Određivanje koštanog regeneracijskog potencijala embrionalnih matičnih stanica i mezenhimnih matičnih stanica koštane srži u miševa

Repić, Dario

Doctoral thesis / Disertacija

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:127:439575

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

University of Zagreb School of Dental Medicine Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Dario Repić

ODREĐIVANJE KOŠTANOG REGENERACIJSKOG POTENCIJALA EMBRIONALNIH MATIČNIH STANICA I MEZENHIMNIH MATIČNIH STANICA KOŠTANE SRŽI U MIŠEVA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014.



UNIVERSITY OF ZAGREB
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Dario Repić

DETERMINATION OF BONE REGENERATION POTENTIAL OF MURINE EMBRYONIC STEM CELLS AND BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Dario Repić

ODREĐIVANJE KOŠTANOG REGENERACIJSKOG POTENCIJALA EMBRIONALNIH MATIČNIH STANICA I MEZENHIMNIH MATIČNIH STANICA KOŠTANE SRŽI U MIŠEVA

DOKTORSKI RAD

Mentori: prof.dr.sc. Silvana Jukić Krmek
prof.dr.sc. Ivo Kalajzić

Zagreb, 2014.

Zahvaljujem mentorima prof.dr.sc. Slivani Jukić Krmek i prof.dr.sc. Ivi Kalajziću na svesrdnoj pomoći pri izradi ovog rada.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji, roditeljima i supruzi Slavici.

Dario Repić, dr.med.dent.

SAŽETAK

U ovom istraživanju analiziran je koštani regeneracijski potencijal mezenhimnih matičnih stanica (MMS) koštane srži i embrionalnih matičnih stanica (EMS). U tu je svrhu upotrijebljen transgenični mišji model αSMARFP/Col2.3GFP. MMS su identificirane kroz izražaj crvene fluorescentne bjelančevine - RFP (od engl. *red fluorescent protein*) koja je pod kontrolom promotora za α-aktin glatkih mišića (αSMA). Kako bi se pratila diferencijacija MMS-a i EMS-a u zrele osteoblaste, upotrijebljena je zelena fluorescentna bjelačevina - GFP (od eng. *green fluorescent protein*), čiji je izražaj pod kontrolom 2,3 kb fragmenta štakorskog promotora za kolagen tip I (Col 2.3). Za obje vrste stanica napravljena je analiza osteogenog potencijala *in vitro* i analiza *in vivo* za EMS.

Nakon poticanja koštane diferencijacije u uvjetima *in vitro*, MMS koštane srži koje izražavaju biljeg αSMARFP diferenciraju se u Col2.3GFP+ stanice, tj. u zrele osteoblaste, pokazuju sposobnost mineralizacije i u znatnoj mjeri izražavaju tipične biljege zrelih osteoblasta (osteokalcin i koštanu sijalobjelančevinu).

EMS pokazuju slabu aktivnost biljega Col2.3GFP nakon poticanja koštane diferencijacije u uvjetima *in vitro*. Također pokazuju slab porast koštanih diferencijacijskih biljega, koji bi potvrdili diferencijaciju EMS-a u zrele osteoblaste. Primijećena je znatna aktivnost alkalne fosfataze i prisutnost mineraliziranog matriksa. Rezultati pokazuju da je uspješnost koštane diferencijacije EMS-a *in vitro* znatno manja u odnosu na koštanu diferencijaciju MMS-a koštane srži, koristeći se standardnim protokolima za koštanu diferencijaciju matičnih stanica.

S druge strane, u uvjetima *in vivo* koristeći se modelom stvaranja teratoma, EMS pokazuju sposobnost diferencijacije u zrele osteoblaste koji izražavaju biljeg Col2.3GFP. Genski konstrukt Col2.3GFP može se upotrebljavati kako bi se potvrdila diferencijacija EMS-a u zrele osteoblaste.

SUMMARY

Determination of bone regeneration potential of murine embryonic stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells

Introduction

Bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) have been used in regenerative bone biology for more than a decade, as they can be easily recovered from patients. More recently some of the focus in this field has shifted towards the use of embryonic stem cells (ESCs). Previous studies reported that ESCs can be induced to differentiate into cells showing a mature osteoblastic phenotype by culturing them under osteoinductive conditions. This study proposes determination of the bone regeneration potential of murine bone marrow MSCs and ESCs.

Materials and methods

For this purpose, a murine model (dual transgenic mice αSMARFP/Col2.3GFP) has been utilized. After isolation of cells from the bone marrow of long bones, MSCs have been identified through the expression of alpha-smooth muscle actin (αSMA) promoter directed RFP. To track the transition of MSCs into mature osteoblasts, a bone-specific fragment of rat type I collagen promoter driving green fluorescent protein (Col2.3GFP) has been utilized. In addition, ESC lines have been derived from the same αSMARFP/Col2.3GFP transgenic mice, allowing identification of cells at the mesenchymal stage (αSMARFP) and at mature osteoblast stage (Col2.3GFP). *In vitro* analysis of osteogenic potential has been made for both types of cells and *in vivo* analysis (teratoma assay) of osteogenic potential for ESCs.

Results

Cultures of bone marrow MSCs were established, and after one week a population of αSMARFP expressing cells was noticed. Following cell sorting, replated αSMARFP+ cells (20-30%) were induced to osteogenesis, and strong expression of osteoblast specific transgene Col2.3GFP was noticed, confirming osteogenic ability of αSMARFP+ cells. Osteogenic differentiation was confirmed by detection of mineralization with von Kossa method and by up-regulation of markers of mature osteoblast lineage cells; osteocalcin and bone sialoprotein. Following osteogenic induction in ESCs, expression of alkaline phosphatase and subsequent mineralization (detected by von Kossa staining) was observed. After one week

of osteogenic induction, ESCs began to express αSMARFP. This expression was localized to the peripheral area encircling a typical ESC colony. Nevertheless, these αSMARFP+ cells did not show activation of the Col2.3GFP, even after 6 weeks of osteogenic differentiation *in vitro*. Also, small increases in expression in some of the bone markers analyzed (Colagen type I, bone sialoprotein) were noticed, but most of them appeared minimal compared to the levels expressed by the MSCs, even after six weeks of osteogenic induction.

In contrast, *in vivo* teratoma assay by ECSs showed bone formation and strong Col2.3GFP signal in the areas that stain positive for mineralization by von Kossa.

Conclusion

These results show that MSCs compare to ESCs, have much more capability to differentiate into mature osteoblast, express specific bone markers and Col2.3GFP transgene after osteogenic induction *in vitro*. On the other hand, in the functional *in vivo* assay ESCs show capability to form bone and activate Col2.3GFP marker.

The results obtained indicate that detection of alkaline phosphatase activity and mineralization of ESCs cultured under osteogenic conditions is not sufficient to demonstrate osteogenic maturation.

This study indicates the utility of the promoter-visual transgene approach to assess the commitment and differentiation of stem cells into the osteoblast lineage. To current knowledge, this study is the first to utilize the expression of Col2.3GFP transgene in the ESCs derived from transgenic mice.

Ključne riječi:

Embrionalne matične stanice, mezenhimne matične stanice, osteoblast, zelena fluorescentna bjelančevina, diferencijacija, teratom.

POPIS OZNAKA I KRATICA

AP	alkalna fosfataza - prema engl. *alkaline phosphatase*
ATF 4	aktivirajući transkripcijski čimbenik 4 - prema engl. *activating transcription factor 4*
BGP	β-glicerolfosfat - prema engl. *β-glycerophosphate*
BMP	koštana morfogenetska bjelančevina - prema engl. *bone morphogenetic protein*
BMSC	stromalne stanice koštane srži - prema engl. *bone marrow stromal cells*
BSP	koštana sijalobjelančevina - prema engl. *bone sialoprotein*
CAT	kloramfenikolska transferaza acetilne skupine - prema engl. *chloramphenicol acetyltransferase*
cDNA	komplementarna DNA - prema engl. *complementary DNA*
CFU-F	kolonije stanica fibroblastnih značajki - prema engl. *colony forming unit-fibroblast*
Col 1	kolagen tip 1 - prema engl. *Colagen type 1*
Col 2.3	2.3 kb - fragment promotora za kolagen tip 1
Col 3,6	3,6 kb - fragment promotora za kolagen tip 1
DMP	bjelančevina dentinskog matriksa - prema engl. *dentin matrix protein*
DNA	deoksiribonukleinska kiselina - prema engl. *deoksiribonucleic acid*
EB	embrioidna tijela - prema engl. *embryoid bodies*
EDTA	etilen diamin tetraoctena kiselina - prema engl. *ethylene diamine tetraacetic acid*
EMS	embrionalne matične stanice
FACS	sortiranje stanica fluorescentnom aktivacijom - prema engl. *fluorescence activated cell sorting*
FBS	fetusni goveđi serum - prema engl. *fetal bovine serum*
FGF	čimbenik rasta fibroblasta - prema engl. fibroblast growth factor
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza - prema engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
GFP	zelena fluorescentna bjelančevina - prema engl. *green fluorescent protein*

IGF	inzulinu sličan čimbenik rasta - prema engl. *insulin-like growth factors*
LIF	inhibicijski čimbenik leukemije - prema engl. *leukemia inhibitory factor*
M-CSF	makrofagni čimbenik rasta kolonija - prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*
MEF	mišji embrionalni fibroblast - prema engl. *mouse embryonic fybroblast*
MEPE	fosfoglikoproteini izvanstanične tvari - prema engl. *matrix extracellular phosphoglycoprotein*
MMP	matriksna metalproteinaza - prema engl. *matrix metalloproteinase*
MMS	mezenhimne matične stanice
NF-kB	jezgrin čimbenik kB - prema engl. *nuclear factor kB*
OC	osteokalcin - prema engl. *osteocalcin*
OP	osteopontin - prema engl. *osteopontine*
OPG	osteoprotegerin - prema engl. *osteoprotegerin*
Osx	osteriks - prema engl. *osterix*
PBS	fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom - prema engl. *phosphate buffered saline*
PCR	lančana reakcija polimerazinog tipa - prema eng. *polymerase chain reaction*
PHEX	regulirajući gen za fosfate homologan endopeptazama na kromosomu X - prema engl. *phospate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome*
RANK	aktivator receptora NF-kB - prema engl. *activator of nuclear factor kappa B*
RANKL	ligand aktivator receptora NF-kB - prema engl. *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*
RFP	crvena fluorescentna bjelančevina - prema engl. *red fluorescent protein*
RNA	ribonukleinska kiselina
RT-PCR	obrnuto prepisivanje i umnažanje lančanom reakcijom polimerazinog tipa - prema engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*
Runx2	transkripcijski čimbenik sličan runtu 2 - prema engl. *runt related transcription factor 2*
SSEA-1	stadij specifičan embrionalni antigen - prema engl. *stage specific embryonic antigen*
TGF- β	transformacijski čimbenik rasta β - prema engl. *transforming growth factor*

TNF	čimbenik tumorske nekroze - prema engl. *tumor necrosis factor*
TRAP	kisela fosfataza otporna na tartarat - prema engl. *tartarate- resistent acid phosphatase*
αSMA	α-aktin glatkih mišića - prema engl. *α-smooth muscle actin*

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1 Koštano tkivo 2

1.1.1 Koštana međustanična tvar 3

1.1.2 Minerali koštanog tkiva 3

1.1.3 Stanice koštanog tkiva 4

1.1.3.1 Stanice koštanih progenitora 4

1.1.3.2 Osteoblasti 4

1.1.3.3 Biljezi stanica osteoblastne loze 5

1.1.3.4 Utjecaj signalnih molekula na osteoblastnu diferencijaciju 6

1.1.3.5 Osteociti 8

1.1.3.6 Obložne stanice 8

1.1.3.7 Osteoklasti 8

1.2 Matične stanice 10

1.2.1 Matične stanice odraslih 11

1.2.1.1 Mezenhimne matične stanice koštane srži 13

1.2.1.2 Koštana diferencijacija MMS-a koštane srži 15

1.2.2 Embrionalne matične stanice 16

1.2.2.1 Diferencijacija EMS-a 19

1.2.2.2 Koštana diferencijacija EMS-a 19

1.2.3 Metode dokazivanja koštane diferencijacije matičnih stanica 23

1.3 Transgenski miševi 24

2. Svrha i cilj rada 26

3. MATERIJALI I POSTUPCI 29

3.1. Pokusne životinje - Transgenski miš 30

3.2. Stvaranje i kultivacija linije EMS-a 30

3.3. Priprema kultura i koštana diferencijacija jednoslojne stanične kulture EMS-a 31

3.5. Priprema kultura i koštane diferencijacije mišjih MMS-a koštane srži 31

3.6. Mjerenje aktivnosti alkalne fosfataze i stupnja mineralizacije 32

3.7. Izolacija RNA i analiza izražaja gena 33

3.8. Detekcija GFP-a u staničnim kulturama (*in vitro*) 33

3.9. Određivanje koštane diferencijacije EMS-a *in vivo* – stvaranje teratoma 34

3.10. Histološka analiza izražaja transgena 34

4. REZULTATI 35

4.1. Određivanje koštane diferencijacije MMS-a koštane srži – *in vitro* 36

4.2. Stvaranje embrionalnih matičnih stanica iz dvostruko transgenskog miša 41

4.3. Određivanja koštane diferencijacije EMS-a *in vitro* – histokemijska analiza 42

4.4. Određivanje koštane diferencijacije EMS-a *in vitro* - analiza izražaja osteoblastnih biljega ..45

4.5. Određivanje koštane diferencijacije EMS-a pomoću izvjestiteljskih transgena 47

4.6. Određivanje koštane diferencijacije EMS-a *in vivo* – stvaranje teratoma 51

5. RASPRAVA 54

6. ZAKLJUČAK 65

7. LITERATURA 68

8. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA 87

1. UVOD

Koštani defekti nakon traume ili kirurškog odstranjivanja cista i tumora u usnoj šupljini, nedovoljna količina kosti u implantacijskoj zoni, gubitak kosti uzrokovan parodontnom bolesti, samo su neka klinička stanja na koja se često nailazi u suvremenoj dentalnoj medicini. Nadoknada uništenog i izgubljenog koštanog tkiva predstavlja pravi izazov u kliničkoj rekonstrukcijskoj kirurgiji. Autologni, alogeni, ksenogeni koštani nadomjestci i različiti aloplastični sintetički materijali najčešće se upotrebljavaju za nadoknadu izgubljene kosti. Korištenje autologne kosti standard je u zahvatima regeneracije koštanog tkiva, ali ima određene nedostatke kao što su bol povezana s otvaranjem dodatnog radnog polja i ograničena količina dobivene kosti. Alogeni graftovi su pak povezani s rizikom od imunološke reakcije odbacivanja i mogućnosti prijenosa infekcije. Navedena stanja predstavljaju izazov za kliničare i znanstvenike, čiji su napori danas uvelike usmjereni pronalaženju novih metoda.

1.1 Koštano tkivo

Koštani sustav svih kralježnjaka građen je od dvaju osnovnih tkiva, hrskavice i koštanog tkiva. Koštano tkivo sastoji se od mineralizirane međustanične tvari i koštanih stanica. Kolagen tip 1 čini 95 % bjelančevina međustanične tvari, ostalih 5 % čine proteoglikani i brojne nekolagene bjelančevine. U ranoj fazi embrionalnog razvoja koštani sustav razvija se od tri različite osnove: paraksijalnog mezoderma, parijetalne mezodermalne ploče i neuralnog grebena. Proces nastanka koštanog tkiva odvija se u četiri faze: migracija mezenhimnih stanica do mjesta nastanka buduće kosti, interakcija tih stanica s epitelom, zgušnjavanje mezenhimnih stanica te diferencijacija tih stanica u osteoblaste ili hondroblaste. Zatim slijede dva različita procesa: intramembransko ili enhondralno okoštavanje. U procesu intramembranskog okoštavanja zgusnute mezenhimske stanice izravno se diferenciraju u progenitore osteoblastične loze i na koncu u osteoblaste. U enhondralnom se okoštavanju iz zgusnutog mezenhima formira hrskavična osnova koja se postupno zamjenjuje s kosti (1, 2).
Morfološki postoje dvije vrste kosti: kortikalna (kompaktna) i spongiozna (spužvasta) kost. Kortikalna kost građena je od gusto formiranih kolagenih vlakana dok spongiozna kost sadrži porozni matriks. Građa svake kosti u skladu je s njezinom funkcijom. Kortikalna kost ima prije svega mehaničku i zaštitnu funkciju dok je uloga spongiozne kosti prije svega metabolička (3). Preciznije, spongiozna kost čini glavnu rezervu iona kalcija i fosfata te ima važnu ulogu u održavanju ravnoteže njihove koncentracije u serumu (4). Hrskavica,

kortikalna te spongiozna kost imaju specifične stanice: hondrocite u hrskavici i osteoblaste, osteocite, osteoklaste i obložne stanice u kosti. Svaka pojedina stanica ima vlastiti razvojni put i fiziološku funkciju (5). Osteoblasti, osteoklasti i obložne stanice nalaze se na površini kosti, dok su osteociti uklopljeni u mineraliziranu međustaničnu tvar. Osteoblasti, osteociti i obložne stanice mezenhimnog su podrijetla, dok osteoklasti potječu od hematopoetskih stanica.

1.1.1 Koštana međustanična tvar

Glavne sastavnice koštane međustanične tvari su kolagen, nekolagenske bjelančevine i minerali. Više od 90 % organske tvari u kostima čini izvanstanična bjelančevina kolagen tip 1 koju izlučuju osteoblasti (6, 7). Bjelančevina kolagen tip 1 sastavljena je od tri polipeptidna lanca omotana na način da čine trostruku uzvojnicu. Kolagen tip 1 izlučuje se iz stanica kao propeptid te pod utjecajem proteaza dolazi do odvajanja C- i N- propeptida. Pritom se pojedinačne zrele kolagenske molekule međusobno udružuju i stvaraju kolagenska vlakna (7). Osim kolagena tip 1, u izgradnji koštanog matriksa sudjeluju i ostale nekolagenske bjelančevine kao što su: proteoglikani (biglikan, dekorin, fibromodulin, hijaluronan, osteoglicin), glikoproteini (alkalna fosfataza - AP - prema engl. *alkaline phosphatase*, osteonektin, tetranektin), SIBLING-bjelančevine (osteopontin, DMP - bjelančevina dentinskog matriksa – prema engl. *dentin matrix protein*, BSP - koštana sijalobjelančevina - prema engl. *bone sialoprotein*) te γ-karboksilirane bjelančevine (OC - osteokalcin - prema engl. *osteocalcin*). Glavna funkcija navedenih bjelančevina je regulacija umrežavanja kolagenih vlakana i kristala hidroksiapatita te povezivanje koštanih stanica s međustaničnom tvari (8).

1.1.2 Minerali koštanog tkiva

Glavni mineral koštanog tkiva jest kalcij – hidroksiapatit koji čini 90 % od svih minerala. Hidroksiapatit je odgovoran za čvrstoću kosti i sposobnost nošenja opterećenja. Proces mineralizacije započinje nakupljanjem minerala hidroksiapatita i anorganskih fosfatnih iona u mjehurićima osteoblasta (9). Kako s vremenom kristali rastu, dolazi do pucanja mjehurića i doticaja kristala s izvanstaničnim okolišem, što omogućava njihov daljni rast. Oni se na

početku odlažu na izloženim mjestima kolagenih niti, nakon čega rastu kako kost sazrijeva. Nekolagenske bjelančevine koje su vezane za kolagene niti također utječu na rast kristala minerala te reguliraju veličinu i oblik kristala (10). Minerali kroz razvoj zadobivaju različita kationska onečišćenja što djeluje na konačni sastav minerala, te uzrokuje razvoj manjih i nepravilnih kristala. Kalcij često bude zamijenjen magnezijem, stroncijem ili kadmijem. Oni čine kristale topljivijim i podložnijim koštanoj predgradnji. S druge strane, ugradnjom fluorida nastaju veći kristali koji su manje topljivi i otporniji na proces razgradnje (11).

1.1.3 Stanice koštanog tkiva

1.1.3.1 Stanice koštanih progenitora

Stanice koštanih progenitora prethodničke su stanice osteoblasta. Nastaju diferencijacijom iz multipotentnih mezenhimnih matičnih stanica (MMS) koštane srži. Ključni čimbenik koji potiče diferencijaciju MMS-a prema koštanim progenitorima je transkripcijski čimbenik sličan runtu (Runx2, prema engl. *runt related transcription factor 2*). Pod utjecajem čimbenika Sox9, MMS se diferenciraju u hondroblaste, dok je PPARγ2 važan za diferencijaciju u adipoblaste (12). Koštane progenitorne stanice nastaju u koštanoj srži te ostaju u stanju mirovanja u perivaskularnim nišama koštane srži te na periostalnoj i endostalnoj površini kosti (13). Morfološki se prepoznaju kao lagano spljoštene stanice izdužene ili ovalne jezgre, s hrapavom endoplazmatskom mrežicom, nešto slobodnih ribosoma i malim Golgijevim tijelom. Morfološki izgled u skladu je s njihovom sudbinom, jer se nakon molekularnog podražaja ove stanice diferenciraju u sekretorno jako aktivne zrele osteoblaste (14).

1.1.3.2 Osteoblasti

Osteoblasti su zrele stanice koštanog tkiva odgovorne za stvaranje koštane međustanične tvari i za regulaciju aktivnosti osteoklasta (15, 16). Također imaju važnu ulogu u regulaciji hematopoeze (17). Osteoblasti se razvijaju iz MMS-a koštane srži pod nadzorom transkripcijskih čimbenika Runx2, osteriksa (Osx, od engl. *osterix)* i aktivirajućeg

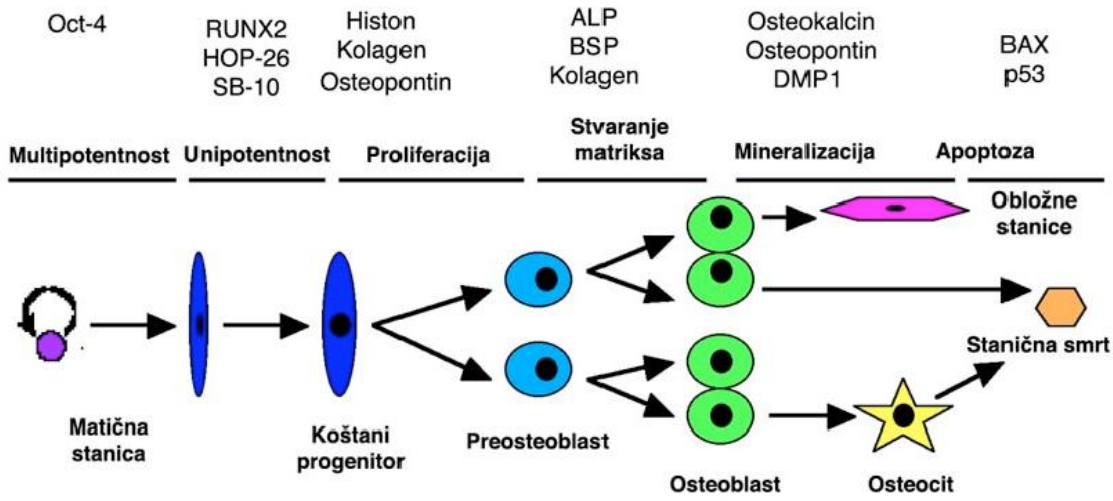
transkripcijskog čimbenika 4 (ATF 4, od engl. *activating transcription factor* 4) (18). Morfološki osteoblasti imaju veliku jezgru, povećan Golgijev aparat te dobro razvijen endoplazmatski retikul.

1.1.3.3 Biljezi stanica osteoblastne loze

Osteoblasti prilikom sazrijevanja prolaze tri stadija: 1) stadij umnažanja stromalnih stanica koštane srži - proliferacija, 2) stadij koji je popraćen početkom stvaranja bjelančevina međustanične tvari – sazrijevanje te 3) stadij ovapnjenja prilikom kojega dolazi do odlaganja mineralnih soli u međustaničnu tvar – mineralizacija (19). Tijekom procesa osteoblastične diferencijacije, koštane progenitorne stanice proliferiraju i prolaze procese sazrijevanja prije nego što postignu stadij zrelog osteoblasta. Stanice na svakom od tih koraka pokazuju izražaj različitih biljega te se, osim morfološki, mogu i na taj način prepoznati i dokazivati (Slika 1.). Stadij matične stanice još je uvijek nejasno definiran, no izražaj gena Oct-4 i Nanog je znakovit za matične stanice. Poticanje diferencijacije u koštane progenitore odvija se pod utjecajem transkripcijskih čimbenika od kojih su dosad najviše istraženi Runx2 i Osx. Dostupni biljezi na površini stanice u tom stadiju su SB-10, HOP-26 i Stro-1, a pomoću njih se mogu izolirati progenitorne stanice. Izražaj gena za alkalnu fosfatazu, kolagen tip 1 i osteopontin (OP, od engl. *osteopontine*) pojavljuje se u stadiju preosteoblasta, koji imaju tipičnu fibroblastičnu morfologiju. Kolagen tip 1 glavni je proizvod osteoblasta i najzastupljenija bjelančevina koštane međustanične tvari, a izlučuje se u ranom stadiju sazrijevanja. OP je manje specifičan biljeg osteoblasta koji je izražen prilikom umnažanja stromalnih stanica. Rani osteoblasti su stanice kubične morfologije te izražavaju BSP. Tijekom sazrijevanja osteoblasta i početkom mineralizacije dolazi do smanjenja izlučivanja AP-a za razliku od OP-a koji se smanjuje u stadiju sazrijevanja te se ponovno povećava u stadiju mineralizacije. Osteokalcin je klasični biljeg zrelih osteoblasta koji stvaraju koštani matriks. Izražaj osteokalcina se javlja u najkasnijem stadiju mineralizacije te je jedini specifičan osteoblastni biljeg. Specifičan biljeg za osteocite je DMP-1 (19, 20).

Životni vijek osteoblasta je od 10 do 14 dana nakon čega mogu doživjeti različitu sudbinu: 1) ugraditi se u koštanu izvanstaničnu tvar te postati osteociti, 2) ostati na površini kosti kao obložne stanice, 3) transdiferencirati se u hondrocitnu staničnu liniju i 4) umrijeti apoptozom (21) (Slika 1.). U 50 - 70 % stanica dolazi do procesa apoptoze dok manji broj osteoblasta postaju osteociti (22). Proces transformiranja osteoblasta u osteocite popraćen je smanjenim

lučenjem AP-a te povećanim izražajem OC-a i specifičnih biljega kao što su: regulirajući gen za fosfate homologan endopeptazama na kromosomu X (PHEX, engl. *phospate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome*), fosfoglikoprotein izvanstanične tvari (MEPE, engl. *matrix extracelluar phosphoglyoprotein*, DMP-1, FGF-23, sklerostin te ORP150 (23).



Slika 1. Koraci diferencijacije osteoblastične loze uz prikaz staničnih biljega kao pokazatelja određenog stupnja zrelosti. Izražaj gena Oct-4 je znakovit za stadij matične stanice. Poticanje diferencijacije u koštane progenitore odvija se pod utjecajem transkripcijskih čimbenika od kojih je dosad najviše istražen Runx2. Kolagen i OP su biljezi koji se pojavljuju u stadiju preosteoblasta, a njihov izražaj raste s diferencijacijom. BSP i OC su klasični biljezi zrelih osteoblasta koji stvaraju koštani matriks. Specifičan biljeg za osteocite je DMP1. Preuzeto i prilagođeno od Kalajzića I. (24).

