je ekspresija analizirana, pa je najviša vrednost ekspresije svih analiziranih gena petnaestog dana od *in vitro* indukcije osteogene diferencijacije. Geni *Colla1* i *Alpl* su rani (*Aubin, 2001*), *Bglap* kasni marker *in vitro* osteogene diferencijacije (*Hoemann i sar., 2009; Hyun i sar., 2011*), a *Sp7* kodira sintezu transkripcionog faktora osteriksa, koji reguliše ekspresiju *Bglap*-a i *Colla1* (*Nakashima, 2002; Koga i sar., 2005*). U ovoj disertaciji, *Bglap* i *Colla1* imaju isti obrazac ekspresije kao i *Sp7* (Grafikon 4.4.), što je u saglasnosti sa studijom *Nakashima*-e i njegovog tima (*2002*). Ovaj tim je pokazao da, kod nokaut (*knock-out* ili *null-mice*, engl.) miševa sa inaktiviranim *Sp7* genom, MSC ne deponuju koštani matriks tokom endohondralnog okoštavanja, niti se ćelije periosta i kondenzovanog mezenhima tokom unutarmembranskog okoštavanja diferenciraju u osteoblaste.

U našem istraživanju su prve morfološke razlike između ADSC indukovanih ka osteogenim ćelijama i neindukovanih ADSC uočene sedam dana nakon trećeg pasaža, kada su u medijumu za osteogenu diferencijaciju zapažene prve ćelije koje liče na osteoblaste, pozitivne na marker osteoblasta osteokalcin. Imunoekspresija osteokalcina u kulturama koje su sedam dana rasle u DMEM-u je manja nego u indukovanim ćelijama. Ćelije koje liče na osteoblaste su dvanaestog dana od indukcije diferencijacije u jednom sloju prekrile dno flaska u vidu struktura čija je organizacija podsećala na organizaciju osteona, a imunoekspresija osteokalcina je bila približno jednaka u ovim i neindukovanim ćelijama. Petnaest dana nakon trećeg pasaža ADSC indukovane ka osteogenim ćelijama su, za razliku od neindukovanih ćelija, jako pozitivne na osteokalcin. Osteokalcin je jedan od nekoliko proteina specifičnih za osteoblaste (*Lian i sar., 1989*) i nakon kolagena I najprisutniji protein u kostima (*Lian i Stein, 2003*). Ima važnu ulogu u diferencijaciji progenitora osteoblasta i pozitivno je regulisan tokom sinteze koštanog matriksa i mineralizacije (*Ryoo i sar., 1997*). Za razliku od

osteokalcina, kolagen I nije specifičan za kost (Kirkham i Cartmell, 2007), ali je važna komponenta koštanog matriksa (Leong i sar., 2008) i ima ulogu u diferencijaciji, proliferaciji i adheziji ćelija osteoplastnog fenotipa (Taubenberger i sar., 2010).

Na osnovu *in vitro* analize ekspresije gena markera osteogeneze i imunoekspresije osteokalcina, za implantacije su odabrane ADSC uzete petnaestog dana nakon indukcije osteogene diferencijacije.

5.2. Subkutani implantanti kao proizvod tkivnog inženjerstva kosti

Neindukovane ADSC *in vitro* kultivisane zaključno sa 12. danom od trećeg pasaža, ADSC uzete 12. dana od *in vitro* indukcije endotelske diferencijacije i ADSC uzete 15. dana od *in vitro* indukcije osteogene diferencijacije, korišćene su za inženjerisanje subkutanih implanata u ovoj disertaciji. Implantanti su inženjerisani uz poštovanje principa biološke trijade, gde je MMK služio kao skafold i nosač, PRP kao izvor regulatornih signala, a ADSC kao izvor ćelija za *in vitro* ekspanziju i diferencijaciju ka endotelskim i osteogenim ćelijama. Ovi implantanti su poređeni na osnovu ekspresije proteina i gena, histološke slike i histomorfometrijskih parametara. kako bi se videlo kako i do kog stepena biološko obogaćivanje MMK može uticati na osteogeni proces i njegov ključni preduslov, vaskularizaciju (Najdanović i sar., 2016).

5.2.1. Vaskularizovanost inženjerisanih subkutanih implanata na modelu miševa

Tokom procesa zalečenja rana, faza inflamacije bi trebalo da bude završena do druge nedelje, a očekuje se da reparacija kostiju bude završena do osme nedelje (Shapiro, 2008), pa su u našem istraživanju ti termini odabrani za histološku, imunohistohemijsku i histomorfometrijsku analizu implanata kao proizvoda tkivnog inženjerstva kosti. U implantima sačinjenim samo od MMK, koji su služili kao kontrola, procenat vaskularizacije nakon dve nedelje od implantacije je bio 75%, što je značajno više ($p < 0,05$) nego u ostalim tipovima implanata. Nakon osam nedelja od implantacije, procenat vaskularizacije u MM implantima je manji (44%), a imunoekspresija VEGFR-a 2, kao i VCAM-a 1 je slabija nego dve nedelje nakon implantacije. VCAM-1 je inducibilni endotelski ćelijski adhezioni molekul koji ima ulogu u regrutovanju

leukocita na mestu inflamacije (*Fries i sar., 1993*). Naime, VCAM-1 je eksprimiran u ćelijama zida krvnih sudova nakon stimulacije citokinima, kada se vezuje za svoj receptor na leukocitima VLA-4 (*Michiels, 2003*). Prema tome, imunoekspresija VCAM-a 1 u MM implantima se može dovesti u vezu sa procesom inflamacije koji prethodi aktivacionoj fazi angiogeneze (*Živković i sar., 2015*). Poznato je da VCAM-1 i njegov receptor VLA-4 nisu eksprimirani na ćelijama mirnih krvnih sudova što bi moglo značiti da, kada se jednom završi formiranje krvnog suda, ovi molekuli bivaju negativno regulisani i nisu neophodni za normalno funkcionisanje krvnih sudova u fazi mirovanja (*Garmy-Susini i sar., 2005*). VCAM-1 je eksprimiran i u stromalnim ćelijama i interaguje sa odgovarajućim ligandom na prekursorima osteoklasta, što je od ključne važnosti tokom ranih stadijuma formiranja osteoklasta (*Feuerbach and Feyen, 1997*). Pošto su krupne, višejedarne ćelije koje liče na osteoklaste uočene u MM implantima, imunoekspresija VCAM-a 1 je verovatno i u vezi za procesom osteoklastogeneze koji je prethodio formiranju ovakvih ćelija u implantima.

U skladu sa ekspresijom VCAM-a 1 je ekspresija gena za ovaj protein, *Vcam-a 1*, u čijem obrascu ekspresije nisu uočene značajne razlike između četiri tačke posmatranja, u odnosu na ma koji kalibrator. U odnosu na ADSC kultivisane jedan dan nakon trećeg pasaža, ekspresija gena za *Vwf* u MM implantima je na približno istom nivou jednu, dve i četiri nedelje posle implantacije. Porast ekspresije *Vwf*-a zabeležen je osam nedelja nakon implantacije. Ekspresija *Flt-a 1* u odnosu na isti kalibrator raste od jedne do osam nedelja nakon implantacije, a sličan trend ekspresije ovog gena postoji i u odnosu na objedinjeni kalibrator. Gen za transkripcioni faktor *Egr-1* ima najnižu ekspresiju u ovoj i MPD grupi u odnosu na kalibrator PRP. Generalno, obrazac ekspresije gena markera endotelskih ćelija je u grupi MM bio "ravan", bez velikih skokova između tačaka posmatranja, ali su MM implanti imali inicijalno višu ekspresiju ovih gena od implanata većine grupa, u odnosu na PRP kao kalibrator. Ovakav obrazac ekspresije gena u MM implantima može biti u vezi sa svojstvom osteokonduktivnih biomaterijala da daju mehaničku podršku za urastanje krvnih sudova domaćina (*Oryan, 2014*).

Kako je jedna od polaznih ideja ove disertacije bila simulacija prirodne reparacije koštanog tkiva, PRP je korišćena kao komponenta implanata, jer sadrži visoko koncentrovane trombocite, koji imaju krunsku ulogu u procesu zalečenja rana

(Nurden i sar., 2008). Nakon povrede kostiju, dolazi do narušavanja strukture koštanog tkiva, oštećivanja periosta i okolnih mekih tkiva kao i prekida krvnih sudova (Geris i sar., 2008). Zalečenje fraktura kostiju je kompleksan mehanizam regeneracije koji uključuje neposredan odgovor na povredu u vidu formiranja hematoma i inflamacije (Wang i sar., 2013), unutarmembransko i endohondralno okoštavanje i remodeliranje kostiju (Probst i Spiegel, 1997). Stvaranje hematoma je zaštita od daljeg krvarenja (Wang i sar., 2013) i potpomaže zalečivanje fraktura (Mizuno i sar., 1990; Grundnes i Reikeraas, 1993), dok inflamatorni odgovor obezbeđuje inicijalnu stabilizaciju između krajeva kosti na mestu preloma, što inicira aktivaciju kaskadnog signalnog puta uključenog u zalečenje fraktura (Wang i sar., 2013).

U implantima koji su sačinjeni nanošenjem PRP na MMK, vaskularizovanost je nakon dve nedelje od implantacije ostvarena uglavnom zahvaljujući krvnim sudovima prisutnim uz granule MMK. Procenat vaskularizacije u MP implantima je manji nego u svim ostalim grupama implanata (22%), a VEGFR-2 i VCAM-1 pozitivne ćelije između granula MMK i u zidu krvnih sudova su malobrojne. Ni osam nedelja nakon implantacije, vaskularna mreža u ovom tipu implanata nije razvijena, iako je imunoekspresija VCAM-a 1 bila nešto intenzivnija, a procenat vaskularizacije blago viši nego u prethodnoj tački posmatranja (31%). Nakon aktivacije agonistom, poput kalcijum hlorida (Intini, 2009), iz PRP-a se oslobađaju različiti faktori rasta uključujući VEGF, FGF, PDGF, TGF- β_1 i TGF- β_2 , interleukin-1 i faktor aktivacije trombocita-4 (PAF4 – *Platelet-activating factor 4*, engl.). Smatra se da ovi faktori imaju uticaj na povećanu vaskularizaciju i proces regeneracije kostiju (Aghaloo i sar., 2005). Međutim, problem je što je period oslobađanja faktora rasta iz trombocita kratak jer je uslovljen kratkim životnim vekom trombocita (Choi i sar., 2004; Marx i sar., 2004; Eppley i sar., 2006), što može biti jedno od objašnjenja za slabu vaskularizovanost implanata MP tipa. Osam nedelja posle implantacije, distribucija VCAM-1 pozitivnih ćelija je slična kao i nakon dve nedelje od implantacije, ali je broj VEGFR-2 pozitivnih ćelija manji. VEGFR-2 je visoko eksprimiran receptor u progenitorima vaskularnih endotelskih ćelija tokom rane embriogeneze (Shibuya i Claesson-Welsh, 2006). U kasnijim stadijumima razvoja krvnih sudova ekspresija VEGFR-a 2 opada (Matsumoto i Claesson-Welsh, 2001), što je slično obrascu ekspresije ovog receptora u MP tipu implanata.

U skladu sa slabom vaskularizovanošću MP implanata je i ekspresija gena markera endotelskih ćelija u ovoj grupi, koja je uglavnom značajno niža nego u ostalim grupama implanata. Ekspresija *Vcam-a 1* raste od prve do četvrte nedelje, a opada osam nedelja nakon implantacije, u odnosu na sva tri tipa kalibratora. Nivo ekspresije *Vwf-a* u MP implantima u odnosu na ADSC uzete 24 sata nakon trećeg pasaža (P03 ćelije) je u svim tačkama posmatranja skoro nepromenjen. U ovom tipu implanata, ekspresija *Egr-a 1* je najviša četiri nedelje nakon implantacije, u odnosu na sva tri kalibratora. U odnosu na PRP, ekspresija *Flt-a 1* je niža nego u ostalim grupama implanata. U MP implantima, ekspresija *Flt-a 1* postepeno raste od prve do četvrte nedelje nakon implantacije. Posle osam nedelja od implantacije, ekspresija *Flt-a 1* opada. Gen *Flt-1* kodira sintezu VEGFR-a 1, proteina koji je negativni regulator rane embriogeneze, a pozitivni regulator u kasnijim stadijumima razvoja embriona (*Fong i sar., 1995*). Tokom razvoja, VEGFR-1 je prvo eksprimiran u angioblastima i endotelskim ćelijama, ali slabije nego VEGFR-2 (*Otrock i sar., 2007*). Pored toga što ekspresiju *Flt-a 1* u našim implantima možemo dovesti u vezu sa prisustvom endotelskih ćelija i njihovih progenitora, ovaj gen mogu eksprimirati i monociti i makrofagi čiju migraciju reguliše (*Clauss i sar., 1996; Sawano i sar., 2001*).

Dve nedelje nakon implantacije, u implantima sačinjenim od MMK, PRP i neindukovanih ADSC, procenat vaskularizacije je nizak (28%), a imunoekspresija VEGFR-a 2 i VCAM-a 1 intenzivne. Osam nedelja posle implantacije, procenat vaskularizacije implanata MPD tipa je tek 21%, a VEGFR-2 pozitivnih ćelija je manje nego dve nedelje nakon implantacije. Retke VCAM-1 pozitivne ćelije uočene su između granula MMK, a intenzivnija imunoekspresija VCAM-a 1 je nađena uz same granule MMK i u okviru struktura koje liče na osteone.

