

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena M. Živković

**MODULATORNI EFEKAT MAKROFAGA
NA OSTEOGENI PROCES U
EKTOPIČNOM *IN VIVO* MODELU I U
RAZLIČITIM USLOVIMA *IN VITRO***

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Jelena M. Živković

**MODULATORY EFFECT OF
MACROPHAGES ON OSTEOGENIC
PROCESS IN ECTOPIC *IN VIVO* MODEL
AND IN DIFFERENT *IN VITRO*
CONDITIONS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Mentori:

dr Stevo Najman
Redovni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Nišu

dr Maja Čakić-Milošević
Docent Biološkog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

dr Jelena Živanov-Čurlis
Vanredni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Nišu

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Laboratoriji za eksperimentalnu medicinu i laboratorijama Odeljenja za ćelijsko i tkivno inženjerstvo Naučnoistraživačkog centra za biomedicinu, kao i laboratorijama Instituta za biologiju i humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Virtuelni koštano zglobovi sistema čoveka i njegova primena u pretkliničkoj i kliničkoj praksi” broj III41017.

Neizmerno sam zahvalna mentoru prof. dr Stevi Najmanu na ukazanom poverenju, strpljenju, razumevanju i nesebičnom prenošenju znanja i iskustava tokom svih godina našeg zajedničkog rada, kao i na idejama, korisnim savetima, velikoj stručnoj pomoći i ličnom angažovanju prilikom izrade i pisanja ove doktorske disertacije. Iskreno zahvaljujem prof. dr Stevi Najmanu na pruženoj šansi da se bavim naučno-istraživačkim radom i što me budno prati na mom putu profesionalnog sazrevanja.

Veliku zahvalnost dugujem mentoru doc. dr Maji Ćakić-Milošević jer je sa velikim interesovanjem pratila moj rad i napredak od upisa doktorskih studija. Doc. dr Ćakić-Milošević je uvek imala za mene strpljenje, razumevanje, dragocene savete i lepu reč, što mi je mnogo pomagalo i tokom studija i prilikom uobličavanja ove doktorske disertacije. Zahvaljujem doc. dr Ćakić-Milošević i na detaljnom pregledu i korekcijama teksta doktorske disertacije.

Prof. dr Jeleni Živanov-Čurlis se zahvaljujem na ukazanom poverenju, razumevanju, podršci i dobronamernim savetima.

Prof. dr Snežani Pajović dugujem veliku zahvalnost za bezrezervnu podršku i pomoć.

Zahvaljujem se prof. dr Aleksandri Korać na podstreku i spremnosti da pomogne u svakoj situaciji.

Osoblju Vivarijuma Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu zahvaljujem na pomoći u radu sa eksperimentalnim životinjama.

Laborantu Malinki Randelović zahvaljujem na tehničkoj pomoći u pojedinim fazama rada.

Laborantu Tanji Prokić zahvaljujem na tehničkoj pomoći u eksperimentalnom radu, prijateljstvu i podršci.

Veliko hvala kolegini Sanji Stojanović na nesebičnoj pomoći tokom eksperimentalnog rada u ćelijskoj kulturi, prijateljstvu i podršci.

Kolegama Jeleni Najdanović, Mariji Vukelić-Nikolić, Dragani Tričković-Vukić, Milici Stanisavljević, Mileni Aleksić i Vladimiru Cvetkoviću zahvaljujem na pomoći tokom različitih faza rada, prijateljstvu i podršci.

Beskrajno se zahvaljujem članovima moje porodice na ljubavi koja mi daje snagu, na podstreku da u životu uvek idem napred i bezgraničnom poverenju koje mi daje sigurnost. Ovu doktorsku disertaciju posvećujem njima.

MODULATORNI EFEKAT MAKROFAGA NA OSTEOGENI PROCES U EKTOPIČNOM *IN VIVO* MODELU I U RAZLIČITIM USLOVIMA *IN VITRO*

REZIME

U kliničkoj praksi velike povrede, bolesti ili nasledne malformacije često dovode do stvaranja velikih koštanih defekata, koji ne mogu spontano da zarastu. Popravka ovakvih koštanih defekata predstavlja već dugo vremena izazov za regenerativnu medicinu i tkivno inženjerstvo.

Proces zarastanja fraktura prolazi kroz tri faze: inflamacije, obnove i remodeliranja. Dakle, popravka koštanih defekata (fraktura) je okarakterisana inicijalnom inflamatornom reakcijom čiji su glavni akteri makrofagi. U odnosu na obilje literaturnih podataka o ulozi makrofaga u procesima zarastanja mekih tkiva, malo je podataka o njihovoj ulozi u procesima reparacije kosti.

Predmet ove doktorske disertacije je ispitivanje modulatornog efekta različito tretiranih makrofaga na ektopični osteogeni proces *in vivo*, kao i delovanja makrofaga različitog porekla i posle različitih tretmana na *in vitro* diferencijaciju preostablastnih ćelija.

Istraživanje je izvedeno na singenim miševima Balb/c soja, muškog pola, starosti 10-12 nedelja. Implanti su formirani od nosača za makrofage koji su imali i funkciju skafolda, a to su bili mineralni matriks kosti (MMK) i krvni ugrušak. Implanti su se međusobno razlikovali po tretmanu unetih peritonealnih makrofaga (PM). Kontrolni implantati nisu sadržavali makrofage, već samo nosače. Ispitivano je sedam tipova implanata koji su bili formirani od: nosača i rezidentnih (nestimulisanih) PM; nosača i tioglikolatom elicitiranih PM; nosača i PM tretiranih lipopolisaharidom u koncentraciji 5 ng/ml; nosača i PM tretiranih lipopolisaharidom u koncentraciji 500 ng/ml; nosača i PM tretiranih sa 5×10^{-6} M deksametazona; nosača MMK i krvnog ugruška; nosača MMK i fiziološkog rastvora. Pokazano je da osteogeni proces zavisi od načina tretmana makrofaga, pa je tako najizraženiji u implantima sa rezidentnim, kao i deksametazonom tretiranim makrofagima, dok je u implantima sa makrofagima tretiranim lipopolisaharidom u koncentraciji 500 ng/ml osteogeni proces inhibiran.