1.1.3.4 Utjecaj signalnih molekula na osteoblastnu diferencijaciju

Osteogeneza je strogo kontroliran proces reguliran uzajamnim djelovanjem mnoštva signalnih molekula kao što su: transkripcijski čimbenici, čimbenici rasta, hormon rasta i dr.

Runx2 (također poznat kao *Cbfa1- core binding factor alpha 1* ili *Osf-2- osteoblast specific factor-2*) je najvažniji transkripcijski čimbenik koji sudjeluje u kontroli procesa osteogeneze.

To je rani biljeg osteogeneze neophodan u kondenzaciji mezenhimskih stanica, njihovoj diferencijaciji u osteoblaste, hipertrofiji hondrocita te u invaziji krvnih žila u razvijajuće koštano tkivo. Runx2 se veže za TGPyGGTPy sekvencu deoksiribonukleinske kiseline (DNA, od engl. *deoksiribonucleic acid*) (25) te na taj način utječe na izražaj gena koji su karakteristični za osteoblaste, uključujući OC, kolagen tip 1, BSP i OP (26, 27). Otto i sur. (28) u svom su istraživanju upotrijebili miševe s isključenom funkcijom gena Runx2 ("knock-out" miš). Njihovi homozigotni mutantni miševi umrli su nakon rođenja zbog zatajenja dišnog sustava. Patohistološka analiza u kojoj su upotrebljavali bojenja *Alizarin red* i *Alcian blue* (*Alizarin red* boji kalcificirana tkiva – kost; *Alcian blue* boji hrskavicu), pokazala je gotovo potpuni nedostatak mineralizirane kosti i normalnu hrskavicu. Kod heterozigotnih miševa nađena je hipoplazija ključnih kostiju i zakašnjeli razvoj intramembranoznih kostiju. Rezultati ovog i drugih istraživanja (27-29) potvrdili su da je Runx2 ključni transkripcijski čimbenik nužan za diferencijaciju stanica osteoblastne stanične loze i u enhondralnom i u intramembranoznom mehanizmu nastanka koštanog tkiva. Postoje dvije izoforme gena Runx2: Runx2 tip 1 je odgovoran za ranu osteogenezu i intramembranozno stvaranje kosti, a Runx2 tip 2 za potpuno sazrijevanje osteoblasta i enhondralno stvaranje kosti (25).

Drugi bitan transkripcijski čimbenik specifičan za osteoblaste je Osx. On usmjerava diferencijaciju osteohondroprogenitora prema osteoblastima. Miševi s izbačenom funkcijom gena Osx također umiru neposredno nakon rođenja zbog dišnih smetnji te pokazuju normalno razvijenu hrskavicu, ali potpuni nedostatak kosti bez obzira radi li se o enhondralnoj ili intramembranoznoj kosti (30). Ti miševi pokazuju normalan izražaj Runx2, dok Runx2 "knock-out " miševi ne izražavaju Osx, što ukazuje da je Osx aktivan u kasnijoj fazi osteogeneze te je pod kontrolom Runx2 čimbenika (30, 31). Treći čimbenik koji kontrolira transkripciju u zrelim osteoblastima je ATF 4. Osobito je važan u kontroli sinteze kolagena tipa 1 (32).

Nekoliko čimbenika rasta igra važnu ulogu u razvoju koštanog tkiva. To su koštane morfogenetske bjelančevine (BMP, od engl. *bone morphogenetic protein*) (33), transformacijski čimbenik rasta β (TGF-β, engl. *transforming growth factor*) (34), čimbenik rasta fibroblasta (FGF, engl. *fibroblast growth factor*) (35, 36), inzulinu sličan čimbenik rasta (IGF, engl. *insulin-like growth factors*) (37), članovi grupe Wnt (38, 39) i hedgehog signalnog puta(31).

1.1.3.5 Osteociti

Osteociti su potpuno diferencirane koštane stanice uklopljene u koštani matriks. Predstavljaju najveću populaciju stanica u kosti te igraju važnu ulogu u koštanom metabolizmu. Nastaju iz zrelih i aktivnih osteoblasta koji, izlučujući koštanu međustaničnu tvar, ostaju zarobljeni u njoj, poprimaju dendritički fenotip i smanjuju svoju sintetsku aktivnost (40). Smješteni su širom kosti u malim šupljinama zvanim lakune. Morfološki, to su zvjezdaste stanice s mnoštvom nastavaka - dendrita koji su položeni u malim kanalima - kanalikulima. Osteociti su povezani dendritičkim nastavcima međusobno, kao i s osteoblastima i obložnim stanicama na endostalnoj i periostalnoj površini kosti. Na taj način stanice međusobno komuniciraju prenoseći signale i hranjive sastojke (41-45). Zahvaljujući zvjezdastoj morfologiji i pukotinastim spojevima kojima su nastavci povezani i kojima se prenose signali, osteociti imaju sposobnost transformacije stimulansa uzrokovanog mehaničkim opterećenjem u biokemijske signale. To u konačnici otvara mogućnost kontrole procesa stvaranja i razgradnje kosti omogućavajući time pravilan odgovor tijela na mehaničko opterećenje (42). Zbog svega navedenog, osteocite nazivaju i „živčane“ stanice koštanog tkiva (40).

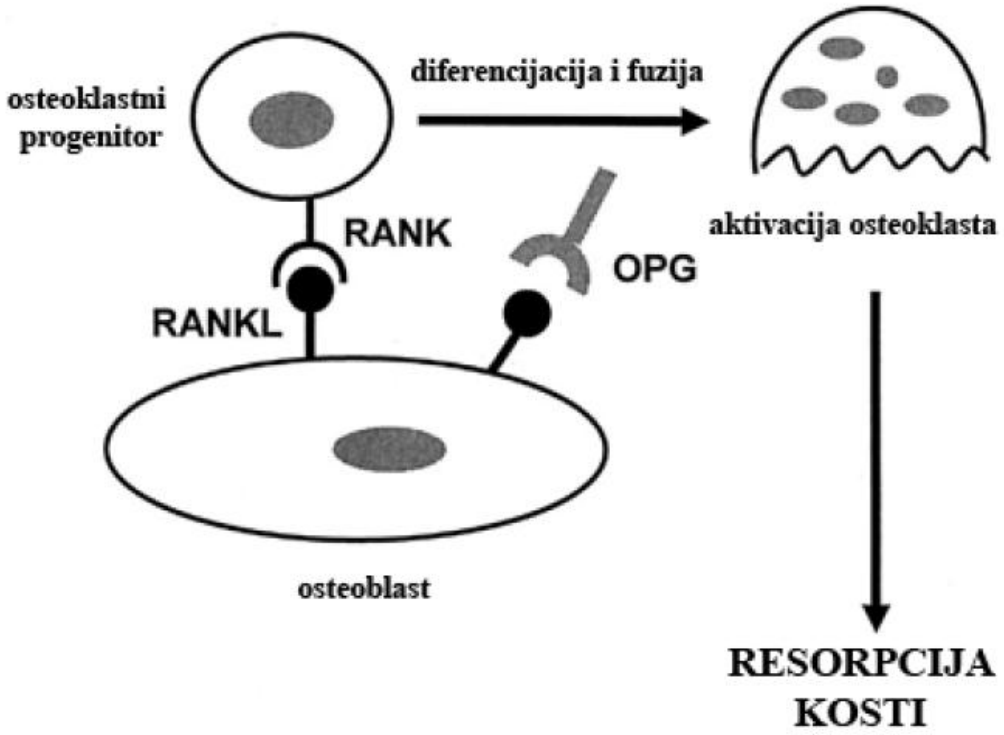
1.1.3.6 Obložne stanice

Obložne stanice su neaktivne, plosnate, izdužene stanice koje se mogu naći i na endostalnoj i na periostalnoj površini kosti. Stvarna funkcija ovih stanica nije u potpunosti razjašnjena, međutim poznato je da ne sudjeluju izravno u stvaranju i razgradnji kosti. Pretpostavlja se da nastaju iz osteoblasta, ali se mogu i rediferencirati u osteoblaste (21, 46, 47). Smatra se da obložne stanice izlučuju kolagenazu koja uklanja nemineralizirani matriks na površini kosti i time sprečavaju prianjanje osteoklasta. Također se pretpostavlja da obložne stanice, primajući signale od osteocita, iste prenose i aktiviraju osteoklaste na ciljanim lokacijama kosti (46).

1.1.3.7 Osteoklasti

Osteoklasti su multinuklearne stanice odgovorne za resorpciju koštanog tkiva. Igraju važnu ulogu u normalnom razvoju kosti. Hematopoetskog su podrijetla odnosno nastaju iz hematopoetskih matičnih stanica koštane srži (3, 48) iz kojih se formiraju mononuklearni

mijelo-monocitni progenitori, fuzijom kojih nastaju zreli osteoklasti. Morfološki, osteoklasti su vrlo velike stanice, (promjera oko 50-100μm) sa 6 do 100 jezgara, velikim brojem mitohondrija, lizosoma i slobodnih ribosoma. Nalaze se unutar udubljenja na površinama kosti koje se nazivaju Howshipovim lakunama, a rezultat su njihove resorptivne aktivnosti (49, 50). Prilikom koštane razgradnje, osteoklast se prilijepi na dio koštanog matriksa putem specifičnih adhezijskih struktura nazvanih podosomi. Podosomi se specifično vežu za kolagen tip 1 i OP putem brojnih integrina (51). U trenutku pričvršćivanja dolazi do polarizacije membrane osteoklasta koja u području kontakta s koštanim tkivom postaje nabrana. Aktivirani osteoklasti izlučuju vodikove ione kroz H^+ pumpu, matriksne metalproteinaze (MMP, prema engl. *matrix metalloproteinase*), kiselu fosfatazu otpornu na tartarat (TRAP, prema engl. *tartarate- resistent acid phosphatase*) i hidrolitičke enzime kao što je katepsin K. Time se pH prostora između nabrane membrane i površine kosti smanjuje na oko 4,5 i sve skupa vodi ka razgradnji mineralne i organske komponente koštanog tkiva. Razgrađeni se matriks endocitozom zatvara unutar mjehurića koji migriraju prema apikalnoj membrani i ispuštaju sadržaj u izvanstanični prostor (52, 53). Zreli osteoklasti izražavaju TRAP (54), receptor za kalcitonin C1a (55, 56), vitronektinski receptor α, MMP 9 te molekulu c-SRC (signalna molekula važna za polarizaciju osteoklasta) (57-59). Glavni čimbenici koji kontroliraju proces osteoklastogeneze su makrofagni čimbenik rasta kolonija (M-CSF, engl. *macrophage colony-stimulating factor*) i ligand aktivator receptora NF-kB (RANKL, engl. *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*). RANKL je najbitniji fiziološki čimbenik diferencijacije osteoklasta. To je transmembranski glikoprotein iz obitelji čimbenika tumorske nekroze (TNF, engl. *tumor necrosis factor*) (15, 60) koji je izražen u osteoblastima, mezenhimnim matičnim stanicama i aktiviranim limfocitima (15). RANKL se veže na svoj receptor na površini osteoklasta, receptor aktivator jezgrinog čimbenika kB (RANK, engl. *receptor activator of nuclear factor kB*) te aktivira jezgrin čimbenik kB (NF-kB, engl. *nuclear factor kB*) što u konačnici dovodi do fuzije preosteoklasta i njihove diferencijacije u zrele osteoklaste (61, 62). Biološku aktivnost čimbenika RANKL može neutralizirati vezanje za molekulu osteoprotegerina (OPG, engl. *osteoprotegerin*), člana obitelji TNF kojeg izlučuju osteoblasti i stromalne stanice (Slika 2.). Vezanjem OPG-a za RANKL inhibira se proces osteoklastogeneze (63-65). Cijeli životni ciklus osteoklasta (stupanj diferencijacije, aktivacije i apoptoze) određen je omjerom čimbenika RANKL i OPG (66). Životni je vijek osteoklasta ograničen te, nakon što su razgradili kost, odumiru apoptozom (67, 68).



Slika 2. Prikaz sustava RANKL/RANK/OPG. RANKL je član obitelji TNF izražen na osteoblastima, koji vezanjem za RANK, membranski receptor izražen na progenitorima osteoklasta, potiče osteoklastogenezu. Osteoblasti također izražavaju OPG, solubilni lažni receptor, čija je uloga kompeticija za RANKL vezanjem kojega se inhibira proces diferencijacije osteoklasta. Preuzeto i prilagođeno od Coetzea i Krugera (16, 69).

1.2 Matične stanice

Cijela nova era u regeneracijskoj medicini i tkivnom inženjerstvu započela je otkrićem matičnih stanica. Prema definiciji matična stanica nediferencirana je stanica koja ima visoku sposobnost samoobnavljanja odnosno proliferacije, te sposobnost diferencijacije u više staničnih loza odnosno vrsta progenitornih stanica. Bitno je naglasiti razliku između matičnih stanica i progenitornih stanica. Matične stanice imaju sposobnost samoobnavljanja i multi-linijske diferencijacije, dok progenitorne stanice nemaju sposobnost samoobnavljanja nego samo diferencijacije u više staničnih linija.

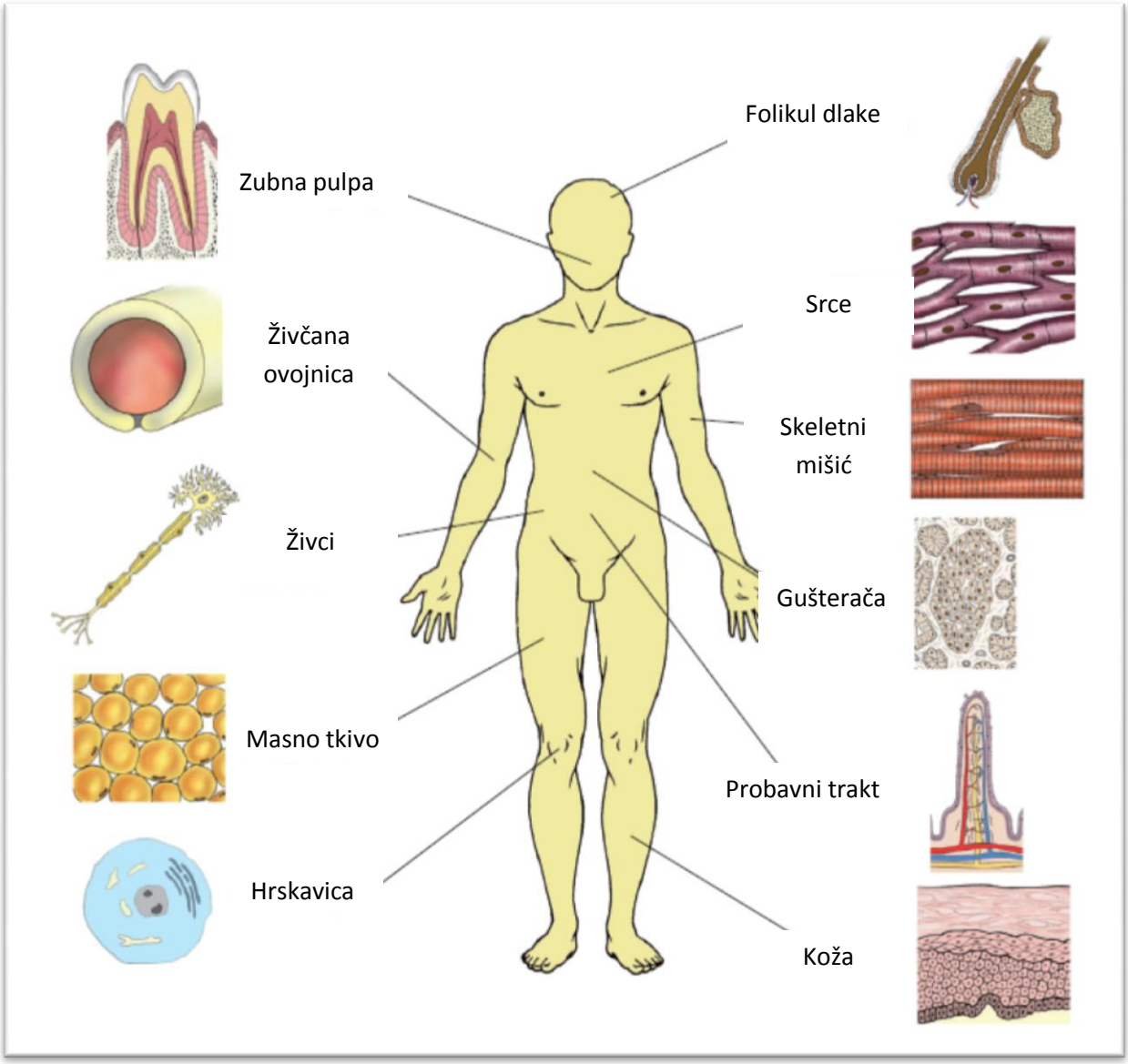
Matične stanice mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine: embrionalne matične stanice (EMS) i matične stanice odraslih. Naziv „matične stanice odraslih“ najviše je u uporabi, iako on ne označava precizno podrijetlo te skupine matičnih stanica i može dovesti do zabune.

Naime, iste stanice prisutne su i u tkivima djece te u pupkovini i posteljici. Stoga su predlagani drugi termini za ovu skupinu matičnih stanica kao što su „tkivne matične stanice“, „somatske matične stanice“ i „postnatalne matične stanice“, ali je termin „matične stanice odraslih“ većinom ostao u uporabi.

Širina diferencijacijskog potencijala matičnih stanica označava se terminom potentnosti. Stanica iz koje se može formirati svako tkivo organizma, te embrionalni organi kao što je posteljica, naziva se totipotentnom. Primjer takve stanice je zigota. Pluripotentne stanice mogu stvoriti tkiva svih triju zametnih listića (endoderma, mezoderma i ektoderma) - takve su embrionalne matične stanice. Multipotentne stanice mogu pak stvarati samo stanice i tkiva karakteristične za zametni listić iz kojega su one same podrijetlom - takve su matične stanice odraslih, npr. mezenhimne matične stanice.

1.2.1 Matične stanice odraslih

Prva istraživanja matičnih stanica započela su šezdesetih godina 20. stoljeća, kada je utvrđeno da u koštanoj srži i krvi postoje stanice koje posjeduju svojstva matične stanice (70, 71) . Danas je poznato da se matične stanice odraslih mogu izolirati iz mnogih tkiva odraslog organizma kao što su: koštana srž, spužvasta kost, periost, zglobna hrskavica, mišić, masno tkivo, živčano tkivo, zubna pulpa, folikul dlake, probavni trakt itd. (Slika 3.). Matične stanice odraslih smještene su u specifičnim nišama u nediferenciranom stanju i odgovorne su za održavanje i obnavljanje tkiva u kojemu se nalaze. Same niše sadrže mnoge stanične i nestanične komponente čijim se međudjelovanjem matične stanice održavaju u mirnom, nediferenciranom stanju (72).



Slika 3. Prikaz glavnih izvora i lokacija matičnih stanica odraslih. Preuzeto i prilagođeno od Hodgkinsona i sur. (72).

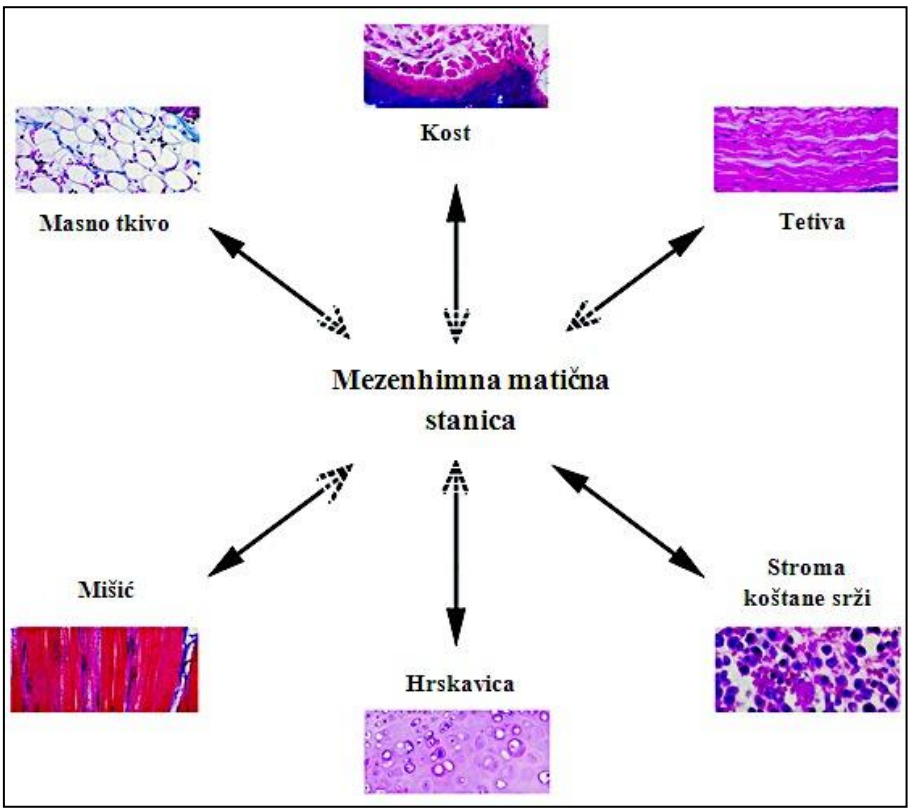
Bez obzira na izvor iz kojega se matične stanice dobivaju, za njihovu uporabu u regeneracijskoj medicini moraju biti ispunjeni sljedeći uvjeti: stanice se moraju dobivati minimalno invazivnim postupcima, moraju biti dostupne u dovoljnoj količini, moraju se razviti efikasni protokoli kojima se na ponovljiv način diferenciraju točno u smjeru željene stanične linije, moraju biti osigurani uvjeti da se mogu sigurno i pouzdano transplantirati bilo u autolognog bilo alogenog domaćina.

Bitno je istaknuti da je omjer broja matičnih stanica i broja diferenciranih somatskih stanica malen kod izolacije većine matičnih stanica odraslih, što predstavlja ozbiljan problem.

Imajući to u vidu, mnoge od gore navedenih populacija matičnih stanica odraslih nisu prikladne za uporabu u tkivnom inženjerstvu (složeni i invazivni postupci dobivanja i mala količina dobivenih stanica), dok su MMS koštane srži i masnog tkiva najprikladniji kandidati.

1.2.1.1 Mezenhimne matične stanice koštane srži

Populacija matičnih stanica koštane srži je heterogena skupina i sastoji se od hematopoetskih matičnih stanica, mezenhimnih matičnih stanica i endotelnih progenitornih stanica (73, 74). Utvrđeno je da se u koštanoj srži na 100 000 stanica nalazi 1 matična stanica. MMS koštane srži su iz skupine matičnih stanica odraslih prve otkrivene, i najbolje su istražena skupina. Friedenstein je još u drugoj polovici sedamdesetih godina utvrdio da koštana srž sadrži populaciju visoko proliferativnih stanica, koje adheriraju za plastičnu površinu i formiraju kolonije fibroblasta. Nazvao ih je „kolonije stanica fibroblastnih značajki“ (CFU-F, prema engl. *colony forming unit-fibroblast*) (75). Kasnije su označavane terminom „stromalne stanice koštane srži“ (BMSC, od engl. *bone marrow stromal cells*), da bi ih Arnold Caplan nazvao danas najčešće korištenim terminom „mezenhimne matične stanice“, analogno terminu već ranije otkrivenih hematopoetskih matičnih stanica (76). To su multipotentne stanice koje se mogu diferencirati u sve vrste mezenhimnih tkiva kao što su kost, hrskavica, tetiva, mišićno i masno tkivo (13) (Slika 4.). Njihova zastupljenost u koštanoj srži je mala i iznosi 1 MMS na $5x10^3$ mononuklearnih stanica koštane srži. Imaju sposobnost brze adherencije za podlogu Petrijeve zdjelice za kultivaciju i formiranja kolonija, pa se na taj način izdvajaju od hematopoetskih matičnih stanica nakon izolacije iz koštane srži (77). Ipak, korištenje te metode može rezultirati dobivanjem heterogene populacije koja se sastoji od matičnih stanica i progenitornih stanica, pri čemu prave MMS često čine svega 30 % od ukupnog broja izoliranih stanica (78).



Slika 4. Prikaz diferencijacijskog potencijala mezenhimnih matičnih stanica koštane srži. Pod kontroliranim uvjetima MMS koštane srži diferenciraju u stanice različitih tkiva kao što su koštano tkivo, hrskavica, masno tkivo, tetive i mišići. Dvostrane strelice ukazuju da diferencirane MMS imaju sposobnost dediferencijacije i transdiferencijacije. Preuzeto i prilagođeno od Chena i Tuana (79).

MMS koštane srži identificiraju se po funkcijskim i morfološkim karakteristikama te po izražavanju specifičnih biljega kao što su Stro-1, ALCAM, SB-10 (80, 81). Također ih karakterizira pozitivni izražaj biljega CD-29, CD-44, CD-49a, CD-73, CD-90, CD- 105 i CD-106, a negativni CD-14, CD-19, CD-34, CD-45, i HLA-DR (82, 83). Biljezi CD-73, CD-90 i CD-105 ujednačeno su i jako izraženi u kulturama MMS-a koštane srži neovisno o broju pasaža i starosti kulture, kao i dobi donora. S druge strane, izražaj biljega Stro-1 i CD-106 opada sa starosti kulture i brojem pasaža, kao i nakon usmjeravanja diferencijacije k adipocitima, osteoblastima i hondrocitima (84).

Oprečna su mišljenja o specifičnim odnosima MMS-a i imunološkog sustava domaćina. Dok mnoge studije tvrde da ne izazivaju imunološku reakciju odbacivanja, da su

imunoprivilegirane i time prikladne za alogenu transplantaciju (85-87), druge su pokazale da pod određenim uvjetima ove stanice ipak izazivaju reakciju odbacivanja (88).
Naravno, postoje ograničenja i teškoće u njihovoj primjeni u tkivnom inženjerstvu. Kultivacija *in vitro* i umnažanje mogu uzrokovati postupni gubitak multipotentnosti i ubrzati starenje stanica. Coelho i sur. izvijestili su da umnažanje MMS-a, odnosno broj pasaža kao i vrsta hranjivog medija utječe na osteogeni kapacitet ovih stanica (89). Sugiura i sur. pokazali su da MMS koštane srži koje su prošle manji broj pasaža, nakon osteogene stimulacije pokazuju snažniji izražaj koštanih biljega nego stanice s većim brojem pasaža (90). Sljedeći problem jesu i veliki troškovi izolacije i umnažanja, a sam postupak je vremenski zahtjevan (91). Također, postoje znatne razlike u diferencijacijskom potencijalu s obzirom na donora. Proliferacijski i diferencijacijski potencijal ovih stanica općenito se smanjuje s godinama (92, 93). Choolani i sur. pokazali su da fetusne MMS koštane srži imaju veći proliferacijski i osteogeni potencijal od MMS-a koštane srži odraslih (94). MMS također mogu nositi razne genetske nepravilnosti uzrokovane izlaganjem sunčevom svjetlu i toksinima, kao i pogreškama u replikaciji DNA koje se dogode tijekom života .
Kao rezultat ovih problema, količina dobivene kosti često nije dovoljna za kliničku primjenu (95-97).