U odnosu na ostale eksperimentalne grupe, relativna ekspresija gena markera endotelskih ćelija u MPD implantima je, u većini tačaka posmatranja i u odnosu na sve kalibratore, bila među vodećim. Jedan od razloga za takve obrasce ekspresije ovih gena u MPD grupi je verovatno posledica uticaja bioloških faktora koji se oslobađaju aktivacijom PRP-a. Literaturni podaci ukazuju na to da biološki faktori oslobođeni iz PRP-a mogu ubrzati *in vitro* i *in vivo* diferencijaciju ADSC, koje prethodno nisu kultivisane u medijumu induktivnom za diferencijaciju ka nekoj ćelijskoj liniji (*Vogel i sar., 2006; Liu i sar., 2008; Man i sar., 2012*). Uz to, neindukovane ćelije koje su

komponenta MPD implanata su imale pozitivno regulisanu ekspresiju gena markera endotelskih ćelija neposredno pre implantacije. Međutim, MPD grupa je nakon dve nedelje od implantacije imala drugi najslabiji procenat vaskularizacije, viši jedino od onog u MP grupi. Posle osam nedelja od implantacije, u MPD implantima je procenat vaskularizacije manji u odnosu na sve ostale grupe implanata. U osnovi ovakvog neslaganja između ekspresije gena markera endotelskih ćelija i histomorfometrijske analize vaskularizovanosti, mogla bi se naći najmanje dva razloga. Prvi razlog bi mogao biti taj što neki analizirani isecci implanata poseduju hemoragična polja koja nisu uključena u histomorfometrijska merenja, ali mogu doprineti višoj ekspresiji gena markera endotelskih ćelija. Drugi razlog je što je histomorfometrijska analiza rađena samo na onim krvnim sudovima sa histološkim karakteristikama jednog krvnog suda, dok su ispitivani geni markeri endotelskih ćelija ekspimirani ne samo u ćelijama zida krvnih sudova već i u progenitorima endotelskih ćelija i u još nekoliko drugih tipova ćelija. Tako, *Flt-1* osim endotelskih ćelija i njihovih progenitora (*Lyden i sar., 2005*), ekspimiraju i monociti i makrofagi (*Clauss i sar., 1996; Sawano i sar., 2001*), dok je ekspresija *Vwf*-a osim u endotelskim ćelijama nađena i u megakariocitima i trombocitima (*Silverman i sar., 2001*). Gen *Egr-1* ekspimiran je u endotelskim ćelijama, glatkim mišićnim ćelijama i fibroblastima (*Silverman i Collins, 1999*), a *Vcam-1* u endotelskim ćelijama (*Michiels, 2003*), ćelijama zida krvnog suda (*Garmy-Susini i sar., 2005*) i ćelijama strome koje imaju odgovarajući ligand na prekursorima osteoklasta (*Feuerbach and Feyen, 1997*).

U implantima sačinjenim od MMK, PRP i ADSC *in vitro* indukovanih ka endotelskim ćelijama, nakon dve nedelje od implantacije su uočeni krvni sudovi, čiji bi oblik i veličina odgovarali kapilarima, arteriolama i venulama. Ovako morfološki heterogeni krvni sudovi odlika su stabilne vaskularne mreže (*Aitsebaomo i sar., 2008*). U ovoj tački posmatranja, procenat vaskularizacije MPE implanata je 45%. Veliki broj VEGFR-2 pozitivnih ćelija nalazi se u prostoru uz granule MMK i u prostorima između njih, a imunoekspresija VCAM-a 1 na tim mestima je umerena. Nakon osam nedelja od implantacije, procenat vaskularizacije MPE implanata je porastao na 73%, što ovu grupu implanata čini najbolje vaskularizovanom među svim eksperimentalnim grupama. Imunoekspresija VCAM-a 1 je snažnija nego dve nedelje posle implantacije i nađena je, osim u matriksu, u ćelijama zida krvnih sudova i u okviru struktura koje liče na osteone.

Imunoekspresija VEGFR-a 2 u MPE implantima intenzivnija je nakon dve nego nakon osam nedelja od implantacije, što je u saglasnosti sa činjenicom da je VEGFR-2 rani marker angiogeneze (Hoeben i sar., 2004). VEGFR-2 je visoko eksprimiran u hemangioblastima, angioblastima i endotelskim ćelijama (Karamysheva, 2008). Stoga bi se moglo zaključiti da je jedan od uzroka široko rasprostranjene imunoekspresije VEGFR-a 2 u MPE grupi prisustvo ADSC *in vitro* indukovanih u endotelske ćelije, kao jedne od komponenti ovog tipa implanata. Dobro razvijena mreža krvnih sudova i pozitivna ekspresija proteinskih i genskih markera vaskulogenog procesa u MPE grupi, najverovatnije su i posledica kombinacije PRP-a i endotelskih ćelija u ovom tipu implanata. Nađeno je da VEGF, angiopoietin, FGF, PDGF i članovi TGF familije, koji se oslobađaju aktivacijom PRP-a (Intini, 2009), utiču na aktivnost endotelskih ćelija (Kanczler i Oreffo, 2008).

Do sada je povoljan efekat PRP pomešane sa ADSC na vaskularizaciju pokazan kombinovanjem PRP sa svežim (Pak i sar., 2013) ili ekspaniranim, nediferenciranim ADSC (Man i sar., 2012). ADSC *in vitro* indukovane u endotelske ćelije korišćene su do sada za implantacije jedino na ortotopskim mestima (Cornejo i sar., 2012; Sahar i sar., 2012) ili sa arterio-venskim vaskularnim snopom (AV-snop) (Yang i sar., 2013), pa se u ovim modelima ne može isključiti uticaj faktora iz okružujuće kosti, niti iz krvnih sudova. ADSC pacova su, osam dana nakon indukcije *in vitro* endotelske diferencijacije, implantirane u defekte kalvarije kritične veličine i osam nedelja nakon početka tretmana defekata, ove ćelije su indukovale porast gustine krvnih sudova, što se odrazilo na osteogeni proces u vidu porasta volumena kostiju (Cornejo i sar., 2012). Sahar i saradnici (2012) su u okviru svog istraživanja radili *in vitro* diferencijaciju ADSC u endotelske ćelije, koje su potom stavili na poli(D,L-laktid) skafolde. Ovako prevaskularizovani skafoldi nisu doveli do porasta formiranja kostiju sami po sebi, ali bi prema rezultatima ove ekipe mogli biti korišćeni kao izvor ćelija za poboljšavanje vaskularizacije i poboljšavanje funkcije postojećih osteoblasta (Sahar i sar., 2012). U drugim istraživanjima, pacovske ADSC diferencirane u endotelske ćelije su inkorporirane u skafolde na bazi hidroksiapatita (HAp-skafoldi) u *in vitro* uslovima i potom implantirane sa AV-snopom. Posledica toga bila je značajno veća gustina krvnih sudova i veći dijametar krvnih sudova nego u grupi sa nediferenciranim ćelijama, HAp-

skafoldom i AV-snopom i u grupi koja je sadržala samo HAp-skafold (Yang i sar, 2013).

U odnosu na objedinjen kalibrator, tokom čitavog *in vivo* eksperimentalnog perioda, ekspresija *Vwf*-a u MPE implantima je bila niska, verovatno zbog činjenice da je ekspresija *Vwf*-a u ADSC *in vitro* diferenciranim u endotelne ćelije u periodu implantacije bila negativno regulisana za razliku od ostalih gena markera endotelskih ćelija. U odnosu na P03 ćelije i objedinjen kalibrator, ekspresija *Vcam*-a 1 u MPE grupi viša je četiri nedelje nakon implantacije nego u ranijim tačkama posmatranja. Ekspresija *Flt*-a 1 raste od jedne do dve nedelje nakon implantacije, a zatim blago opada u odnosu na sve tipove kalibratora. U odnosu na PRP, u MPE grupi implanata se ekspresija *Egr*-a 1 smanjivala od prve ka četvrtoj nedelji, a skok je zabeležen osam nedelja nakon implantacije. Molekularni mehanizam u osnovi indukcije ekspresije *Egr*-a 1 uključuje Ang-1, koji svoj efekat ostvaruje preko signalnih puteva Erk1/2, PI-3 kinaza/AKT i mTOR (Abdel-Malak i sar., 2009). Gen *Egr*-1 može biti pozitivno regulisan u odgovoru na hipoksiju, citokine i faktore rasta (Abdel-Malak i sar., 2009). Moglo bi se pretpostaviti da je aktivacija ovog gena u našim ektopičnim osteogenim implantima stimulirana faktorima rasta oslobođenim iz ćelija koje su njihova komponenta.

Nakon dve nedelje od implantacije, implantni grupe sa MMK, PRP i ADSC *in vitro* indukovanim ka osteogenim ćelijama (MPO tip) sadržali su krvne sudove manjeg dijametra, a procenat vaskularizacije bio je 40%. Između granula MMK se nalaze brojne VEGFR2-pozitivne ćelije, a imunoekspresija VCAM-a 1 izražena je i u matriksu i u pojedinačnim ćelijama. Osam nedelja posle implantacije, procenat vaskularizacije je blago porastao (49%), kao i imunoekspresija VCAM-a 1. Ćelije koje eksprimiraju VEGFR-2 nalaze se uz granule MMK i između njih, u zidu krvnih sudova i u okviru struktura koje liče na osteone koje prožimaju granule MMK. Ekspresija *Vwf*-a u odnosu na PRP i objedinjeni kalibrator je u MPO implantima, tokom čitavog *in vivo* eksperimentalnog perioda, uglavnom viša nego u ostalim tipovima implanata. Ekspresija *Vcam*-a 1 u odnosu na P03 i u odnosu na PRP je najviša četiri nedelje nakon implantacije, dok u odnosu na objedinjeni kalibrator raste od prve nedelje ka osmoj nedelji nakon implantacije. U svakoj tački posmatranja, ekspresija *Flt*-a 1 u MPO implantima je viša nego u ostalim grupama implanata u odnosu na PRP, što je u većini tačaka posmatranja značajno ($p < 0,05$). U odnosu na P03 ćelije i objedinjen kalibrator se

zapaža da je ekspresija *Flt-a 1* najviša jednu nedelju nakon implantacije, a u narednim tačkama posmatranja ekspresija ovog gena opada. U odnosu na P03 ćelije, dve nedelje posle implantacije je ekspresija *Egr-a 1* jedino u ovoj i MPD grupi pozitivno regulisana. U odnosu na PRP, u MPO i MPEO grupi je ekspresija *Egr-a 1* značajno viša, u svim tačkama posmatranja, nego u ostalim grupama implanata.

Posle dve nedelje od implantacije, implantirane grupe sa MMK, PRP i ADSC indukovanim *in vitro* ka endotelskim i osteogenim ćelijama (MPEO tip) su dobro vaskularizovani (44%), tkivnog matriksa jako pozitivnog na VCAM-1 i bogatog VEGFR-2 pozitivnim ćelijama. Osam nedelja nakon implantacije, procenat vaskularizacije je u ovim implantima smanjen u odnosu na dve nedelje nakon implantacije (24%), VEGFR-2 pozitivne ćelije se nalaze uz granule MMK i u zidu krvnih sudova, a VCAM-1 pozitivni su matriks uz MMK granule, deo matriksa udaljen od granula, kao i ćelije zida krvnih sudova. U odnosu na sve tipove kalibratora, u MPEO implantima je zabeležen stalni rast ekspresije *Vcam-a 1* tokom *in vivo* eksperimentalnog perioda, pa je četiri ili osam nedelja nakon implantacije ekspresija ovog gena maksimalna. Uz MPO grupu, MPEO grupa je imala najvišu ekspresiju *Vwf-a* u odnosu na objedinjeni kalibrator. U odnosu na PRP, ekspresija *Flt-a 1* je u svim tačkama posmatranja viša u MPEO nego u ostalim grupama implanata, izuzev grupe MPO, što je u većini slučajeva značajno. U svim tipovima implanata, ekspresija *Vwf-a* je u odnosu na PRP najviša nakon osam nedelja od implantacije, što je očekivano imajući u vidu ulogu *Vwf-a* u kasnijim stadijumima angiogeneze (Starke i sar., 2011). U odnosu na objedinjeni kalibrator, ovi implantirani imaju nisku ekspresiju *Egr-a 1* zaključno sa periodom nakon četiri nedelje od implantacije, a osam nedelja nakon implantacije ekspresija *Egr-a 1* naglo raste.

Pozitivan efekat kombinacije endotelskih ćelija i osteoblasta ranije je uočen u ektopično implantiranim HA/bTCP skafoldima. Skafoldi naseljeni *in vitro* kokultiviranim osteoblastima, osteoklastima i endotelskim ćelijama indukovali su formiranje krvnih sudova i tkiva nalik na koštano (Papadimitropoulos i sar., 2011). Na važnost kokultivacije endotelskih ćelija i osteoblasta ukazuju i Yu i saradnici (2009), koji su kokultivirali endotelske ćelije dobijene iz kostne srži i osteoblaste na skafoldu od polikaprolaktona i hidroksiapatita. Nađeno je da prisustvo oba tipa ćelija u skafoldima rezultira formiranjem struktura koje liče na krvne sudove u defektu femura

pacova (*Yu i sar., 2009*). S druge strane, na modelu defekta kalvarije pacova, alografti naseljeni kombinacijom endotelskih ćelija i osteoblasta ili samo osteoblastima su imali slabiju vaskularizovanost nakon osam nedelja od implantacije od alografta naseljenih samo endotelskim ćelijama (*Cornejo i sar., 2012*). Trebalo bi imati u vidu da su pomenuta istraživanja rađena na različitim modelima (ortotopski/ektopični), sa ćelijama različitog porekla i životinjama različitih vrsta. Ono što je zajedničko modelu *Cornejo*-a i saradnika i našem je odnos endotelskih ćelija i osteoblasta u implantima – 1:1, kojim se postiže potencijalno jednak uticaj obe ćelijske linije (*Cornejo i sar., 2012*). Međutim, prema *Unger*-u (*2007*) i saradnicima i *Koob*-u (*2011*) i njegovom timu, bolja vaskularizacija bi mogla biti postignuta promenom odnosa endotelskih ćelija i osteoblasta u korist endotelskih ćelija.

5.2.2. Osteogeni proces u inženjerisanim subkutanim implantima na modelu miševa

Na histološkim preparatima grupe implanata koji su sadržali samo MMK, uočeno je da je resorpcija granula MMK bila intenzivnija osam nedelja nakon implantacije u odnosu na dve nedelje posle implantacije. Krupne, višejedarne ćelije koje su retke nakon dve nedelje od implantacije, brojnije su i prijanjaju uz granule MMK osam nedelja posle implantacije. Opisana rana ekspresija markera vaskulogeneze bi se mogla dovesti u vezu sa prisustvom višejedarnih ćelija. One se javljaju u odgovoru na prisustvo granula biomaterijala kao neophodan korak za uspešnu integraciju biomaterijala tipa koštanog zamenika (*Barbeck i sar., 2014*). Iako je u implantima MM tipa došlo do sazrevanja vezivnog tkiva, u smislu pojave usnopljenih vlakana kolagena, a ćelije nalik osteoblastima su na pojedinim mestima prijanjale uz MMK granule, proces mineralizacije tkiva čiji je izgled odgovarao osteoidu nije napredovao nakon osam nedelja u odnosu na dve nedelje nakon implantacije. Na to ukazuje imunoekspresija osteokalcina, markera osteogenog procesa koji ima najselektivniji obrazac ekspresije od svih produkata osteoblasta, jer ga sintetišu isključivo zreli osteoblasti, odontoblasti i cementoblasti (*Bronckers i sar., 1998*).