U okviru preliminarnih *in vitro* istraživanja urađena je morfološka i funkcionalna analiza rezidentnih i tioglikolatom elicitiranih PM, kao i rezidentnih PM tretiranih sa 1, 10 i 100 ng/ml lipopolisaharida. Morfologija ćelija je analizirana 24 h nakon tretmana. Funkcionalna analiza je obuhvatala ispitivanje sekretorne aktivnosti makrofaga primenom L929 bioeseja, kao i produkciju reaktivnih jedinjenja kiseonika semikvantitativnim NBT testom. Pokazano je da tioglikolatom elicitirani PM imaju morfološke i funkcionalne karakteristike inflamatornih makrofaga. Isto važi i za rezidentne PM tretirane lipopolisaharidom, pri čemu je efekat lipopolisaharida koncentracijski zavisao. Takođe, ispitan je i uticaj sekretornih priozvoda RAW 264.7 makrofaga posle različitih tretmana na osteogeni proces *in vitro*. RAW 264.7 makrofagi su tretirani sa 1 ng/ml i 100 ng/ml lipopolisaharida, 10^{-6} M deksametazonom ili nisu tretirani, a njihovi kondicionirani medijumi su korišćeni u eseju osteogene diferencijacije MC3T3-E1 preosteoblasta. Pokazano je da kondicionirani medijumi netretiranih ili deksametazonom tretiranih makrofaga ubrzavaju osteogeni proces, dok ga kondicionirani medijum makrofaga tretiranih sa 100 ng/ml lipopolisaharida usporava.

Svi naši eksperimentalni rezultati predstavljaju doprinos razumevanju mehanizama kojima su makrofagi uključeni u osteogeni proces. Generalno, ovi rezultati ukazuju na to da upravljanje funkcionalnim stanjem makrofaga može biti sredstvo za usmeravanje procesa osteogeneze i da je racionalna kontrola aktivnosti makrofaga značajna za kreiranje strategija koštano-tkivnog inženjerstva i kliničkog pristupa osteoregeneraciji. Na ovaj način proširuju se mogućnosti aktivnog delovanja na poboljšanje procesa obnavljanja koštanog tkiva posle povrede, što može biti primenljivo u tkivnom inženjerstvu i kliničkoj praksi.

KLJUČNE REČI: MAKROFAG, OSTEOGENEZA, IMPLANT, BALB/C MIŠ, TKIVNO INŽENJERSTVO, *IN VITRO*

NAUČNA OBLAST: BIOLOGIJA

UŽA NAUČNA OBLAST: BIOLOGIJA ĆELIJA I TKIVA

UDK BROJ: [576.32/.36 : 611.018.53] : [611.018.4 : 616.71-001.5](043.3)

MODULATORY EFFECT OF MACROPHAGES ON OSTEOGENIC PROCESS IN ECTOPIC *IN VIVO* MODEL AND IN DIFFERENT *IN VITRO* CONDITIONS

ABSTRACT

In clinical practice, major injuries, diseases or congenital malformations often lead to the formation of large bone defects, which can not heal spontaneously. Repair of these bone defects has long been a challenge for regenerative medicine and tissue engineering.

The process of fracture healing passes through three phases: inflammation, reparation and remodeling. So repair of bone defects (fractures) is characterized by an initial inflammatory response, whose main participants are macrophages. Compared to the abundance of literature data about the role of macrophages in the healing process of soft tissues, there is lack of information on their role in the process of bone repair.

The subject of this doctoral thesis was to investigate the modulatory effect of differently treated macrophages on ectopic osteogenic process, as well as effects of macrophages of different origin and after different treatments on osteogenic differentiation of preosteoblasts *in vitro*.

The study was performed on male Balb/c mice 10-12 weeks of age. Implants were formed from the carriers which served as scaffolds for macrophages and these were bone mineral matrix (BMM) and blood clot. Experimental implants contained differently treated peritoneal macrophages (PM). Control implants did not contain macrophages, but only cell carriers. We examined seven types of implants, which have been formed from: carriers and resident (non-stimulated) PM; carriers and thioglycollate elicited PM; carriers and PM treated with 5 ng/ml of lipopolysaccharide; carriers and PM treated with 500 ng/ml of lipopolysaccharide; carriers and PM treated with 5×10^{-6} M dexamethasone; BMM and blood clot; BMM and saline. The results of *in vivo* investigation showed that the osteogenic process depends on previous treatment of macrophages, and is the most pronounced in implants which contained resident PM or

PM treated with dexamethasone. Osteogenic process was inhibited in implants which contained PM treated with 500 ng/ml of lipopolysaccharide.

Within the preliminary *in vitro* studies a morphological and functional analysis of resident and thioglycollate elicited PM was performed, as well as analysis of resident PM treated with 1, 10 and 100 ng/ml of lipopolysaccharide. The morphology of the cells was analyzed 24 hours after treatment. Functional analysis included examination of secretory macrophage activity using L929 bioassay and the production of reactive oxygen species by semiquantitative NBT assay. It has been shown that the thioglycollate elicited PM have morphological and functional characteristics of inflammatory macrophages. The same was for PM treated with lipopolysaccharide, wherein the effect of lipopolysaccharide on macrophages depends on its concentration. Also, the effect of secretory products of RAW 264.7 macrophages after various treatments on osteogenic differentiation *in vitro* was investigated. RAW 264.7 macrophages were treated with 1 ng/ml or 100 ng/ml of lipopolysaccharide, 10^{-6} M dexamethasone or not treated, and their conditioned media were used in the osteogenic differentiation assay performed on MC3T3-E1 preosteoblasts. Conditioned media of untreated macrophages or macrophages treated with dexamethasone accelerate the osteogenic process, while conditioned medium of macrophages treated with 100 ng/ml lipopolysaccharide slows it down.