1.2.1.2 Koštana diferencijacija MMS-a koštane srži

U dosadašnjim istraživanjima *in vitro* utvrđeno je da MMS koštane srži imaju osteogeni potencijal kad se uzgajaju u uvjetima koji potiču osteogenezu. Nakon poticanja koštane diferencijacije, MMS formiraju kolonije sastavljene od kubičnih stanica pozitivnih na alkalnu fosfatazu, koje na kraju formiraju mineralizirane koštane čvoriće. Usporedna studija Coelha i sur. pokazala je da je stupanj mineralizacije i izražaj koštanih biljega veći u kulturama koje su uzgajane u mediju αMEM u odnosu na one uzgajane u mediju DMEM (18). Najčešće korišteni i najpouzdaniji dodatci hranjivom mediju koji se upotrebljavaju za poticanje koštane diferencijacije su askorbinska kiselina (potiče sintezu kolagena), β-glicerol fosfat (potiče mineralizaciju) i deksametazon (83, 98-100). Različite izoforme koštanog morfogenetskog proteina (BMP)- BMP-2, BMP-6, BMP-9 također uspješno potiču koštanu diferencijaciju MMS-a koštane srži (101-103).

Osim toga, dobro je dokumentirano da MMS koštane srži mogu stvarati koštano tkivo *in vivo* nakon potkožne implantacije ovih stanica u imunodeficijentne miševe (104, 105).

1.2.2 Embrionalne matične stanice

U novije vrijeme težište istraživanja u regeneracijskoj medicini i koštanoj biologiji prebačeno je na istraživanje koštanog diferencijacijskog potencijala embrionalnih matičnih stanica. To su pluripotentne stanice koje se mogu neograničeno umnažati i diferencirati u sve tipove tkiva. U odnosu na MMS, one predstavljaju potencijalno neograničen izvor progenitornih stanica. Nakon *in vivo* ektopične potkožne transplantacije EMS stvaraju teratome. Dobivaju se iz unutrašnje mase stanica blastociste embrija (106). Blastocista je mikroskopska kuglasta nakupina stanica koja se razvija 5 - 8 dana nakon oplodnje. Na njoj se razlikuju tri strukture. Prva je trofoblast koji tvori vanjski sloj stanica, iz kojih se razvijaju ekstraembrionalna tkiva kao što su posteljica i pupkovina. Unutar blastociste je šupljina koja se naziva blastokela. Treća struktura je unutrašnja masa stanica, koja je smještena na jednoj strani blastociste vezana za trofoblast. Stanice koje tvore unutrašnju masu stanica jesu pluripotentne i izvor su embrionalnih matičnih stanica (107). One također stvaraju zametne stanice, spermatocite i oocite (108, 109) (Slika 5.).

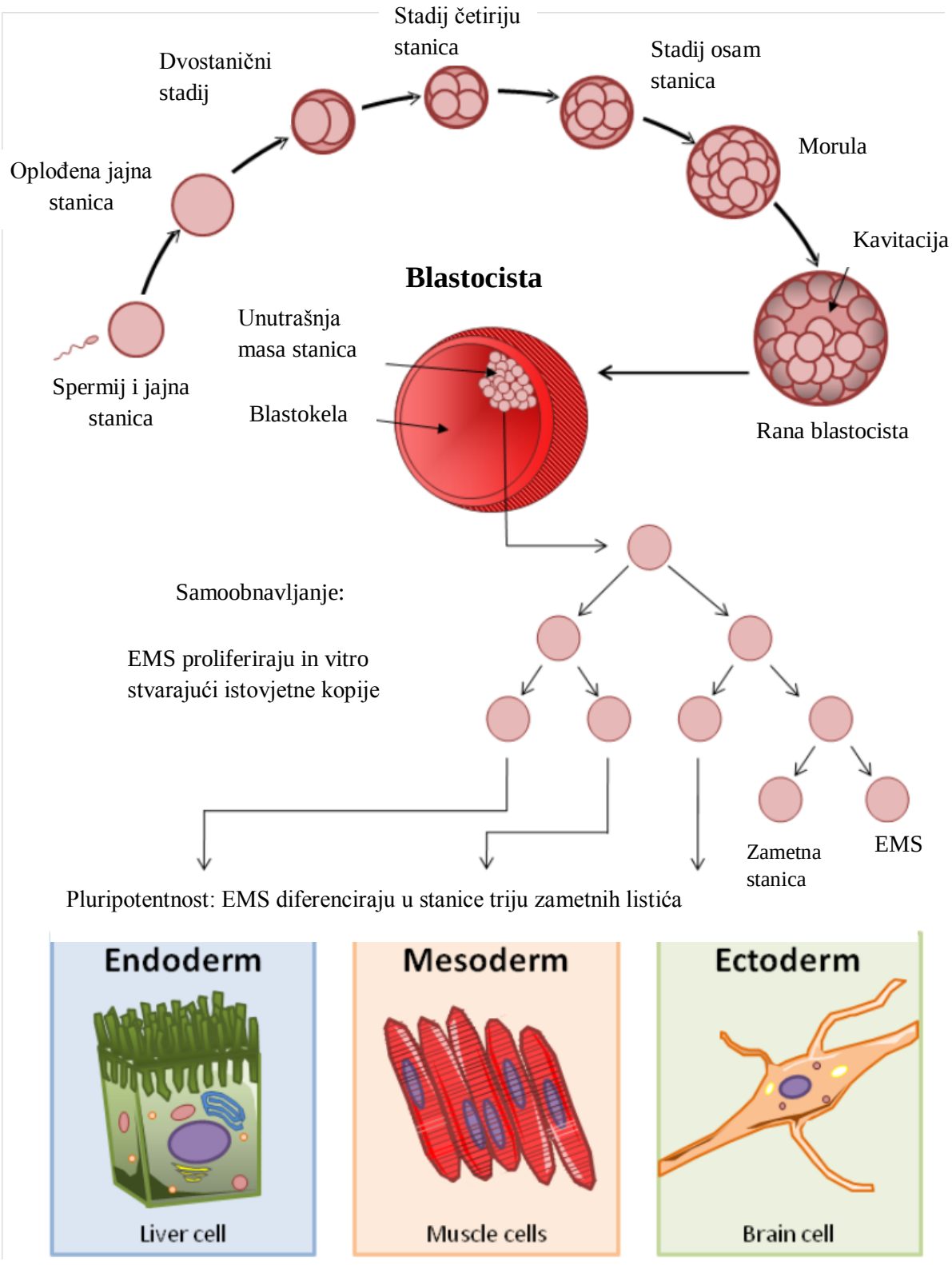
Evans i Kaufman prvi su još 1981. godine izolirali pluripotentne stanice iz mišjeg embrija (110). Precizna tehnika izdvajanja i dobivanja linija mišjih EMS-a sa 100-postotnom uspješnosti opisana je 1997. godine (111). Sljedeće su godine po prvi put izdvojene EMS iz ljudske blastociste (112).

EMS se mogu prepoznati po izražaju specifičnih biljega pluripotencije koji se nalaze na staničnoj površini. To su stadij specifični embrionalni antigen 1 (SSEA-1 od engl. *stage specific embryonic antigen) (*samo mišje EMS), SSEA-3 i 4 (samo ljudske EMS), Oct 4, Sox 2 i NANOG (113). Oct 4, Sox2 i NANOG tri su ključna transkripcijska čimbenika odgovorna za održavanje EMS-a u nediferenciranom stadiju (114).

Nakon izolacije, mišje EMS mogu se umnažati *in vitro* u ko-kulturi s mišjim embrionalnim fibroblastima (MEF, od engl. *mouse embryonic fibroblast*) koji sprečavaju njihovu diferencijaciju. MEF podržavaju rast i proliferaciju EMS-a zahvaljujući lučenju polipeptida zvanog inhibicijski čimbenik leukemije (LIF, od engl. *leukemia inhibiting factor)* (106, 115).

Pretpostavlja se da LIF, bilo da ga luče MEF ili se dodaje kao rekombinantni protein, djeluje po principu heterodimerizacije receptora za LIF i površinskog membranskog receptora iz sustava signalnog puta gp130. Aktivacija tog signalnog puta uzrokuje aktivaciju i transkripciju gena odgovornih za samoobnavljanje i pluripotentnost mišjih EMS-a (116, 117). LIF predominatno potiče aktivaciju transkripcijskog faktora Stat3 koji aktivira ciljne gene karakteristične za nediferencirani stadij EMS-a (118). Također je dokazano da BMP, osobito

BMP-4, igra ulogu u održavanju pluripotentnog fenotipa EMS-a u suradnji s čimbenikom Stat3. Mišje EMS u prisutnosti BMP-4 i LIF-a zadržavaju svojstva pluripotentnosti i samoobnavljanja i bez prisutnosti MEF-a i seruma (119).



Slika 5. Prikaz ranog stadija embrionalnog razvoja, od oplodnje do stadija stvaranja blastociste. EMS se izdvajaju iz unutrašnje mase stanica blastociste, imaju sposobnost samoobnavljanja, proliferacije te formiranja stanica i tkiva svih triju zametnih listića. Preuzeto i prilagođeno od Gotharda D. i sur. (120).

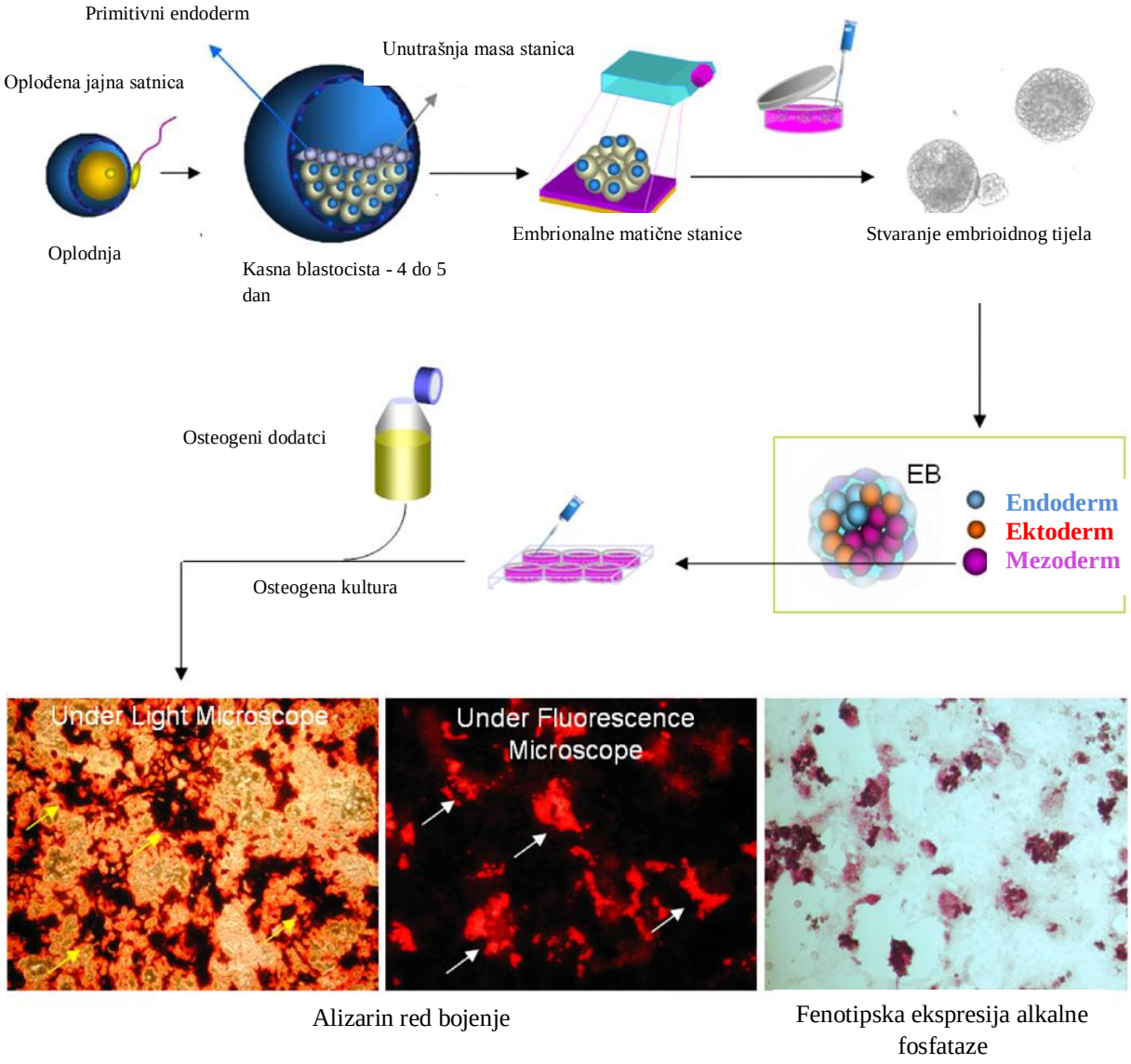
1.2.2.1 Diferencijacija EMS-a

U nedostatku ključnih faktora za održavanje pluripotentnosti, EMS se počinju diferencirati i u prikladnim kultivacijskim uvjetima stvaraju stanične linije triju zametnih listića - endoderma, mezoderma i ektoderma. Tri su osnovna pristupa za poticanje diferencijacije EMS-a (121). Prvi pristup je formiranje trodimenzijskih kuglastih agregata ili klastera stanica tzv. embrioidnih tijela – EB (od engl. *embryoid bodies*) slobodnom agregacijom stanica (108). Drugi je pristup kultivacija EMS-a izravno na stromalnim stanicama, a treći je diferencijacija EMS-a u jednom sloju na sloju izvanstaničnih proteina. Upotrebljavajući ova tri pristupa uz specifične dodatke i uvjete kultivacije, dobiven je cijeli spektar staničnih linija iz mišjih EMS-a: hondrociti, osteoblasti, glatke mišićne stanice, adipociti, neuroni, oligodendrociti, keratinociti itd. (121). Bez obzira na to koji se pristup primjenjuje, od neprocjenjive je važnosti pronaći točan i dobro definiran protokol s točno preciziranom metodologijom, poznatim faktorima rasta i njihovim količinama koji će rezultirati diferencijacijom u točno željenom smjeru, bez kontaminacije s neželjenim staničnim lozama, bez stvaranja teratoma u in vivo primjeni. Mnogo je istraživanja do danas provedeno s ciljem pronalska metoda što bolje kontrole diferencijacije EMS-a i dobivanja čistih i homogenih staničnih kultura pogodnih za kliničku primjenu u regeneracijskoj medicini (122). Međutim, napredak je na tom polju mukotrpan i spor i zahtijeva još mnogo rada (123). Poznavanje mehanizama genske kontrole i različitih čimbenika koji kontroliraju diferencijaciju EMS-a u određenim smjerovima još je uvijek nedovoljno.
Za ovo je istraživanje od posebnog interesa diferencijacija mišjih EMS-a u smjeru stanica osteoblastične loze.

1.2.2.2 Koštana diferencijacija EMS-a

Korištenje ljudskih EMS-a u istraživanju i terapiji nosi određene kontroverzije. Naime, postupak dobivanja EMS-a uključuje ili uništavanje embrija u stadiju blastociste, ili reprogramiranje somatskih stanica u stanice s potencijalom embrionalnih matičnih stanica, pri čemu se nailazi na razne probleme.
Prvi uspješni *in vitro* pokusi koštane diferencijacije EMS-a napravljeni su na mišjim stanicama (124-126).

Diferencijacija mišjih EMS-a *in vitro* može se potaknuti uklanjanjem MEF-a ili LIF-a iz kulture. Da bi se EMS diferencirale u osteoblaste, moraju proći kroz stadij mezenhimnih stanica, iz kojih se diferenciraju progenitori osteoblasta. Stoga se za diferencijaciju EMS-a upotrebljavaju gotovo isti uvjeti kao za MMS. Najčešće se rabe dva različita postupka – prvi s embrioidnim tijelima, a drugi je izravni diferencijacijski postupak koji zaobilazi formiranje embrioidnih tijela (127-130). U većini ranijih istraživanja upotrebljavan je diferencijacijski protokol koji uključuje formiranje EB-a. Kuglasti agregati stanica omogućavaju bolji međustanični kontakt i signalizaciju, što vodi spontanoj i nasumičnoj diferencijaciji. Za vrijeme stvaranja EB-a *in vitro*, EMS ulaze u istovrsni diferencijacijski put kao za vrijeme ranih faza embrionalnog razvoja. Zapravo EB oponaša embrij u ranoj fazi razvoja te dolazi do spontanog formiranja stanica svih triju zametnih listića: endoderma, mezoderma i ektoderma (131). EB-ovi stari 3-7 dana enzimatski se disociraju te se dobivene stanice ponovo kultiviraju u jednom sloju uz dodatak osteoinduktivnih faktora. Iz stvorenih se mezodermalnih stanica daljnom usmjerenom diferencijacijom stvaraju stanice osteoblastne loze (Slika 6.).



Slika 6. Prikaz postupka izolacije embrionalnih matičnih stanica, dobivanja embrioidnih tijela te poticanja koštane diferencijacije. Prisutnost mineraliziranog matriksa nakon poticanja koštane diferencijacije dokazuje se metodom *Alizarin red* bojenja, a izražaj alkalne fosfataze bojenjem za alkalnu fosfatazu. Preuzeto i prilagođeno od Seong i sur. (132).

Više je metoda za dobivanje embrioidnih tijela u kulturi, a najčešće se upotrebljava suspenzijska kultura u plastičnim neadherirajućim kultivacijskim zdjelicama i tzv. „metoda visećih kapi“ (od eng. “hanging drop”) (127). Jedna od negativnih strana EB-a je stvaranje šupljine, što je posljedica apoptoze stanica u središtu. Kavitaciju je teško kontrolirati i to vodi do gubitka određenog broja stanica za diferencijaciju. Također, spontano stvaranje stanica svih triju zametnih listića neminovno smanjuje broj stanica koje se mogu diferencirati u smjeru točno željene ciljne stanične loze.

Langer i sur. razvili su postupak izravne koštane diferencijacije ljudskih EMS-a zaobilazeći korak stvaranja EB-a, pri čemu je uspješnost tog izravnog postupka bila veća od EB protokola (130). Više je autora razvilo isti direktni diferencijacijski protokol za mišje EMS (129, 133). Prema navodima iz literature, oprečna su stajališta o tome koji je postupak efikasniji i praktičniji (127, 130).

Glavni osteogeni čimbenici koji se dodaju u hranjivi medij u svrhu poticanja *in vitro* diferencijacije EMS-a prema osteoblastnoj lozi su: askorbinska kiselina, β-glicerol-fosfat i deksametazon. U prisutnosti ovih osteoinduktivnih čimbenika EMS se diferenciraju u smjeru osteoblastne stanične loze. Askorbinska kiselina potiče osteoblaste na lučenje kolagenog matriksa, dok je β-glicerol fosfat podložan razgradnji djelovanjem osteoblastne alkalne fosfataze i kao takav postaje izvor fosfatnih iona potrebnih za mineralizaciju. Rezultat je *in vitro* stvaranje trodimenzijskih mineraliziranih čvorića koji su pokriveni višekutnim stanicama nalik osteoblastima. Čvorići nalikuju spužvastoj kosti i pozitivno se boje na alkalnu fosfatazu i kolagen tip 1 (134). Brojna su druga istraživanja pokazala pozitivan učinak raznih molekula i čimbenika na proces osteogeneze, međutim korištenje hranjivog medija sa spomenutim osnovnim dodatcima vrlo je učinkovita i jeftina metoda poticanja osteogeneze.

Pozitivan učinak na koštanu diferencijaciju EMS-a pokazali su retinoična kiselina i 1,25-hidroksi vitamin D3 (124, 135). Nadalje, koštana je diferencijacija EMS-a pospješena istovremenom kultivacijom s fetalnim osteoblastima, hondrocitima i fibroblastima parodontnog ligamenta (124).

Kultivacija EMS-a zajedno s drugim stanicama, npr. jetrenim stanicama ili u hranjivom mediju koji je dobiven od jetrenih stanica, potiče diferencijaciju u smjeru mezoderma i posljedično vodi do formiranja većeg broja koštanih prekursora (128). Taj sinergistički učinak počiva na činjenici da za vrijeme gastrulacije *in vivo* visceralni endoderm potiče mezodermnu diferencijaciju, a poznato je da su jetrene stanice po svojim biološkim funkcijama jako slične visceralnom endodermu (136).

Novija istraživanja krenula su u smjeru korištenja trodimenzijskih polimernih nosača, matičnih stanica kao izvora koštanih progenitornih stanica te specifičnih kultivacijskih osteoinduktivnih faktora. Cilj je *in vitro* diferencirane koštane progenitore ili osteoblaste na specifičnim nosačima upotrebljavati za *in vivo* transplantaciju i nadoknadu izgubljene kosti. Zasad se puno bolji rezultati postižu s MMS nego s EMS (137).

1.2.3 Metode dokazivanja koštane diferencijacije matičnih stanica

Nekoliko je standardnih metoda koje se najčešće upotrebljavaju za dokazivanje koštane diferencijacije matičnih stanica.

Glavna histokemijska metoda koja se upotrebljava u svim istraživanjima osteogeneze je bojenje na alkalnu fosfatazu. Alkalna fosfataza je membranski enzim koji katalizira hidrolizu organskih fosfata kao što su fosfatni monoesteri. Enzim je izražen u mnogim tkivima, a posebno je obilan u tkivima kao što su kost, jetra, bubreg, posteljica, a aktivan je i u EMS. Dakle, jasno je da unatoč jakom izražaju i aktivnosti ovog enzima u osteoblastima i koštanom tkivu on nije osteoblast-specifičan. Ovom se metodom prisutnost i aktivnost enzima dokazuje dodavanjem supstrata koji bude hidroliziran djelovanjem alkalne fosfataze i pri tome dolazi do promjene boje supstrata. Supstrat je pri tome povezan s diazonij solima, što dovodi do njegovog odlaganja točno ondje gdje su stanice pozitivne na alkalnu fosfatazu.

Metode koje otkrivaju biomineralizaciju i prisutnost mineraliziranog matriksa su bojenja von Kossa i Alizarin red . Obje metode pokazuju prisutnost kalcijevih soli. U bojenju von Kossa upotrebljava se srebreni nitrat, pri čemu srebro zamjenjuje kalcij pa je mineralizirani matriks obojen u tamnosivo boju. Alizarin red je boja s velikim afinitetom za kalcij, koja boji mineralizirane čvoriće u crvenu boju.

Važna i neizostavna metoda za procjenu diferencijacije matičnih stanica u stanice osteoblastne loze je analiza genskog izražaja. Obrnuto prepisivanje i umnažanje lančanom reakcijom polimerazinog tipa (RT-PCR, od engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*) je metoda izbora za dokazivanje izražaja gena karakterističnih za osteogenu diferencijaciju, a najčešće se upotrebljavaju Runx2, Osx, AP, kolagen tip 1, BSP i OC. Gubitak izražaja biljega pluripotencije EMS-a, Oct-4 i Nanog također se provjerava. Vremenski slijed u kojem se provodi analiza izražaja spomenutih biljega je 7, 14, 21 dan. U prvih sedam dana kultivacije očekuje se povećani izražaj transkripcijskih čimbenika Runx2 i Osx, nakon čega slijedi aktivacija biljega AP i kolagena tip 1, da bi izražaj OC bio vidljiv u trećem tjednu kultivacije.

1.3 Transgenski miševi

Životinja u čiji je genom s određenim ciljem ubačen određeni strani gen naziva se transgenskom. Glavna metoda za dobivanje gena koji se ubacuju u domaćina je tehnologija rekombinantne DNA. Osim strukturnog gena, ubačena DNA sadrži i slijedove baza koje joj omogućavaju da se ubaci u strukturu genoma domaćina te da gen bude ispravno izražen u stanici domaćina. Mikroiniciranje DNA u oplođenu jajnu stanicu i uporaba embrionalnih matičnih stanica dva su osnovna postupka za stvaranje transgenskih miševa (138).
Skupina američkih znanstvenika sa Sveučilišta u Connecticutu razvila je posebne modele transgenskih miševa za proučavanje osteogeneze. U genom tih transgenskih miševa ubačeni su tzv. geni izvjestitelji (reporterski geni, engl. *reporter gene*) koji su pod nadzorom promotora specifičnih za određeni stupanj sazrijevanja stanica osteoblastične loze. Izvjestiteljski geni koji se upotrebljavaju za proučavanje osteogeneze razvijeni su u obliku koji omogućava neprekidno praćenje tijekom cijelog vremena uzgoja stanica *in vitro*, te koji se može prikazati na histološkim rezovima kostiju embrija i odrasloga miša. Rezultati istraživanja ukazali su na mogućnost uporabe određenih oblika zelene florescentne bjelančevine (GFP, engl. *green flourescent protein*) kao biljega živih stanica (139-142). Korištenje GFP-a u istraživanjima kosti omogućuje vidljivo razlučivanje stanica koštane loze tijekom različitih stadija sazrijevanja (procesa osteogeneze), izdvajanje staničnih populacija pomoću metode sortiranja stanica fluorescentnom aktivacijom (FACS od engl. *fluorescence activated cell sorting*) i točno određivanje njihovog genskog izražaja (143-146).
Prednost korištenja izvjestiteljskog gena GFP sposobnost je zadržavanja stabilnosti signala u histološkim postupcima pripreme tkiva koji uključuju uporabu paraformaldehida za fiksaciju, dekalcifikacijske otopine, te uklapanje u parafin ili smrznute blokove (147).

Za uporabu genskih konstrukata promotor – gen izvjestitelj u proučavanju osteogeneze nužno je bilo pronaći promotore koji su aktivni u različitim razvojnim stadijima diferencijacije osteoblasta. Štakorski promotor za gen kolagen tip 1 ima modularnu strukturu prema kojoj određene domene koriste stanice različitih tkiva u kojima se stvara kolagen tip 1. Istraživanje Bogdanovica i sur. (148) koji su koristili transgenske miševe u kojih fragmenti kolagenskog promotora kontroliraju aktivnost enzima kloramfenikolske transferaze acetilne skupine (CAT, od engl. *chloramphenicol acetyltransferase*), pokazalo je da je 3,6 kb fragment promotora kolagena (Col3,6) odgovoran za aktivnost u koštanim, ali i u drugim tkivima (tetiva, koža,

pluća). Fragment 2,3 kb (Col2.3) ima ograničeniju aktivnost s jakom aktivnošću u kostima i zubima, a slabom aktivnošću u tetivi te neprimjetnom u drugim tkivima (143, 148).

Kalajzić i sur. razvili su transgenskog miša u kojem je GFP pod kontrolom 3,6 kb i 2,3 kb fragmenta promotora za kolagen tip 1 te su analizirali aktivnost tih promotora u kulturama stromalnih stanica koštane srži i u kulturama kalvarijskih osteoblasta (146). Konstrukt Col3,6GFP aktivira se u staničnoj kulturi istovremeno s izražajem kolagena tip 1 i ALP-a, odnosno u preosteoblastima koji imaju potencijal diferencijacije u zrele osteoblaste. Taj konstrukt može se uspješno upotrebljavati u izdvajanju preosteoblastičnih stanica, u primarnoj kulturi tijekom 3 do 4 dana prije sazrijevanja stanica u osteoblaste. Drugi konstrukt Col2.3GFP aktivira se u staničnim kulturama znatno kasnije od Col3.6GFP te je izražaj ograničen na čvoriće koji mineraliziraju. Stanice koje izražavaju taj konstrukt predstavljaju razmjerno homogenu populaciju visoko diferenciranih zrelih osteoblasta i osteocita (149). Histološka analiza tjemenih kostiju i femura potvrdila je izražaj konstrukta Col3,6GFP u stadiju preosteoblasta, dok je aktivnost konstrukta Col2,3GFP uočena isključivo u zrelim osteoblastima i osteocitima (150). Kalajzić i sur. zaključili su kako navedni konstrukti imaju važnu istraživačku vrijednost u određivanju stupnja zrelosti stanica osteoblastne loze (146).