Pošto se ektopično formiranje kostiju indukovano biomaterijalima uvek odvija po obrascu unutarmembranskog okoštavanja (*Barradas i sar., 2011*), pojava ćelija koje liče na osteoblaste u MM implantima se može povezati sa regrutovanjem rezidentnih

mezenhimskih ćelija. Naime, MM implanti imaju samo biomaterijal na bazi kalcijum-fosfata u svom sastavu. Biomaterijali čija je osnovna komponenta kalcijum-fosfat nakon implantacije pobuđuju inflamatorni odgovor, koji je okidač za infiltraciju rezidentnih jednojedarnih prekursorskih ćelija i njihovo fuzionisanje i diferencijaciju u osteoklaste (Detsch i sar., 2008). Tako aktivirana osteoklastogeneza dovodi do degradacije i resorpcije biomaterijala na bazi kalcijum-fosfata (Ripamonti i sar., 2010). Oslobođeni Ca^{2+} i PO_4^{3-} joni stimulišu diferencijaciju osteogenih ćelija i depoziciju koštanog matriksa (Chai i sar., 2012).

Relativna ekspresija *Spp-a 1* u MM implantima je u odnosu na P03 ćelije i objedinjen kalibrator uglavnom negativno regulisana. Inicijalno viša ekspresija *Spp-a 1* koja se u MM implantima uočava u odnosu na PRP i objedinjen kalibrator, može se pripisati osteokonduktivnoj prirodi implantiranog MMK. Ovaj biomaterijal privlači rezidentne progenitore (Scherberich i sar., 2010) i predstavlja skafold za krvne sudove i ćelije koje formiraju kost (Kim i Kim, 2008). Za razliku od osteokalcina, osteopontin je protein koji nije specifičan za kost (Sodek i sar., 2000; Gürsoy i sar., 2010), a ekspimiraju ga osteoblasti u ranim fazama formiranja kostiju (Denhardt i sar., 2001). Regulacija ekspresije *Spp-a 1* recipročno je koordinisana od strane osteoblasta i osteoklasta – inhibirana je u osteoblastima na mestima formiranja kostiju u vreme kada je u osteoklastima na mestima resorpcije kostiju stimulisana (Gluhak-Heinrich i sar., 2000; Mazzali i sar., 2002). Ekspresija *Spp-a 1* u našim implantima je verovatno rezultat koordinisane aktivnosti osteoblasta i osteoklasta. Tako, pozitivno regulisana ekspresija *Spp-a 1* može ukazivati na usidravanje osteoklasta u mineralizovani koštani matriks (Reinholt i sar., 1990), ali i na sekreciju od strane osteoblasta koja se odvija u ranim stadijumima razvoja kostiju i potpomaže pričvršćivanje osteoblasta za komponente vanćelijskog matriksa (Sasano, 2000).

U implantima sačinjenim od MMK i PRP, rano se uočavaju znaci intenzivne resorpcije granula MMK, već dve nedelje nakon implantacije. Usled toga su, osam nedelja posle implantacije, implantirane granule MMK većim delom resorbovane. I dve i osam nedelja nakon implantacije, vezivno tkivo je uglavnom nezrelo, a imunoekspresija osteokalcina i prisustvo ćelija koje liče na osteoblaste slabi. Ekspresija *Spp1* gena je u odnosu na ćelije nakon trećeg pasaža i objedinjeni kalibrator u svim tačkama posmatranja negativno regulisana, a u odnosu na PRP najviša ekspresija *Spp-a*

I je četiri nedelje nakon implantacije. Razlog za slabije znake osteogenog procesa u MP tipu implanata mogao bi biti taj što granule trombocita sadrže faktore rasta neophodne za početak tkivne reparacije i regeneracije (*Lazić i sar., 2009*), a verovatno nedovoljne za progresiju osteogenog procesa.

Podaci iz literature o uticaju MMK kombinovanog sa PRP na osteogeni proces uglavnom ukazuju na povoljne efekte ovakve kombinacije. Gustina kostiju u defektima lobanje zečeva, koji su bili napunjeni kombinacijom MMK i PRP (*Aghaloo i sar., 2005; Shayesteh i sar., 2005*), viša je nego u grupi životinja čiji su defekti popunjeni samo MMK. Histološke analize *Torres*-a i saradnika nakon popunjavanja poda sinusa otkrile su da je regeneracija kostiju značajno bolja na mestima tretiranim PRP-om i neorganskom goveđom kosti nego na mestima gde je stavljena samo neorganska goveđa kost (*Torres i sar., 2009*). Međutim, *Döri* i saradnici su našli da nema značajnih razlika u tretmanu unutar koštanih defekata kada je neorganski MMK kombinovan sa PRP-om i kada je korišćen sam (*Döri i sar., 2007*). Razlike u rezultatima ovih istraživanja bi mogle biti pripisane tome da su eksperimenti rađeni na ortotopskim modelima, na različitim organskim vrstama i pod različitim uslovima.

U implantima sačinjenim od MMK, PRP i neindukovanih ADSC, znaci resorpcije granula MMK su slabi i dve i osam nedelja nakon implantacije, iako su na pojedinim mestima prisutne višejedarne ćelije koje liče na osteoklaste. Prisustvo ćelija koje liče na osteoblaste i prijanjaju uz granule MMK je slabo, ali uočljivije nego u MM i MP implantima. Postojanje ovih ćelija u MPD grupi verovatno je posledica sinergističkog efekta PRP-a i neindukovanih ADSC, koji je uočen od strane *Barba-Recreo*-a i saradnika (*2015*) na modelu bifosfonat-zavisne osteonekroze u vilici pacova. Ovaj tim je pomešao kultivisane ADSC uzete iz trećeg pasaža i PRP što je dovelo do niže učestalosti osteonekroze, većeg stepena formiranja i razgradnje kostiju i prisustva većeg broja osteoklasta u vilicama tretiranih pacova u poređenju sa pacovima kontrolne grupe koji nisu primili ADSC/PRP tretman za prevenciju bifosfonat-zavisne osteonekroze (*Barba-Recreo i sar., 2015*).

U MPD implantima, uočena vlakna kolagena su u obe tačke posmatranja uglavnom usnopljena. Imunoekspresija osteokalcina je intenzivna dve nedelje nakon implantacije, a zaključno sa četvrtom nedeljom nakon implantacije ekspresija gena za osteopontin je visoka. Osam nedelja posle implantacije, imunoekspresija osteokalcina je

slabo izražena, a ekspresija *Spp-a 1* opada, te bi se moglo zaključiti da je osteogeni proces u MPD implantima neodrživ u kasnijem periodu. Prethodno je na osnovu histomorfometrijske analize zaključeno da je procenat vaskularizacije u ovim implantima slab, što bi moglo biti uzrok neodrživog osteogenog procesa osam nedelja nakon implantacije. U saglasnosti sa tim je istraživanje u kome su neindukovane ADSC zasejane na skafold od poli-laktid glikolne kiseline i implantirane ortotopski, u nepčanu kost pacova (Conejero i sar., 2006). Do formiranja kosti nije došlo čak ni dvanaest nedelja nakon implantacije, a defekti su bili ispunjeni gustim vezivnim tkivom (Conejero i sar., 2006). Za razliku od ovog i našeg istraživanja, Man i saradnici (2012) su na ektopičnom modelu pokazali da je mreža krvnih sudova razvijena, a mineralizacija dobra nakon implantacije neindukovanih ADSC izolovanih iz preponske regije, PRP i biomaterijala na bazi alginata. Ovakav efekat može se pripisati sekreciji citokina i hemokina od strane ADSC, jer su ovi molekuli signali za privlačenje rezidentnih MSC i progenitorskih ćelija na mesto povrede (Cai i sar., 2012). Razlika u efektu ADSC u ekperimentu Man-a i saradnika (2012) i našem mogla bi biti pripisana tome što su ADSC dobijene iz masnog tkiva različite lokalizacije kao i različitim načinu pripreme implanata. Kod Man-a i saradnika, priprema subkutanih implanata uključivala je *in vitro* enkapsulizaciju ADSC i PRP sa alginatnim biomaterijalom u trajanju od tri nedelje, dok su komponente naših implanata pomešane neposredno pre implantacije.

U grupi implanata sačinjenih od MMK, PRP i ADSC *in vitro* indukovanih ka endotelskim ćelijama (MPE tip), proces resorpcije granula MMK započet dve nedelje nakon implantacije je intenziviran osam nedelja nakon implantacije, što bi se moglo pripisati fagocitnoj aktivnosti uočenih višejedarnih ćelija. Vlakna kolagena, opažena dve nedelje posle implantacije, izgledaju usnopljeno na osam nedelja nakon implantacije. Imunoekspresija osteokalcina intenzivnija je osam nedelja nakon implantacije nego na dve nedelje od implantacije i uglavnom se uočava u blizini kockastih ćelija koje liče na osteoblaste i koje naležu na granule MMK. Ovakva histološka slika u MPE tipu implanata može biti posledica oslobađanja faktora rasta od strane endotelskih ćelija, kao što su koštani morfogenetski protein-2 (BMP-2 – *Bone morphogenetic protein 2*, engl.), endotelin-1 i IGF, koji utiču na diferencijaciju prekursora osteoblasta (Cornejo i sar., 2012). S druge strane,

osteoblasti oslobađaju VEGF, koji deluje na endotelske ćelije i potpomaže angiogenezu (*Santos i Reis., 2010*), pa bi se moglo pretpostaviti da je diferencijacija prekursora osteoblasta u osteoblaste u MPE implantima regulisana endotelskim ćelijama koje su komponenta MPE implanata. Postojanje prekursora osteoblasta u ovom tipu implanata verovatno je u vezi sa opisanom izvanrednom vaskularizovanošću MPE implanata i pericitima, jednim od tipova ćelija koje čine zid krvnog suda (*Barradas i sar., 2011*). Periciti se mogu diferencirati u mnogo različitih tipova ćelija uključujući osteoblaste, te tako mogu imati ulogu u procesu ektopične kalcifikacije (*Collett i Canfield, 2005*). Ova činjenica ukazuje na to da osteoblasti u MPE implantima mogu, bar delimično, biti vaskularnog porekla, što predstavlja još jednu vezu između vaskularizacije i osteogenog procesa.

Ekspresija *Spp-a 1* u MPE grupi je pozitivno regulisana u svakoj tački posmatranja i u odnosu na sve tipove kalibratora, osim u odnosu na P03 ćelije i to jedino jednu nedelju nakon implantacije. Visoka i stabilna ekspresija ovog gena tokom čitavog *in vivo* eksperimentalnog perioda verovatno je posledica interakcije koja se odvija između sekretovanog osteopontina i endotelskih ćelija. Rastvorljivi osteopontin ima antiapoptotski efekat na adherentne endotelske ćelije (*Khan i sar., 2002*), te bi se moglo pretpostaviti da su dobra vaskularizovanost i osteogeni proces u MPE implantima delom postignuti i ovim mehanizmom.

Osam nedelja nakon implantacije, u implantima sa MMK, PRP i ADSC *in vitro* indukovanim ka osteogenim ćelijama (MPO tip), resorpcija implantiranog MMK je intenzivnija nego dve nedelje posle implantacije. Vlakna kolagena su i dve i osam nedelja posle implantacije uglavnom usnopljena. Prisustvo ćelija nalik osteoblastima i struktura koje liče na osteone u granulama MMK je veće, a imunoekspresija osteokalcina izraženija nakon osam u odnosu na dve nedelje od implantacije. U zavisnosti od tipa kalibratora u odnosu na koji se genska ekspresija sagledava, ekspresija *Spp-a 1* je najviša dve i četiri nedelje nakon implantacije.

Pri poređenju efekata poli-D-glikolidnih skafolda, praznih ili naseljenih nediferenciranim ili ADSC prethodno podvrgnutim osteogenoj diferencijaciji, na reparaciju defekata nepčane kosti pacova, nađeno je da jedino ADSC diferencirane u osteogene ćelije pobuđuju znatnu regeneraciju koštanog tkiva (*Conejero i sar., 2006*). Rezultati istraživanja rađenog takođe na ortotopskom modelu, a u koje su uključeni i

implanti sa endotelskim ćelijama, kao i oni sa kombinacijom endotelskih ćelija i osteoblasta, daje prednost endotelskim u odnosu na sve ostale tipove ćelija i njihove kombinacije u alograftu (*Cornejo i sar., 2012*). *Cornejo* i tim (*2012*) su ispitivali efekat ADSC pacova, *in vitro* diferenciranih u endotelske ćelije i osteoblaste i potom nanesenih na koštane alografte, na zalečenje defekata kalvarije. Osam nedelja nakon implantacije, volumen kostiju je bio značajno viši u defektima koji su sadržali alografte sa endotelskim ćelijama nego u defektima koji su sadržali alografte sa osteoblastima ili alografte sa zajedno implantiranim endotelskim ćelijama i osteoblastima. Nije bilo značajnih razlika između dve poslednje pomenute grupe i kontrolnih grupa (alografti bez ćelija i alografti sa nediferenciranim ADSC).

I dve i osam nedelja posle implantacije, implantirane grupe sa MMK, PRP i ADSC indukovanim *in vitro* ka endotelskim i osteogenim ćelijama, sadržali su visoko organizovana, usnopljena vlakna kolagena u prostorima između granula MMK. Dve nedelje nakon implantacije, na površini granula implantiranog MMK su opažene ćelije kockastog oblika koje liče na osteoblaste. Ćelije, vlakna i krvni sudovi prodrli su u unutrašnjost MMK granula. Krvni sudovi su postavljeni centralno, a ćelije i vlakna koncentrično oko krvnog suda, pa ove strukture podsećaju na osteone. Osam nedelja posle implantacije, bilo je i dalje ćelija koje liče na osteoblaste kockastog oblika, ali su se pojedine bile spljoštene, tako da liče na neaktivne osteoblaste. U MPEO implantima je imunoekspresija osteokalcina jaka i dve i osam nedelja od implantacije. Nešto slabija imunoekspresija osteokalcina u većini tipova implanata, dve nedelje nakon implantacije nego osam nedelja posle implantacija, je očekivana jer je osteokalcin kasni marker formiranja koštanog tkiva (*Lee i sar., 2000*). Interakcija između endotelskih ćelija i osteoblasta može se odvijati preko nekoliko tipova pukotinastih veza (*gap junction*, engl.), uključujući pukotinaste veze preko koneksina 37 (Cx37), 40 (Cx40) i 43 (Cx43) (*Yeh i sar. 2006*). Komunikacija preko Cx43 gap veza indukuje ekspresiju markera diferencijacije osteoblasta uključujući osteokalcin (*Guillotin i sar. 2008*).