All our experimental results contribute to the understanding of mechanisms by which macrophages are involved in osteogenic process. Overall, these results indicate that the management of the functional state of macrophages could be a tool for directing the osteogenic process, expanding the possibilities of influencing the regeneration of bone tissue after injury. This may be applicable in bone tissue engineering and clinical practice.

KEY WORDS: MACROPHAGE, OSTEOGENESIS, IMPLANT, BALB/C MOUSE, TISSUE ENGINEERING, *IN VITRO*

SCIENTIFIC FIELD: BIOLOGY

SPECIAL TOPICS: CELL AND TISSUE BIOLOGY

UDC NUMBER: [576.32/.36 : 611.018.53] : [611.018.4 : 616.71-001.5](043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Problem istraživanja	1
1.2. Koštano tkivo	2
1.2.1. Čelije koštanog tkiva	3
1.2.1.1. Osteoblasti	3
1.2.1.2. Osteociti	5
1.2.1.3. Osteoklasti	6
1.2.1.4. Čelije koje oblažu koštano tkivo	8
1.2.2. Vanćelijski matriks koštanog tkiva	8
1.3. Veza između skeletnog i imunskog sistema	9
1.4. Makrofagi	10
1.4.1. Podela makrofaga prema njihovim funkcionalnim karakteristikama	11
1.5. Koštani defekti	13
1.5.1. Reparacija koštanih defekata	13
1.5.1.1. Faza inflamacije	14
1.5.1.2. Faza obnove (reparacije)	15
1.5.1.3. Faza remodeliranja	16
1.6. pristupi rešavanju problema velikih koštanih defekata- uloga regenerativne medicine i tkivnog inženjerstva	17
1.6.1. Biomaterijali	18
1.6.1.1. Autograft	19
1.6.1.2. Alograft	19
1.6.1.3. Ksenograft	20
2. PREDMET I CILJ ISTRAŽIVANJA	21
3. MATERIJAL I METODI	22
3.1. Eksperimenti <i>in vivo</i>	22
3.1.1. Eksperimentalne životinje	22
3.1.2. Implanti	22
3.1.2.1. Mineralni matriks kosti kao komponenta implanta	23
3.1.2.2. Krvni ugrušak kao komponenta implanta	23

3.1.2.3. Makrofagi kao komponenta implanta	24
<i>Kolektovanje peritonealnih makrofaga</i>	24
3.1.3. Formiranje implanata	25
3.1.3.1. Formiranje kontrolnih implanata	25
3.1.3.2. Formiranje implanata sa makrofagima	25
3.1.4. Implantacija i ekstrakcija implanata	26
3.1.5. Histomorfološka analiza svetlosnom mikroskopijom	28
3.1.5.1. Priprema implanata za svetlosno-mikroskopsku analizu	28
<i>Hematoksilin-eozin bojenje</i>	29
<i>Trihromno bojenje po Massonu</i>	29
<i>Toluidin-plavo bojenje</i>	29
<i>Imunohistohemijska bojenja streptavidin-biotin metodom</i>	30
3.2. Eksperimenti <i>in vitro</i>	31
3.2.1. Čelijske linije	31
3.2.1.1. L929 čelijska linija	31
3.2.1.2. MC3T3-E1 čelijska linija	31
3.2.1.3. RAW 264.7 čelijska linija	32
3.2.2. Kratkotrajne čelijske kulture makrofaga	32
3.2.3. Tretman rezidentnih peritonealnih makrofaga	32
lipopolisaharidom i kolektovanje kondicioniranog medijuma	
3.2.4. Tretman RAW 264.7 makrofaga lipopolisaharidom	33
i deksametazonom i kolektovanje kondicioniranog medijuma	
3.2.5. Metode za funkcionalnu analizu makrofaga	33
3.2.5.1. L929 bioesej za determinaciju TNF- α	33
<i>MTT test</i>	34
3.2.5.2. Mikroskopski NBT test	34
3.2.6. Osteogena diferencijacija <i>in vitro</i>	35
3.2.6.1. Test čelijske proliferacije	35
3.2.6.2. Osteogena diferencijacija MC3T3-E1 ćelija	36
3.2.7. Metode svetlosno-mikroskopskog ispitivanja	37
osteogeno diferenciranih ćelija	
<i>Bojenje Von Kossa</i>	37

<i>Imunocitohemijska bojenja streptavidin-biotin metodom</i>	37
4. REZULTATI	39
4.1. Rezultati <i>in vivo</i> istraživanja	39
4.1.1. Histološki nalaz nakon nedelju dana od implantacije	39
4.1.1.1. Implanti sa rezidentnim peritonealnim makrofagima - NM tip	39
4.1.1.2. Implanti sa tioglikolatom elicitiranim peritonealnim makrofagima - TM tip	41
4.1.1.3. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim nižom koncentracijom lipopolisaharida - LM1 tip	43
4.1.1.4. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim višom koncentracijom lipopolisaharida - LM2 tip	44
4.1.1.5. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim deksametazonom - DM tip	46
4.1.1.6. Implanti formirani kombinovanjem nosača makrofaga - K tip	47
4.1.1.7. Implanti od mineralnog matriksa kosti- B tip	49
4.1.2. Histološki nalaz nakon dve nedelje od implantacije	51
4.1.2.1. Implanti sa rezidentnim peritonealnim makrofagima - NM tip	51
4.1.2.2. Implanti sa tioglikolatom elicitiranim peritonealnim makrofagima - TM tip	52
4.1.2.3. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim nižom koncentracijom lipopolisaharida - LM1 tip	54
4.1.2.4. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim višom koncentracijom lipopolisaharida - LM2 tip	56
4.1.2.5. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim deksametazonom - DM tip	58
4.1.2.6. Implanti formirani kombinovanjem nosača makrofaga - K tip	60
4.1.2.7. Implanti od mineralnog matriksa kosti- B tip	61
4.1.3. Histološki nalaz nakon četiri nedelje od implantacije	63
4.1.3.1. Implanti sa rezidentnim peritonealnim makrofagima - NM tip	63
4.1.3.2. Implanti sa tioglikolatom elicitiranim peritonealnim makrofagima - TM tip	64
4.1.3.3. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim	66