U drugom istraživanju (151) ista se grupa autora vodila spoznajom da su perivaskularne stanice - periciti (prisutni u perivaskularnim nišama) stanice s potencijalom mezenhimnih matičnih stanica (84, 152, 153). Korišteni su transgenski miševi kod kojih je izvjestiteljski gen GFP bio pod kontrolom promotora za α-aktin glatkih mišića (α-SMA, eng. *α-smooth muscle actin*) i dokazali da stanice koje izražavaju α-SMAGFP imaju pericitno-miofibroblastni fenotip i pokazuju osteogeni potencijal, odnosno mogu se diferencirati *in vitro* i *in vivo* u zrele osteoblaste koji su izražavali Col2.3GFP. Iz koštane srži i masnog tkiva izolirane α-SMAGFP+ stanice pokazale su i adipogeni i osteogeni potencijal *in vitro*. Također, α-SMAGFP+ stanice izolirane iz masnog tkiva bile su pozitivne i za druge biljege mezenhimnih matičnih stanica, kao što su antigen matične stanice 1 (SCA-1, engl. *stem cell antigen 1*) i CD90, a negativne za CD117 i CD11b (hematopoetske biljege) (154-156) . Zaključili su da je α-SMAGFP koristan biljeg stanica s karakteristikama mezenhimne matične stanice.

MMS se dakle mogu identificirati kroz izražaj α-SMAGFP-a, dok zreli osteoblasti izražavaju Col2.3GFP (146, 151).

2. Svrha i cilj rada

Uporaba matičnih stanica u terapiji sve većeg broja bolesti današnjice vrlo je nedvojbena. Embrionalne matične stanice imaju sposobnost diferencijacije u stanice i tkiva svih triju zametnih listića. Kada su injicirane u odraslog miša, EMS stvaraju teratome koji sadržavaju široku lepezu različitih tipova zrelih stanica. Premda široke diferencijacijske sposobnosti pružaju ogroman regeneracijski potencijal ovih stanica, to također predstavlja veliki izazov u razumijevanju procesa diferencijacije i mogućnosti kontrole samog procesa (108).

S druge strane, dobro je istražen koštani regeneracijski potencijal MMS-a odraslih. Rezultati istraživanja već su potvrdili uspješnu uporabu ovih stanica za transplantacijske postupke u regeneracijskoj medicini (157-159). Uobičajeni protokol čini uporaba matičnih stanica različitih izvora, najčešće MMS-a koštane srži i MMS-a masnog tkiva, u kombinaciji sa osteoinduktivnim faktorima i različitim nosačima trodimenzijske geometrije (151, 160-162). Uporaba MMS-a koštane srži i masnoga tkiva predstavlja novi važan terapijski pristup za liječenje bolesti mišićno-skeletnog sustava (163-166). Usprkos terapijskim prednostima MMS-a odraslih, postoje nedostatci prilikom njihovog korištenja: 1) visok trošak izolacije stanica, 2) ograničen proliferacijski potencijal ovisno o donoru, 3) smanjenje diferencijacijskog potencijala nakon opetovanog umnažanja.

Nasuprot tome, kada se razvije uspješan protokol diferencijacije, EMS imaju potencijal za stvaranje velikog broja koštanih progenitornih stanica. Izvjesno je stvaranje organizirane banke EMS-a koja bi sadržavala stanične linije svih tipova HLA i koja bi poslužila kao izvor donorskih stanica za liječenje pacijenata.

Nedavna istraživanja potvrdila su sposobnost diferencijacije mišjih i ljudskih EMS-a u osteoblaste (124, 126, 167-169). Međutim, uspoređujući osteogeni potencijal EMS-a s MMS-om koštane srži, primijećen je manji osteogeni potencijal EMS-a. Navedeno je jasno vidljivo u istraživanjima *in vivo* u kojima su transplantirane MMS pokazale sposobnost stvaranja kosti dok EMS nisu (137).

Uzimajući u obzir potencijal EMS-a za stvaranje kosti, nužno je otkriti biljege karakteristične za različite stupnjeve diferencijacije do zrelog osteoblasta, koji na putu od EMS-a prolazi međustupanj mezenhimne matične stanice, preko koštanog progenitora do zrelog osteoblasta. Također, nužno je razviti sustav u kojemu se stanice na različitim stupnjevima diferencijacije mogu prepoznati i izdvojiti. Uspješna metoda označavanja, vizualnog prepoznavanja i izdvajanja koštanih stanica različitog stupnja razvoja je korištenje genskih konstrukata promotor-GFP izvjestiteljski geni.

Pregledom literature evidentno je da se model transgenskih miševa i GFP-izvjestiteljskih gena nije upotrebljavao u dosadašnjim istraživanjima na polju EMS-a i njihove diferencijacije u smjeru osteoblastične loze. Vođeni tom spoznajom, autori ovog istraživanja isplanirali su niz pokusa u kojima će model dvostruko transgenskog miša iskoristiti za određivanje i praćenje diferencijacije matičnih stanica prema zrelim osteoblastima. Stoga je cilj ovog istraživanja odrediti koštani regeneracijski potencijal mišjih MMS-a i EMS-a *in vitro* i mišjih EMS-a *in vivo*. U tu svrhu upotrijebit će se MMS koštane srži, te linija EMS-a , koje će se izolirati iz dvostruko transgenskih miševa αSMARFP/Col2.3GFP. To će omogućiti da se vizualno prati proces diferencijacije stanica te se iste stanice dokažu u mezenhimnom stadiju (αSMARFP+) i u stadiju zrelih osteoblasta (Col2.3GFP+). Krajnji cilj je bolje razumijevanje tog procesa, a sve u svrhu korištenja tih stanica za regeneraciju koštanog tkiva.

Prvi cilj (*in vitro*)

a) Odrediti koštani regeneracijski potencijal mišjih MMS-a koštane srži obilježenih izražajem αSMARFP *in vitro.*

b) Odrediti koštani regeneracijski potencijal mišjih EMS-a *in vitro*, upotrebljavajući dva različita protokola: protokol s embrioidnim tijelima i izravni diferencijacijski protokol.

Drugi cilj (*in vivo*)

Istražititi sposobnost EMS-a da se diferenciraju u zrele osteoblaste *in vivo*, stvaraju novu kost i aktiviraju izražaj transgena, koristeći se pritom intramuskularnom implantacijom stanica u imunodeficijentne sojeve miševa s posljedičnim stvaranjem teratoma.

3. MATERIJALI I POSTUPCI

3.1. Pokusne životinje - Transgenski miš

U istraživanju su upotrebljavane matične stanice izolirane iz dvostruko transgenskih miševa α-SMARFP/Col2.3GFP, koji su dobiveni križanjem već prije razvijenih α-SMARFP-cherry i Col2.3GFP miševa (146, 170). Sve transgenske životinje uzgojene su u soju miševa C57Bl6. Pokus intramuskularne transplantacije i stvaranja teratoma *in vivo* napravljen je korištenjem 3-4 mjeseca staroga NOD/SCID/interleukin 2 receptor [IL2r] gamma (null) (NSG) miša kao primatelja (171).

Svi postupci vezani za pokusne životinje odrađeni su u skladu sa standardima za rukovanje i rad s pokusnim životinjama američkog Nacionalnog instituta za zdravlje (*National Institutes of Health,* USA). Sve protokole za rad s pokusnim životinjama odobrilo je Povjerenstvo za brigu o laboratorijskim životinjama (*Animal Care Committiee*) Zdravstvenog centra Sveučilišta u Connecticutu.

3.2. Stvaranje i kultivacija linije EMS-a

EMS su izolirane iz α-SMARFP/Col2.3GFP miševa. Nakon parenja i utvrđivanja trudnoće ženke su žrtvovane, disecirana je blastocista, a i iz nje su izdvojene stanice unutrašnje mase i pripremljene embrionalne matične stanice (172).

Postupak je proveden na Odjelu za transgenske životinje, Zdravstvenog centra Sveučilišta u Connecticutu. Genotipiziranje je napravljeno pomoću setova primera eGFP (5'-TCATCTGCACCACCGGCAAGC; 5'-AGCAGGACCATGTGATCGCGC) i RFP (5'-CCATCATCAAGGAGTTCATGC; 5'- TCTTGACCTCAGCGTCGTAGT). EMS divljeg tipa izolirane od C57Bl6 netransgenskog miša su komercijalno dostupne te su kupljene (*Life Technologies*, Carlsbad, CA).

EMS su nasađene na tzv. „feeder" stanice (mišje embrionalne fibroblaste, mitotski inaktivirane koristeći se gama-zrakama) u hranjivom mediju za EMS: DMEM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, SAD), koji sadrži 15-postotni fetusni goveđi serum (FBS, HyClone, Logan, UT, USA), 1-postotni penicilin-streptomicin (100 U/mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina), inhibicijski čimbenik leukemije (LIF – od engl. *leukemia inhibitory factor*), natrij-piruvat, β-merkaptoetanol, neesencijalne aminokiseline i L-glutamin.

3.3. Priprema kultura i koštana diferencijacija jednoslojne stanične kulture EMS-a

EMS su tripsinizirane (0,05 % tripsin/ 1 mM etilen diamin tetraoctena kiselina (EDTA, od engl. *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*) i nasađene u 0.1 % želatinom pokrivene zdjelice promjera 100 mm u hranjivi medij (visokoglukozni DMEM obogaćen s 20% FBS-a i 1-postotni penicilin-streptomicin). Nakon četiri dana stanice su ponovo tripsinizirane i nasađene (100 000 stanica/zdencu) u pločice promjera zdenca 35 mm (Falcon, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, SAD) te su diferencirane tijekom četrdeset i dva dana koristeći osteodiferencirajući medij: αMEM, uz dodatak 50 μg/mL askorbinske kiseline, 10 nM deksametazona i 8 mM β-glicerofosfata (BGP, od engl. *β-glycerophosphate*) (124, 167). Medij je mijenjan svaka dva dana do kraja pokusa.

3.4. Koštana diferencijacija EMS-a uporabom embrioidnih tijela

Embrioidna su tijela dobivena metodom „suspenzijske kulture". EMS su odvojene od podloge uporabom otopine 0.05 % tripsina i 1mM EDTA, presađene su na dva dana u 0.1% želatinom pokrivene zdjelice, nakon čega su prebačene u EMS hranjivi medij u neadherirajuće Petrijeve zdjelice tijekom šest dana. Medij je mijenjan svaki dan. Stanice su plutajući formirale trodimenzionalne kuglaste nakupine tzv. embrioidna tijela. Šestog su dana embrioidna tijela sakupljena te su tripsinizirana (0.25% tripsin/EDTA) kako bi se dobile pojedinačne stanice. Stanice (100 000/zdencu) su presađene u pločice za staničnu kulturu promjera zdenca 35 mm (Falcon, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, SAD) te je jedna skupina stanica hranjena hranjivim medijem DMEM, 20% FCS, 1% penicilin/streptomicin tijekom četri dana, nakon čega je diferencirana tijekom dvadeset i jednog dana upotrebljavajući osteodiferencirajući medij (EB-D), a druga skupina je izravno prebačena u osteodiferencirajući medij na 21 dan (EB-L). Medij je mijenjan svaka dva dana do kraja pokusa.

3.5. Priprema kultura i koštane diferencijacije mišjih MMS-a koštane srži

Transgenski miševi stari od 6 do 8 tjedana žrtvovani su pomoću CO_2 plina. Femuri i tibije izdvojeni su od okolnog tkiva. Nakon odstranjivanja epifiznih ploča rasta, koštana srž je isprana hranjivim medijem za staničnu kulturu αMEM obogaćenim sa 100 U/mL penicilina, 100 μg/mL streptomicina i 10% FBS-a (GIBCO BRL, Life Technologies, Grand Island, NY,

SAD), rabeći iglu veličine 25G. Jednostanična je suspenzija pripravljena propuštanjem staničnih agregata kroz iglu veličine 18G te filtriranjem kroz stanični filter s porama veličine 70μm (Falcon; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, SAD). Koncentracija stanica određena je brojanjem u 0,04 % tripanskom plavilu te su stanice posađene u gustoći 10^6 živih stanica/cm^2 u pločice za staničnu kulturu promjera 100 mm. Četvrtog dana od zasijavanja, polovica medija je zamijenjena svježim. Sedmoga dana dio pločica sa stanicama je pripremljen za sortiranje. Stanice su isprane u PBS-u, te su nakon 15-minutne tripsinizacije u 2,5% tripsinu, sortirane uporabom uređaja za sortiranje stanica FACS Vantage (Becton Dickinson, San Jose, CA, SAD). Dio sortiranih stanica ($5x10^4/cm^2$) posađen je u pločice za staničnu kulturu promjera zdenca 35 mm i podvrgnut procesu koštane diferencijacije, kao što navode Kalajzić i sur. (151). Drugi dio stanica iskorišten je za tzv. „spot“ kultivaciju u kojoj je $1x10^5$ stanica posađeno u 100μl hranjivog medija (173). Nakon tjedan dana u bazalnim uvjetima potaknuta je koštana diferencijacija dodavanjem askorbinske kiseline (50 μg/mL) i BGP-a (8 mM).
Dio pločica sa stanicama koji nije sortiran također je podvrgnut postupku koštane diferencijacije od 7 do 21 dana, nakon čega se pristupilo postupku izolacije RNA u svrhu utvrđivanja izražaja koštanih biljega.

3.6. Mjerenje aktivnosti alkalne fosfataze i stupnja mineralizacije

Nakon 21 dana u osteodiferencirajućem mediju, osteoblastna aktivnost u kulturama procijenjena je histokemijskom analizom aktivnosti alkalne fosfataze (58), koristeći se komercijalno dostupnim kitom (86-R Alkaline Phosphatase, Sigma Diagnostics, Inc. ST. Louis, MO, SAD). Stupanj mineralizacije procijenjen je metodama bojenja von Kossa i Alizarin red. Bojenje von Kossa napravljeno je inkubacijom kultivacijskih pločica u 5% srebro nitratu pod UV svjetlom. Kao izvor UV svjetla korišten je ultraljubičasti *crosslinker*. Prisutnost mineraliziranih čvorića procijenjena je bojenjem s 1% Alizarin red (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) nako što su stanice fiksirane u 70% etanolu (174).
Nakon što su stanice obojene, pločice za staničnu kulturu su skenirane pomoću skenera (Umax Astra 4000, Umax, Taiwan).

3.7. Izolacija RNA i analiza izražaja gena

Ukupna stanična RNA izolirana je pomoću TRIzol reagenta prema uputama proizvođača (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD). Stanice su isprane u PBS-u, dodano je 1 ml TRIzol reagenta te su stanice skupljene u *eppendorf* tube. Kako bi se razbili mineralizirani čvorići, takva suspenzija je homogenizirana ULTRA-TURRAX T 10 Basic homogenizatorom (IKA, Wilmington, NC, USA) te je dodano 200 µl kloroforma. Nakon što su uzorci dobro promiješani, centrifugirani su 5 minuta na 12000 g pri 4°C. Gornja vodena faza prenesena je u novu tubicu te je dodan isti volumen izopropanola. RNA je precipitirana preko noći na -20°C nakon čega su uzorci centrifugirani 15 minuta na 12000 g. Precipitat je opran u 70-postotnom etanolu, centrifugiran 5 minuta na 12000 g te otopljen u destiliranoj vodi tretiranoj s dietil-pirokarbonatom (DEPC voda) (175).

Količina i kvaliteta RNA određena je gel elektroforezom i metodom spektrofotometrije, koristeći se pri tom uređajem NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Ukupna stanična RNA obrnuto je prepisana u komplementarnu DNA (cDNA, prema engl. *complementary DNA*) prema uputi proizvođača za Superscript III First Strand Synthesis System, te je korištena za reakciju RT-PCR (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) i to 1 µg RNA po uzorku.

Metodom RT-PCR na stroju 7900HT fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) izmjeren je relativni izražaj OC-a, BSP-a, osteriksa, Runx2 i kolagena tip 1, koristeći se pritom komercijalno dostupnim probama- TaqMan® Gene expression probe (identifikacijski brojevi proba: osteokalcin, Mm03413826_mH; koštana sijalobjelančevina, Mm00492555_m1; osteriks, Mm00504574_m1; Runx2, Mm00501584_m1 i kolagen tip 1, Mm00483888_m1) . Kao kontrolni gen za normalizaciju korišten je gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH, prema engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) (Mm99999915_g1).

3.8. Detekcija GFP-a u staničnim kulturama (*in vitro*)

Izražaj fluorescentnog izvjestiteljskog gena (αSMARFP i Col2.3GFP) u kulturi stanica analiziran je uporabom invertnog mikroskopa Olympus IX50 (Olympus America Inc., Melville, NY, SAD) opremljenog invertiranim IX-FLA filterima. Za slikanje staničnih kultura dobivenih od αSMARFP/Col2.3GFP transgenskog miša upotrijebljeni su sljedeći filteri: GFP

(eksitacije 500/20, emisije 535/30) i RFP (eksitacije 560/40, emisije 630/75), kako bi se vizualno razlikovali signal GFP-a od signala RFP-a. Slike su snimljene pomoću SPOT-kamere (Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI, SAD).

3.9. Određivanje koštane diferencijacije EMS-a *in vivo* – stvaranje teratoma

Za procjenu koštanog potencijala EMS-a *in vivo* korišten je ektopični koštani transplantacijski model (intramuskularna transplantacija stanica) u imunodeficijentnim miševima. EMS dobivene iz αSMARFP/Col2.3GFP uzgojene su kao jednoslojna kultura stanica na želatinoznoj podlozi. Nakon druge pasaže, 10^6 stanica ubrizgano je u bedreni mišić NSG miša. Miševi su anestezirani kombinacijom ketamina/ksilazina intraperitonealnom injekcijom. Koža na unutarnjoj strani bedra dezinficirana je 70-postotnim alkoholom te su stanice u PBS otopini injektirane u bedreni mišić špricom, rabeći iglu veličine 25G. Šest tjedana nakon ubrizgavanja stanica utvrđeno je postojanje teratoma. Napravljena jee RTG-snimka donjih udova i disekcija teratomskog tkiva koje je potom histološki obrađeno.

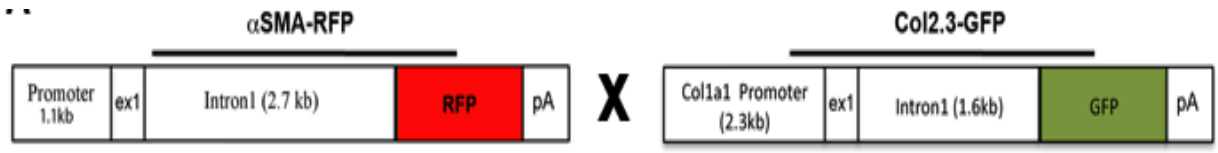
3.10. Histološka analiza izražaja transgena

Teratomsko tkivo fiksirano je preko noći u 4-postotnom paraformaldehidu na 4^{o}C. Tijekom 24 sata hidratizirano je u saharozi, uloženo u smrzavajući medij (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, USA) i izrezano na debljinu reza od 5 μm, upotrebljavajući sustav traka *CryoJane* (Instrumedics, Ann Arbor, MI, USA). Na histološke je rezove nakapan 50-postotni glicerol u PBS-u te su rezovi prekriveni pokrovnicama. Izražaj signala GFP-a zabilježen je pomoću invertnog mikroskopa Zeiss Observer.Z1 (Carl Zeiss MicroImaging, Thornwood, NY, USA) s odgovarajućim filter-kockama optimiziranima za varijante GFP-a. Histološki preparati cijelo su vrijeme bili zaštićeni od izlaganja svjetlosti. Slike su snimljene crno /bijelom kamerom, a zatim je boja na slici odabrana programom AxioVision (Carl Zeiss Mycroscopy Ltd, Cambridge, GB). Da bi se dobila cijela slika kosti, kosti su snimljene na visokom povećanju i spojene u združenu sliku.

4. REZULTATI

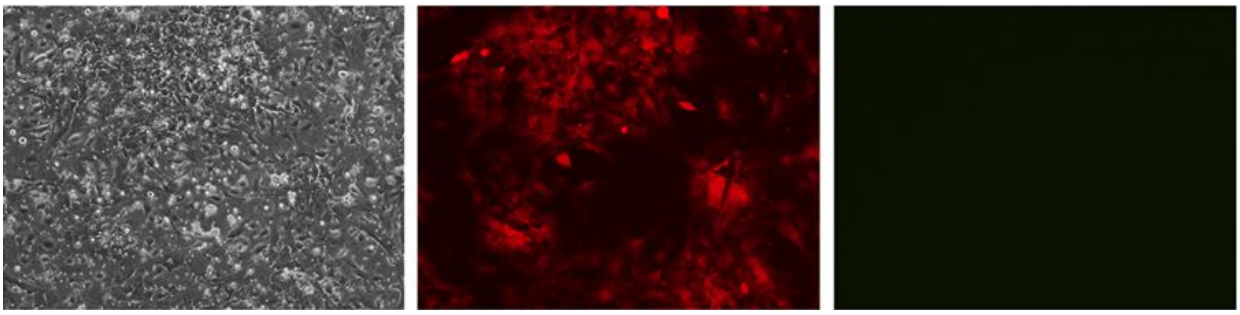
4.1. Određivanje koštane diferencijacije MMS-a koštane srži – *in vitro*

U svrhu identifikacije populacije stanica koje imaju potencijal mezenhimnih matičnih stanica korišten je transgenski miš u kojemu αSMA promotor regulira izražaj RFP-a. Navedeni transgen aktivan je u populaciji stanica koje imaju sposobnost diferencijacije u zrele osteoblaste u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Kako bi se procijenila navedena sposobnost diferencijacije, upotrijebljen je Col2.3GFP miš koji je pokazao izražaj transgena u osteoblastima i osteocitima. Tranzicija mezenhimnih matičnih stanica u osteoblaste procijenjena je uporabom primarne kulture matičnih stanica koštane srži. Stanične kulture dobivene su koristeći se matičnim stanicama iz koštane srži dvostrukog transgenskog miša αSMARFP/Col2.3GFP (Slika 7.)



Slika 7. Grafički prikaz genskog konstrukta korištenog u stvaranju transgenskih miševa αSMARFP/Col2.3GFP. Promotor αSMA kontrolira izražaj RFP-a, dok 2.3kb fragment promotora kolagena tip 1 kontrolira izražaj GFP-a.

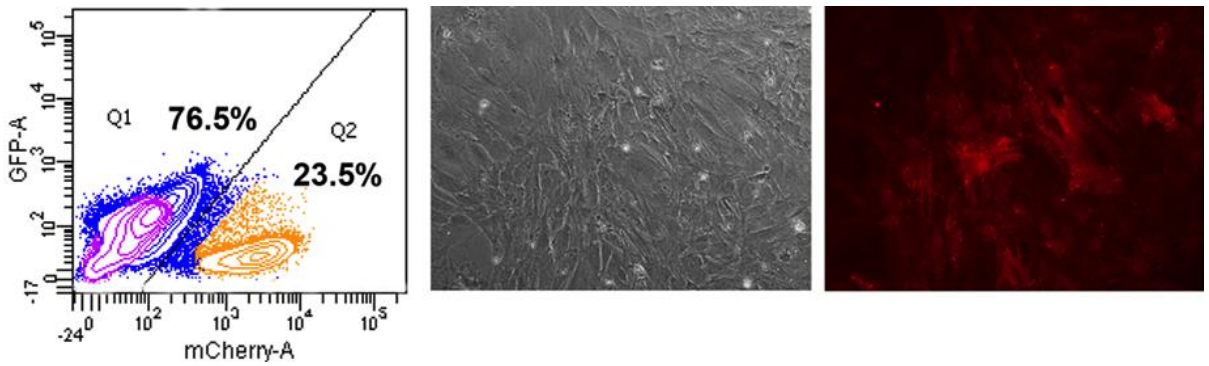
Nakon izolacije, stanice su kultivirane u hranjivom mediju za staničnu kulturu (αMEM obogaćen sa 100 U/mL penicilina, 100 μg/mL streptomicna i 10% FBS-a) u vremenskom periodu od sedam dana. Tijekom navedenog vremenskog perioda došlo je do aktivacije αSMARFP transgena u znatnom broju stanica, što se jasno vidi na Slici 8-B. Snažan signal RFP-a vidljiv je u većini stanica. Biljeg Col2.3GFP još nije aktivan jer stanične kulture nisu ni usmjerene prema osteoblastnoj lozi (Slika 8-C.).



A **B** **C**

Slika 8. Kultura sedam dana starih MMS-a koštane srži koje su dobivene od dvojnog αSMARFP/Col2.3GFP transgenskog miša (**A**-*brightfiled*/svijetlo polje; **B**-RFP; **C**- GFP).

Nakon sedam dana kultivacije stanica u navedenim uvjetima, dio je staničnih pločica sortiran metodom FACS s obzirom na izražaj αSMARFP transgena na uređaju za sortiranje stanica. Postotak αSMARFP+ iznosio je 23.5%. αSMARFP+ stanice kultivirane su u hranjivom mediju za staničnu kulturu (αMEM obogaćen sa 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL streptomicna i 10% FBS-a) tijekom sedam dana. Slika 9.

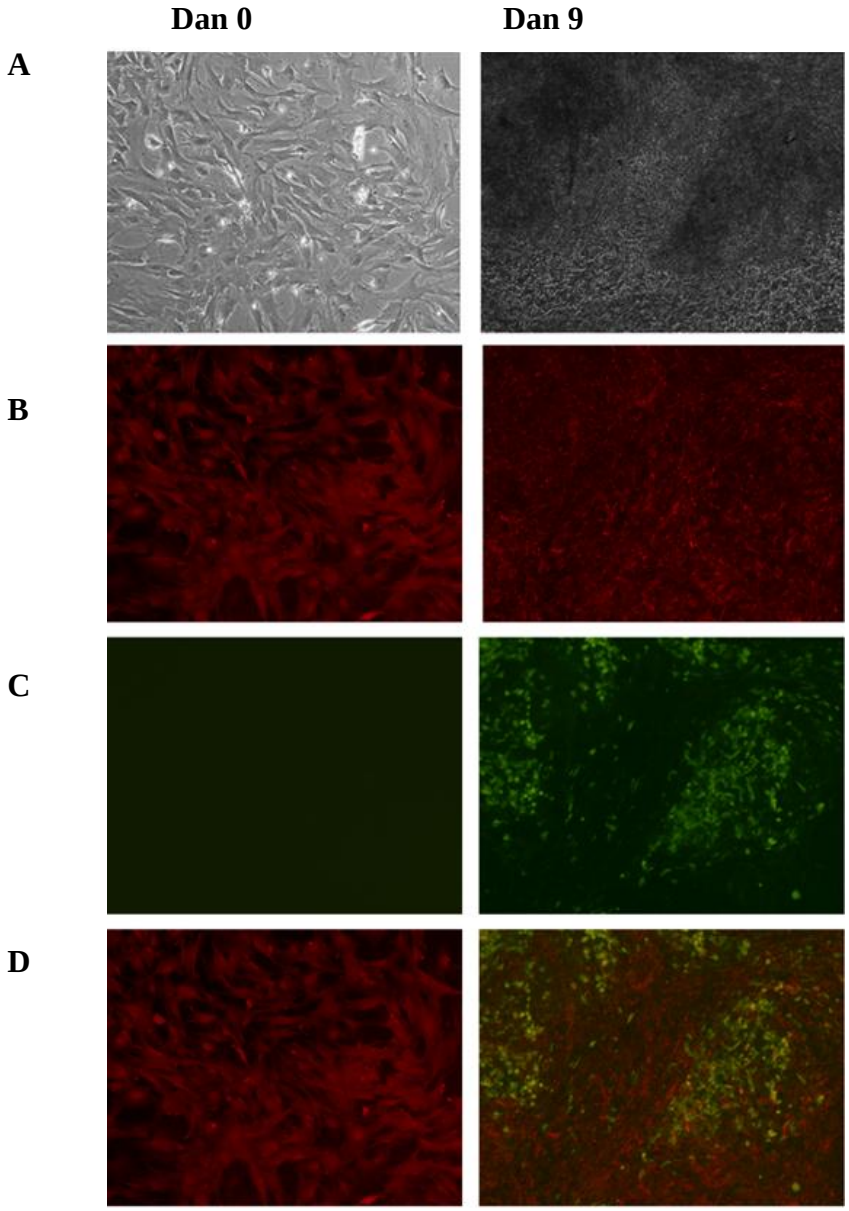


A **B** **C**

Slika 9. **A**-Rezultati FACS analize pokazuju aktivnost αSMARFP-a i nedostatak aktivnosti Col2.3GFP-a. Prikaz kulture stanica tjedan dana nakon sortiranja prije početka koštane diferencijacije, **B**- svijetlo polje; **C**-RFP.