Oslobađanje difuzibilnih faktora od strane endotelskih ćelija i osteoblasta je recipročno kada je u pitanju uticaj na rast i diferencijaciju ova dva tipa ćelija (*Zhou i Dong, 2012*). Neki od faktora koje sekretuju endotelske ćelije, PDGF-AB, TGF- β 1, TGF- β 2, FGF-2, EGF, osteoprotegerin (OPG) i BMP-2 (*Kozawa et al., 2001*; *Bouletreau i sar., 2002*), imaju uticaj na diferencijaciju osteogenih ćelija i migraciju i

proliferaciju osteoblasta. Osteoblasti sekretuju VEGF koji potpomaže proliferaciju endotelskih ćelija i stimuliše diferencijaciju i angiogenezu preko aktivacije specifičnih receptora (*Clarkin i sar., 2008*).

Posmarajući u odnosu na P03 ćelije kao i u odnosu na PRP, ekspresija gena za osteopontin u MPEO implantima najviša je osam nedelja nakon implantacije. U odnosu na objedinjeni kalibrator, ekspresija *Spp1* gena dva puta dostiže svoj najviši nivo – dve i osam nedelja nakon implantacije. Moglo bi se pretpostaviti da je ekspresija *Spp-a 1* najviša u MPE i MPEO grupama jer su ćelije nalik osteoblastima i višejedarne ćelije u njima zastupljenije nego u ostalim eksperimentalnim grupama. Iz literature je poznato da je osteopontin pretežno eksprimiran na mestima gde se odvija proliferacija ćelija (*Lian i Stein, 1995*), što bi moglo biti jedno od objašnjenja za višu ekspresiju *Spp-a 1* u svim tipovima implanata koji su sadržali ćelije, nego u MM i MP tipu implanata.

5.2.3. Povezanost vaskularizovanosti i osteogenog procesa u različitim inženjerskim subkutanim implantima

U grupama MM i MP, imunoekspresija osteokalcina i ekspresija gena *Spp1* su slabije nego u grupama koje su, uz MMK i PRP, sadržale alternativno i ekspanirane ADSC, neindukovane, indukovane u endotelske i osteogene ili kombinaciju endotelskih i osteogenih ćelija. Postojanje intenzivnije imunoekspresije osteokalcina, više ekspresije *Spp1* gena i brojnijih ćelija koje liče na osteoblaste u grupama implanata koje smo obogatili ćelijama nego u MM i MP implantima, u skladu je sa istraživanjem *Yoshimi*-ja i saradnika (*2009*) rađenim na ortotopskom modelu defekta mandibule pasa. Ovaj tim je pokazao da je regeneracija kosti brža, a sam kvalitet kosti mnogo bolji kada su u defekte stavljeni implantati sačinjeni od biološke trijade, nego kada implantati nisu sadržali MSC. Možda je ključni razlog za pozitivan efekat biološke trijade, u ovom i u našem istraživanju, taj što adultne MSC, osteoblasti, fibroblasti i endotelske ćelije eksprimiraju membranske receptore specifične za faktore rasta koji se oslobađaju aktivacijom PRP-a (*Anitua i sar., 2004*). Uz to, PRP pored faktora rasta sadrži i fibrin, fibronektin, vitronektin i trombospondin koji se ponašaju kao ćelijski adhezivni molekuli i važni su za migraciju osteoblasta, fibroblasta i ćelija epitelnog tipa (*Marx, 2004*).

U našem istraživanju, implanti sačinjeni od samo jedne komponente biološke trijade, konkretno MMK, dve nedelje nakon implantacije imaju viši procenat vaskularizacije nego ostali tipovi implanata, a po imunoekspresiji VEGFR-a 2 i VCAM-a 1 mogu parirati ostalim tipovima implanata čija je kompozicija mnogo bogatija. U odnosu na kalibrator PRP, uočeno je da je u ovim implantima ekspresija gena markera endotelskih ćelija inicijalno viša nego u implantima većine grupa. Uz to, postoje i blaga imunoekspresija osteokalcina i ekspresija gena za osteopontin, *Spp-a 1*. Međutim, ono što bi kod MM implanata moglo predstavljati problem za kliničku primenu, koja bi bila kontrolisana u nekom dužem vremenskom periodu, je to što osam nedelja posle implantacije, verovatno usled smanjenja procenta vaskularizacije, jenjavaju i ekspresija proteina i gena markera osteogenog procesa.

Sledeći korak ka postizanju dobrog biološkog kvaliteta osteogenih implanata, koji bi omogućio da se u dužim intervalima tokom *in vivo* eksperimentalnog perioda održe krvni sudovi i napreduje osteogeni proces, bilo je nanošenje PRP na MMK. Međutim, u MP implantima, osam nedelja nakon implantacije procenat vaskularizovanosti je i dalje nizak, a ekspresija ispitivanih proteina i gena markera endotelskih ćelija su slabi u obe tačke posmatranja. Uz to, ekspresija markerskih gena endotelskih ćelija je uglavnom značajno niža ($p < 0.05$) nego u ostalim tipovima implanata. U skladu sa takvom vaskularizovanošću su slaba imunoekspresija osteokalcina i negativna regulacija ekspresije *Spp-a 1*. Zajedno gledano, podaci koje smo dobili nakon završenih analiza u MP implantima mogli bi predstavljati problem za njihovu kliničku primenu.

Obogaćivanje implanata neindukovanim ADSC je u poređenju sa MP implantima dovelo do blagog povećanja procenta vaskularizovanosti. Ekspresija gena markera endotelskih ćelija u MPD u odnosu na druge tipove implanata je u većini tačaka posmatranja viša, što je često i značajno ($p < 0.05$). Međutim, procenat vaskularizacije, imunoekspresija VEGFR-a 2, VCAM-a 1 i osteokalcina i ekspresija *Spp1* gena opadaju tokom *in vivo* eksperimentalnog perioda, što bi moglo biti nedostatak za kliničku primenu ovog tipa implanata.

Prema postavljenoj hipotezi ove disertacije, rešenje bi se moglo naći u primeni ADSC *in vitro* indukovanih u endotelske ćelije. Nivoi ekspresije gena markera endotelskih ćelija u ranijim tačkama posmatranja zaostaju čak i za kontrolnim

implanata, a procenat vaskularizacije MPE tipa implanata dve nedelje posle implantacije je 45%, ali se progenitori endotelskih ćelija u njima ipak uočavaju (imunoekspresija VEGFR-a 2). U kasnijim tačkama posmatranja, procenat vaskularizacije raste na 73% i viši je nego u ostalim tipovima implanata, a raste i ekspresija markerskih gena endotelskih ćelija, što je verovatno dovelo do pojave znaka osteogenog procesa u ovim implantima.

Nanošenje PRP i ADSC *in vitro* indukovanih u osteogene ćelije na MMK, rezultira ekspresijom gena markera endotelskih ćelija, koja je u uglavnom značajno viša ($p < 0.05$) nego u drugim implantima. Uz to, tokom *in vivo* eksperimentalnog perioda, raste procenat vaskularizacije sa 40 na 49%, a ekspresija proteina i gena markera osteogenog procesa ukazuju na to da bi vaskularizovanost ostvarena u MPO tipu implanata mogla biti povoljna za osteogeni proces.

Imajući u vidu značaj interakcije endotelskih i osteogenih ćelija, MPEO implanti su sačinjeni naseljavanjem MMK PRP-om i ćelijama oba navedena tipa, dobijenim *in vitro* diferencijacijom ADSC. Kako procenat vaskularizovanosti MPEO implanata opada sa 44 na 24%, trend rasta markerskih gena endotelskih ćelija u njima bi se pre mogao dovesti u vezu sa bogatom celularizovanošću i velikim brojem progenitora endotelskih ćelija kao i prisustvom drugih tipova ćelija koje eksprimiraju ove gene, nego sa postojanjem dobro razvijene vaskularne mreže. Imunoekspresija osteokalcina i ekspresija *Spp-a 1* ukazuju na postojanje osteogenog procesa osam nedelja nakon implantacije. Međutim, regresija tkiva između granula MMK je velika što može biti znak prejake stimulacije u MPEO implantima i predstavljati problem za njihovu kliničku primenu.

Budući da je u implantima MPE i MPO tipa ekspresija gena markera endotelskih ćelija i gena za osteopontin dobro izbalansirana tokom čitavog *in vivo* eksperimentalnog perioda, da u njima postepeno rastu ekspresija proteina markera endotelskih i osteogenih ćelija kao i procenat vaskularizovanosti, kompozicija ovih implanata mogla bi biti najpogodnija, od ispitivanih tipova implanata, za konstrukciju inženjerisanih implanata. Prednost za potencijalnu kliničku primenu ova dva tipa implanata, u odnosu na ostale, mogle bi biti činjenice da u drugim tipovima implanata postoje problemi sa parametrima vaskularizovanosti i/ili osteogenog procesa. Tako, u MM implantima tokom vremena opada ekspresija ispitivanih parametara vaskulogeneze i osteogenog

procesa, u MP implantima je konstantno niska ekspresija gena markera ovih procesa. Nizak procenat vaskularizacije i smanjivanje ekspresije proteina markera endotelskih i osteogenih ćelija bi mogli predstavljati problem za primenu MPD implanata, a prejak regresija tkiva između granula MMK i nizak procenat vaskularizacije za primenu MPEO tipa implanata.

Veza između vaskularizovanosti i osteogenog procesa je, bez svake sumnje, kompleksna. Rezultati ove disertacije potvrđuju da je vaskularizovanost od suštinske važnosti za osteogeni proces, ali vaskularizovanost nije jedini preduslov osteogeneze. Nedovoljno razvijena vaskularna mreža može dovesti do brojnih patoloških stanja koštanog tkiva, kao što su idiopatska osteonekroza, osteonekroza vezana za traumu ili trombofiliju, kao i osteonekroza u vilicama vezana za bifosfonate (*Carulli i sar., 2013*). S druge strane, prekomerna vaskularizovanost može biti uzrok formiranja vezivnog tkiva i brojnih bolesti uključujući osteopetrozu, vertebralni hemangiom, pahidermoperiostozu, *Gohram–Stoutov-u* bolest i *Klippel–Trénaunay-ov* sindrom (*Carulli i sar., 2013*). Prema tome, mera idealne vaskularizovanosti ostaje problem koji još treba da se rešava u budućnosti. Jedan od mogućih mehanizama bi mogla biti kontrola vaskularizovanosti tokom formiranja kostiju pomoću VEGF-a. VEGF je od ključnog značaja za normalnu angiogenezu i stvaranje odgovarajuće arhitekture kalusa (*Geris i sar., 2008*), a njegova proizvodnja je vodeći mehanizam koji spaja angiogenezu i osteogenezu tokom zalečenja fraktura (*Street i sar., 2002*). Uz to, nađeno je da je prekomerno eksprimiran VEGF razlog za pojačanu resorpciju koštanog tkiva (*Helmrich i sar., 2013*). Pretpostavljeno je da se negativan efekat VEGF-a može izbeći kontrolisanjem trajanja njegove ekspresije, kontrolisanjem doze u kojoj se aplikuje i obezbeđivanjem odgovarajućeg osteogenog okruženja (*Helmrich i sar., 2013*). U našim istraživanjima, koristili smo PRP koji je, pored mnogih drugih faktora rasta, izvor i VEGF-a. Na osnovu navedenih studija i naših sopstvenih istraživanja, moglo bi se zaključiti da se VEGF može podešavati i preko različitog broja trombocita u PRP, različitog načina pripreme i načina primene koji bi uključivao i regulatore aktivacije PRP-a.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih eksperimentalnih rezultata u skladu sa postavljenim ciljevima ove disertacije, moguće je izvesti više zaključaka.

1) O dobijanju mezenhimskih matičnih ćelija *in vitro* ekspanzijom ćelija stromalne vaskularne frakcije izolovane iz epididimalnog belog masnog tkiva BALB/c miševa:

- ćelije dobijene *in vitro* ekspanzijom stromalne vaskularne frakcije epididimalnog belog masnog tkiva BALB/c miševa ekspimiraju pozitivne markere mezenhimskih matičnih ćelija, CD29 i CD44, a ne ekspimiraju CD14, negativan marker mezenhimskih matičnih ćelija, što zajedno ukazuje na postojanje mezenhimskih matičnih ćelija među ekspanziranim ćelijama stromalne vaskularne frakcije.

2) O diferenciranju mezenhimskih matičnih ćelija ka endotelskim *in vitro* indukcijom diferenciranja:

- ADSC podvrgnute *in vitro* endotelskoj diferencijaciji imaju najvišu ekspresiju proteina markera endotelskih ćelija, VEGFR-a 2 i VCAM-a 1, dvanaest dana od početka *in vitro* indukcije endotelske diferencijacije.
- ekspresija gena markera endotelskih ćelija *Egr-a 1*, *Flt-a 1* i *Vcam-a 1* u ADSC podvrgnutih endotelskoj diferencijaciji je najviša dvanaest dana, a *Vwf-a* sedam dana od početka indukcije endotelske diferencijacije.

3) O diferenciranju mezenhimskih matičnih ćelija ka osteogenim ćelijama *in vitro* indukcijom diferenciranja:

- ADSC imaju najvišu imunoekspresiju osteokalcina, markera osteoblasta, petnaest dana od početka *in vitro* indukcije osteogene diferencijacije.
- ekspresija gena markera osteogenih ćelija *Sp7*, *Bglap-a*, *Alpl-a* i *Colla1* je najviša petnaestog dana od početka *in vitro* indukcije osteogene diferencijacije.