nižom koncentracijom lipopolisaharida - LM1 tip	
4.1.3.4. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim	67
višom koncentracijom lipopolisaharida - LM2 tip	
4.1.3.5. Implanti sa peritonealnim makrofagima	69
tretiranim deksametazonom - DM tip	
4.1.3.6. Implanti formirani kombinovanjem nosača makrofaga - K tip	70
4.1.3.7. Implanti od mineralnog matriksa kosti- B tip	72
4.1.4. Histološki nalaz nakon osam nedelja od implantacije	74
4.1.4.1. Implanti sa rezidentnim peritonealnim makrofagima - NM tip	74
4.1.4.2. Implanti sa tioglikolatom elicitiranim peritonealnim	75
makrofagima - TM tip	
4.1.4.3. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim	77
nižom koncentracijom lipopolisaharida - LM1 tip	
4.1.4.4. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim	78
višom koncentracijom lipopolisaharida - LM2 tip	
4.1.4.5. Implanti sa peritonealnim makrofagima	80
tretiranim deksametazonom - DM tip	
4.1.4.6. Implanti formirani kombinovanjem nosača makrofaga - K tip	81
4.1.4.7. Implanti od mineralnog matriksa kosti- B tip	83
4.2. Rezultati <i>in vitro</i> istraživanja	85
4.2.1. Rezultati preliminarnih istraživanja	85
4.2.1.1. Morfološka i funkcionalna analiza rezidentnih	85
i tioglikolatom elicitiranih peritonealnih makrofaga	
4.2.1.1.1. Mikroskopska analiza	85
4.2.1.1.2. Funkcionalna analiza	86
<i>Sposobnost redukcije NBT</i>	86
<i>Citotoksična aktivnost kondicioniranih medijuma</i>	88
4.2.1.2. Morfološka i funkcionalna analiza rezidentnih	89
peritonealnih makrofaga tretiranih lipopolisaharidom	
4.2.1.2.1. Mikroskopska analiza	90
4.2.1.2.2. Funkcionalna analiza	91
<i>Sposobnost redukcije NBT</i>	91

<i>Citotoksična aktivnost kondicioniranih medijuma</i>	92
4.2.2. Istraživanja na RAW 264.7 ćelijskoj liniji	95
4.2.2.1. Morfološka i funkcionalna analiza	95
RAW264.7 makrofaga nakon tretmana	
4.2.2.1.1. Mikroskopska analiza	95
4.2.2.1.2. Funkcionalna analiza	97
<i>Citotoksična aktivnost kondicioniranih medijuma</i>	97
4.2.3. Osteogena diferencijacija MC3T3-E1 ćelija	101
u kondicioniranim medijumima	
4.2.3.1. Test ćelijske proliferacije	101
4.2.3.2. Mikroskopska analiza MC3T3-E1 ćelija u kulturi	102
nakon 3. i 6. dana kultivacije u osteogenom medijumu	
4.2.3.3. Ekspresija osteogenih markera posle osteogene indukcije	106
MC3T3-E1 ćelija ispitivana bojenjem <i>Von Kossa</i> i	
imunocitohemijskim bojenjima	
5. DISKUSIJA	110
5.1. <i>In vivo</i> istraživanja uloge makrofaga u osteogenezi	111
5.1.1. Proces resorpcije u ektopičnim implantima	111
5.1.2. Angiogeni potencijal ektopičnih implanata	114
5.1.3. Vezivno-tkivna arhitektura u ektopičnim implantima	118
5.1.4. Imunohistohemijska analiza ektopičnih implanata	123
5.1.5. Osteogeni potencijal ispitivanih ektopičnih implanata	125
5.2. Analiza povezanosti funkcinalnog stanja makrofaga	128
i osteoreparatornog procesa na modelima <i>in vitro</i>	
5.2.1. Rezidentni i tioglikolatom elicirani peritonealni makrofagi	129
imaju različite morfološke i funkcionalne karakteristike	
5.2.2. Uticaj lipopolisaharida na morfološke i funkcionalne	130
karakteristike rezidentnih peritonealnih makrofaga	
u kulturi zavisi od njegove koncentracije	
5.2.3. Lipopolisaharid i deksametazon imaju različit efekat	131
na RAW 264.7 makrofage u kulturi	
5.2.4. Modulatorni efekat makrofaga na osteogenu diferencijaciju	133

čelija <i>in vitro</i>	
5.3. Mogućnosti za kontrolisanje osteogenog procesa pomoću delovanja na makrofage	136
6. ZAKLJUČCI	140
7. LITERATURA	143
BIOGRAFIJA AUTORA	I
Izjava o autorstvu	II
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	III
Izjava o korišćenju	IV

1. UVOD

1.1. Problem istraživanja

Primarna uloga skeleta kao strukture, dugo je pružala kostima nezavidnu reputaciju inertnog i statičnog materijala. Međutim, sposobnost koštanog tkiva da prilagodi svoju morfologiju i masu u zavisnosti od funkcionalnih potreba, njegova sposobnost samopopravke bez ostavljanja ožiljaka, kao i sposobnost da u kratkom vremenskom roku mobiliše mineralne zalihe, pokazali su da se radi o veoma „pametnoj“ i dinamičnoj strukturi (Sabolinski i sar., 1996).

Dakle, koštano tkivo je izuzetno dinamično tkivo koje je u stalnom procesu resorpcije i formiranja, što doprinosi održavanju njegove strukture, popravci oštećenih delova tkiva i homeostazi fosfora i kalcijuma u organizmu. Kroz ovaj uravnotežen proces, poznat i kao proces remodeliranja, oko 10% koštanog tkiva jednog organizma se obnovi tokom godine, a tokom 10 godina se obnovi svo koštano tkivo, tj. celokupan skelet (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil i sar., 2006).