Nakon toga, stanične su kulture hranjene ostediferencirajućim hranjivim medijem (αMEM, uz dodatak 50 µg/mL askorbinske kiseline i 8 mM β-glicerolfosfata- BGP) kako bi se potaknula diferencijacija MMS-a koštane srži, koje su prepoznate po izražaju αSMARFP, u smjeru

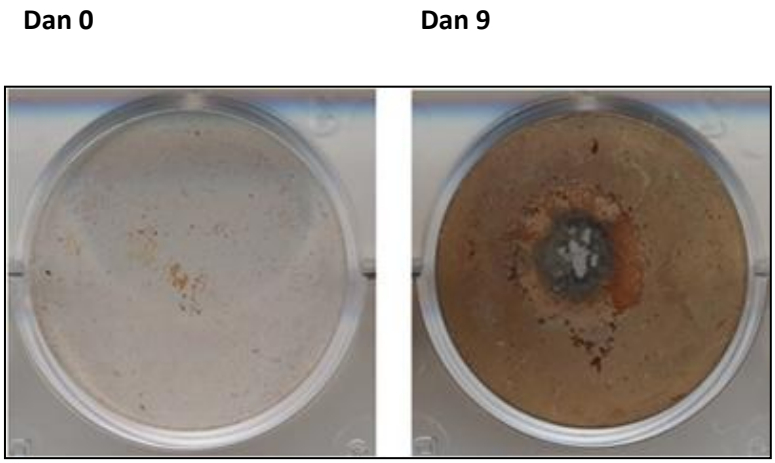
stanica osteoblastične loze. Aktivacija osteoblastnog specifičnog transgena Col2.3GFP potvrdila je osteogenu sposobnost αSMARFP+ stanica. Snažan izražaj Col2.3GFP-a primijećen je kada su sortirane stanice koje izražavaju αSMARFP presađene kao točkasta kultura i inducirane u smjeru koštane diferencijacije, Slika 10.



Slika 10. Prikaz kulture MMS-a koštane srži nultog i devetog dana nakon početka koštane diferencijacije. **A**-svijetlo polje; **B**-RFP; **C**-GFP; **D**–kompozitni prikaz preklapanja slika B i C.

Vidljivo je kako nultog dana (prije početka osteogene stimulacije) stanice izražavaju samo transgen αSMARFP, karakterističan za stadij mezenhimne matične stanice, a nema aktivnosti Col2.3GFP-a. Devetog dana osteogene stimulacije aktivnost transgena αSMARFP se smanjuje, što govori da su se stanice počele diferencirati u smjeru osteoblastnih progenitora i zrelih osteoblasta. To se potvrđuje snažnom aktivnošću transgena Col2.3GFP devetog dana kulture, što je jasno vidljivo u kompozitnom prikazu kojim su preklopljene slike kulture snimljene GFP i RFP filterima (Slika 10 A-D.).

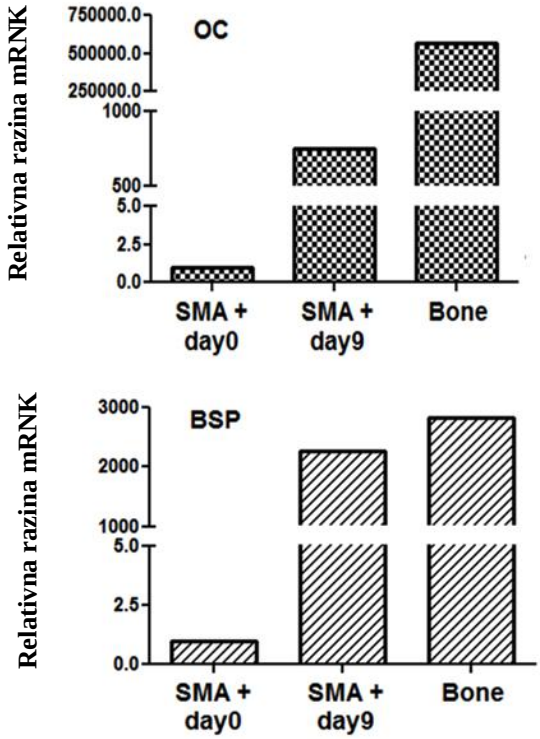
Koštana diferencijacija i prisutnost mineraliziranog matriksa također je potvrđena metodom bojenja von Kossa koja prikazuje prisutnost mineralizacije devetog dana stanične kulture, dok prije dodavanja osteoinduktivnih faktora nema tragova mineraliziranog matriksa (Slika 11.).



Slika 11. Bojenje von Kossa koje dokazuje koštanu diferencijaciju i prisutnost mineraliziranog matriksa devetog dana stanične kulture.

Kako bi se dokazalo da stanice koje izražavaju transgen Col2.3GFP predstavljaju zrele osteoblaste, nultog dana te devetog dana osteodiferencijacije izolirana je RNA iz kultura αSMARFP+ stanica. Metodom RT-PCR određen je izražaj biljega karakterističnih za zrele osteoblaste, osteokalcina (OC – od engl. *osteocalcin*) i BSP-a (Slika 12.). Iz grafičkog prikaza vidljivo je povećanje izražaja spomenutih biljega nakon devetog dana u osteodiferencirajućem mediju. Razina ovih biljega uspoređena je s razinom istih biljega u zrelom koštanom tkivu tj. uzorku kosti. Vidljivo je cca 2500 x povećanje relativne razine biljega BSP-a nakon devet

dana osteodiferencijacije te približavanje razini BSP-a u zrelom koštanom tkivu. Nešto manje povećanje, ali ne beznačajno (cca 750 x), vidljivo je i za OC. S obzirom na to da OC predstavlja biljeg zrelih osteoblasta, logično je da povećanje njegove relativne razine nije toliko izraženo jer je devetog dana osteodiferencijacije samo dio stanica dosegao stadij zrelog osteoblasta.

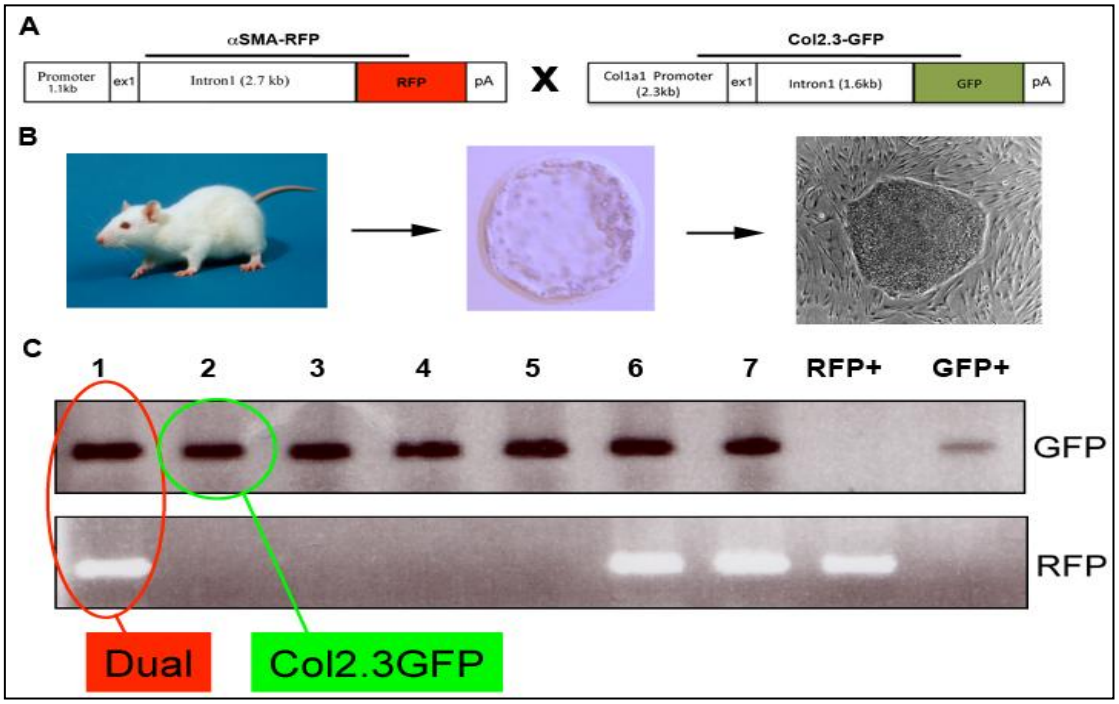


Slika 12. Izražaj koštanih biljega karakterističnih za zrele osteoblaste - osteokalcina (OC) i koštane sijalobjelančevine (BSP) - nultog (day 0) i devetog dana (day 9) koštane diferencijacije u kulturama αSMA+ stanica, uspoređen s izražajem istih biljega u koštanom tkivu (*bone*). SMA+ : stanice koje izražavaju transgen αSMARFP, bone- kost.

Koštana diferencijacija i aktivacija transgena procijenjena je u tri različita biološka pokusa te su prikazani rezultati najreprezentativnijeg pokusa. Ovi rezultati ukazuju da αSMARFP+ stanice imaju potencijal diferencijacije u osteoblaste i aktivacije konstrukta Col2.3GFP, što upućuje na to da predstavljaju populaciju mezenhimnih matičnih stanica. Rezultati navedenih metoda potvrdili su uspješnu *in vitro* diferencijaciju mezenhimnih matičnih stanica koštane srži u zrele osteoblaste.

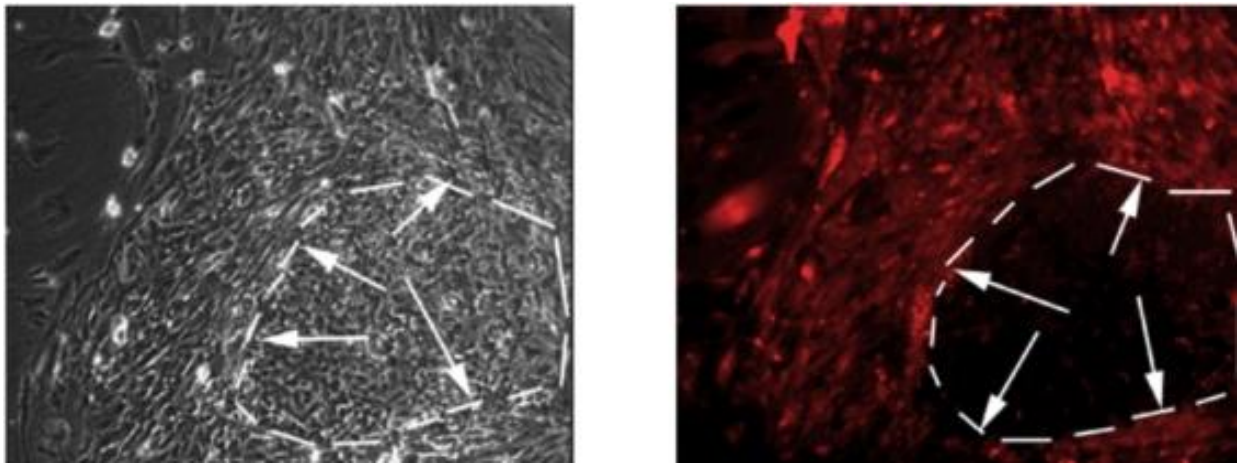
4.2. Stvaranje embrionalnih matičnih stanica iz dvostruko transgenskog miša

Za potrebe ovog istraživanja križani su heterozigotni αSMARFP i homozigotni Col2.3GFP miš te su iz blastocista nastalih embrija izdvojene EMS. EMS genotipizirane su metodom lančane reakcije polimerazinog tipa (PCR, od eng. *polymerase chain reaction*) korištenjem specifičnih primera GFP i RFP. Na Slici 13. vidljivo je da su dobivena tri različita klona stanica koja sadrže oba transgena (klon 1, klon 6, klon 7).



Slika 13. Stvaranje linija embrionalnih matičnih stanica. **A)** Konstrukti korišteni za stvaranje transgenskoga miša. Promotor αSMA upravlja izražajem RFP izvjestiteljskog transgena (αSMARFP), dok 2.3 kb fragment promotora za kolagen tip 1 upravlja izražajem GFP-a (Col2.3GFP). **B)** Križanjem tih dvaju transgenskih miševa dobijen je dvostruko transgenski miš iz kojega su dobivene linije EMS-a. **C)** Genotipiziranje EMS-a korištenjem dvaju setova primera koji razlikuju GFP od RFP-a. GFP - zelena fluorescentna bjelančevina; RFP - crvena fluorescentna bjelančevina.

Nakon izolacije, EMS su posađene u pločice za staničnu kulturu zajedno s mišjim embrionalnim fibroblastima u mediju koji sadrži LIF, kako bi se spriječila diferencijacija, a pritom održala proliferacija. Nakon uklanjanja embrionalnih mišjih fibroblasta i LIF-a iz staničnih kultura, EMS su počele spontano diferencirati. Pritom su poprimile fibroblastični oblik te je većina stanica izražavala αSMARFP signal (Slika 14.). Navedeno ukazuje na njihovo usmjeravanje prema mezenhimnim matičnim stanicama. Kao što je vidljivo iz Slike 14. αSMARFP signal nije izražen unutar samih kolonija EMS-a, ali je jako izražen u stanicama nalik fibroblastima koje okružuju kolonije EMS-a.

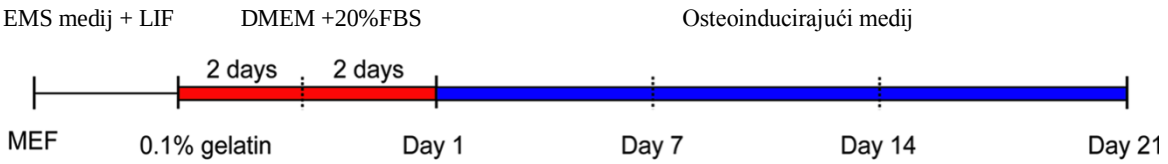


A **B**

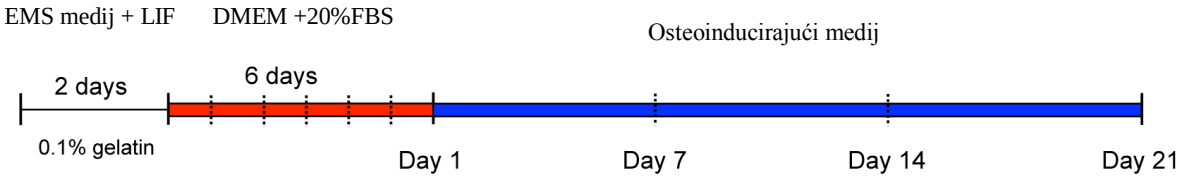
Slika 14. Prateći početak diferencijacije utvrđen je izražaj αSMARFP signala u stanicama koje okružuju koloniju EMS-a, dok izražaj αSMARFP signala u samoj koloniji EMS-a nije utvrđen. Morfološki izgled αSMARFP+ stanica je nalik fibroblastima. Razlika između dviju jasnih populacija označena je strelicama. **A)** svijetlo polje; **B)** RFP

4.3. Određivanja koštane diferencijacije EMS-a *in vitro* – histokemijska analiza

U ovom istraživanju korištene su metode iz prethodno objavljenih istraživanja u kojima su dodavanjem askorbinske kiseline i beta-glicerol fosfata uspješno poticali koštanu diferencijaciju EMS-a. Dva su protokola korištena u svrhu umnažanja i poticanja koštane diferencijacije EMS-a: 1) jednoslojna stanična kultura (Slika 15.) i 2) protokol koji uključuje stvaranje embrioidnih tijela (Slika 16.).



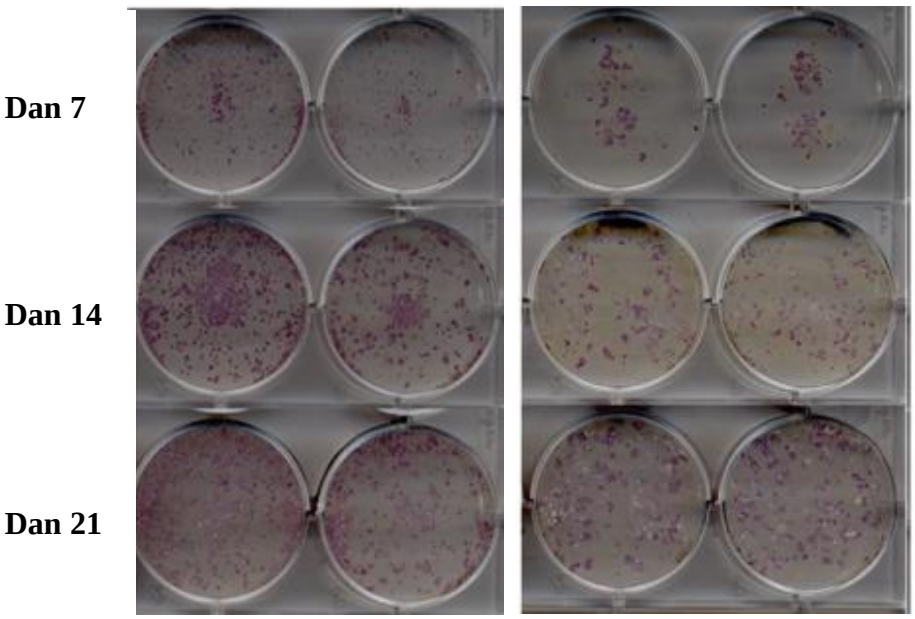
Slika 15. Protokol diferencijacije mišjih EMS-a – jednoslojna stanična kultura.



Slika 16. Protokol diferencijacije mišjih EMS-a – protokol koji uključuje stvaranja embrioidnih tijela.

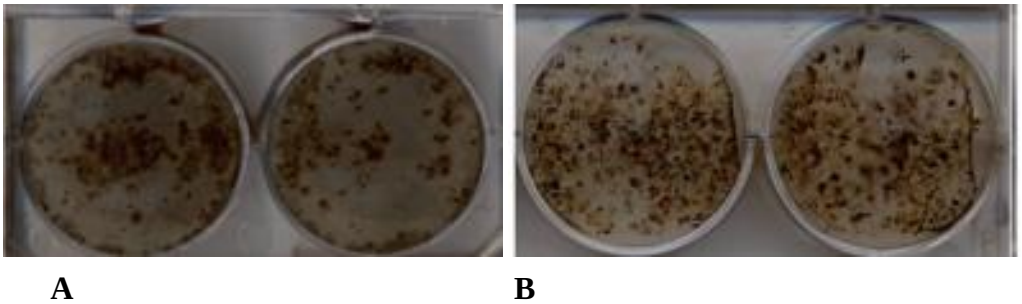
Tijekom dvadeset i jednog dana poticanja koštane diferencijacije, svakih je sedam dana (vremenski slijed: 7. dan; 14. dan; 21. dan) rađena procjena stupnja koštane diferencijacije. Korištene su uobičajene metode kao što su analiza aktivnosti alkalne fosfataze (bojenje na alkalnu fosfatazu) i analiza stvaranja mineraliziranog matriksa (metoda von Kossa bojenja).

EMS stare sedam dana su pokazale aktivnost alkalne fosfataze, koja je postala sve izraženija četrnaestog dana, a najveća je dvadeset i prvog dana. Nije primijećena znatna razlika u aktivnosti alkalne fosfataze s obzirom na vrstu protokola, osim četrnaestog dana starosti kulture kada je aktivnost AP jača u jednoslojnoj staničnoj kulturi (Slika 17. A, B).



Slika 17. Histokemijska analiza aktivnosti alkalne fosfataze u vremenskom slijedu 7.; 14.; 21. dan koštane diferencijacije EMS-a. **A** – protokol s jednoslojnom staničnom kulturom; **B** – protokol s embrioidnim tijelima

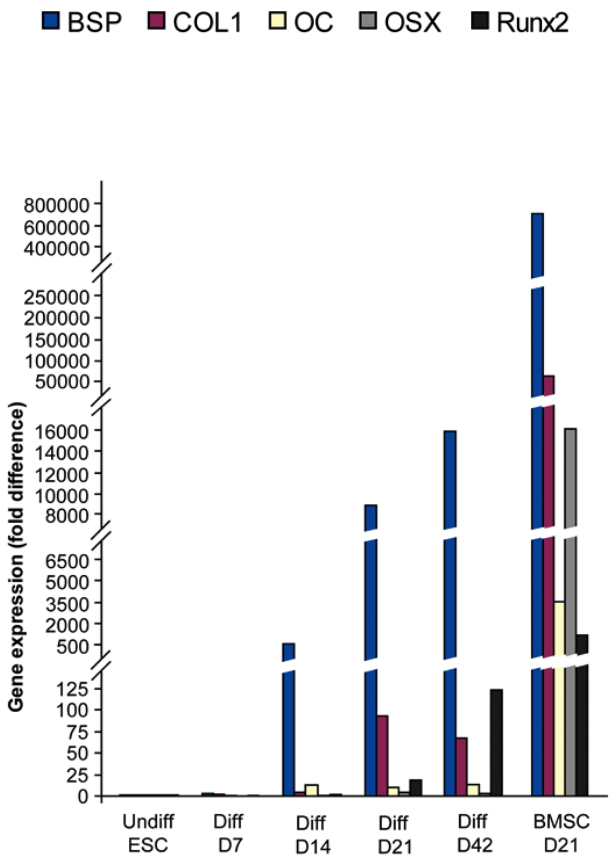
Dvadeset prvog dana je pomoću metode von Kossa bojenja potvrđeno stvaranje mineraliziranog matriksa u znatnom postotku staničnih kolonija izvedenih od EMS-a. Nema znatne razlike u razini mineralizacije s obzirom na vrstu protokola (Slika 18. A, B).



Slika 18. Histokemijska analiza mineralizacije metodom von Kossa bojenja dvadeset i prvog dana koštane diferencijacije EMS-a. **A** – protokol za jednoslojnu staničnu kulturu; **B** – protokol s embrioidnim tijelima.

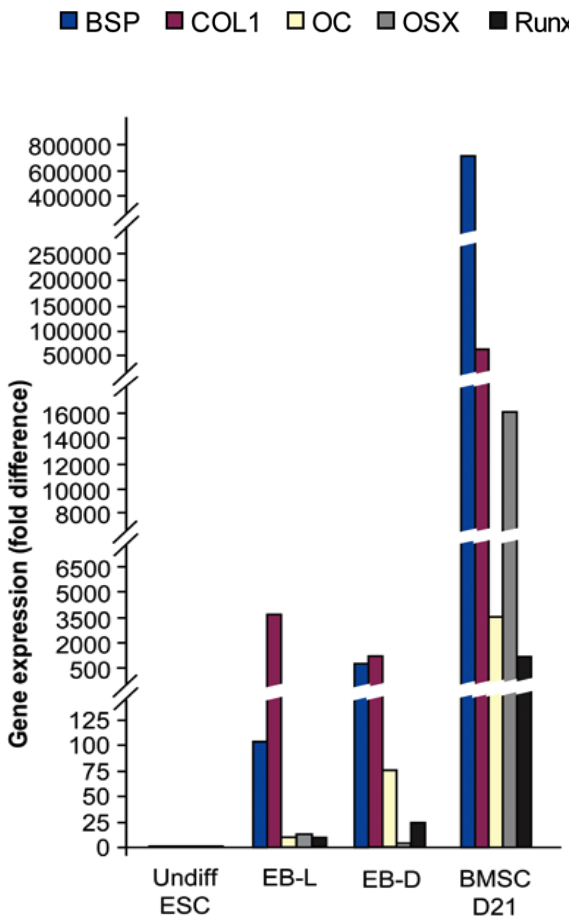
4.4. Određivanje koštane diferencijacije EMS-a *in vitro* - analiza izražaja osteoblastnih biljega

Nakon histokemijskih metoda, diferencijacija EMS-a prema stanicama osteoblastične loze dodatno je analizirana metodom RT- PCR. Određen je izražaj biljega karakterističnih za stanice osteoblastne loze: Runx2, osteriks, kolagen tip I, BSP i OC. Od stanica koje su usmjerene osteoblastnoj lozi očekuje se povećanje glavnih transkripcijskih faktora Runx2 i osteriks, nakon čega bi trebalo doći do povećanja u izražaju ostalih navedenih biljega osteoblastne loze: kolagena tip 1, BSP-a i OC-a (146). Rezultati ovog istraživanja pokazali su kako nijedan od navedenih biljega nije izražen u nediferenciranim EMS ili sedmog dana nakon poticanja koštane diferencijacije EMS-a, upotrebljavajući pritom protokol jednoslojne stanične kulture (Slika 19.). Tijekom četrnaestog dana uočeno je povećanje izražaja biljega BSP i kolagena tip 1. Runx2 biljeg otkriven je tek u četrdeset i drugom danu stanične kulture. Jedini biljeg koji je pokazao povećani izražaj tijekom osteogene diferencijacije je BSP. Izražaj biljega osteriks i biljega zrelih osteoblasta OC jako je nizak ili nije otkriven tijekom bilo kojeg stupnja diferencijacije. Kako bi se potvrdilo da razine koštanih biljega u kulturi EMS-a pokazuju minimalno povećanje, određen je izražaj koštanih biljega u kulturi MMS-a koštane srži nakon dvadeset i jednog dana poticanja koštane diferencijacije te su dobiveni rezultati međusobno uspoređeni. Vidljivo je kako je izražaj svih koštanih biljega u kulturi MMS-a koštane srži višestruko veći u odnosu na kulturu EMS-a.



Slika 19. Analiza izražaja osteoblastnih biljega kod nediferenciranih EMS-a, tijekom koštane diferencijacije transgenskih EMS-a (protokol jednoslojne stanične kulture) i MMS-a koštane srži. Određen je izražaj biljega Runx2, osteriksa (OSX), kolagena tip 1 (COL 1), BSP-a i OC-a. Nediferencirane EMS upotrebljavale su se za normalizaciju izražaja, a RNA iz MMS-a koštane srži kao pozitivna kontrola. Undiff ESC – nediferencirane EMS, Diff D7, D14, D21 i D42 – diferencirane EMS tijekom različitog vremenskog perioda, BMSC D21 – MMS koštane srži nakon 21-og dana koštane diferencijacije.

U drugoj seriji pokusa analizirana je diferencijacija EMS-a koje su dobivene digestijom od embrioidnih tijela (protokol s embrioidnim tijelima). Stanice su nakon digestije embrioidnih tijela umnožavane tijekom četiri dana u DMEM-u , nakon čega je potaknuta osteogeneza (EB-D) ili su nakon digestije izravno podvrgnute osteogenezi (EB-L). Određivan je izražaj osteoblastnih biljega metodom RT-PCR nakon dvadeset i jednog dana koštane diferencijacije. Slično kao kod jednoslojne stanične kulture EMS-a, otkrivene su samo niske razine biljega kolagena tip 1, BSP-a i vrlo niska razina OC-a. Izražaj svih ostalih koštanih biljega nije vidljiv ili je jako nizak u usporedbi s diferenciranim MMS koštane srži (Slika 20.).