4) O vaskularizovanosti na modelu inženjerisanih subkutanih implanata BALB/c miševa:

- u implantima koji kao komponentu imaju samo mineralni matriks kosti, inicijalno su visoki procenat vaskularizacije, imunoekspresija VEGFR-a 2 i VCAM-a 1 i ekspresija gena markera endotelskih ćelija, dok u kasnijim tačkama posmatranja *in vivo* eksperimentalnog perioda, opadaju procenat vaskularizacije i ekspresija proteina i, delom, gena markera endotelskih ćelija.
- u implantima koje čine mineralni matriks kosti i plazma obogaćena trombocitima u svim tačkama posmatranja su procenat vaskularizacije i ekspresija proteina markera endotelskih ćelija niski, a u većini tačkama posmatranja je ekspresija gena markera endotelskih ćelija značajno niža ($p < 0.05$) nego u ostalim tipovima implanata.
- u implantima dobijenim od mineralnog matriksa kosti, plazme obogaćene trombocitima i neindukovanih ADSC, procenat vaskularizacije i imunoekspresija VEGFR-a 2 i VCAM-a 1 opadaju tokom *in vivo* eksperimentalnog perioda, a ekspresija gena markera endotelskih ćelija je među vodećim u poređenju sa ostalim tipovima implanata.
- implanti koje čine mineralni matriks kosti, plazma obogaćena trombocitima i ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama imaju visok procenat vaskularizacije dve nedelje nakon implantacija, četiri ili osam nedelja nakon implantacija višu ekspresiju svih gena markera endotelskih ćelija, osim *Flt-a 1*, u odnosu na ranije tačke posmatranja, a osam nedelja posle implantacija odlikuju se najvišim procentom vaskularizacije i većom brojnošću VEGFR-2 i VCAM-1 pozitivnih ćelija u odnosu na ostale ispitivane tipove implanata.
- u implantima sačinjenim od mineralnog matriksa kosti, plazme obogaćene trombocitima i ADSC *in vitro* indukovanih ka osteogenim ćelijama, procenat vaskularizacije raste osam nedelja nakon implantacija u odnosu na dve nedelje posle implantacija, a ekspresija gena i proteina markera endotelskih ćelija u svim tačkama posmatranja je visoka.

- u implantima sačinjenim od mineralnog matriksa kosti, plazme obogaćene trombocitima i ADSC indukovanih *in vitro* ka endotelskim i osteogenim ćelijama, procenat vaskularizacije i imunoekspresija VEGFR-a 2 opadaju osam nedelja nakon implantacija u odnosu na dve nedelje nakon implantacija, imunoekspresija VCAM-a 1 je snažnija i postoji trend rasta ekspresije gena markera endotelskih ćelija, izuzev *Vwf-a*, tokom *in vivo* eksperimentalnog perioda.

5) O osteogenom procesu na modelu inženjerisanih subkutanih implanata BALB/c miševa:

- u implantima koji kao komponentu imaju samo mineralni matriks kosti, postoje rani znaci osteogenog procesa, dok u kasnijim tačkama posmatranja *in vivo* eksperimentalnog perioda, opadaju imunoekspresija osteokalcina i ekspresija *Spp-a 1*.
- u implantima sačinjenim od mineralnog matriksa kosti i plazme obogaćene trombocitima osam nedelja nakon implantacija ne dolazi do napredovanja osteogenog procesa u odnosu na ranije tačke posmatranja, na šta ukazuju imunoekspresija osteokalcina i ekspresija *Spp-a 1*.
- u implantima sačinjenim od mineralnog matriksa kosti, plazme obogaćene trombocitima i neindukovanih ADSC, obrasci imunoekspresije osteokalcina i ekspresije *Spp1* gena ukazuju na to da osteogeni proces dobro napreduje zaključno sa tačkom posmatranja četiri nedelje nakon implantacija, a osam nedelja nakon implantacija dolazi do smanjene imunoekspresije osteokalcina i ekspresije *Spp1* gena u odnosu na ranije tačke posmatranja.
- u implantima koje čine mineralni matriks kosti, plazma obogaćena trombocitima i ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim ćelijama, osam nedelja nakon implantacija raste imunoekspresija osteokalcina, dok je ekspresija *Spp-a 1* visoka i stabilna tokom čitavog *in vivo* eksperimentalnog perioda, što čini ovu kombinaciju povoljnom za konstrukciju osteogenih implanata.
- implanti sačinjeni od mineralnog matriksa kosti, plazme obogaćene trombocitima i ADSC *in vitro* indukovanih ka osteogenim ćelijama imaju izraženu imunoekspresiju

osteokalcina i visoku ekspresiju *Spp1* gena, u svim tačkama posmatranja tokom *in vivo* eksperimentalnog perioda, što ovaj tip implanata čini pogodnim za potencijalnu primenu u tkivnom inženjerstvu kosti.

- osam nedelja nakon implantacija, kompozicija implanata koju čine mineralni matriks kosti, plazma obogaćena trombocitima i ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama indukuje ekspresiju markera osteogenog procesa, ali i jaku regresiju tkiva između granula MMK.

6) O razlikama u osteogenom procesu u različito inženjerisanim subkutanim implantima:

- konstrukcija implanata koja uključuje samo mineralni matriks kosti nije dovoljna za održivost dobre vaskularizovanosti i osteogenog procesa.
- postoji dobar osteogeni potencijal neindukovanih ADSC za konstrukciju osteogenih implanata, ali koji nije dovoljan za održivost osteogenog procesa nakon dužeg *in vivo* eksperimentalnog perioda.
- endotelske ćelije, u kombinaciji sa mineralnim matriksom kosti i plazmom obogaćenom trombocitima, jesu jedan od najznačajnijih faktora koji dovodi do dobre vaskularizovanosti i početka osteogenog procesa.
- same osteogene ćelije u implantima sa mineralnim matriksom kosti i plazmom obogaćenom trombocitima su dovele do povoljnijih osteogenih rezultata od kombinacije endotelskih i osteogenih ćelija.
- prejak regresija tkiva u implantima koje čine mineralni matriks kosti, plazma obogaćena trombocitima i ADSC *in vitro* indukovane ka endotelskim i osteogenim ćelijama nameće potrebu za traženjem optimalnih odnosa broja implantiranih endotelskih i osteogenih ćelija u njima.
- dalja istraživanja uticaja mezenhimskih matičnih ćelija belog masnog tkiva, indukovanih *in vitro* ka endotelskim i osteogenim ćelijama, na vaskularizovanost ektopičnih osteogenih implanata trebalo bi usmeriti na unapređenje mogućnosti,

uslova i načina za postizanje što boljeg biološkog kvaliteta vaskularizovanih tkivnih matriksa od značaja za tkivno inženjerstvo kosti i kliničku praksu.

7. LITERATURA

Abdel-Malak NA, Mofarrahi M, Mayaki D, Khachigian LM and Hussain SN. (2009) Early growth response-1 regulates angiopoietin-1-induced endothelial cell proliferation, migration and differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 209-216.

Adair TH and Montani JP. (2010) *Angiogenesis*. Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53242/>

Aghaloo TL, Moy PK and Freymiller EG. (2005) Evaluation of platelet rich plasma in combination with freeze-dried bone in the rabbit cranium, A pilot study. *Clin Oral Implants Res* 16: 250-257.

Aitsebaomo J, Portbury AL, Schisler JC and Patterson C (2008). Brothers and sisters: molecular insights into arterial-venous heterogeneity. *Circ Res* 103: 929-939.

Ajduković Z, Najman S, Đorđević Lj, Savić V, Mihailović D, Petrović D, Ignjatović N and Uskoković D (2005). Repair of bone tissue affected by osteoporosis with hydroxyapatite-poly-L-lactide (HAp-PLLA) with and without blood plasma. *J Biomater Appl* 20: 179-190.

Allo BA, Costa DO, Dixon SJ, Mequanint K and Rizkalla AS (2012). Bioactive and biodegradable nanocomposites and hybrid biomaterials for bone regeneration. *J Funct Biomater* 3: 432-463.

Alsousou J, Thompson M, Hulley P, Noble A and Willett K (2009). The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *J Bone Joint Surg Br* 91: 987-996.

Anderson SM, Siegman SN and Sequra T. (2011) The effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) presentation within fibrin matrices on endothelial cell branching. *Biomaterials* 32: 7432-7443.

Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P and Nurden AT. (2004) Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 91: 4-15.

Anselme K. (2000) Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21: 667-681.

Arinzeh TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A and Kadiyala S. (2003) Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am* 85-A: 1927-1935.

Arrigoni E, Lopa S, de Girolamo L, Stanco D and Brini AT. (2009) Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models. *Cell Tissue Res* 338: 401-411.

Aubin JE. (2001) Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord* 2: 81-94.

Audigier Y. (2011) Apelin signalling: lineage marker and functional actor of blood vessel formation, Vasculogenesis and Angiogenesis-from Embryonic Development to Regenerative Medicine, Dr. Dan Simionescu (Ed.). InTech, DOI: 10.5772/26645.

Avwioro G. (2011) Histochemical uses of haematoxylin-a review. *JPCS* 1: 24-34.

Azuma N, Duzgun SA, Ikeda M, Kito H, Akasaka N, Sasajima T and Sumpio BE (2000) Endothelial cell response to different mechanical forces. *J Vasc Surg* 32: 789-794.

Baer PC. (2011) Adipose-derived stem cells and their potential to differentiate into the epithelial lineage. *Stem Cells Dev* 20: 1805-1816.

Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, Georgiev-Hristov T, Ruiz Bravo-Burguillos E, Abarrategi A, Burgueño M and 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. *J Craniomaxillofac Surg* 43: 1161-1168.

Barbeck M, Udeabor S, Lorenz J, Kubesch A, Choukroun J, Sader R, Kirkpatrick C and 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. *Ann Maxillofac Surg* 4: 150-157.

Barbeck M, Najman S, Stojanović S, Mitić Ž, Živković JM, Choukroun J, Kovačević P, Sader R, Kirkpatrick CJ and Ghanaati S. (2015) Addition of blood to a phylogenetic bone substitute leads to an increased in vivo vascularization. *Biomed Mater* 10:055007.

Barradas AM, Yuan H, van Blitterswijk CA and Habibovic P. (2011) Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *Eur Cell Mater* 21: 407-429.

Beck L Jr and D'Amore PA. (1997) Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J* 11: 365-373.

Benjamin LE, Hemo I and Keshet E. (1998) A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 125: 1591-1598.

Bennett JH, Moffatt S and Horton M. (2001) Cell adhesion molecules in human osteoblasts: structure and function *Histol Histopathol* 16: 603-611.

Bishop AT and Pelzer M. (2007) Vascularized bone allotransplantation: current state and implications for future reconstructive surgery. *Orthop Clin North Am* 38: 109-122.

Boscolo E, Mulliken JB and Bischoff J. (2011) VEGFR-1 mediates endothelial differentiation and formation of blood vessels in a murine model of infantile hemangioma. *Am J Pathol* 179: 2266-2277.

Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. (2012) Recent advances in bone tissue engineering scaffolds, *Trends Biotechnol* 30: 546-554.

Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA and Longaker MT. (2002) Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg* 109: 2384-2397.

Boyan BD, Ranly DM and Schwartz Z. (2006) Use of growth factors to modify osteoinductivity of demineralized bone allografts: lessons for tissue engineering of bone. *Dent Clin North Am* 50: 217-228, viii.

Brånemark R, Brånemark PI, Rydevik B i Myers RR. (2001) Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review. *J Rehabil Res Dev* 38: 175-181.

Bronckers AL, Price PA, Schrijvers A, Bervoets TJ and Karsenty G. (1998) Studies of osteocalcin function in dentin formation in rodent teeth. *Eur J Oral Sci* 106: 795-807.

Buschmann J, Welti M, Hemmi S, Neuenschwander P, Baltes C, Giovanoli P, Rudin M and Calcagni M. (2011) Three-dimensional co-cultures of osteoblasts and endothelial cells in DegraPol foam: histological and high-field magnetic resonance imaging analyses of pre-engineered capillary networks in bone grafts. *Tissue Eng Part A* 17:291-299.

Cai X, Su X, Li G, Wang J and Lin Y. (2012) Osteogenesis of Adipose-Derived Stem Cells, Osteogenesis, in: prof. Yunfeng Lin (Editor). InTech, DOI: 10.5772/34025.

Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q and Zhao RC. (2005) Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 370-379.

Caprioli A, Minko K, Drevon C, Eichmann A, Dieterlen-Lievre F and Jaffredo T. (2001) Hemangioblast commitment in the avian allantois: cellular and molecular aspects. *Dev Biol* 238: 64-78.

Cvetković VJ, Najman SJ, Rajković JS, Žabar ALj, Vasiljević PJ, Đorđević LjB and Trajanović MD. (2013) A comparison of the microarchitecture of lower limb long bones between some animal models and humans: a review. *Vet Med (Praha)* 58: 339-351.

Cvetković VJ, Najdanović JG, Vukelić-Nikolić MĐ, Stojanović S and Najman SJ. (2015) Osteogenic potential of in vitro osteo-induced adipose-derived mesenchymal stem cells combined with platelet-rich plasma in an ectopic model. *Int Orthop* 39: 2173-2180.

Carano RAD and Filvaroff EH. (2003) Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 8: 980-989.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W and Nagy A. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435-439.

Carmeliet P. (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395.

Carulli C, Innocenti M and Brandi ML. (2013) Bone vascularization in normal and disease conditions. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 106.

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

Chai YC, Carlier A, Bolander J, Roberts SJ, Geris L, Schrooten J, Van Oosterwyck H and Luyten FP. (2012) Current views on calcium phosphate osteogenicity and the translation into effective bone regeneration strategies. *Acta Biomater* 8: 3876-3887.

Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh JJ and Lee SH. (2004) Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33: 56-59.

Choi KM, Seo YK, Yoon HH, Song KY, Kwon SY, Lee HS and Park JK. (2008) Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *J Biosci Bioeng* 105: 586-594.

Chung CH, Golub EE, Forbes E, Tokuoka T and Shapiro IM. (1992) Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int* 51: 305-311.

Clarkin CE, Emery RJ, Pitsillides AA and Wheeler-Jones CPD. (2008) Evaluation of VEGF-Mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells. *J Cell Physiol* 214: 537-544.

Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Röckl W, Waltenberger J and Risau W. (1996) The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem* 271: 17629-17634.

Collett GDM and Canfield AE. (2005) Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ Res* 96: 930-938.

Conrad C and Huss R. (2005) Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. *J Surg Res* 124: 201-208.

Conejero JA, Lee JA, Parrett BM, Terry M, Wear-Maggitti K, Grant RT and Breitbart AS. (2006) Repair of palatal bone defects using osteogenically differentiated fat-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 117: 857-863.

Cornejo A, Sahar DE, Stephenson SM, Chang S, Nguyen S, Guda T, Wenke JC, Vasquez A, Michalek JE, Sharma R, Krishnegowda NK and Wang HT. (2012) Effect of adipose tissue-derived osteogenic and endothelial cells on bone allograft osteogenesis and vascularization in critical-sized calvarial defects. *Tissue Eng Part A* 18: 1552-1561.