Relativno česta je pojava da povrede, bolesti i nasledne malformacije dovedu do velikih oštećenja koštanog tkiva. Zarastanje preloma kosti uključuje više različitih faza koje se delimično preklapaju, a označene su kao faza inflamacije, faza obnavljanja (reparacije) i faza remodeliranja. Smatra se da je faza inflamacije kritična za pravilno zarastanje fraktura, jer tokom nje dolazi do oslobađanja niza medijatora inflamacije i faktora rasta, koji do mesta oštećenja tkiva privlače različite tipove ćelija. Makrofagi se smatraju najvažnim akterima ove faze zarastanja preloma, jer sintetišu različite faktore kao što su proinflamatorni citokini, faktori rasta i reaktivna jedinjenja kiseonika, kojima utiču na proces osteogeneze i zarastanja preloma kosti. U literaturi postoje različita, često oprečna mišljenja o tome kako makrofagi i njihovi produkti utiču na proces osteogeneze (Grundnes and Reikeraas, 2000; Champagne, 2002; Mountziaris and Mikos, 2008; Lacey et al., 2009; Soltan et al., 2012; Bhat et al., 2013).

Veliki koštani defekti ne mogu spontano da zarastu, pa se u ovakvim slučajevima često primenjuju biomaterijali u ulozi nosača ćelija i tkivnog skafolda, najčešće na bazi hidroksiapatita.

Prelomi kosti dovode i do krvarenja. Krv koaguliše na mestu preloma, tako da na taj način ne samo makrofagi već i komponente krvnog ugruška utiču na inicijaciju procesa reparacije. Danas posoji mišljenje da su aktivnost makrofaga i formiranje krvnog ugruška tokom inflamatorne faze esencijalni za iniciranje procesa reparacije (Shapiro et al., 2008).

Od inflamatorne faze zarastanja preloma i usklađenosti procesa koje ona podrazumeva zavise i tokovi svih ostalih faza, što konačno vodi do ozdravljenja koštanog tkiva. Remećenje inflamatorne faze, bilo da se radi o njenoj supresiji ili o intenziviranju, može bitno da utiče na konačan ishod zarastanja koštanih defekata. Zbog toga je od izuzetnog značaja kontrola ćelija, ćelijskih produkata i ćelijskih interakcija tokom ove inicijalne faze. Danas su mnoga istraživanja na polju regenerativne medicine okrenuta ka makrofagima, kao ćelijama koje koordiniraju sve navedene procese. Ukoliko bi se pronašli mehanizmi upravljanja funkcionalnim stanjem ovih ćelija, a time i osteoreparatornog procesa, to bi imalo veliki značaj za definisanje odgovarajućih kliničkih tretmana u cilju bržeg ozdravljenja koštanog tkiva nakon povrede.

1.2. Koštano tkivo

Koštano tkivo, kao glavna komponenta skeleta odraslog organizma, predstavlja potpornu strukturu na koju se vezuju mišići, štiti vitalne organe u lobanjskoj i grudnoj duplji i štiti kostnu srž u kojoj nastaju krvne ćelije. Koštano tkivo je bogato vaskularizovano i metabolički veoma aktivno. Ono služi kao rezervoar kalcijuma, fosfata i drugih jona koji mogu kontrolisano da se deponuju ili oslobađaju radi održavanja stalne koncentracije važnih jona u telesnim tečnostima. Osim navedenih funkcija, kosti deluju i kao sistem poluga koji pojačava sile nastale tokom kontrakcije skeletnih mišića i tako ih pretvara u pokrete tela.

Poprečno presečena kost se sastoji od homogenog područja bez šupljina – kompaktnog koštanog tkiva i područja sa brojnim međusobno povezanim šupljinama – sunderastog (spongioznog, trabekularnog) koštanog tkiva. Međutim, kada se posmatraju pod mikroskopom i kompaktna i spongiozna kost imaju istu osnovnu histološku građu.

Po mikroskopskoj građi kost može da se podeli na dva tipa: primarnu, nezrelu ili vlaknastu i sekundarnu, zrelu ili lamelarnu. Primarna kost je prvo koštano tkivo koje

se pojavljuje tokom embrionalnog razvića, nakon zarastanja preloma (fraktura) i u drugim reparacionim procesima. Nju karakteriše nepravilan raspored tankih kolagenih vlakana, za razliku od sekundarne kosti gde je njihov lamelarni raspored pravilan. Naime, u sekundarnom koštanom tkivu su vlakna kolagena poredana u lamelama debljine 3 do 7 μm , koje se pružaju paralelno jedna prema drugoj, ili su raspoređene koncentrično oko vaskularnog kanala koji sadrži krvne sudove, nerve i rastresito vezivno tkivo. Čitav ovaj sistem se naziva Haverzov sistem ili osteon (Junquera i Carneiro, 2005).

1.2.1. Čelije koštanog tkiva

Koštano tkivo sadrži četiri tipa ćelija:

1. osteoblaste
2. osteocyte
3. osteoklaste
4. ćelije koje oblažu koštano tkivo

1.2.1.1. Osteoblasti

Osteoblasti su jednojedarne ćelije koje leže na površini koštanog matriksa. Pretežno su okruglog oblika i sa bazofilnom citoplazmom. Poseduju jedno jedro okruglog oblika, dobro razvijen Goldžijev kompleks i endoplazmatski retikulum (Nakamura, 2007). Osteoblasti nastaju diferencijacijom multipotentnih mezenhimskih matičnih ćelija CFU-F linije (CFU-F - *Colony forming unit-fibroblast*, engl.), koje se nalaze u kostnoj srži. One se mogu diferencirati i u fibroblaste, mioblaste, adipocite i hondrocite (Boskey, 1996). Najranije osteoprogenitorske ćelije eksprimiraju transkripcioni faktor Runx2 (Runx2 - *Runt-related transcription factor 2*, engl.) ili kako se drugačije označava Cbfa1 (Cbfa1 - *Core-binding factor subunit alpha 1*, engl.), koji je neophodan za diferencijaciju ovih ćelija u zrele osteoblaste (Harada i Rodan, 2003). Ovi osteoprogenitori se dalje diferenciraju u preosteoblaste koji se i dalje dele, a zatim od njih nastaju zreli osteoblasti koji se više ne dele, već sintetišu komponente koštanog matriksa (Boskey, 1996).