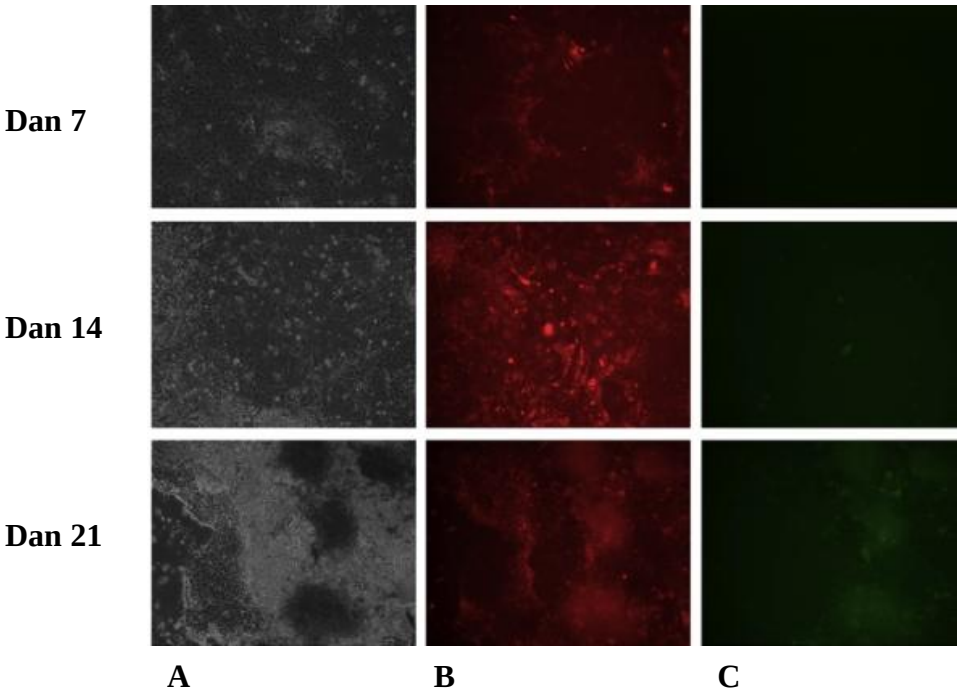


Slika 20. Analiza izražaja osteoblastnih biljega kod nediferenciranih EMS-a, tijekom koštane diferencijacije transgenskih EMS-a (protokol s embrioidnim tijelima) i MMS-a koštane srži. Određen je izražaj biljega Runx2, osteriksa (OSX), kolagena tip 1 (COL 1), BSP-a i OC-a. Nediferencirane EMS upotrebljavale su se za normalizaciju izražaja, a RNA iz MMS-a koštane srži kao pozitivna kontrola. Undiff ESC – nediferencirane EMS, EB-L- izravno diferencirane EMS, EB-D- EMS diferencirane nakon 4 dana u DMEM-u, BMSC D21 – MMS koštane srži nakon 21-og dana koštane diferencijacije.

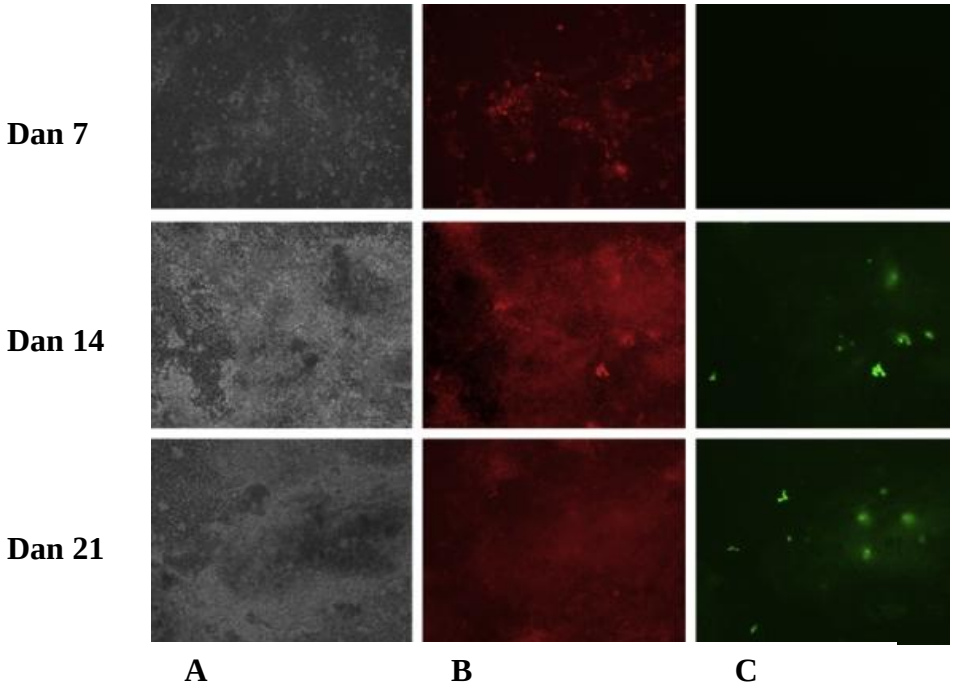
4.5. Određivanje koštane diferencijacije EMS-a pomoću izvjestiteljskih transgena

Osim standardnih metoda, u svrhu određivanja koštane diferencijacije EMS-a praćen je izražaj izvjestiteljskih transgena αSMARFP i Col2.3GFP u osteostimuliranim kulturama EMS-a (Slika 21. i 22.). Izražaj mezenhimnog biljega αSMARFP primijećen je u stanicama oko kolonija EMS-a već sedmoga dana, dok biljeg Col2.3GFP u tom periodu nije vidljiv. Daljnjom kultivacijom u mediju za koštanu diferencijaciju izražaj biljega αSMARFP pojačava

se kao posljedica diferencijacije EMS-a u mezenhimne stanice. Četrnaestog dana starosti kulture uočen je maksimalan izražaj biljega αSMARFP, međutim nije uočena aktivnost biljega zrelih osteoblasta Col2.3GFP. Izražaj oba biljega nije pokazao nikakve razlike s obzirom na korišteni protokol diferencijacije EMS-a (protokol s jednoslojnom staničnom kulturom i protokol s embrioidnim tijelima). Nakon dvadeset i jedan dan koštane diferencijacije, izražaj αSMARFP biljega znatno je smanjen. Usprkos prisutnosti mineraliziranih kolonija, detekcija izražaja Col2.3GFP u kulturama EMS-a diferenciranih po protokolu jednoslojne stanične kulture nije bila moguća (Slika 21- dan 21). Signal GFP-a nije primijećen ni nakon produžetka kultivacije do 42 dana. Vidljiv je samo pozadinski signal mineraliziranog matriksa zelenkaste boje. Kultura EMS-a koja je diferencirana po protokolu s embrioidnim tijelima pokazala je svega nekoliko stanica koje izražavaju biljeg Col2.3GFP (Slika 22.- 14 i 21 dan).

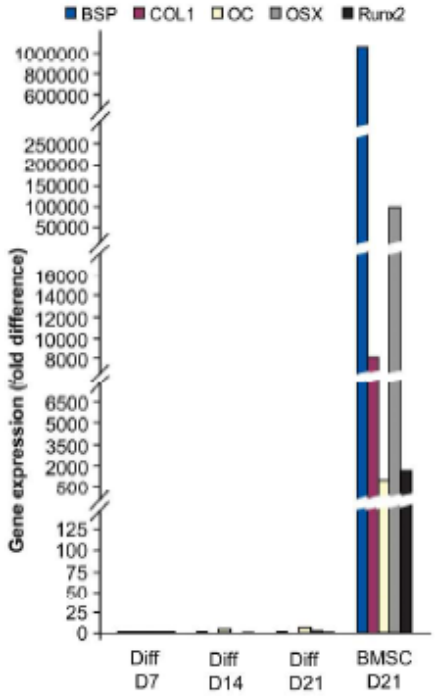


Slika 21. Kultura EMS-a diferenciranih po protokolu jednoslojne stanične kulture. A-svijetlo polje; B – RFP signal; C – GFP signal. Epifluorescentno snimanje za GFP nije pokazalo aktivnost signala GFP-a, vidljiv je samo pozadinski signal mineraliziranog matriksa zelenkaste boje. Signal RFP-a najizraženiji je četrnaestog dana stanične kulture.

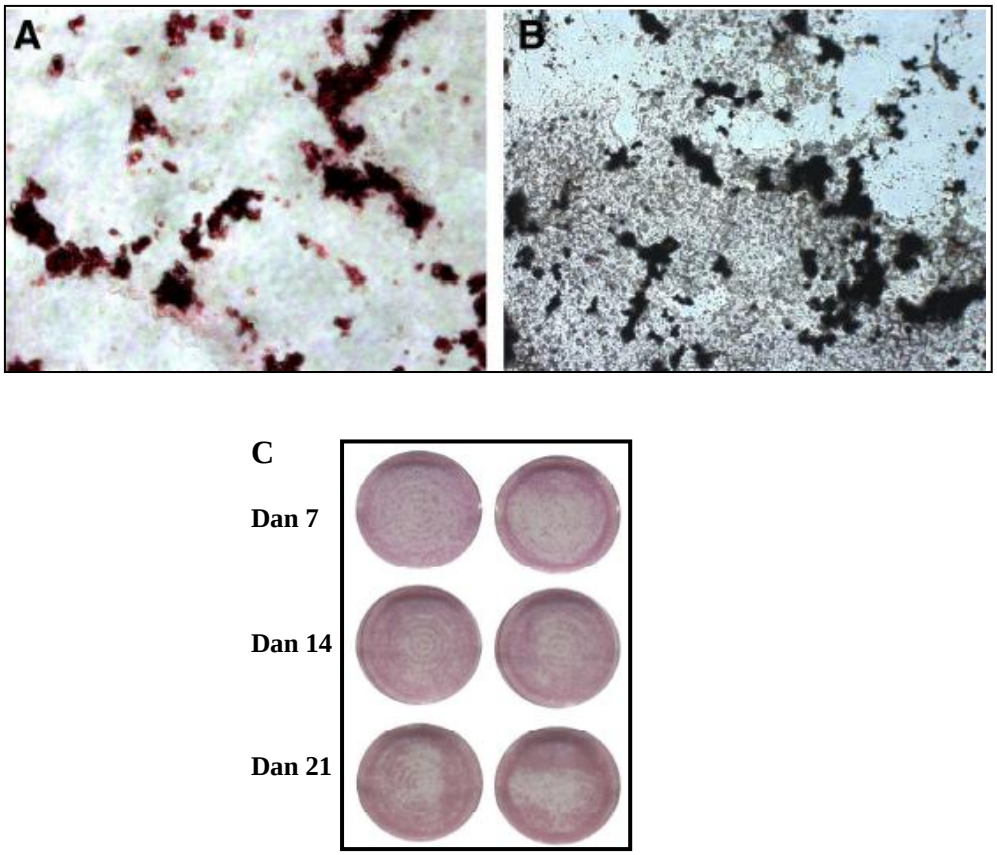


Slika 22. Kultura EMS-a diferenciranih po protokolu s embrioidnim tijelima. A-svijetlo polje; B – RFP signal; C- GFP signal. Epifluorescentno snimanje za GFP nije pokazalo aktivnost signala GFP-a sedmog dana. Vidljivo je svega nekoliko stanica koje izražavaju biljeg Col2.3GFP 14. i 21. dana stanične kulture.

Nakon izostanka znatnije aktivacije biljega Col2.3GFP i slabog izražaja specifičnih osteoblastnih biljega u kulturama transgenskih EMS-a, bilo je potrebno isključiti mogućnost da gensko inženjerstvo utječe na diferencijacijske mogućnosti transgenskih EMS-a. U svrhu potvrđivanja da transgeni nisu utjecali na diferencijaciju embrionalnih matičnih stanica, napravljen je pokus u kojemu je potaknuta koštana diferencijacija EMS-a divljeg tipa (netransgenskog miša) koristeći se istim protokolom s jednoslojnom staničnom kulturom. Nakon provedene analize izražaja osteoblastnih gena metodom RT-PCR također je uočen slab izražaj svih glavnih osteoblastnih biljega (Slika 23.). Navedene kulture EMS-a divljeg tipa pokazale su sličnu aktivnost AP i sličan stupanj mineralizacije (Slika 24.).



Slika 23. Analiza izražaja osteoblastnih biljega metodom RT-PCR tijekom 7., 14. i 21. dana (D7, D14, D21) koštane diferencijacije EMS-a divljeg tipa (netransgenskog miša) (protokol jednoslojne stanične kulture) u usporedbi s diferenciranim MMS koštane srži (21 dan). Određen je izražaj biljega Runx2, osteriksa (OSX), kolagena tip 1 (COL 1), BSP-a i OC-a. Prikazani su rezultati jednog od dva neovisna pokusa.

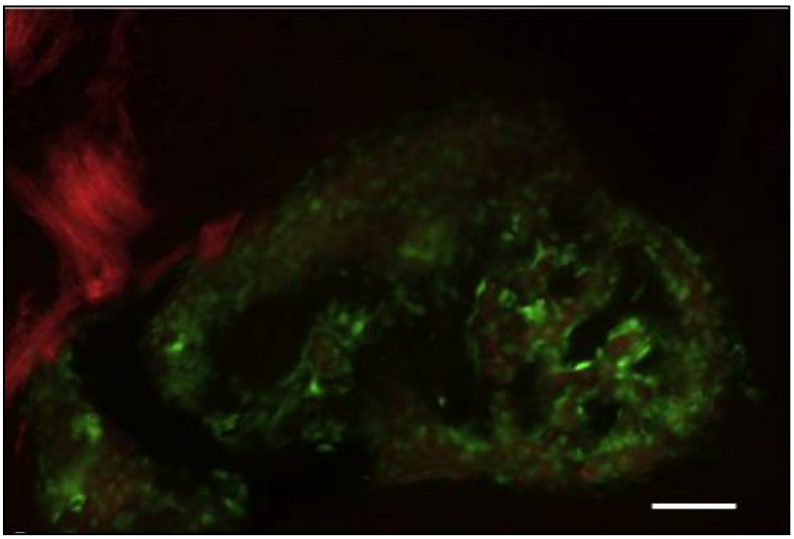


Slika 24. Histokemijska analiza kulture EMS-a divljeg tipa diferencirane po protokolu jednoslojne stanične kulture tijekom 21 dan. **A**- Alizarin red bojenje 21. dana starosti stanične kulture; **B**-von Kossa bojenje 21. dana stanične kulture. Slike A i B načinjene su fazno-kontrastnim mikroskopom (povećanje 100x). **C**- Analiza aktivnosti alkane fosfataze 7., 14., 21. dana stanične kulture.

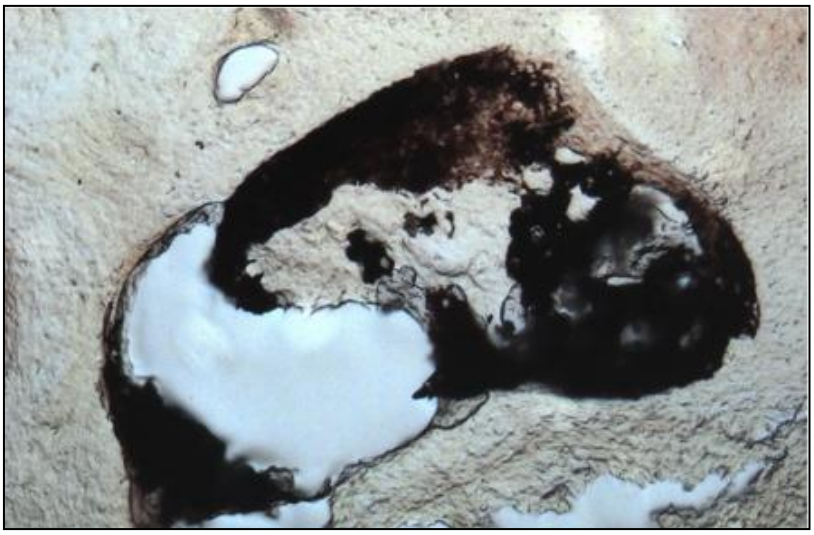
4.6. Određivanje koštane diferencijacije EMS-a *in vivo* – stvaranje teratoma

U svrhu određivanja sposobnosti koštane diferencijacije EMS-a i aktivacije biljega Col2.3GFP *in vivo*, proveden je pokus intramuskularne transplantacije – tzv. teratom model. Nediferencirane EMS od dvostruko transgenskog miša umnožene su te transplantirane u bedreni mišić imunodeficijentnog miša. Prisutnost tumorskoga tkiva potvrđena je šest tjedana nakon implantacije. Tumorsko tkivo je izdvojeno i pripremljeno za histološku obradu. Na histološkim preparatima vidljiv je snažan signal Col2.3GFP-a u pojedinim područjima (Slika

25.). Navedena su područja pozitivno obojena primjenom metode von Kossa bojenja, što je znak prisutnosti mineraliziranog tkiva (Slika 26.). Navedeni rezultati potvrđuju da zreli osteoblasti koji izražavaju Col2.3GFP mogu nastati diferencijacijom EMS-a u funkcionalnom modelu *in vivo*. Genski konstrukt Col2.3GFP može se upotrijebiti kako bi se potvrdila koštana diferencijacija EMS-a.



Slika 25. Određivanje izražaja biljega Col2.3GFP *in vivo* tijekom stvaranja teratoma.
Embrionalne matične stanice koje su dobivene od αSMARFP/Col2.3GFP transgenskog miša transplantirane su u femoralni mišić imunodeficijentnog miša. U novostvorenom teratomskom tkivu vidljiv je snažan izražaj signala Col2.3GFP.



Slika 23. Metoda von Kossa bojenja istog preparata koja potvrđuje prisutnost mineraliziranog tkiva u područjima u kojima je izražen Col2.3GFP. U pokusu su korištena četiri miša kojima su embrionalne matične stanice ubrizgane u femoralni mišić .

5. RASPRAVA

Mezenhimne matične stanice koštane srži i embrionalne matične stanice već su neko vrijeme predmet najaktivnijih istraživanja u području transplantacijske regeneracijske medicine i koštanog tkivnog inženjerstva. U osnovi, matične stanice umnažaju se *in vitro* kako bi se postigao zadovoljavajući broj stanica, potom se usmjeravaju prema osteoblastnoj lozi, a onda se koštane progenitorne stanice ili preosteoblasti nasađeni na trodimenzionalne nosače transplantiraju na željeno mjesto u organizmu. Transplantirani preosteoblasti ili osteoblasti bi trebali djelovati osteoinduktivno i ubrzati integraciju transplantiranog grafta s tkivom domaćina (176). Nužno je razviti dobro definirane, precizne i efikasne protokole s točno preciziranom metodologijom, poznatim dodatcima i njihovim količinama koji će rezultirati diferencijacijom matične stanice u točno željenom smjeru, bez kontaminacije s neželjenim staničnim lozama. Osobito je važno spriječiti moguće stvaranje teratoma ako se upotrebljavaju embrionalne matične stanice (177). Takvi bi protokoli omogućili kliničku uporabu matičnih stanica kod ljudi. Osim toga, takvi bi protokoli omogućili korištenje matičnih stanica kao modela za proučavanje osteogeneze i koštanog razvoja *in vitro*. Osteogeneza je visoko složeni proces tijekom razvoja, pregradnje i cijeljenja kosti u kojemu koštane progenitorne stanice bivaju privučene na željenu lokaciju te se u interakciji sa susjednim stanicama i bjelančevinama međustanične tvari diferenciraju u osteoblaste. Na današnjem stupnju znanstvenih spoznaja koštana diferencijacija matičnih stanica *in vitro* može samo do određenog stupnja prikazati taj proces. Krajnji rezultat koštane diferencijacije *in vitro* mineralizirani je matriks formiran od strane diferenciranih osteoblasta, dok stvaranje *in vitro* potpunog morfološki strukturiranog tkiva kosti nije do sada opisano u literaturi. Očigledno je da su signali koji su potrebni stanicama koštane loze za organizaciju u funkcionalne koštane jedinice prisutni u ektopičnom području nakon transplantacije, a nisu prisutni u *in vitro* uvjetima (137). Iznimno je teško rasvijetliti složene molekularne mehanizme i signalne puteve koji kontroliraju proces stvaranja koštanog tkiva *in vivo*. Matične stanice predstavljaju model koji je lako podložan molekularnoj karakterizaciji i genetičkoj manipulaciji. Također, osteodiferencirane matične stanice su dobar poligon za razvoj farmakokinetičkih i citotoksično/genotoksičnih *screening* testova za biomaterijale i lijekove koji se rabe u koštanoj patologiji (178).

Do ovog trenutka napravljena su mnogobrojna istraživanja i mnoštvo je studija objavljeno o uspješnoj *in vitro* i *in vivo* koštanoj diferencijaciji mišjih MMS koštane srži i EMS-a (83, 124-

126, 135, 160, 179). Mnogo je dodataka korišteno u svrhu promocije diferencijacije ovih stanica prema osteoblastnoj lozi. Nakon mnogo objavljenih rezultata istraživanja razvijen je relativno jednostavan i jeftin osteogeni hranjivi medij koji se danas najviše upotrebljava. Radi se o hranjivom mediju αMEM s dodatkom fetusnog goveđeg seruma, antibiotika, askorbinske kiseline i β-glicerol fosfata. U ovom istraživanju korišten je upravo taj hranjivi osteogeni medij za poticanje koštane diferencijacije MMS-a koštane srži i EMS-a.

Većina do sad objavljenih istraživanja koristila su se standardnim metodama za dokazivanje koštane diferencijacije matičnih stanica u zrele osteoblaste (124, 125). To su analiza izražaja gena karakterističnih za osteoblaste, histokemijske metode bojenja na alkalnu fosfatazu te von Kossa i *Alizarin red* bojenja, koja služe kao potvrda mineralizacije.

Cilj je ovog istraživanja bio procijeniti sposobnost koštane diferencijacije mišjih MMS-a koštane srži i EMS-a *in vitro*, te sposobnost koštane diferencijacije mišjih EMS-a *in vivo*. U istraživanju su korištene spomenute uobičajene metode dokazivanja koštane diferencijacije (aktivnost alkalne fosfataze, stupanj mineralizacije i analiza izražaja osteoblastnih gena). Osim toga, matične su stanice dobivene iz dvostruko transgenskih miševa koji su nositelji vizualnih biljega mezenhimnih matičnih stanica (αSMARFP) i osteoblasta (Col2.3GFP) (151, 180). To je omogućilo praćenje diferencijacije iste stanične kulture od stadija matične stanice do eventualnog stadija osteoblasta, bez potrebe za prekidom razvoja kulture. Uz standardne metode dokazivanja koštane diferencijacije, aktivacija izvjestiteljskih gena (GFP i RFP) karakterističnih za stadij mezenhimne matične stanice i stadij zrelog osteoblasta, dodatno je potvrdila diferencijaciju prema osteoblastima. Razvoj transgenskih modela mišjih matičnih stanica i pouzdanih stadij-specifičnih vidljivih izvjestiteljskih biljega otvara široke mogućnosti kontrole učinkovitosti i pouzdanosti protokola za koštanu diferencijaciju matičnih stanica. Učinak različitih dodataka na proces koštane diferencijacije matičnih stanica može biti učinkovito testiran na transgenskim mišjim modelima.

Diferencijacija MMS-a koštane srži koje su dobivene od dvostruko transgenskog miša (αSMARFP/Col2.3GFP) prema stanicama koštane linije procijenjena je *in vitro*. Veliki je broj biljega korišten u svrhu identifikacije mezenhimnih matičnih stanica koštane srži. Biljezi koji se uobičajeno upotrebljavaju za označavanje ljudskih stanica su CD-146 (181) i Stro-1 (182), dok se biljezi nestin (183), αSMA (184) i osteriks (185) uobičajeno upotrebljavaju za identifikaciju populacije mišjih mezenhimnih matičnih stanica koštane srži. Opredijeljenost mezenhimnih matičnih stanica koštane srži prema koštanoj liniji i diferencijacija prema

osteoblastima jasno je definirana. Transkripcijski čimbenici koji imaju glavnu ulogu u regulaciji izražaja osteoblastnih gena su prepoznati, to su Runx2 i osteriks. Oni se upotrebljavaju kao biljezi koji označavaju stadij koštanih progenitora. Stadij preosteoblasta označen je izražajem alkalne fosfataze (58), OP-a, i BSP-a. Stadij zrelih osteoblasta može biti procijenjen temeljem izražaja biljega kao što su OC i DMP-1. Uz navedene biljege, u ovom istraživanju uspješno su upotrijebljeni vizualni biljezi kako bi se označili različiti stadiji koštane stanične linije. Rezultati istraživanja Kalajzića i sur. ukazuju na to da je izražaj biljega αSMARFP karakterističan za stadij mezenhimne matične stanice, dok je izražaj biljega Col2.3GFP karakteristika zrelih osteoblasta (146, 151, 184). Rezultati navedenih istraživanja ukazuju na to da se mezenhimne matične stanice koje pokazuju izražaj biljega αSMARFP mogu diferencirati u zrele osteoblaste i aktivirati izražaj Col2.3GFP. Rezultati ovoga istraživanja u skladu su s rezultatima prethodno navedenih istraživanja. Nakon izolacije, MMS koštane srži hranjene su u bazalnim uvjetima tijekom sedam dana te su sedmog dana sortirane s obzirom na izražaj biljega αSMARFP. Postotak stanica koje izražavaju biljeg αSMARFP iznosio je 23.5 %. Kulture stanica koštane srži su heterogene, tako da većinu stanica sedmog dana u kulturi čine stanice hematopoetske loze, većinom makrofazi. Biljeg αSMARFP je aktivan u stanicama fibroblastičnog izgleda te nije aktivan u stanicama hematopoetske loze. Sortirane stanice su diferencirane prema koštanoj staničnoj liniji koristeći se pri tome osteodiferencirajućim hranjivim medijem. Rezultati istraživanja ukazuju na smanjenje aktivnosti transgena αSMARFP devetog dana osteogene stimulacije, što ukazuje na početak diferencijacije stanica u smjeru osteoblastnih progenitora i zrelih osteoblasta. Devetog dana starosti kulture također je primijećena snažna aktivnost biljega zrelih osteoblasta Col2.3GFP, što je jasno vidljivo u kompozitnom prikazu kojim su preklopljene slike kulture snimljene GFP i RFP filterima (Slika 10.). Aktivnost zrelih osteoblasta i posljedično stvaranje mineraliziranog matriksa potvrđeno je metodom von Kossa bojenja. Dokazana je prisutnost mineralizacije devetog dana stanične kulture, dok prije dodavanja osteoinduktivnih faktora nema tragova mineraliziranog matriksa (Slika 11.). Konačnu potvrdu sposobnosti diferencijacije MMS-a koštane srži u zrele osteoblaste dala je analiza izražaja biljega karakterističnih za zrele osteoblaste. Metodom RT-PCR određen je izražaj biljega OC i BSP. Rezultati su pokazali cca 2500 x povećanje relativne razine biljega BSP u staničnim kulturama devetog dana osteodiferencijacije u odnosu na nulti dan osteodiferencijacije (Slika 12.). Razina biljega BSP u diferenciranim kulturama MMS-a koštane srži približna je razini BSP u zrelom koštanom tkivu. Također je primjećeno povećanje (cca 750 x) biljega OC. S

obzirom na to da OC predstavlja biljeg zrelih osteoblasta, logično je da povećanje njegove relativne razine nije toliko izraženo jer je devetog dana osteodiferencijacije samo dio stanica dosegao stadij zrelog osteoblasta. Navedeni rezultati ukazuju na uspješnu diferencijaciju MMS-a koštane srži u zrele osteoblaste. Također, potvrđeno je da stanice koje izražavaju biljeg αSMARFP predstavljaju populaciju mezenhimnih matičnih stanica te imaju sposobnost aktivacije biljega Col2.3GFP, odnosno potencijal diferencijacije u zrele osteoblaste. Uspješan protokol koštane diferencijacije MMS-a koštane srži naveden u ovom istraživanju u skladu je s rezultatima drugih autora koji su također uspješno diferencirali MMS koštane srži (83).