Culmes M, Ecksteina HH, Burgkartb R, Nüssler AK, Guenther M, Wagner E and Pelisek J. (2013) Endothelial differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells is improved by epigenetic modifying drug BIX-01294. *Eur J Cell Biol* 92:70-79.

Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pawlin D and Berman JS. (2001) Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 107: 1055-1061.

Detsch R, Mayr H and Ziegler G. (2008) Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics. *Acta Biomater* 4: 139-148.

De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J and Hedrick MH. (2003) Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174: 101-109.

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

Döri F, Huszár T, Nikolidakis D, Arweiler NB, Gera I and Sculean A. (2007) Effect of platelet-rich plasma on the healing of intrabony defects treated with an anorganic bovine bone mineral and expanded polytetrafluoroethylene membranes. *J Periodontol* 78: 983-990.

Druecke D, Langer S, Lamme E, Pieper J, Ugarkovic M, Steinau HU and Homann HH. (2004) Neovascularization of poly(ether ester) blockcopolymer

scaffolds in vivo: long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. *J Biomed Mater Res A* 68: 10-18.

El-Ganzuri MA, Ahmed RR and Bastawy EM (2015) Regulatory Mechanisms of Bone Development and Function . *Peertechz J Cytol Pathol* 1: 005-017.

Eppley BL, Woodell JE and Higgins J. (2004) Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 114: 1502-1508.

Eppley BL, Pietrzak WS and Blanton M. (2006) Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg* 118: 147e-159e.

Fernandez Pujol B, Lucibello FC, Gehling UM, Lindemann K, Weidner N, Zuzarte ML, Adamkiewicz J, Elsässer HP, Müller R and Havemann K. (2000) Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation* 65: 287-300.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ and Moore MW. (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380: 439-442.

Feuerbach D and Feyen JH. (1997) Expression of the cell-adhesion molecule VCAM-1 by stromal cells is necessary for osteoclastogenesis. *FEBS Lett* 402: 21-24.

Fischer LJ, McIlhenny S, Tulenko T, Golesorkhi N, Zhang P, Larson R, Lombardi J, Shapiro I and DiMuzio PJ. (2009) Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force. *J Surg Res* 152: 157-166.

Flamme I, Frölich T and Risau W. (1997) Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol* 173: 206-210.

Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ and Cerri PS. (2015) Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.* 2015:421746.

Folkman J and Haudenschild C (1980) Angiogenesis in vitro. *Nature* 288: 551-556.

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M and Breitman ML. (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376: 66-70.

Fraser JK. (2002) Adipose tissue: challenging the marrow monopoly. *Cytotherapy* 4: 509-510.

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

Freshney RI. (2005) *Culture of animal cells-a manual of basic technique* (5th ed). John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.

Freyman TM, Yannas IV and Gibson LJ. (2001) Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Prog Mater Sci* 46: 273-282.

Fries JWU, Williams AJ, Atkins RC, Newman W, Lipscomb MF and Collins T. (1993) Expression of VCAM-1 and E-Selectin in an in Vivo Model of Endothelial Activation *Am J Pathol* 143: 725-737.

Fu M, Zhu X, Zhang J, Liang J, Lin Y, Zhao L Ehrengruber MU and Chen YE. (2003) Egr-1 target genes in human endothelial cells indentified by microarray analysis. *Gene* 315: 33-41.

Garmy-Susini B, Jin H, Zhu Y, Sung RJ, Hwang R and Varner J. (2005) Integrin alpha4 beta1-VCAM-1 mediated adhesion between endothelial and mural cells is required for blood vessel maturation. *J Clin Invest* 115: 1542-1551.

Gashler A and Sukhatme VP. (1995) Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc finger family of transcription factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 50: 191-224.

Gentile P, Scioli MG, Orlandi A and Cervelli V. (2011) Review: Application of Platelet-Rich Plasma in Hard Tissue Defects. *J Tissue Sci Eng* S2: 001.

Geris L, Gerisch A, Sloten JV, Weiner R and Oosterwyck HV. (2008) Angiogenesis in bone fracture healing: a bioregulatory model. *J Theor Biol* 251: 137-158.

Gimble J and Gullak F. (2003) Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 5: 362-369.

Glowacki J. (1998) Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 355 Suppl: S82-S89.

Gluhak-Heinrich J, Villarreal A and Pavlin D. (2000) Reciprocal regulation of osteopontin gene during mechanically induced bone formation and resorption. *J Bone Miner Res* 15 Suppl 1: S478.

Gomillion CT and Burg KJL. (2006) Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials* 27: 6052-6063.

Grellier M, Bordenave L and Amédée J. (2009) Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 27: 562-571.

Grundnes O and Reikeras O. (1993) The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthop. Scand.* 64: 340-342.

Gueven S, Mehrkens A, Saxer F, Schaefer DJ, Martinetti R, Martin I and Scherberich A. (2011) Engineering of large osteogenic grafts with rapid engraftment capacity using mesenchymal and endothelial progenitors from human adipose tissue. *Biomaterials* 32: 5801-5809.

Guillotin B, Bareille R, Bourget C, Bordenave L and Amédée J. (2008) Interaction between human umbilical vein endothelial cells and human osteoprogenitors triggers pleiotropic effect that may support osteoblastic function. *Bone* 42: 1080-1091.

Gürsoy G, Acar Y and Alagöz S. (2010) Osteopontin: a multifunctional molecule. *JMMS* 1: 055-060.

Hanna R, Trejo PM and Weltman RL. (2004) Treatment of intrabony defects with bovine-derived xenograft alone and in combination with platelet-rich plasma: a randomized clinical trial. *J Periodontol* 75: 1668-1677.

Hanseler P, Jung UW, Jung RE, Choi KH, Cho KS, Hammerle CH and Weber FE. (2012) Analysis of hydrolyzable polyethylene glycol hydrogels and deproteinized bone mineral as delivery systems for glycosylated and non-glycosylated bone morphogenetic protein-2. *Acta Biomater* 8: 116-123.

Healy KE and Guldberg RE. (2007) Bone tissue engineering. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 7: 328-330.

Helmrich U, Di Maggio N, Güven S, Groppa E, Melly L, Largo RD, Heberer M, Martin I, Scherberich A and Banfi A. (2013) Osteogenic graft vascularization and bone resorption by VEGF expressing human mesenchymal progenitors *Biomaterials* 34: 5025-5035.

Hentze H, Graichen R and Colman A. (2007) Cell therapy and the safety of embryonic stem cell-derived grafts. *Trends Biotechnol* 25: 24-32.

Hill PA. (1998) Bone remodeling. *Br J Orthod* 25: 101-107.

Hirschi KK and d'Amore PA. (1996) Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 32: 687-698.

Hislop WS, Finlay PM and Moos KF. (1993) A preliminary study into the uses of anorganic bone in oral and maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg* 31: 149-153.

Hoeben A, Landuyt B, Highley MS Wildiers H, Van Oosterom AT and De Bruijn EA. (2004) Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 56: 549-580.

Hoemann CD, El-Gabalawy H and McKee MD. (2009) In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol* 57: 318-323.

Hong SJ, Traktuev DO and March KL. (2010) Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant* 15: 86-91.

Hyun JS, Nelson ER, Montoro D, Levi B and Longaker MT. (2011) Skeletal and Adipose Tissue Engineering with Adipose-Derived Stromal Cells, *Tissue Engineering for Tissue and Organ Regeneration*, in: prof. Daniel Eberli (Editor) InTech, DOI: 10.5772/22971.

Indovina A and Block MS. (2002) Comparison of 3 bone substitutes in canine extraction sites. *J Oral Maxillofac Surg* 60: 53-58.

Ignjatović N, Savić V, Najman S, Plavgić M and Uskoković D. (2001) A study of HAp/PLLA composite as a substitute for bone powder, using FT-IR spectroscopy. *Biomaterials* 22: 571-575.

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

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

Jain RK. (2003) Molecular regulation of vessel maturation *Nat Med* 9: 685-693.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI and Bruder SP (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64: 295-312.

Jin GZ, Han CM and Kim HW. (2015) In vitro co-culture strategies to prevascularization for bone regeneration: a brief update. *Tissue Eng Regen Med* 12: 69-79.

Josse RG. (2009) Bone Biology and the Role of RANK/RANKL/OPG Pathway. Geriatrics and Aging Conference Report from the 2009 CGS Annual Scientific Meeting: Satellite Symposium 30-31.

Junqueira LC and Carneiro J. (2005) *Basic histology: Text and Atlas* (11th ed). McGraw-Hill Companies Inc, New York.

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. *J Orthop Res* 29: 853-860.

Kanczler JM and Oreffo RO. (2008) Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater* 215: 100-114.

Kanczler JM, Ginty PJ, White L, Clarke NMP, Howdle SM, Shakesheff KM and Oreffo RO. (2010) The effect of the delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenic protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation. *Biomaterials* 31: 1242-1250.

Karamysheva AF. (2008) Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Moscow)* 73: 751-762.

Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H and Ogle RC (2005). Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells* 23: 412-423.

Khan SA, Lopez-Chua CA, Zhang J, Fisher LW, Sørensen ES and Denhardt DT. (2002) Soluble osteopontin inhibits apoptosis of adherent endothelial cells deprived of growth factors. *J Cell Biochem* 85: 728-736.

Kilpadi KL, Chang PL and Bellis SL. (2001) Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel. *J Biomed Mater Res* 57: 258-267.

Kim SG, Chung CH, Kim YK, Park JC and Lim SC. (2002) Use of particulate dentin-Plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 17: 86-94.

Kim SS and Kim BS. (2008) Comparison of osteogenic potential between apatite-coated poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite particulates and Bio-Oss. *Dent Mater J* 27: 368-375.

Kim S and Von Recum H. (2008) Endothelial stem cells and precursors for tissue engineering: Cell source, differentiation, selection, and application. *Tissue Eng Part B Rev* 14: 133-147.

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

Klinge B, Alberius P, Isaksson S and Jönsson J. (1992) Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramics in repair of experimental skull bone defects. *J Oral Maxillofac Surg* 50: 241-249.

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

Konno M, Hamazaki TS, Fukuda S, Tokuhara M, Uchiyama H, Okazawa H, Okochi H and Asashima M. (2010) Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in serum-free culture. *Biochem Biophys Res Commun* 400: 461-465.

Koob S, Torio-Padron N, Stark GB, Hannig C, Stankovic Z and Finkenzeller G. (2011) Bone formation and neovascularization mediated by mesenchymal stem cells and endothelial cells in critical-sized calvarial defects. *Tissue Eng Part A* 17: 311-321.

Kozawa O, Matsuno H and Uematsu T. (2001) Involvement of p70 S6 kinase in bone morphogenetic protein signaling: vascular endothelial growth factor synthesis by bone morphogenetic protein-4 in osteoblasts. *J Cell Biochem* 81: 430-436.

Kume T. (2008) Foxc2 transcription factor: a newly described regulator of angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 18: 224-228.

Kwee L, Baldwin HS, Shen HM, Stewart CL, Buck C, Buck CA and Labow MA. (1995) Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. *Development* 121: 489-503.

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

Laschke MW, Kleer S, Scheuer C, Schuler S, Garcia P, Eglin D, Alini M and Menger MD. (2012) Vascularisation of porous scaffolds is improved by incorporation of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater* 24: 266-277.

Lazić Z, Bubalo M, Petković-Curčin A, Dukat M and Mihajlović B. (2009) Terapijska primena plazme bogate trombocitima u oralnoj hirurgiji. *Vojnosanit Pregl* 66: 821-825.

Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E and Ringdén O. (2003) HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 31: 890-896.

Lee AJ, Hodges S and Eastell R. (2000) Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem* 37(Pt 4): 432-446.

Leong DT, Nah WK, Gupta A, Hutmacher DW and Woodruff MA. (2008) The osteogenic differentiation of adipose tissue-derived precursor cells in A 3D scaffold/matrix environment. *Curr Drug Discov Technol* 5: 319-327.

Levenberg S, Rouwkema J, Macdonald M, Garfein ES, Kohane DS, Darland DC, Marini R, van Blitterswijk CA, Mulligan RC, D'Amore PA and Langer R

(2005). Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat Biotechnol* 23: 879-884.

Lian J, Stewart C, Puchacz E, Mackowiak S, Shalhoub V, Collart D, Zambetti G and Stein, G. (1989) Structure of the rat osteocalcin gene and regulation of vitamin D-dependent expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 1143-1147.

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

Lian JB and Stein GS. (2003) Runx2/Cbfa1: a multifunctional regulator of bone formation. *Curr Pharm Des* 9: 2677-2685.

Lin CS, Xin ZC, Deng CH, Ning H, Lin G and Lue TF (2010). Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol* 25: 807-815.

Lindsay DT. (1996) *Functional human anatomy*. St. Louis, Mosby.

Lippross S and Alini M. (2007) Platelet-rich plasma for bone healing-to use or not to use? AO Research Institute, Davos, 01.2007. Available from: http://www.aofoundation.org/Documents/platelet_plasma.pdf

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

Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, Meotti C, Bertoja AZ, Giardino R, Fornasari PM, Mercuri M and Picci P. (2003) Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 24: 3095-3100.

Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajar KA, Manova K, Benezra R and Rafii S. (2001) Impaired recruitment of bone marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7: 1194-1201.

Lysiak-Drwal K, Dominiak M, Solski L, Zywicka B, Pielka S, Konopka T and Gerber H. (2008) Early histological evaluation of bone defect healing with and

without guided bone regeneration techniques: experimental animal studies. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 62: 282-288.

Marx RE. (2001) Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 10: 225-228.

Marx RE. (2004) Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 62:489-496.

Madonna R and De Caterina R. (2008) In vitro neovasculogenic potential of resident adipose tissue precursors. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C1271-C1280.

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

Matsumoto T and Claesson-Welsh L. (2001) VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*. 2001: re21.

Mauney JR, Jaquiéry C, Volloch V, Heberer M, Martin I and Kaplan DL. (2005) In vitro and in vivo evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering. *Biomaterials*. 26: 3173-3185.

Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R and Hughes J. (2002) Osteopontin-a molecule for all seasons. *QJM* 95: 3-13.

Meinhart JG, Deutsch M, Fischlein T, Howanietz N, Fröschl A and Zilla P. (2001) Clinical autologous in vitro endothelialization of 153 infrainguinal ePTFE grafts. *Ann Thorac Surg* 71 Suppl 5: S327-S331.