Diferencijacija osteoblasta je kontrolisana transkripcionim faktorima i citokinima. Pored već pomenutog Runx2 (Cbfa1), i Osx (Osx – *Osterix*, engl.) je apsolutno neophodan za osteoplastnu diferencijaciju. Neki od ciljnih gena Runx2 su geni čija je ekspresija karakteristična za zrele osteoblaste, npr. geni za osteokalcin (OC), koštani sijaloprotein, osteopontin (OP) i kolagen I, kao i sam Runx2 gen. Osx igra važnu ulogu u usmeravanju prekursorskih ćelija od hondrocitne linije, a ka osteoplastnoj liniji.

Na kraju faze formiranja koštanog matriksa, osteoblaste čeka jedna od sledećih sudbina:

1. da se nađu zarobljeni u koštanom matriksu i postanu osteociti
2. da se transformišu u neaktivne osteoblaste i ostanu na površini
3. da podlegnu apoptozi, što je sudbina oko 80% osteoblasta (Bodine i Komm, 2002; Lian JB, Stein, 2003; Asagiri i Takayanagi, 2007; Baron i Rawadi, 2007) (Slika 1).

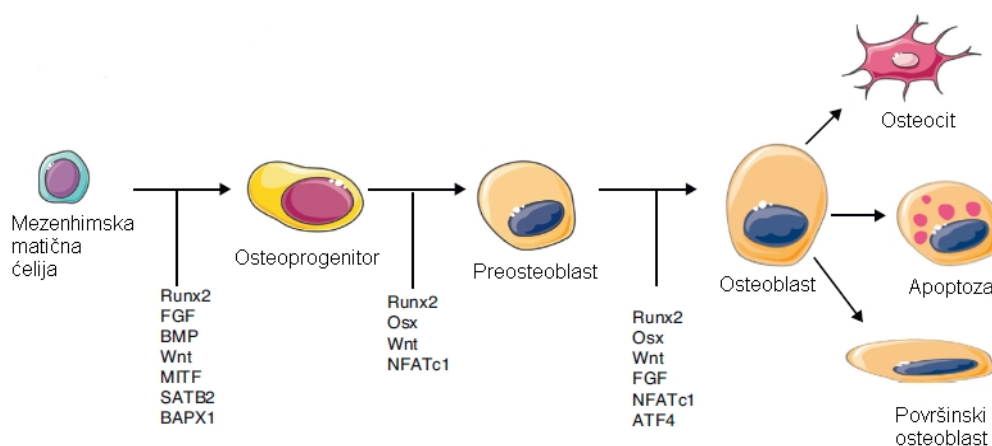
Razviće koštanog, kao i ostalih tkiva, regulisan je kompleksnom molekularnom interakcijom između Wnt/katenin i TGF- β /BMP (TGF- β - *Transforming growth factor beta*, engl.; BMP - *Bone Morphogenetic Protein*, engl.) signalnih puteva. BMP2 i Wnt signalni putevi zajedno omogućavaju ekspresiju Runx2 gena i promovišu diferenciranje osteoblasta (Manolagas, 2000).

Postoji najmanje 30 različitih BMPs koji čine najveću grupu TGF- β superfamilije. Nazvani su tako zbog svojih osteoinduktivnih karakteristika i regulišu diferencijaciju mezenhimskih matičnih ćelija u komponente koštanog, hrskavičavog i masnog tkiva (Noble i sar., 1997). BMP-2 i BMP-7 indukuju mezenhimske matične ćelije na ekspresiju transkripcionih faktora Runx2 i Osx i promovišu diferencijaciju osteoblasta (Jilka i sar., 1998; Li i sar., 2004).

Od osteoblasta zavisi sinteza organskih sastojaka koštanog matriksa (kolagena I, proteoglikana i glikoproteina), kao i njegova mineralizacija. U odgovoru na stimuluse kao što su slični insulinu faktori rasta (IGFs - *Insulin-like Growth Factors*, engl.), faktor rasta krvnih pločica (PDGFs - *Platelet-Derived Growth Factor*, engl.), bazični fibroblastni faktor rasta (bFGF - *basic Fibroblast Growth Factor*, engl.), transformišući faktor rasta - β (TGF- β - *Transforming growth factor β* , engl.), mnogobrojni citokini, BMPs i Wnts, osteoblasti sintetisju različite faktore rasta (Datta, 2008). Delujuć

autokrinim i parakrinim putem na receptore koji se nalaze na membrani osteoblaste, ovi faktori rasta regulišu njihovu aktivnost. Na površini osteoblasta se nalaze i receptori za mnoge endokrine hormone: paratiroidni i tiroidni hormon, hormon rasta, insulin, progesteron i prolaktin (Wozney i sar., 1998; Lee i sar., 2003).

Osteoblasti sintetišu i citokine od kojih mnogi učestvuju u regulaciji diferencijacije osteoklasta, npr: faktor stimulacije kolonija makrofaga (M-CSF - *Macrophage Colony-stimulating Factor*, engl.), receptorski aktivator za nuklearni faktor κ B ligand (RANKL - *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand*, engl.) i osteoprotegerin (OPG- *Osteoprotegerin*, engl.) (Lee i sar., 2003).



Sika 1. Ključni molekularni signali tokom diferencijacije i aktivacije osteoblasta. Preuzeto i modifikovano iz: Arboleya i Castaneda, 2013. *Reumatol Clin.* 9: 303-315

1.2.1.2. Osteociti

Osteociti čine 90-95% svih ćelija koštanog tkiva adultnih organizama, gde reaguju na mehaničke draži i šalju signale za resorpciju ili formiranje koštanog matriksa. To su jednojedarne ćelije zvezdolikog oblika, međusobno povezane nastavcima koji se pružaju sa njihove površine kroz kanaliće u koštanom matriksu-kanalikule, prečnika od 130 do 390 nm (You i sar., 2004). Nastavci polaze radijalno od tela osteocita i mnogo su duži i brojniji oni koji zadiru u unutrašnjost koštanog matriksa, od onih koji polaze ka površini (Marotti, 2000). Drugim rečima, osteociti su na neki

način polarizovani. Ove ćelije ne samo da komuniciraju sa drugim ćelijama na površini koštanog tkiva, već su njihovi nastavci u kontaktu sa ćelijama kostne srži, što im daje mogućnost da regrutuju prekursore osteoklasta i regulišu resorpciju koštanog matriksa (Zhao i sar., 2002).