Nakon što je potvrđena sposobnost koštane diferencijacije MMS-a koštane srži, sljedeći je cilj ovog istraživanja bio procijeniti sposobnost diferencijacije mišjih EMS-a u stanice koštane linije. Rezultati prethodno objavljenih istraživanja (186, 187) navode dva različita protokola koštane diferencijacije EMS-a: protokol s embrioidnim tijelima i izravni diferencijacijski protokol. U ovom istraživanju korištena su oba protokola u svrhu procjene njihove učinkovitosti.

Za diferencijaciju EMS-a prema koštanoj liniji nužna je njihova diferencijacija kroz međustadij mezenhimne matične stanice. Za identifikaciju stadija MMS-a upotrijebljen je vizualni biljeg αSMARFP, a za identifikaciju stadija zrelih osteoblasta biljeg Col2.3GFP. Diferencijacija EMS-a, koje su dobivene od dvostruko transgenskog miša, prema stanicama koštane linije procijenjena je *in vitro* (primarna kultura EMS-a) i *in vivo* (intramuskularnom transplantacijom stanica i posljedičnim stvaranjem teratoma).

Nakon uklanjanja embrionalnih mišjih fibroblasta i LIF-a iz staničnih kultura potaknuta je diferencijacija EMS-a prema koštanoj staničnoj liniji te je procjenjivana tijekom tri tjedna. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da stanice poprimaju fibroblastični oblik te da većina stanica izražava signal αSMARFP. Navedeno ukazuje na njihovo usmjeravanje prema mezenhimnim matičnim stanicama. Kao što je vidljivo na Slici 14., signal αSMARFP nije izražen unutar samih kolonija EMS-a, ali je jako izražen u stanicama nalik fibroblastima koje okružuju kolonije EMS-a.

Nakon prvog tjedna primijećena je aktivnost alkalne fosfataze u kulturama EMS-a, koja se blago povećavala tijekom tri tjedna kultivacije. Metodom von Kossa bojenja dokazana je prisutnost mineraliziranog matriksa nakon 21 dana osteodiferencijacije, što bi trebalo predstavljati potvrdu diferencijacije EMS-a u zrele osteoblaste. Rezultati nisu pokazali razliku

u aktivnosti alkalne fosfataze i razini mineralizacije s obzirom na vrstu protokola za diferencijaciju EMS-a.

Prema rezultatima Kalajzića i sur. (180), i rezultatima ovog istraživanja, kultura MMS-a koštane srži pokazuje postupno povećanje u izražaju biljega karakterističnih za koštano tkivo tijekom navedenog vremenskog perioda osteodiferencijacije. Dakle, znakovito je da stanice koje su usmjerene k osteoblastnoj lozi pokazuju povećanje glavnih transkripcijskih faktora Runx2-a i osteriksa, nakon čega dolazi do povećanja u izražaju ostalih navedenih biljega osteoblastne loze: kolagena tip 1, BSP-a i OC-a (146). Rezultati ovog istraživanja pokazali su kako nijedan od navedenih biljega nije izražen u nediferenciranim EMS ili sedmog dana nakon poticanja koštane diferencijacije EMS-a. Tijekom četrnaestog dana uočili smo povećanje izražaja biljega BSP i kolagena tip 1. Biljeg Runx2 otkriven je tek u četrdeset i drugom danu jednoslojne stanične kulture. Jedini biljeg koji je pokazao povećani izražaj tijekom osteogene diferencijacije je BSP. Izražaj biljega osteriks i biljega zrelih osteoblasta OC jako je nizak ili nije otkriven tijekom bilo kojeg stupnja diferencijacije. Treba spomenuti kako otkrivanje malog porasta izražaja navedenih gena u koštano-diferenciranim kulturama EMS-a u odnosu na nediferencirane kulture EMS-a, koje općenito pokazuju mali ili nikakav izražaj koštanih biljega, nije dovoljno za potvrdu diferencijacije u zrele osteoblaste. Stoga je u ovom istraživanju uspoređena razina koštanih biljega u kulturi osteodiferenciranih EMS sa razinom koštanih biljega u osteodiferenciranoj kulturi MMS-a koštane srži. Niska razina izražaja svih osteoblastnih biljega u kulturama EMS-a osobito je vidljiva u usporedbi s razinom istih biljega u kulturi MMS-a koštane srži nakon dvadeset i jednoga dana poticanja koštane diferencijacije. Vidljivo je kako je izražaj svih koštanih biljega u kulturi MMS-a koštane srži nekoliko tisuća puta veći u odnosu na kulturu EMS-a. Također, dodatno je jednoslojna stanična kultura EMS-a procjenjivana tijekom kasnijeg vremenskog perioda (42. dan), u slučaju da se EMS diferenciraju sporije od MMS-a koštane srži. Međutim, izražaj koštanih biljega je slab i nakon 42 dana osteostimulacije. Jedini biljeg koji je pokazao snažniji porast bio je BSP. S obzirom da nije uočen jači izražaj drugih osteoblastnih biljega, navedeni jači izražaj BSP-a može se pripisati stanicama koje nisu osteoblasti, misleći pri tome na stanice koje su diferencirane iz EMS-a i sudjeluju u stvaranju placente *in vivo* (188).

Brojna prijašnja istraživanja potvrdila su uspješnu koštanu diferencijaciju embrionalnih matičnih stanica analizom stupnja mineralizacije i izražaja koštanih gena (126, 187, 189-191). U literaturi su također opisani i oprečni rezultati. Evans i sur. (192) su u svom istraživanju

uspoređivali stupanj mineralizacije i izražaj osteoblastnih gena između primarnih kultura mišjih EMS-a, MMS-a koštane srži i kalvarijskih osteoblasta kultiviranih u osteostimulirajućem mediju. Rezultati njihovog istraživanja su ukazali na veći stupanj mineralizacije kod kultura EMS-a za razliku od kultura MMS-a koštane srži i kalvarijskih osteoblasta. Međutim, razine osteoblastnih biljega (Runx2, AP, kolagen tip 1, OC) bile su 100 - 1000 x veće u kulturama MMS-a koštane srži i kalvarijskih osteoblasta u odnosu na kulture EMS-a. Autori su primijetili znatan broj mrtvih stanica u koštanim čvorićima. Zaključno, smatraju da se visoka razina mineraliziranog matriksa koja je utvrđena kod kulture EMS-a može pripisati distrofičnoj netipičnoj mineralizaciji vezanoj za slojeve nekrotičnih stanica, a ne sintezi posredovanoj zrelim osteoblastima. Slične rezultate navode Both i sur. (137). koji su primijetili smanjenu mogućnost diferencijacije mišjih i ljudskih EMS-a u stanice kosti. Rezultati ovog istraživanja *in vitro* u potpunosti su u skladu s istraživanjem Evansa i sur. (192) kao i s rezultatima Botha i sur. (137). Rezultati ovog i spomenutih istraživanja ukazuju na činjenicu da koštana diferencijacija EMS-a mora biti pažljivo promatrana jer izražaj alkalne fosfataze i prisutnost mineralizacije (pozitivno von Kossa i *Alizarin red* bojenje) nisu dovoljan kriterij za procjenu koštane diferencijacije EMS-a. Evans i sur. (192) smatraju da nakupljanje iona kalcija koji se pojavljuje tijekom koštane diferencijacije EMS-a u velikoj mjeri nije ovisno o osteoblastima. Naime, metoda bojenja *Alizarin red* otkriva prisutnost kalcija koji je vezan za anorganski anion, čime sama metoda nije specifična za otkrivanje mineralizacije posredovane osteoblastima. Kako su navedene metode nespecifične, proces koštane diferencijacije minimalno se mora potvrditi kombinacijom ovih metoda i metode analize izražaja gena specifičnih za koštano tkivo. Također, kako bi se sa sigurnošću potvrdila sposobnost matičnih stanica za koštanu diferencijaciju, prikladno je koristiti se modelima *in vivo,* kao što su ektopično stvaranje kosti i sposobnost cijeljenja koštanih defekata kritične veličine.

Kako bi došlo do koštane diferencijacije, hranjivom se mediju dodaje β-glicerolfosfat, koji bude hidroliziran djelovanjem osteoblastne alkalne fosfataze, čime nastaju fosfati potrebni za mineralizaciju koštanog matriksa (58). Budući da je alkalna fosfataza ključna za navedeni proces, nužno je istaknuti da je alkalna fosfataza izražena u drugim tkivima, kao i u nediferenciranim EMS prije početka koštane diferencijacije. Dakle, mineralizacija matriksa može biti posredovana alkalnom fosfatazom iz drugih stanica, a ne samo osteoblastnom alkalnom fosfatazom. Uobičajeni se protokoli za diferencijaciju koriste visokom koncentracijom egzogenog β-glicerolfosfata za koji prijašnja istraživanja navode da uzrokuje

distrofično odlaganje minerala (193, 194). Koristeći se protokolom koji nije uključivao β-glicerolfosfat u hranjivom mediju, Evans i sur. (192) nisu primijetili znatniju prisutnost Ca^{++} iona (metodom *Alizarin red*) u kulturama EMS-a, što može ukazivati na ulogu β-glicerolfosfata u procesu distrofične mineralizacije.

Nadalje, jedno od mogućih objašnjenja kojim se može objasniti stvaranje mineraliziranog matriksa u kulturi u kojoj nije došlo do osteoblastne diferencijacije, snažna je korelacija između mineralizacije i smrti stanice. Naime, poznato je da je patološka mineralizacija često povezana s apoptozom i nekrozom stanica *in vivo* (195). Poznato je da nekrotično tkivo stimulira nepravilnu mineralizaciju u uvjetima *in vivo* i *in vitro* zbog sklonosti nakupljanju netopljivih soli koje sadrže kalcij i fosfat (196-198). Nakupine EMS-a su debele višeslojne strukture pa postoji mogućnost da, zbog smanjene opskrbe hranjivim tvarima, stanice u centru podlegnu nekrozi i distrofičnoj kalcifikaciji.

Iz svega navedenog vidljiva je izrazita složenost u postupku interpretacije prisutnosti mineralizacije u kulturi koja je dobivena iz EMS-a.

U ovom istraživanju korišten je sustav vidljivih transgena kako bi se procijenio proces koštane diferencijacije *in vitro* i *in vivo*. Kalajzić i sur. u prethodnim su istraživanjima dokazali kako je promotor Col2.3 izražen u stanicama koje su sposobne stvarati minerale (osteoblastima) i u stanicama koje se nalaze u koštanom matriksu tj. osteocitima (180, 199). Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da kod dvostruko transgenske linije EMS-a koja je razvijena diferencijacija u osteoblastnu staničnu liniju može biti potvrđena izražajem biljega Col2.3GFP. Tri tjedna nakon što se jednoslojnoj staničnoj kulturi EMS-a dodavao medij za koštanu diferencijaciju, nije se primijetio izražaj biljega Col2.3GFP, iako je primijećena snažna aktivnost AP-a i taloženje minerala. U jednom od četiriju pokusa u kojima su upotrijebljene stanice dobivene iz embrioidnih tijela, dokazan je malen broj stanica koje izražavaju biljeg Col2.3GFP. Dakle, u uvjetima *in vitro* koštane diferencijacije izražaj biljega Col2.3GFP bio je minimalan ili nepostojeći. Nakon izostanka znatnije aktivacije biljega Col2.3GFP *in vitro* i slabog izražaja specifičnih osteoblastnih biljega u kulturama transgeničnih EMS-a, morala se isključiti mogućnost da je genetička manipulacija promijenila diferencijacijske sposobnosti transgenskih EMS. Stoga je u sljedećem pokusu potaknuta koštana diferencijacija EMS-a divljeg tipa (netransgenskog miša) koristeći se istim protokolom s jednoslojnom staničnom kulturom. Nakon provedene analize izražaja osteoblastnih gena metodom RT-PCR, također je vidljiv slab izražaj svih glavnih

osteoblastnih biljega (Slika 23). Navedene kulture EMS-a divljeg tipa pokazuju sličnu aktivnost AP-a i sličan stupanj mineralizacije, kao i kulture transgenskih EMS-a (Slika 24.). Zaključeno je da GFP transgeni nisu utjecali na diferencijaciju EMS-a.

Većina istraživanja u svojim protokolima za koštanu diferencijaciju EMS-a upotrebljava osnovne osteogene dodatke kao što su β-glicerolfosfat, askorbinska kiselina i deksametazon (124, 130). Buttery i sur. (124) u svom su istraživanju prvi upotrijebili spomenute dodatke te su nakon 21 dan kultivacije potvrdili prisutnost mineraliziranog matriksa metodama von Kossa i *Alizarin red* bojenja. Također, mineralizirani čvorići bili su pozitivni na kolagen tip 1 i osteokalcin. Suprotno navedenom istraživanju Butteryja i sur., rezultati istraživanja Evansa i sur.(192) ukazali su na veći stupanj mineralizacije kod kultura EMS-a u odnosu na kulture MMS-a koštane srži i kalvarijskih osteoblasta, koristeći se pritom istim dodatcima hranjivom mediju. Međutim, razine osteoblastnih biljega (Runx2, AP, kolagen tip 1, OC) bile su 100 - 1000 x veće u kulturama MMS-a koštane srži i kalvarijskih osteoblasta u odnosu na kulture EMS-a. Rezultati ovog istraživanja nisu potvrdili veliku učinkovitost navedenih osteostimulirajućih dodataka prilikom koštane diferencijacije EMS-a *in vitro*, te su u potpunosti u skladu s rezultatom Evansa i sur. Drugi su se istraživači koristili drugim dodatcima osnovnom hranjivom mediju kao što su: retinoična kiselina (125, 200), kompaktin (125), vitamin D3 (126), BMP 2 (125, 201) i FGF (202). Njihovi su rezultati pokazali da navedeni dodatci dovode do povećanog stvaranja mineraliziranog matriksa i povećanog izražaja koštano-specifičnih biljega kao što su OC, OP, osteonektin, BSP i AP. Korištenje različitih dodataka u protokolima onemogućuje izravnu usporedbu rezultata ovog i navedenih istraživanja.

Na temelju rezultata ovog istraživanja, evidentno je da je uspješnost koštane diferencijacije EMS-a *in vitro* manja u odnosu na koštanu diferncijaciju MMS-a koštane srži. EMS su pluripotentne stanice te moraju proći duži put diferencijacije, koji nakon razvoja triju zametnih listića, uključuje mezenhimni međustadij na putu do eventualnog nastanka zrelih osteoblasta. S druge strane, MMS koštane srži već su usmjerene prema stanicama mezenhimne loze, uključujući i osteoblastnu lozu. Tako određeni postotak MMS-a koštane srži izražava osteoblastni biljeg AP. Bez obzira na to, ne mora nužno značiti da sve stanice koje su AP pozitivne imaju sposobnost stvaranja koštanog tkiva *in vivo* (95). Iz navedenog je vidljivo da je puno zahtjevnije pronaći uspješne i precizne protokole za koštanu

diferencijaciju EMS-a, ali je isto tako nužan oprezan pristup prilikom analize sposobnosti koštane diferencijacije MMS-a koštane srži.

Kako bi se dokazalo da se transgen Col2.3GFP ipak može aktivirati u zrelim osteoblastima dobivenim iz transgenskih EMS-a, u drugoj seriji pokusa napravljena je procjena koštane diferencijacije transgenskih EMS-a *in vivo*. Nediferencirane transgenske EMS transplantirane su u bedreni mišić imunodeficijentnog miša kako bi se stvorio teratom. Rezultati su ukazali na prisutnost koštanog tkiva unutar teratoma. Također je primijećena jaka aktivnost biljega Col2.3GFP u područjima u kojima se nalazilo koštano tkivo. Dakle, u uvjetima *in vivo* transgenske EMS pokazale su sposobnost spontane diferencijacije u zrele osteoblaste i aktivacije biljega Col2.3GFP. Navedeni rezultat potvrdio je korisnost izvjestiteljskog biljega Col2.3GFP kao biljega zrelih osteoblasta prilikom procjene koštane diferencijacije EMS-a. Rezultati ovog istraživanja u skladu su s rezultatima istraživanja Botha i sur.(137). Both i sur. u svom su istraživanju uspjeli dokazati diferencijaciju mišjih EMS-a u stanice koštane loze koristeći se također istim teratomskim modelom. U teratomskom modelu nediferencirane EMS spontano i nasumično diferenciraju u stanice sva tri zametna listića, a time i u koštano tkivo. Međutim, navedeni je model upotrijebljen samo kao potvrda sposobnosti diferencijacije EMS-a u stanice koštane loze, premda pluripotentnost nediferenciranih EMS-a i posljedična sposobnost stvaranja teratoma predstavlja veliki nedostatak koji otežava njihovu primjenu u tkivnom inženjerstvu. Iz svega navedenog, vidljiva je nužnost razvoja učinkovitog i preciznog protokola za usmjeravanje diferencijacije EMS-a u smjeru točno željene stanične loze, bez kontaminacije nepoželjnim staničnim lozama i stvaranja teratoma.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na nužnost opreznog pristupa prilikom procjene koštane diferencijacije EMS-a. Prisutnost pozitivnog bojenja na AP i mineralizacija nisu dovoljni pokazitelji prisutnosti zrelih osteoblasta. Snažna je osteogeneza obilježena jakim povećanjem izražaja osteokalcina, kao što je to vidljivo u primarnoj kulturi MMS-a koštane srži (180). EMS dobivene od αSMARFP/Col2.3GFP miša predstavljaju model koji se može upotrijebiti u svrhu procjene njihove sposobnosti za stvaranje kosti u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Jedna od zadaća budućih istraživanja jest pronalaženje detaljnih, točnih i uspješnih protokola kojima će se diferencijacija EMS-a ciljano usmjeriti prema zrelim osteoblastima, koristeći se pritom jasnim kriterijima kako bi se procijenila pripadnost koštanoj staničnoj liniji i funkcijska sposobnost osteoblasta za stvaranje koštanog matriksa. Pretraživanjem literature zaključeno je da je ovo istraživanje prvo koje je upotrijebilo izražaj transgena Col2.3GFP kao biljega zrelih

osteoblasta u osteodiferenciranoj kulturi EMS-a. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da transgenske EMS koje nose transgen Col2.3GFP, predstavljaju model pomoću kojega se može procijeniti koštana diferencijacija EMS-a.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na sljedeće zaključke:

1. MMS koštane srži dobivene iz dvostruko transgenskog miša αSMARFP/Col2.3GFP pokazuju izražaj αSMARFP biljega. Nakon poticanja koštane diferencijacije αSMARFP+ stanice se diferenciraju u Col2.3GFP+ stanice, tj. u zrele osteoblaste, pokazuju sposobnost mineralizacije i u znatnoj mjeri izražavaju tipične biljege zrelih osteoblasta (BSP, OC). MMS koštane srži imaju sposobnost diferencijacije u zrele osteoblaste u *in vitro* uvjetima.

2. EMS dobivene iz dvostruko transgenskog miša αSMARFP/Col2.3GFP pokazuju slabu aktivnost biljega Col2.3GFP nakon poticanja koštane diferencijacije u *in vitro* uvjetima. Također pokazuju slab porast koštanih diferencijacijskih biljega (kolagen tip 1, BSP, OC, Runx2 i osteriks), koji bi potvrdili diferencijaciju EMS-a u smjeru zrelih osteoblasta. Primijećena je znatna aktivnost AP-a i prisutnost mineraliziranog matriksa.

3. Rezultati upućuju na činjenicu da koštana diferencijacija EMS-a mora biti pažljivo promatrana jer izražaj alkalne fosfataze i prisutnost mineralizacije nisu dovoljan kriterij za potvrdu uspješne koštane diferencijacije EMS-a.

4. Rezultati pokazuju da je uspješnost koštane diferencijacije EMS-a *in vitro* znatno manja u odnosu na koštanu diferencijaciju MMS-a koštane srži, koristeći se pri tom standardnim protokolima za koštanu diferencijaciju matičnih stanica.

5. Dvostruko transgenske EMS pokazuju sposobnost diferencijacije u zrele osteoblaste koji izražavaju biljeg Col2.3GFP u funkcionalnom modelu *in vivo* – teratom model. Genski konstrukt Col2.3GFP može se upotrijebiti kako bi se potvrdila diferencijacija EMS-a u zrele osteoblaste.

6. MMS i EMS dobivene od transgenskog miša αSMARFP/Col2.3GFP predstavljaju model koji se može upotrijebiti u svrhu procjene njihove sposobnosti za stvaranje kosti u uvjetima *in vitro* i *in vivo*.

7. LITERATURA

1. Chung UI, Kawaguchi H, Takato T, Nakamura K. Distinct osteogenic mechanisms of bones of distinct origins. J Orthop Sci. 2004;9(4):410-4.
2. Karaplis AC. Embryonic Development of Bone and the Molecular Regulation of Intramembranous and Endochondral Bone Formation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principles of bone biology. San Diego, CA: Academic Press; 2002. p. 33-58.
3. Marks SC, Odgren PR. Structure and Development of the Skeleton. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principles of Bone Biology. San Diego, CA: Academic Press; 2002. p. 3-15.
4. Matić I. Uloga neuropeptida Y (NPY) u diferencijaciji osteoblasta [dissertation]. Zagreb: Prirodoslovno -matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.; 2013. 2 p.
5. Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. Genes Dev. 1999 Dec 1;13(23):3037-51.
6. van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. FASEB J. 1991 Oct;5(13):2814-23.
7. Prockop DJ. Mutations that alter the primary structure of type I collagen. The perils of a system for generating large structures by the principle of nucleated growth. J Biol Chem. 1990 Sep 15;265(26):15349-52.
8. Lane TF, Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. FASEB J. 1994 Feb;8(2):163-73.
9. Anderson HC. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. J Cell Biol. 1969 Apr;41(1):59-72.
10. Ali SY, Sajdera SW, Anderson HC. Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. Proc Natl Acad Sci U S A. 1970 Nov;67(3):1513-20.
11. Glimcher M. The nature of the mineral phase in bone; Biological and clinical i mplications. In: Avioli LV, Krane SM, editors. Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders. 3 ed. San Diego, CA: Academic Press; 1998. p. 23-51.
12. Bianco P, Riminucci M, Kuznetsov S, Robey PG. Multipotential cells in the bone marrow stroma: regulation in the context of organ physiology. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 1999;9(2):159-73.

13. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
14. Aubin JE, Liu F. The osteoblast lineage. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principles of Bone Biology. San Diego, CA: Academic Press; 1996 p. 51-67.
15. Takahashi N, Udagawa N, Suda T. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. Biochem Biophys Res Commun. 1999 Mar 24;256(3):449-55.
16. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell. 1998 Apr 17;93(2):165-76.
17. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature. 2003 Oct 23;425(6960):841-6.
18. Jensen ED, Gopalakrishnan R, Westendorf JJ. Regulation of gene expression in osteoblasts. Biofactors. 2010 Jan-Feb;36(1):25-32.
19. Stein GS, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Frenkel B, Montecino M. Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principles of Bone Biology. San Diego, CA: Academic Press; 1996. p. 69-86.
20. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. Science. 2000 Sep 1;289(5484):1501-4.
21. Franz-Odendaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. Dev Dyn. 2006 Jan;235(1):176-90.
22. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. J Bone Miner Res. 1998 May;13(5):793-802.
23. Mikuni-Takagaki Y, Kakai Y, Satoyoshi M, Kawano E, Suzuki Y, Kawase T, et al. Matrix mineralization and the differentiation of osteocyte-like cells in culture. J Bone Miner Res. 1995 Feb;10(2):231-42.
24. Kalajzic I. Identifikacija i karakterizacija stadija diferencijacije stanica osteoblastične loze [dissertation]. Split: Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu; 2005. 17 p.

25. Schroeder TM, Jensen ED, Westendorf JJ. Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. Birth Defects Res C Embryo Today. 2005 Sep;75(3):213-25.
26. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. Cell. 2003 May 30;113(5):631-42.
27. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell. 1997 May 30;89(5):747-54.
28. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. Cell. 1997 May 30;89(5):765-71.
29. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. Cell. 1997 May 30;89(5):755-64.
30. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell. 2002 Jan 11;108(1):17-29.
31. Nakashima K, de Crombrugghe B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. Trends Genet. 2003 Aug;19(8):458-66.
32. Yang X, Matsuda K, Bialek P, Jacquot S, Masuoka HC, Schinke T, et al. ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. Cell. 2004 Apr 30;117(3):387-98.
33. Hughes FJ, Collyer J, Stanfield M, Goodman SA. The effects of bone morphogenetic protein-2, -4, and -6 on differentiation of rat osteoblast cells in vitro. Endocrinology. 1995 Jun;136(6):2671-7.
34. Maeda S, Hayashi M, Komiya S, Imamura T, Miyazono K. Endogenous TGF-beta signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells. EMBO J. 2004 Feb 11;23(3):552-63.
35. Canalis E, Centrella M, McCarthy T. Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. J Clin Invest. 1988 May;81(5):1572-7.
36. Naganawa T, Xiao L, Abogunde E, Sobue T, Kalajzic I, Sabbieti M, et al. In vivo and in vitro comparison of the effects of FGF-2 null and haplo-insufficiency on bone formation in mice. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Jan 13;339(2):490-8.

37. Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. Periodontol 2000. 2006;41:48-72.
38. Hill TP, Spater D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. Dev Cell. 2005 May;8(5):727-38.
39. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. Dev Cell. 2005 May;8(5):739-50.
40. Kalajzic I, Braut A, Guo D, Jiang X, Kronenberg MS, Mina M, et al. Dentin matrix protein 1 expression during osteoblastic differentiation, generation of an osteocyte GFP-transgene. Bone. 2004 Jul;35(1):74-82.
41. Nijweide PJ, Burger EH, Klein-Nulend J, . The Osteocyte. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principles of Bone Biology. Sand Diego, CA: Academic Press; 2002. p. 93-107.
42. Noble BS, Reeve J. Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. Mol Cell Endocrinol. 2000 Jan 25;159(1-2):7-13.
43. Doty SB. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. Calcif Tissue Int. 1981;33(5):509-12.
44. Palumbo C, Palazzini S, Marotti G. Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation. Bone. 1990;11(6):401-6.
45. Yellowley CE, Li Z, Zhou Z, Jacobs CR, Donahue HJ. Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells. J Bone Miner Res. 2000 Feb;15(2):209-17.
46. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocr Rev. 2000 Apr;21(2):115-37.
47. Marks SC, Odgren PR. Structure and Development of the Skeleton. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principles of Bone Biology. Sand Diego, CA: Academic Press; Biology. 2002: p. 3-15.
48. Li Z, Kong K, Qi W. Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling. Biochem Biophys Res Commun. 2006 May 5;343(2):345-50.
49. Massey HM, Flanagan AM. Human osteoclasts derive from CD14-positive monocytes. Br J Haematol. 1999 Jul;106(1):167-70.