Merfeld-Clauss S, Gollahalli N, March KL and Traktuev DO. (2010) Adipose tissue progenitor cells directly interact with endothelial cells to induce vascular network formation. *Tissue Eng Part A* 16: 2953-2966.

Merkx MAW, Maltha JC, Freihofer HPM and Kuijpers-Jagtman AM. (1999) Incorporation of three types of bone block implants in the facial skeleton. *Biomaterials* 20: 639-645.

Michiels C. (2003) Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* 196: 430-443.

Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM and Jee WS. (1989) Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microscopy* 3: 953-961.

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

Mizuno K, Mineo K, Tachibana T, Sumi M, Matsubara T and Hirohata K. (1990) The osteogenic potential of fracture hematoma. Subperiosteal and intramuscular transplantation of the haematoma. *J Bone Joint Surg Br* 72: 822-829.

Mizuno H. (2009) Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: Ten years of research and literature review. *J Nippon Med Sch* 76: 56-66.

Morgan JM, Navabi H, Schmid KW and Jasani B. (1994) Possible role of tissue-bound calcium ions in citrate mediated high-temperature antigen retrieval. *J Pathol* 174: 301-304.

Murphy MB, Blashki D, Buchanan RM, Fan D, De Rosa E, Shah RN, Stupp SI, Weiner BK, Simmons PJ, Ferrari M and Tasciotti E. (2011) Multi-composite bioactive osteogenic sponges featuring mesenchymal stem cells, platelet-rich plasma, nanoporous silicon enclosures, and peptide amphiphiles for rapid bone regeneration. *J Funct Biomater* 2: 39-66.

Nair MB, Varma HK, Kumary TV, Suresh BS and John A (2006). Cell interaction studies with novel bioglass coated hydroxyapatite porous blocks. *Trends Biomater Artif Organs* 19: 108-114.

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

Najdanović JG, Cvetković VJ, Stojanović S, Vukelić-Nikolić MĐ, Čakić-Milošević MM, Živković JM and Najman SJ (2016). Effects of bone tissue engineering triad components on vascularization process: comparative gene expression and histological evaluation in an ectopic bone-forming model. *Biotechnol Biotec Eq* DOI:10.1080/13102818.2016.1213662. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2016.1213662>

Nakagami H, Morishita R, Maeda K, Kikuchi Y, Ogihara T and Kaneda Y. (2006) Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler. Thromb* 13: 77-81.

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

Navarro M, Michiardi A, Castaño O and Planell JA. (2008) Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface* 5: 1137-1158.

Nurden AT, Nurden P, Sanchez M, Andia I and Anitua E (2008). Platelets and wound healing. *Front Biosci* 13: 3525-3548.

O'Brien FJ. (2011) Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater Today* 14: 88-95.

Ogawa R. (2006) The importance of adipose-derived stem cells and vascularized tissue regeneration in the field of tissue transplantation. *Cur Stem Cell Res Ther* 1: 13-20.

Oryan A, Alidadi S, Moshiri A and Maffulli N. (2014) Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res* 9: 18.

Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehniger G, Bornhäuser M and Werner C. (2004) Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 22: 377-384.

Otrock ZK, Makarem JA and Shamseddine AI. (2007) Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis* 38: 258-68.

Pak J, Chang JJ, Lee JH and Lee SH. (2013) Safety reporting on implantation of autologous adipose tissue-derived stem cells with platelet-rich plasma into human articular joints *BMC Musculoskeletal Disorders* 14: 337.

Papadimitropoulos A, Scherberich A, Güven S, Theilgaard N, Crooijmans HJ, Santini F, Scheffler K, Zallone A and Martin I. (2011) A 3D in vitro bone organ model using human progenitor cells. *Eur Cell Mater* 21: 445-458.

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

Patel-Hett S and D'Amore PA (2011). Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *Int J Dev Biol* 55: 353-363.

Patrick CW Jr. (2000) Adipose tissue engineering: the future of breast and soft tissue reconstruction following tumor resection. *Semin Surg Oncol* 19: 302-311.

Patrick CW. (2004) Breast tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng* 6: 109-130.

Partap S, Lyons F and O'Brien FJ. (2010) IV.1. Scaffolds & Surfaces. *Stud Health Technol Inform* 152: 187-201.

Pearse AGE. (1980) *Histochemistry: Theoretical and applied* (4th ed). Churchill Livingstone, Edinburgh-Toronto.

Pedersen TO, Blois AL, Xue Y, Xing Z, Cottler-Fox M, Fristad I and Leknes KN, Lorens JB and Mustafa K. (2012) Osteogenic stimulatory conditions enhance growth and maturation of endothelial cell microvascular networks in culture with mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng* 3: 2041731412443236.

Pettersson P, Cigolini M, Sjostrom L, Smith U and Bjorntorp P. (1984) Cells in human adipose tissue developing into adipocytes. *Acta Med Scand* 215: 447-451.

Piattelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G and Piattelli A. (1999) Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 14: 835-840.

Pilleri SA, Roncador G, Ceccareli C, Piccioli M, Briskomatis A, Sabattini E, Ascani S, Santini D, Piccaluga PP, Leone O, Damiani S, Ercolessi C, Sandri F, Pieri F, Leoncini L and Falini B. (1997) Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. *J Pathol* 183: 116-124.

Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Pénicaud L and Casteilla L. (2004) Plasticity of human adipose lineage cells toward

endothelial cells: Physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109: 656-663.

Probst A and Spiegel HU. (1997) Cellular mechanisms of bone repair. *J Invest Surg* 10: 77-86.

Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E and Marcacci M. (2001) Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 344: 385-386.

Rajković J, Stojanović S, Đorđević Lj, Cvetković T and Najman S. (2015) Locally applied cholecalciferol and alfacalcidol act differently on healing of femur defects filled with bone mineral matrix and platelet-rich plasma in ovariectomized rats. *Biotechnol Biotec Eq* 29: 963-969.

Rao RR and Stegemann JP. (2013) Cell-based approaches to the engineering of vascularized bone tissue. *Cytotherapy* 15: 1309-1322.

Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A and Heinegård D. (1990) Osteopontin-a possible anchor osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4473-4475.

Ribatti D and Crivellato E. (2012) "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. *Dev Biol* 372: 157-165.

Ripamonti U, Klar RM, Renton LF and Ferretti C. (2010) Synergistic induction of bone formation by Hop-1, HTGbeta3 and inhibition by zoledronate in macroporous coral-derived hydroxyapatites. *Biomaterials* 31: 6400-6410.

Ross MH and Pawlina W. (2011) *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology* (6th ed). Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, Philadelphia.

Rouwkema J, de Boer J and Van Blitterswijk CA. (2006) Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Eng* 12: 2685-2693.

Rouwkema J, Rivron NC and van Blitterswijk CA. (2008) Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 26: 434-441.

Rouwkema J, Westerweel PE, de Boer J, Verhaar MC and van Blitterswijk CA. (2009) The use of endothelial progenitor cells for prevascularized bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 15: 2015-2027.

Ryoo HM, Hoffmann HM, Beumer T, Frenkel B, Towler DA, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ and Lian JB. (1997) Stage-specific expression of Dlx-5 during osteoblast differentiation: involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol* 11: 1681-1694.

Sahar DE, Walker JA, Wang HT, Stephenson SM, Shah AR, Krishnegowda NK and Wenke JC. (2012) Effect of endothelial differentiated adipose-derived stem cells on vascularity and osteogenesis in poly(D,L-lactide) scaffolds in vivo. *J Craniofac Surg* 23: 913-918.

Sandor GK and Suuronen R (2008). Combining adipose-derived stem cells, resorbable scaffolds and growth factors: An overview of tissue engineering. *J Can Dent Assoc* 74: 167-170.

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

Sârb S, Raica M and Cîmpean AM. (2011) Human embryonic blood vessels: what do they tell us about vasculogenesis and angiogenesis? *Vasculogenesis and Angiogenesis - from Embryonic Development to Regenerative Medicine*, in: Dr. Dan Simionescu (Editor). InTech. DOI: 10.5772/27380.

Sasano Y, Zhu JX, Kamakura S, Kusunoki S, Mizoguchi I and Kagayama M. (2000) Expression of major bone extra cellular matrix proteins during embryonic osteogenesis in rat mandibles. *Anat Embryol (Berl)* 202: 31-37.

Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T and Shibuya M. (2001) Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 97: 785-791.

Scherberich A, Müller AM, Schäfer DJ, Banfi A and Martin I. (2010) Adipose tissue-derived progenitors for engineering osteogenic and vasculogenic grafts. *J Cell Physiol* 225: 348-353.

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

Schroeder JE and Mosheiff R. (2011) Tissue engineering approaches for bone repair: concepts and evidence. *Injury* 42: 609-613.

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. *Int Orthop* 39: 799-805.

Scott MA, Levi B, Askarinam A, Nguyen A, Rackohn T, Ting K, Soo C and James AW. (2012) Brief review of models of ectopic bone formation. *Stem Cells Dev* 21: 655-667.

Seifalian AM, Tiwari A, Hamilton G and Salacinski HJ. (2002) Improving the clinical patency of prosthetic vascular and coronary bypass grafts: the role of seeding and tissue engineering. *Artif Organs* 26: 307-320.

Shapiro F. (2008) Bone development and its relation to fracture repair, The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater* 15:53-76.

Shayesteh YS, Khorsand A, Motahhary P, Dehghan M, Shafiee Ardestani MA. (2005) Evaluation of platelet-rich plasma in combination with deproteinized bovine bone mineral in the rabbit cranium; a pilot study. *J Dent* 2: 127-134.

Shibuya M and Claesson-Welsh L. (2006) Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 312: 549-560.

Silverman ES and Collins T. (1999) Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology. *Am J Pathol* 154: 665-670.

Silverman MD, Zamora DO, Pan Y, Texeira PV, Planck SR and Rosenbaum JT. (2001) Cell adhesion molecule expression in cultured human iris endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 2861-2866.

Sodek J, Ganss T and McKee MD. (2000) Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med*. 11: 279-303.

Soker S, Machado M and Atala A (2000). Systems for therapeutic angiogenesis in tissue engineering. *World J Urol* 18: 10-18.

Song S, Kim EJ, Bahney CS, Miclau T, Marcucio R and Roy S. (2015) The synergistic effect of micro-topography and biochemical culture environment to promote angiogenesis and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater* 18: 100-111.

Sophia Fox AJ, Bedi A and Rodeo SA. (2009) The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health* 1: 461-468.

Starke RD, Ferraro F, Paschalaki KE, Dryden NH, McKinnon TA, Sutton RE, Payne EM, Haskard DO, Hughes AD, Cutler DF, Laffan MA, Randi AM. (2011) Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *Blood* 117: 1071-1080.

Stevens MM. (2008) Biomaterials for bone tissue engineering. *Mater today* 11: 18-25.

Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA and Filvaroff EH. (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9656-9661.

Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK and Hedrick MH. (2005) Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54: 132-141.

Strober W. (2001) Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. Appendix 3:Appendix 3B.

Sumi M, Sata M, Toya N, Yanaga K, Ohki T and Nagai R. (2007) Transplantation of adipose stromal cells, but not mature adipocytes, augments ischemia-induced angiogenesis. *Life Sci* 80: 559-565.

Sumpio BE, Riley JT and Dardik A. (2002) Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 1508-1512.

Sun H, Qu Z, Guo Y, Zang G and Yang B. (2007) In vitro and in vivo effects of rat kidney vascular endothelial cells on osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells growing on polylactide-glycolic acid (PLGA) scaffolds. *Biomed Eng Online* 6: 41.

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: 95-106.

Sung JH Yang HM, Park JB, Choi GS, Joh JW, Kwon CH, Chun JM, Lee SK and Kim SJ. (2008) Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 40: 2649-2654.

Taha MF and Hedayati V. (2010) Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. *Tissue Cell* 42: 211-216.

Taléns-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Castell JV and Gómez-Lechón MJ. (2006) Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells *World J Gastroenterol* 12: 5834-5845.

Tang D, Tare RS, Yang LY, Williams DF, Ou KL and Oreffo RO. (2016) Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Biomaterials*. 83: 363-382.

Tapp H, Hanley EN Jr, Patt JC and Gruber HE. (2009) Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Exp Biol Med* 234: 1-9.

Taubenberger AV, Woodruff MA, Bai H, Muller DJ and Hutmacher DW. (2010) The effect of unlocking RGD-motifs in collagen I on pre-osteoblast adhesion and differentiation. *Biomaterials* 31: 2827-2835.

Tissue Engineering. 1995 Annual report of the Whitaker Foundation: tissue engineering; 1995. http://www.whitaker.org/95_annual_report/tissue95.html.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS and Jones JM. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147.

Tobita M, Orbay H and Mizuno H. (2011) Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives. *Discov Med* 11: 160-170.

Tögel F and Westenfelder C (2007). Adult bone marrow-derived stem cells for organ regeneration and repair. *Dev Dyn* 236: 3321-3331.

Torres J, Tamimi F, Martinez PP, Alkhraisat MH, Linares R, Hernández G and Torres-Macho J and López-Cabarcos E. (2009) Effect of platelet-rich plasma on sinus lifting: a randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 36: 677-687.

Traktuev DO, Parfenova EV, Tkachuk VA and March KL. (2006) Adipose stromal cells-plastic type of cells with high therapeutic potential. *Tsitologiya* 48: 83-94.

Traktuev DO, Prater DN, Merfeld-Clauss S, Sanjeevaiah AR, Saadatzadeh MR, Murphy M, Johnstone BH, Ingram DA and March KL. (2009) Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. *Circ Res* 104: 1410-1420.

Tsai JC, Liu L, Guan J and Aird WC. (2000) The Egr-1 gene is induced by epidermal growth factor in ECV304 cells and primary endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1414-C1424.

Tsuji W, Rubin JP and Marra KG. (2014) Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration *World J Stem Cells* 6: 312-321.

Tuzlakoglu K, Bolgen N, Salgado AJ, Gomes ME, Piskin E and Reis RL. (2005) Nano- and micro-fiber combined scaffolds: a new architecture for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 16: 1099-1104.

Undale AH, Westendorf JJ, Yaszemski MJ and Khosla S. (2009) Mesenchymal stem cells for bone repair and metabolic bone diseases. *Mayo Clin Proc* 84: 893-902.

Unger RE, Sartoris A, Peters K, Motta A, Migliaresi C, Kunkel M, Bulnheim U, Rychly J, and Kirkpatrick CJ. (2007) Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials* 28: 3965-3976.

Väänänen HK, Salo J and Lehenkari P. (1996) Mechanism of osteoclast-mediated bone resorption. *J Bone Miner Metab* 4: 187-192.