Proces diferencijacije osteocita, ili osteocitogeneza, nije u potpunosti objašnjen, mada postoje neka značajna zapažanja. Naime, pokazano je da je formiranje osteocitnih nastavaka zavisi od razgradnje kolagena I (Holmbeck i sar., 2005). Osteociti miševa defektnih za transmembransku metaloproteinazu tipa 1 (MT1-MMP - *type 1 transmembrane metalloproteinase*, engl.) pokazuju značajno smanjenje dužine svojih nastavaka (Holmbeck i sar., 1999); MT1-MMP je membranska proteinaza koja razgrađuje kolagene I, II, III, fibrin, fibronektin i druge matriksne molekule.

Uprkos svojoj relativnoj neaktivnosti u odnosu na osteoblaste, osteociti imaju glavnu ulogu u uspostavljanju i održavanju strukture kosti. Zbog svoje distribucije kroz koštani matriks i međusobne povezanosti, smatra se da su osteociti glavne ćelije koje detektuju mehanički pritisak i organizuju signale za resorpciju i formiranje koštanog matriksa (Lanyon, 2003). Pretpostavlja se da mikrooštećenja kosti prvo detektuju osteociti, koji onda aktiviraju diferencijaciju osteoklasta (Verborgt i sar., 2000; Hedgecock i sar., 2007).

U kulturi, osteociti stvaraju malu količinu kolagena i fibronektina (manje nego osteoblasti), ali su mnogo aktivniji od osteoblasta u produkciji osteokalcina, osteonektina i osteopontina (Aarden i sar., 1996). *In vivo* istraživanja su pokazala da osteociti sintetišu i IGF-1. IGF-1 promoviše formiranje kosti i stimuliše diferencijaciju osteoblasta u osteocite (Conover, 1996).

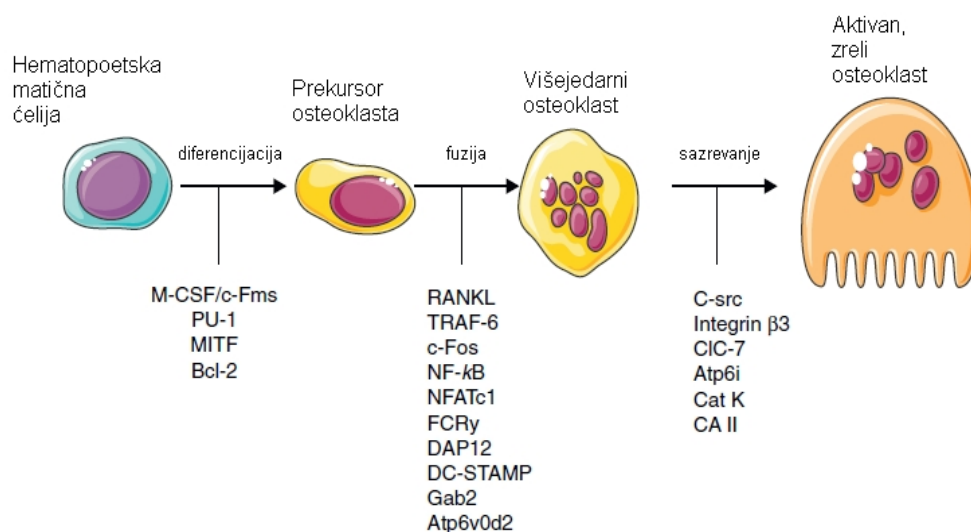
Konačno, sudbina osteocita je da ih osteoklasti fagocituju u toku resorpcije zajedno sa vanćelijskim matriksom (Bonewald, 2002).

1.2.1.3. Osteoklasti

U koštanom tkivu se stalno odvijaju procesi remodeliranja. Remodeliranje kosti je neophodno kako bi se uklonilo staro koštano tkivo i mikrooštećenja, što omogućava održavanje biomehaničke stabilnosti kosti i reguliše mineralnu homeostazu čitavog organizma. Proces remodeliranja koštanog tkiva podrazumeva njegovu resorpciju i

ponovnu izgradnju. Osteoklasti su ćelije koje učestvuju u uklanjanju starog koštanog matriksa. Resorpcija kosti podrazumeva razlaganje kako mineralne tako i organske komponente koštanog matriksa, a osteoklasti mogu da izvedu obe ove funkcije (Väänänen i Laitala-Leinonen, 2008).

Osteoklasti se od ostalih ćelija koštanog tkiva izdvajaju svojom veličinom i prisustvom velikog broja jedara. U njihovoj citoplazmi postoje i brojne vezikule, vakuole, lizozomi, mitohondrije i dobro razvijeni Goldžijev kompleks i endoplazmatski retikulum. Aktivirani osteoklasti se nalaze na površini kalcifikovanog koštanog matriksa gde učestvuju u njegovoj razgradnji (Nakamura, 2007). Osteoklasti pripadaju monocitno/makrofagnoj ćelijskoj liniji (Slika 2) i formiraju se višestrukim fuzijama jednojedarnih prekursorskih ćelija (Walker, 1973). Mnoga istraživanja su pokazala da su induktori njihove diferencijacije RANKL i M-CSF. M-CSF je glavni faktor koji učestvuje u usmeravanju monocita ka osteoklastnoj liniji, dok RANKL podržava diferencijaciju i aktivaciju osteoklasta. Za M-CSF se smatra da je neophodan za proliferaciju osteoklastnih progenitora, dok RANKL direktno kontroliše proces diferencijacije aktiviranjem RANK receptora. Istraživanja su pokazala i to da se u *in vitro* uslovima monociti mogu diferencirati u osteoklaste jedino ako su u kulturi zajedno sa osteoblastima ili drugim ćelijama strome (Takahashi i sar., 1988; Yoshida i sar., 1990; Wiktor-Jedrzejczak i sar., 1990; Yasuda i sar., 1998).