50. Hayase Y, Muguruma Y, Lee MY. Osteoclast development from hematopoietic stem cells: apparent divergence of the osteoclast lineage prior to macrophage commitment. Exp Hematol. 1997 Jan;25(1):19-25.
51. Horton MA, Nesbit MA, Helfrich MH. Interaction of osteopontin with osteoclast integrins. Ann N Y Acad Sci. 1995 Apr 21;760:190-200.
52. Bar-Shavit Z. The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. J Cell Biochem. 2007 Dec 1;102(5):1130-9.
53. Stenbeck G, Horton MA. A new specialized cell-matrix interaction in actively r esorbing osteoclasts. J Cell Sci. 2000 May;113 (Pt 9):1577-87.
54. Reddy SV, Scarcez T, Windle JJ, Leach RJ, Hundley JE, Chirgwin JM, et al. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the mouse tartrate-resistant acid phosphatase gene. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 1993;8(10):1263-70.
55. Quinn JM, Morfis M, Lam MH, Elliott J, Kartsogiannis V, Williams ED, et al. Calcitonin receptor antibodies in the identification of osteoclasts. Bone. 1999 Jul;25(1):1-8.
56. Inoue D, Shih C, Galson DL, Goldring SR, Horne WC, Baron R. Calcitonin-dependent down-regulation of the mouse C1a calcitonin receptor in cells of the osteoclast lineage involves a transcriptional mechanism. Endocrinology. 1999 Mar;140(3):1060-8.
57. Zaidi M, Blair HC, Moonga BS, Abe E, Huang CL. Osteoclastogenesis, bone resorption, and osteoclast-based therapeutics. J Bone Miner Res. 2003 Apr;18(4):599-609.
58. Weinreb M, Halperin D. Rat osteoclast precursors in vivo express a vitronectin receptor and a chloride-bicarbonate exchanger. Connect Tissue Res. 1998;37(3-4):177-82.
59. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. Endocr Rev. 1992 Feb;13(1):66-80.
60. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature. 1997 Nov 13;390(6656):175-9.
61. Darnay BG, Haridas V, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with

tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappab and c-Jun N-terminal kinase. J Biol Chem. 1998 Aug 7;273(32):20551-5.

62. Galibert L, Tometsko ME, Anderson DM, Cosman D, Dougall WC. The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily. J Biol Chem. 1998 Dec 18;273(51):34120-7.
63. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. Genes Dev. 1998 May 1;12(9):1260-8.
64. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. Nature. 1999 Jan 28;397(6717):315-23.
65. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell. 1997 Apr 18;89(2):309-19.
66. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. J Bone Miner Res. 2000 Jan;15(1):2-12.
67. Selander KS, Harkonen PL, Valve E, Monkkonen J, Hannuniemi R, Vaananen HK. Calcitonin promotes osteoclast survival in vitro. Mol Cell Endocrinol. 1996 Sep 18;122(2):119-29.
68. Hughes DE, Dai A, Tiffee JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. Nat Med. 1996 Oct;2(10):1132-6.
69. Coetzee M, Kruger MC. Osteoprotegerin-receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand ratio: a new approach to osteoporosis treatment? South Med J. 2004 May;97(5):506-11.
70. Pillow RP, Epstein RB, Buckner CD, Giblett ER, Thomas ED. Treatment of bone-marrow failure by isogeneic marrow infusion. N Engl J Med. 1966;275(2):94-7.
71. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation. 1968 Mar;6(2):230-47.

72. Hodgkinson T, Yuan X-F, Bayat A. Adult stem cells in tissue engineering. Expert Rev Med Devices. 2009;6(6):621-40.
73. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23(7):1185-9.
74. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001;98(14):7841-5.
75. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. International review of cytology. 1976;47:327-59.
76. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 1991 Sep;9(5):641-50.
77. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. Stem cells (Dayton, Ohio). 2001;19(3):180-92.
78. Post S, Abdallah BM, Bentzon JF, Kassem M. Demonstration of the presence of independent pre-osteoblastic and pre-adipocytic cell populations in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Bone. 2008;43(1):32-9.
79. Chen FH, Tuan RS. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. Arthritis Res Ther. 2008;10(5):223.
80. Dennis JE, Carbillet J-P, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. Cells, tissues, organs. 2002;170(2-3):73-82.
81. Arpornmaeklong P, Brown SE, Wang Z, Krebsbach PH. Phenotypic characterization, osteoblastic differentiation, and bone regeneration capacity of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev. 2009;18(7):955-68.
82. Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. Journal of cellular physiology. 2009;218(2):237-45.
83. Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, Okumura M, Fujinaga T. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. Cell Tissue Res. 2005 Feb;319(2):243-53.
84. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortesidis A, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. J Cell Sci. 2003 May 1;116(Pt 9):1827-35.

85. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. Experimental Hematology. 2003 Oct;31(10):890-6.
86. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. Lancet. 2008;371(9624):1579-86.
87. Gotherstrom C, Ringden O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, Le Blanc K. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. Am J Obstet Gynecol. 2004 Jan;190(1):239-45.
88. Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EGA, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. Blood. 2006;108(6):2114-20.
89. Coelho MJ, Cabral AT, Fernande MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in alpha-MEM and in DMEM. Biomaterials. 2000 Jun;21(11):1087-94.
90. Sugiura F, Kitoh H, Ishiguro N. Osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Mar 26;316(1):233-9.
91. Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, da Silva CL, Cabral JMS. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. Journal of cellular physiology. 2010;223(1):27-35.
92. Quarto R, Thomas D, Liang CT. Bone progenitor cell deficits and the age-associated decline in bone repair capacity. Calcif Tissue Int. 1995 Feb;56(2):123-9.
93. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. J Bone Miner Res. 1999 Jul;14(7):1115-22.
94. Zhang ZY, Teoh SH, Chong MS, Schantz JT, Fisk NM, Choolani MA, et al. Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2009 Jan;27(1):126-37.
95. Siddappa R, Licht R, van Blitterswijk C, de Boer J. Donor variation and loss of multipotency during in vitro expansion of human mesenchymal stem cells for bone

tissue engineering. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society. 2007;25(8):1029-41.

96. Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA. Cell-based bone tissue engineering. PLoS Med. 2007;4(2):e9.
97. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. Experimental hematology. 2004;32(5):414-25.
98. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. Journal of cellular biochemistry. 1997;64(2):295-312.
99. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. Bone. 1992;13(1):81-8.
100. Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. Biomaterials. 2000 Jun;21(11):1095-102.
101. Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. J Bone Miner Res. 2003 Oct;18(10):1842-53.
102. Sykaras N, Opperman LA. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? J Oral Sci. 2003 Jun;45(2):57-73.
103. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). J Bone Joint Surg Am. 2003 Aug;85-A(8):1544-52.
104. Mendes SC, Tibbe JM, Veenhof M, Both S, Oner FC, van Blitterswijk CA, et al. Relation between in vitro and in vivo osteogenic potential of cultured human bone marrow stromal cells. J Mater Sci Mater Med. 2004;15(10):1123-8.
105. Both SK, van der Muijsenberg AJC, van Blitterswijk CA, de Boer J, de Bruijn JD. A rapid and efficient method for expansion of human mesenchymal stem cells. Tissue engineering. 2007;13(1):3-9.
106. Bishop AE, Buttery LD, Polak JM. Embryonic stem cells. J Pathol. 2002 Jul;197(4):424-9.
107. Rathjen PD, Lake J, Whyatt LM, Bettess MD, Rathjen J. Properties and uses of embryonic stem cells: prospects for application to human biology and gene therapy. Reprod Fertil Dev. 1998;10(1):31-47.

108. Keller GM. In vitro differentiation of embryonic stem cells. Curr Opin Cell Biol. 1995 Dec;7(6):862-9.
109. Kim HS, Oh SK, Park YB, Ahn HJ, Sung KC, Kang MJ, et al. Methods for derivation of human embryonic stem cells. Stem cells (Dayton, Ohio). 2005;23(9):1228-33.
110. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 1981;292(5819):154-6.
111. Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997;94(11):5709-12.
112. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998;282(5391):1145-7.
113. Bielby RC, Boccaccini AR, Polak JM, Buttery LDK. In vitro differentiation and in vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells. Tissue engineering. 2004;10(9-10):1518-25.
114. Boyer LA, Mathur D, Jaenisch R. Molecular control of pluripotency. Curr Opin Genet Dev. 2006;16(5):455-62.
115. Cheng L, Gearing DP, White LS, Compton DL, Schooley K, Donovan PJ. Role of leukemia inhibitory factor and its receptor in mouse primordial germ cell growth. Development. 1994;120(11):3145-53.
116. Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. Annu Rev Cell Dev Biol. 2001;17:435-62.
117. Viswanathan S, Benatar T, Rose-John S, Lauffenburger DA, Zandstra PW. Ligand/receptor signaling threshold (LIST) model accounts for gp130-mediated embryonic stem cell self-renewal responses to LIF and HIL-6. Stem cells (Dayton, Ohio). 2002;20(2):119-38.
118. Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. Genes Dev. 1998;12(13):2048-60.
119. Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. Cell. 2003;115(3):281-92.

120. Gothard D. Enhanced Osteogenic Differentiation via Chemically Engineered Aggregation of Mouse Embryonic Stem Cells [dissertation]. Nottingham: University of Nottingham; 2009. 7 p.
121. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. Genes Dev. 2005;19(10):1129-55.
122. Raikwar SP, Mueller T, Zavazava N. Strategies for developing therapeutic application of human embryonic stem cells. Physiology (Bethesda). 2006;21:19-28.
123. Gruen L, Grabel L. Concise review: scientific and ethical roadblocks to human embryonic stem cell therapy. Stem cells (Dayton, Ohio). 2006;24(10):2162-9.
124. Buttery LD, Bourne S, Xynos JD, Wood H, Hughes FJ, Hughes SP, et al. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. Tissue engineering. 2001;7(1):89-99.
125. Phillips BW, Belmonte N, Vernochet C, Ailhaud G, Dani C. Compactin enhances osteogenesis in murine embryonic stem cells. Biochemical and biophysical research communications. 2001;284(2):478-84.
126. zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ. In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. Differentiation. 2003 Jan;71(1):18-27.
127. Kurosawa H. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. J Biosci Bioeng. 2007;103(5):389-98.
128. Hwang Y-S, Randle WL, Bielby RC, Polak JM, Mantalaris A. Enhanced derivation of osteogenic cells from murine embryonic stem cells after treatment with HepG2-conditioned medium and modulation of the embryoid body formation period: application to skeletal tissue engineering. Tissue engineering. 2006;12(6):1381-92.
129. Duplomb L, Dagouassat M, Jourdon P, Heymann D. Differentiation of osteoblasts from mouse embryonic stem cells without generation of embryoid body. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2007;43(1):21-4.
130. Karp JM, Ferreira LS, Khademhosseini A, Kwon AH, Yeh J, Langer RS. Cultivation of human embryonic stem cells without the embryoid body step enhances osteogenesis in vitro. Stem cells (Dayton, Ohio). 2006;24(4):835-43.
131. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. Mol Med. 2000;6(2):88-95.

132. Seong JM, Kim BC, Park JH, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang YS. Stem cells in bone tissue engineering. Biomed Mater. 2010 Dec;5(6):062001.
133. Hwang Y-S, Polak JM, Mantalaris A. In vitro direct osteogenesis of murine embryonic stem cells without embryoid body formation. Stem Cells Dev. 2008;17(5):963-70.
134. Beresford JN, Graves SE, Smoothy CA. Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: a model of bone formation? American journal of medical genetics. 1993;45(2):163-78.
135. Kawaguchi J, Mee PJ, Smith AG. Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors. Bone. 2005;36(5):758-69.
136. Lu CC, Brennan J, Robertson EJ. From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo. Curr Opin Genet Dev. 2001;11(4):384-92.
137. Both SK, van Apeldoorn AA, Jukes JM, Englund MCO, Hyllner J, van Blitterswijk CA, et al. Differential bone-forming capacity of osteogenic cells from either embryonic stem cells or bone marrow-derived mesenchymal stem cells. J Tissue Eng Regen Med. 2011;5(3):180-90.
138. Kalajzic I. Identifikacija i karakterizacija stadija diferencijacije stanica osteoblastične loze [dissertation]. Split: Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu; 2005. 23 p.
139. Zhuo L, Sun B, Zhang CL, Fine A, Chiu SY, Messing A. Live astrocytes visualized by green fluorescent protein in transgenic mice. Dev Biol. 1997 Jul 1;187(1):36-42.
140. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a s source of ubiquitous green cells. FEBS Lett. 1997 May 5;407(3):313-9.
141. Fleischmann M, Bloch W, Kolossov E, Andressen C, Muller M, Brem G, et al. Cardiac specific expression of the green fluorescent protein during early murine embryonic development. FEBS Lett. 1998 Dec 4;440(3):370-6.
142. Motoike T, Loughna S, Perens E, Roman BL, Liao W, Chau TC, et al. Universal GFP reporter for the study of vascular development. Genesis. 2000 Oct;28(2):75-81.
143. Krebsbach PH, Harrison JR, Lichtler AC, Woody CO, Rowe DW, Kream BE. Transgenic expression of COL1A1-chloramphenicol acetyltransferase fusion genes in bone: differential utilization of promoter elements in vivo and in cultured cells. Mol Cell Biol. 1993 Sep;13(9):5168-74.
144. Dacic S, Kalajzic I, Visnjic D, Lichtler AC, Rowe DW. Col1a1-driven transgenic markers of osteoblast lineage progression. J Bone Miner Res. 2001 Jul;16(7):1228-36.

145. Kalajzic Z, Liu P, Kalajzic I, Du Z, Braut A, Mina M, et al. Directing the expression of a green fluorescent protein transgene in differentiated osteoblasts: comparison between rat type I collagen and rat osteocalcin promoters. Bone. 2002;31(6):654-60.
146. Kalajzic I, Kalajzic Z, Kaliterna M, Gronowicz G, Clark SH, Lichtler AC, et al. Use of type I collagen green fluorescent protein transgenes to identify subpopulations of cells at different stages of the osteoblast lineage. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2002;17(1):15-25.
147. Walter I, Fleischmann M, Klein D, Muller M, Salmons B, Gunzburg WH, et al. Rapid and sensitive detection of enhanced green fluorescent protein expression in paraffin sections by confocal laser scanning microscopy. Histochem J. 2000 Feb;32(2):99-103.
148. Bogdanovic Z, Bedalov A, Krebsbach PH, Pavlin D, Woody CO, Clark SH, et al. Upstream regulatory elements necessary for expression of the rat COL1A1 promoter in transgenic mice. J Bone Miner Res. 1994 Feb;9(2):285-92.
149. Kalajzic I. Identifikacija i karakterizacija stadija diferencijacije stanica osteoblastične loze [dissertation]. Split: Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu; 2005. 69 p.
150. Kalajzic I. Identifikacija i karakterizacija stadija diferencijacije stanica osteoblastične loze [dissertation]. Split: Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu; 2005. 73 p.
151. Kalajzic Z, Li H, Wang LP, Jiang X, Lamothe K, Adams DJ, et al. Use of an alpha-smooth muscle actin GFP reporter to identify an osteoprogenitor population. Bone. 2008 Sep;43(3):501-10.
152. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. J Bone Miner Res. 2003 Apr;18(4):696-704.
153. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. Stem Cells. 2001;19(3):180-92.
154. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. Science. 1988 Jul 1;241(4861):58-62.
155. Van Vlasselaer P, Falla N, Snoeck H, Mathieu E. Characterization and purification of osteogenic cells from murine bone marrow by two-color cell sorting using anti-Sca-1 monoclonal antibody and wheat germ agglutinin. Blood. 1994 Aug 1;84(3):753-63.
156. Welm BE, Tepera SB, Venezia T, Graubert TA, Rosen JM, Goodell MA. Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population. Dev Biol. 2002 May 1;245(1):42-56.

157. Granero-Molto F, Weis JA, Longobardi L, Spagnoli A. Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. Expert Opin Biol Ther. 2008 Mar;8(3):255-68.
158. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. J Cell Physiol. 2007 Nov;213(2):341-7.
159. Gao C, Seuntjens J, Kaufman GN, Tran-Khanh N, Butler A, Li A, et al. Mesenchymal stem cell transplantation to promote bone healing. J Orthop Res. 2012 Aug;30(8):1183-9.
160. Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Satomura K, Emmons RV, Rowe DW, Robey PG. Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. Transplantation. 1997 Apr 27;63(8):1059-69.
161. Olivier EN, Rybicki AC, Bouhassira EE. Differentiation of human embryonic stem cells into bipotent mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2006 Aug;24(8):1914-22.
162. Stoeger T, Proetzel GE, Welzel H, Papadimitriou A, Dony C, Balling R, et al. In situ gene expression analysis during BMP2-induced ectopic bone formation in mice shows simultaneous endochondral and intramembranous ossification. Growth Factors. 2002 Dec;20(4):197-210.
163. Bacou F, el Andalousi RB, Daussin PA, Micallef JP, Levin JM, Chammas M, et al. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal muscle. Cell Transplant. 2004;13(2):103-11.
164. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. Nat Biotechnol. 2004 May;22(5):560-7.
165. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell. 2002 Dec;13(12):4279-95.
166. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 2001 Apr;7(2):211-28.
167. Duplomb L, Dagouassat M, Jourdon P, Heymann D. Concise review: embryonic stem cells: a new tool to study osteoblast and osteoclast differentiation. Stem cells (Dayton, Ohio). 2007;25(3):544-52.

168. Jukes JM, Both SK, Leusink A, Sterk LM, van Blitterswijk CA, de Boer J. Endochondral bone tissue engineering using embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 May 13;105(19):6840-5.
169. Brown SE, Tong W, Krebsbach PH. The derivation of mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells. Cells Tissues Organs. 2009;189(1-4):256-60.
170. Grcevic D, Pejda S, Matthews BG, Repic D, Wang L, Li H, et al. In vivo fate mapping identifies mesenchymal progenitor cells. Stem Cells. 2012 Feb;30(2):187-96.
171. Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, Yoshimoto G, et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. Blood. 2005 Sep 1;106(5):1565-73.
172. Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory manual. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, US; 2003. .
173. Liu Y, Wang L, Fatahi R, Kronenberg M, Kalajzic I, Rowe D, et al. Isolation of murine bone marrow derived mesenchymal stem cells using Twist2 Cre transgenic mice. Bone. 2010 Nov;47(5):916-25.
174. Stanford CM, Jacobson PA, Eanes ED, Lembke LA, Midura RJ. Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). J Biol Chem. 1995 Apr 21;270(16):9420-8.
175. Matic I. Uloga neuropeptida Y (NPY) u diferencijaciji osteoblasta [dissertation]. Zagreb: Prirodoslovno matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2013. 37 p.
176. Holy CE, Fialkov JA, Davies JE, Shoichet MS. Use of a biomimetic strategy to engineer bone. J Biomed Mater Res A. 2003 Jun 15;65A(4):447-53.
177. Trounson A. Human embryonic stem cells: mother of all cell and tissue types. Reprod Biomed Online. 2002;4 Suppl 1:58-63.
178. Heng BC, Cao T, Stanton LW, Robson P, Olsen B. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. J Bone Miner Res. 2004 Sep;19(9):1379-94.
179. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. Blood. 1994 Dec 15;84(12):4164-73.
180. Kalajzic I, Kalajzic Z, Kaliterna M, Gronowicz G, Clark SH, Lichtler AC, et al. Use of type I collagen green fluorescent protein transgenes to identify subpopulations of cells at different stages of the osteoblast lineage. J Bone Miner Res. 2002 Jan;17(1):15-25.

181. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. Cell. 2007 Oct 19;131(2):324-36.
182. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. J Bone Miner Res. 2003 Apr;18(4):696-704.
183. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, MacArthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. Nature. 2010 Aug 12;466(7308):829-U59.
184. Grcevic D, Pejda S, Matthews BG, Repic D, Wang LP, Li HT, et al. In Vivo Fate Mapping Identifies Mesenchymal Progenitor Cells. Stem Cells. 2012 Feb;30(2):187-96.
185. Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, et al. Osteoblast Precursors, but Not Mature Osteoblasts, Move into Developing and Fractured Bones along with Invading Blood Vessels. Developmental Cell. 2010 Aug 17;19(2):329-44.
186. Bielby RC, Boccaccini AR, Polak JM, Buttery LDK. In vitro differentiation and in vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells. Tissue Eng. 2004 Sep;10(9-10):1518-25.
187. Karp JM, Ferreira LS, Khademhosseini A, Kwon AH, Yeh J, Langer RS. Cultivation of human embryonic stem cells without the embryoid body step enhances osteogenesis in vitro. Stem Cells. 2006 Apr;24(4):835-43.
188. Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. Expression of Bone Sialoprotein (Bsp) in Developing Human Tissues. Calcified Tissue Int. 1991 Dec;49(6):421-6.
189. Buttery LDK, Bourne S, Xynos JD, Wood H, Hughes FJ, Hughes SPF, et al. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. Tissue Engineering. 2001 Feb;7(1):89-99.
190. Karner E, Backesjo CM, Cedervall J, Sugars RV, Ahrlund-Richter L, Wendel M. Dynamics of gene expression during bone matrix formation in osteogenic cultures derived from human embryonic stem cells in vitro. Bba-Gen Subjects. 2009 Feb;1790(2):110-8.
191. Kuznetsov SA, Cherman N, Robey PG. In Vivo Bone Formation by Progeny of Human Embryonic Stem Cells. Stem Cells Dev. 2011 Feb;20(2):269-87.

192. Evans ND, Swain RJ, Gentleman E, Gentleman MM, Stevens MM. Gene-expression analysis reveals that embryonic stem cells cultured under osteogenic conditions produce mineral non-specifically compared to marrow stromal cells or osteoblasts. Eur Cell Mater. 2012;24:211-23.

193. Orriss IR, Utting JC, Brandao-Burch A, Colston K, Grubb BR, Burnstock G, et al. Extracellular Nucleotides block bone mineralization in vitro: Evidence for dual inhibitory mechanisms involving both P2Y(2) receptors and pyrophosphate. Endocrinology. 2007 Sep;148(9):4208-16.

194. Gronowicz G, Woodiel FN, McCarthy MB, Raisz LG. In vitro mineralization of fetal rat parietal bones in defined serum-free medium: effect of beta-glycerol phosphate. J Bone Miner Res. 1989 Jun;4(3):313-24.

195. Magne D, Julien M, Vinatier C, Merhi-Soussi F, Weiss P, Guicheux J. Cartilage formation in growth plate and arteries: from physiology to pathology. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology. 2005 Jul;27(7):708-16.

196. Gadeau AP, Chaulet H, Daret D, Kockx M, Daniel-Lamaziere JM, Desgranges C. Time course of osteopontin, osteocalcin, and osteonectin accumulation and calcification after acute vessel wall injury. J Histochem Cytochem. 2001 Jan;49(1):79-86.

197. Hussmann J, Russell RC, Kucan JO, Khardori R, Steinau HU. Soft-tissue calcifications: differential diagnosis and therapeutic approaches. Ann Plast Surg. 1995 Feb;34(2):138-47.

198. Zhao Y, Urganus AL, Spevak L, Shrestha S, Doty SB, Boskey AL, et al. Characterization of dystrophic calcification induced in mice by cardiotoxin. Calcif Tissue Int. 2009 Sep;85(3):267-75.

199. Kalajzic I, Staal A, Yang WP, Wu YL, Johnson SE, Feyen JHM, et al. Expression profile of osteoblast lineage at defined stages of differentiation. Journal of Biological Chemistry. 2005 Jul 1;280(26):24618-26.

200. zur Nieden NI, Price FD, Davis LA, Everitt RE, Rancourt DE. Gene profiling on mixed embryonic stem cell populations reveals a biphasic role for beta-catenin in osteogenic differentiation. Mol Endocrinol. 2007 Mar;21(3):674-85.

201. zur Nieden NI, Kempka G, Rancourt DE, Ahr HJ. Induction of chondro-, osteo- and adipogenesis in embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2: effect of cofactors on differentiating lineages. BMC Dev Biol. 2005;5:1.

202. Shimko DA, Burks CA, Dee KC, Nauman EA. Comparison of in vitro mineralization by murine embryonic and adult stem cells cultured in an osteogenic medium. Tissue Eng. 2004 Sep-Oct;10(9-10):1386-98.

8. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA

Dario Repić rođen je 23. siječnja 1979. u Livnu, BiH. Osnovnu školu i opću gimnaziju završio je u Trogiru. Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 1997. godine. Dobitnik je stipendije Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta za osobito nadarene studente. Diplomirao je 27.2.2004. s odličnim prosjekom ocjena. Pripravnički staž odradio je u Domu zdravlja Splitsko-dalmatinske županije. Od 1.7.2006. do 9.4.2009. radio je u privatnoj Stomatološkoj ordinaciji Dario Repić, dr. stom. u Marini. U travnju 2009. primljen je na radno mjesto asistenta na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu, a u lipnju iste godine započinje specijalističko usavršavanje iz Endodoncije i restaurativne dentalne medicine na Klinici za stomatologiju KBC-a Zagreb za potrebe Medicinskog fakulteta u Splitu. Poslijediplomski doktorski studij Dentalna medicina upisao je 2009. godine na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Dobitnik je jednogodišnje stipendije Hrvatske zaklade za znanost za projekt pod nazivom „Koštani regeneracijski potencijal mezenhimnih matičnih stanica diferenciranih iz embrionalnih matičnih stanica u usporedbi s mezenhimnim matičnim stanicama odraslih". Projekt je realiziran od 14.2.2010. do 13.2.2011. na *University of Connecticut, Department of Reconstructive Sciences, School of Dental Medicine*, Farmington, SAD, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ive Kalajzića. Od 2010. godine sudjeluje kao istraživač na projektu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa, broj 065-0650445-0434, pod naslovom: „Epidemiološki aspekti endodoncije u Republici Hrvatskoj", pod mentorstvom prof. dr. sc. Silvane Jukić Krmek. Specijalistički ispit iz Endodoncije i restaurativne dentalne medicine položio je 19.6.2013. Član je Hrvatske komore dentalne medicine i Hrvatskog endodontskog društva.

Popis objavljenih radova:

1. **Repic D**, Torreggiani E, Franceschetti T, Matthews BG, Ivcevic S, Lichtler AC, Grcevic D, Kalajzic I. Utilization of transgenic models in the evaluation of osteogenic differentiation of embryonic stem cells. Connect Tissue Res. 2013;54(4-5):296-304. Epub 2013 Aug 26.
2. Grcevic D, Pejda S, Matthews BG, **Repic D**, Wang L, Li H, Kronenberg MS, Jiang X,Maye P, Adams DJ, Rowe DW, Aguila HL, Kalajzic I. In vivo fate mapping identifies mesenchymal progenitor cells. Stem Cells. 2012 Feb;30(2):187-96.

3. Jurela A, **Repic D**, Pejda S, Juric H, Vidakovic R, Matic I, Bosnjak A. The effect of two different bracket types on the salivary levels of S mutans and S sobrinus in the early phase of orthodontic treatment. Angle Orthod. 2013 Jan;83(1):140-5. Epub 2012 Jul 5.
4. Pejda S, Varga ML, Milosevic SA, Mestrovic S, Slaj M, **Repic D**, Bosnjak A. Clinical and microbiological parameters in patients with self-ligating and conventional brackets during early phase of orthodontic treatment. Angle Orthod. 2013 Jan;83(1):133-9. Epub 2012 Jul 3.
5. Pejda S, Juric H, **Repic D**, Jokic D, Medvedec I, Sudarevic K. Oral Health Changes during Early Phase of Orthodontic Treatment. Oral Hyg Health. 2013;1:110.