Vailhé B, Vittet D and Feige JJ. (2001) In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest* 81: 439-452.

Valentijn KM, Sadler JE, Valentijn JA, Voorberg J and Eikenboom J. (2011) Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood* 117: 5033-5043.

Van Mourik JA, Romani de Wit T and Voorberg J. (2002) Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. *Histochem Cell Biol* 117: 113-122.

Verseijden F, Posthumus-van Sluijs SJ, Farrell E, van Neck JW, Hovius SE, Hofer SO and van Osch GJ. (2010) Prevascular structures promote vascularization in engineered human adipose tissue constructs upon implantation. *Cell Transplant* 19: 1007-1020.

Vogel JP, Szalay K, Geiger F, Kramer M, Richter W and 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: 462-469.

Von Offenberg Sweeney N, Cummins PM, Cotter EJ, Fitzpatrick PA, Birney YA, Redmond EM and Cahill PA. (2005) Cyclic strain-mediated regulation of vascular endothelial cell migration and tube formation. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 573-582.

Wakui S. (1992) Epidermal growth factor receptor at endothelial cell and pericyte Interdigitation in human granulation tissue. *Microvascular Res* 4: 255-262.

Wang DS, Miura M, Demura H and Sato K. (1997) Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. *Endocrinol* 138: 2953-2962.

Wang L, Fan H, Zhang ZY, Lou AJ, Pei GX, Jiang S, Mu TW, Qin JJ, Chen SY and Jin D. (2010) Osteogenesis and angiogenesis of tissue-engineered bone constructed by prevascularized β -tricalcium phosphate scaffold and mesenchymal stem cells *Biomaterials* 31: 9452-9461.

Wang X, Wang Y, Gou W, Lu Q, Peng J and Lu S (2013). Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *Int Orthop* 37: 2491-2498.

Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmöller M, Russo PA, Bolte H, Sherry E, Behrens E and Terheyden H (2004). Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 364: 766-770.

Weibrich G, Kleis WK, Hafner G and Hitzler WE. (2002) Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg* 30: 97-102.

Westbroek I, De Rooij KE, Nijweide PJ. Osteocyte-specific monoclonal antibody MAb OB7.3 is directed against Phex protein. *J Bone Miner Res.* 2002;17: 845-853.

Williams SK, McKenney S and Jarrell BE. (1995) Collagenase lot selection and purification for adipose tissue digestion. *Cell Transplant* 4: 281-289.

Williams DF. (2008) On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials.* 29: 2941-2953.

Wu X, Rabkin-Aikawa E, Guleserian KJ, Perry TE, Masuda Y, Sutherland FW, Schoen FJ, Mayer JE Jr and Bischoff J. (2004) Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H480-H487.

Xiao Y, Peperzak V, van Rijn L, Borst J and de Bruijn JD (2010). Dexamethasone treatment during the expansion phase maintains stemness of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 4: 374-386.

Xie X, Wang Y, Zhao C, Guo S, Liu S, Jia W, Tuan RS and Zhang C (2012). Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration. *Biomaterials* 33: 7008-7018.

Yang P, Huang X, Shen J, Wang C, Dang X, Mankin H, Duan Z and Wang K. (2013) Development of a new pre-vascularized tissue-engineered construct using pre-differentiated rADSCs, arteriovenous vascular bundle and porous nano-hydroxyapatite-polyamide 66 scaffold. *BMC Musculoskeletal Disorders* 14: 318.

Yang YQ, Tan YY, Wong R, Wenden A, Zhang LK and Rabie AB (2012). The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci* 4: 64-68.

Yeh HI, Lee PY, Su CH, Tian TY, Ko YS and Tsai CH (2006). Reduced expression of endothelial connexins 43 and 37 in hypertensive rats is rectified after 7-day carvedilol treatment. *Am J Hypertens* 19: 129-135.

Yildirim M, Spiekermann H, Handt S and Edelhoff D. (2001) Maxillary sinus augmentation with the xenograft Bio-Oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of the implant site: A histologic and histomorphometric clinical study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 16: 23-33.

Yoshimi R, Yamada Y, Ito K, Nakamura S, Abe A, Nagasaka T, Okabe K, Kohgo T, Baba S and Ueda M. (2009) Selfassembling peptide nanofiber scaffolds, platelet-rich plasma, and mesenchymal stem cells for injectable bone regeneration with tissue engineering. *J Craniofac Surg* 20: 1523-1530.

Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, Sato K, Inoue K, Nagase T, Koshima I and Gonda K. (2006) Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol* 208: 64-76.

You TM, Choi BH, Li J, Jung JH, Lee HJ, Lee SH and Jeong SM (2007). The effect of platelet-rich plasma on bone healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss: a pilot study in the dog tibia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 103: e8-e12.

Young S, Kretlow JD, Nguyen C, Bashoura AG, Baggett LS, Jansen JA, Wong M and Mikos AG (2008). Microcomputed Tomography Characterization of Neovascularization in Bone Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng Part B Rev* 14: 295-306.

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

Zhang N, Wu YP, Qian SJ, Teng C, Chen S and Li H. (2013) Research progress in the mechanism of effect of PRP in bone deficiency healing. *ScientificWorldJournal* 2013: 134582.

Zhou J and Dong J. (2012) Vascularization in the bone repair, Osteogenesis, in: prof. Yunfeng Lin (Editor). InTech. DOI:10.5772/36325.

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

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

Živković JM, Najman SJ, Vukelić MĐ, Stojanović S, Aleksić MV, Stanisavljević MN and Najdanović JG. (2015) Osteogenic effect of inflammatory

macrophages loaded onto mineral bone substitute in subcutaneous implants. Arch Biol Sci 67: 173-186.

8. PRILOG-LISTA SKRAĆENICA

Actb – “housekeeping” gen za β -aktinski lanac

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

AKT-protein kinaza B

Alpl (*Alkaline phosphatase liver/bone/kidney*, engl.) – tkivno-nespecifična alkalna fosfataza koja se eksprimira u jetri, kostima i bubrezima

Ang-1 – angiopoetin-1

AV-snop – arterio-venski vaskularni snop

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

BMP-2 – koštani morfogenski protein 2

BMSC (*Bone marrow stem cells*, engl.) – mezenhimske matične ćelije kostne srži

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

CD29 – anti-Integrin β 1

CD44 – receptor hijaluronata i osteopontina

CD105 – endoglin

cDNK – jednolančana, komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina

Colla1 (*Collagen type I α 1 chain*, engl.) – alfa lanac kolagena I

Cx37 (*Gap junction connexin 37*, engl.) – pukotinasta veza preko koneksina 37

Cx40 (*Gap junction connexin 40*) – pukotinasta veza preko koneksina 40

Cx43 (*Gap junction connexin 43*, engl.) – pukotinasta veza preko koneksina 43

DAB – di amino benzidin

dH₂O – destilovana voda

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Minimal Essential Medium*, engl.) – standardni medijum za ćelijske kulture

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

dNTP – deoksiribonukleotid trifosfat

ECGF (*Epithelial cell growth factor*, engl.) – faktor rasta epitelnih ćelija

EĆ – endotelska ćelija

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

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

Egr-1 (*Early growth response protein 1*, engl.) – transkripcioni faktor vrlo ranog odgovora 1

ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase 1/2*, engl.) – kinaza aktivirana vanćelijskim signalom 1/2

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

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

HA (*Hydroxyapatite*, engl.) – hidroksiapatit

HAp-skafoldi – skafoldi na bazi hidroksiapatita

HE – Hematoksilin-eozin bojenje

HLA (*Human leukocyte antigen*, engl.) – humani leukocitni antigen

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

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

IL-1 (*Interleukin 1*, engl.) – interleukin 1

MHC (*Major Histocompatibility Complex*, engl.) – glavni kompleks histokompatibilnosti

MMK – mineralni matriks kosti

MM tip implanata – implanti sačinjeni od MMK

MPD tip implanata – implanti sačinjeni od MMK, PRP i neindukovanih, u standardnom medijumu *in vitro* ekspanziranih ADSC

MPE tip implanata – implanti sačinjeni od MMK, PRP i mezenhimskih matičnih ćelija masnog tkiva *in vitro* indukovanih u EĆ

MPEO tip implanata – implanti sačinjeni od MMK, PRP, ADSC *in vitro* indukovanih u EĆ i ADSC *in vitro* indukovanih u OĆ

MP tip implanata – implanti sačinjeni od MMK i PRP

MPO tip implanata – implanti sačinjeni od MMK, PRP, ADSC *in vitro* indukovanih u OĆ

MSC (*Mesenchymal stem cells*, engl.) – mezenhimska matična ćelija

mTOR (*Mammalian target of rapamycin*, engl.) – ciljani molekul rapamicina kod sisara

OĆ – osteogena ćelija

OPG – osteoprotegerin

Osx (*Osterix* engl.) – transkripcioni faktor uključen u osteogenu diferencijaciju

P03-1 dan – ćelije koje su do prvog dana nakon trećeg pasaža rasle u standardnom medijumu za ćelijske kulture DMEM-u

P03-12 dana – ćelije koje su do dvanaest dana nakon trećeg pasaža rasle u standardnom medijumu za ćelijske kulture DMEM-u

PAF4 (*Platelet-activating factor 4*, engl.) – faktor aktivacije trombocita 4

PBS (*Phosphate Buffer Saline*, engl.) – fiziološki rastvor puferovan fosfatnim puferom

PCR (*Polymerase chain reaction*, engl.) – lančana reakcija polimeraze

PDAF (*Platelet-derived angiogenesis factor*, engl.) – trombocitni faktor angiogeneze

PDEGF (*Platelet-derived endothelial growth factor*, engl.) – trombocitni endotelni faktor rasta

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

PF4 (*Platelet factor 4*, engl.) – trombocitni faktor 4

PI3K (*Phosphatidylinositide 3-kinases*, engl.) – fosfatidil-inozitol 3-kinaza, PI-3 kinaza

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

qRT-PCR (quantitative real-time PCR, engl.) – kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu

RNK – ribonukleinska kiselina

RT buffer – pufer za reverznu transkripciju

Sca-1 (*Stem cells antigen-1*, engl.) – antigen matičnih ćelija 1

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

Sp7 – gen za transkripcioni faktor Osteriks uključen u osteogenu diferencijaciju

Spp1 (*Secreted phosphoprotein 1*, engl.) – gen za osteopontin

TAE pufer – Tris, acetat, EDTA pufer

TBE (*Trypan blue dye exclusion*, engl.) – metoda bojenja tripan-plavim

TCP (*Tricalcium phosphate*, engl.) – tri-kalcijum fosfat

TGF- β (*Transforming growth factor beta*, engl.) – transformišući faktor rasta beta

TRAP (*Tartrate-resistant acid phosphatase*, engl.) – tartarat-rezistentna kiselina fosfataza

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

VCAM 1 (*Vascular cell adhesion molecule 1*, engl.) – vaskularni ćelijski adhezivni molekul 1

VEGF, VEGFA (*Vascular endothelial growth factor*, engl.) – vaskularni endotelni faktor rasta

VEGFR-2/*Kdr* (*Vascular endothelial growth factor receptor 2/Kinase insert domain protein receptor*, engl.) – receptor vaskularnog endotelnog faktora rasta 2

VEGFR-1/*Flt-1* (*Vascular endothelial growth factor receptor 1/ Fms-related tyrosine kinase*, engl.) – receptor vaskularnog endotelnog faktora rasta 1

VLA-4 (*Very late antigen 4*, engl.) – integrina $\alpha 4\beta 1$

vWF (*Von Willebrand factor*, engl.) – gen za fon Vilebrandov faktor

9. BIOGRAFIJA AUTORA

Jelena Najdanović je rođena 31.08.1982. godine u Nišu, Republika Srbija. Diplomirala je aprila 2008. godine na Odseku Biologija i ekologija Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu sa prosečnom ocenom 8,35 i ocenom na diplomskom ispitu 10. Školske 2008/09. godine, upisala je doktorske studije iz oblasti Biologija ćelija i tkiva na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Položila je sve planom i programom predviđene ispite sa prosečnom ocenom 9,67.

Izabrana je u zvanje istraživač-pripravnik na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu maja 2009. godine. Od novembra 2010. godine, radila je kao saradnik u nastavi, a od novembra 2012. godine radi u zvanju asistenta na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu. Kao asistent Medicinskog fakulteta učestvuje u izvođenju nastave na integrisanim akademskim studijama i osnovnim strukovnim studijama, ali i u vannastavnim aktivnostima studenata kao mentor studentskih radova.

Angažovana je kao istraživač na projektu Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije: „Virtuelni koštano-zglobni sistem čoveka i njegova primena u pretkliničkoj i kliničkoj praksi“ (Br. III41017; Rukovodilac prof. dr Miroslav Trajanović, Mašinski fakultet Univerziteta u Nišu; 2011-2016. godina), u okviru koga radi istraživanja na potprojektu "Modeli osteoreparacije", na Medicinskom fakultetu u Nišu (rukovodilac prof. dr Stevo Najman).

U saradnji sa drugim autorima objavila je 35 naučnih radova i saopštenja. Od ovog broja, šest radova je publikovano *in extenso* u časopisima sa SCI liste, jedan je kategorije M21, a pet M23, dva rada su publikovana *in extenso* u časopisima nacionalnog značaja kategorije M52, 24 su saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu i tri su saopštenja sa nacionalnih skupova štampana u izvodu.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Јелена Г. Најдановић**

Број индекса **Б302/2008**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај мезенхимских ћелија белог масног ткива миша, индукованих *in vitro* ка ендотелским и остеогеним ћелијама, на васкуларизованост ектопичних остеогених импланата

- 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, 01.08.2016

Јелена Најдановић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Јелена Г. Најдановић**

Број индекса **Б302/2008**

Студијски програм **Биологија ћелија и ткива**

Наслов рада **Утицај мезенхимских ћелија белог масног ткива миша, индукованих *in vitro* ка ендотелским и остеогеним ћелијама, на васкуларизованост ектопичних остеогених импланата**

Ментори **др Стево Најман**, редовни професор, Универзитет у Нишу-Медицински факултет

др Маја Чакић Милошевић, доцент, Универзитет у Београду-Биолошки факултет

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, 01.08.2016.

Јелена Најдановић

Изјава о коришћењу

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

Утицај мезенхимских ћелија белог масног ткива миша, индукованих *in vitro* ка ендотелским и остеогеним ћелијама, на васкуларизованост ектопичних остеогених импланата

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, 01.08.2016.

Јелена Најдановић

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.