Slika 2. Ključni molekularni signali tokom diferencijacije i aktivacije osteoklasta. Preuzeto i modifikovano iz: Arbolea i Castaneda, 2013. Reumatol Clin. 9: 303-315

1.2.1.4. Čelije koje oblažu koštano tkivo

Na mestima gde se ne odvija remodeliranje koštanog tkiva, površina kosti je pokrivena slojem ćelija koje se nazivaju ćelije koje oblažu koštano tkivo (Slika 3). Predstavljaju populaciju ćelija koje nastaju od osteoblasta. Ove ćelije su spljoštenog oblika sa malo citoplazme i organela oko nukleusa. Njihove morfološke karakteristike i činjenica da se ispod njih nalazi mala količina osteoida, pokazuju da ove ćelije praktično nemaju ulogu u sintezi vanćelijskog matriksa koštanog tkiva. Misli se da imaju ulogu u održavanju i nutritivnoj potpori osteocita koji se nalaze u koštanom matriksu ispod njih, s obzirom na to da sa njima uspostavljaju gap veze (Robey, 2002).



Slika 3. Čelije koje oblažu koštano tkivo

1.2.2. Vanćelijski matriks koštanog tkiva

Vanćelijski matriks kosti izgrađen je, pre svega, od vlakana kolagena I i nekolagenih proteina. Mineralni sadržaj kosti čini uglavnom hidroksiapatit $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, kao i manja količina karbonata, magnezijuma i fosfata (Tzaphlidou, 2008). Igličasti kristali hidroksiapatita su nađeni na kolagenim fibrilima, unutar ili oko njih. Uočava se da su oni orijentisani u istom pravcu kao i vlakna kolagena. Veliki broj nekolagenih proteina je prisutan u vanćelijskom matriksu kosti, ali njihove pojedinačne uloge nisu u potpunosti razjašnjene. Većinu sintetišu osteoblasti, ali ne sve: oko $\frac{1}{4}$ nekolagenih proteina su proteini plazme koje apsorbuje koštani matriks (Vynios i sar., 2001).

Kolagen I je glavni tip kolagena u kostima, gde čini 90 do 95% organske komponente kosti. To je fibrilarni protein, koji se sastoji uglavnom od pravolinijski

postavljenih kolagenih vlakana. U kostima, iako kolagen zadržava svoj regularni paralelni raspored, on nije uniformno distribuiran kao kod drugih tkiva, npr. kože. Takođe, kolageni matriks u kostima je građen od izuzetno gusto postavljenih kolagenih vlakana (Tzaphlidou, 2008). U vanćelijskom matriksu kosti se u tragovima mogu naći i kolageni tipa III i V, kao i FACIT (*Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple Helices*, engl.) kolageni. FACIT kolageni predstavljaju grupu nefibrilarnih proteina koji služe kao molekulski mostovi između ostalih komponenti vanćelijskog matriksa. Ovde spadaju kolageni tipa IX, XII, XIV, XIX, XX i XXI (Clarke, 2008).

Osteoklacin je glavni nekolageni protein, koji čini oko 1% koštanog matriksa. To je mali Ca^{2+} vezujući protein, a nalazi se isključivo u kosti i dentinu. Iako je ovo jedan od najzastupljenijih nekolagenih proteina u koštanom matriksu, njegova biološka uloga nije precizno definisana. Za sada se smatra da učestvuje u procesu mineralizacije (Zebboudj i sar., 2002). On ima ulogu u vezivanju kalcijuma i stabilizaciji hidroksiapatita unutar matriksa i/ili regulaciji procesa formiranja kosti (Vynios i sar., 2001).

Osteopontin je komponenta mnogih tkiva, a u kosti ga sintetišu preosteoblasti, osteoblasti i osteociti. Smatra se da ima ulogu u remodeliranju tkiva, jer privlači osteoklaste ka mineralnoj fazi kosti i učestvuje u njihovom usidrenju, tačnije u vezivanju osteoklasta za mineralizovanu površinu. U slobodnom obliku služi kao aktivator unutarćelijskih signalnih puteva. Osteopontin učestvuje u vezivanju i svih ostalih ćelija koštanog tkiva za vanćelijski matriks, u prenošenju unutarćelijskih signala, pokretljivosti osteoklasta i njihovoj aktivaciji, kao i iniciranju odgovora osteoblasta na mehanički pritisak (Ganss i sar., 1999).

1.3. Veza između skeletnog i imunskog sistema

U *in vivo* uslovima različite ćelije i faktori utiču na ćelije koštanog tkiva. Sve je više dokaza da makrofagi i njihovi prekursori, monociti, igraju u tome ključnu ulogu. Ove ćelije imaju ulogu u neimunološkom regulisanju fundamentalnih aspekata formiranja kosti, regeneraciji, remodeliranju i reparaciji.

Makrofagi/monociti regulišu homeostazu kosti na nekoliko načina, a najviše sekrecijom citokina. U skladu sa uslovima koji vladaju u okruženju, makrofagi dobijaju

različite funkcionalne karakteristike i sekretuju različite citokine i druge molekule. Mnogi od tih sekretornih produkata su proangiogeni i osteogeni. Takođe, makrofagi mogu aktivirati druge ćelije u svojoj okolini da sekretuju određene citokine značajne za proces osteogeneze. Još jedna jedinstvena sposobnost makrofaga je da reaguju brzo na hemoatraktante sa mesta povrede tkiva. Tokom zarastanja fraktura, makrofagi dolaze do mesta povrede i otpuštaju različite citokine koji promovišu angiogenezu i regrutaciju mezenhimskih matičnih ćelija. Sve ove sposobnosti makrofaga govore u prilog potencijalnoj upotrebi ovih ćelija u tkivnom inženjerstvu kosti (Dong i Wang, 2013).

Inflamacija je visokoregulisan biološki proces koji igra važnu ulogu u pokretanju regeneracije kosti nakon povrede. Sa druge strane, u slučaju nekih inflamatornih bolesti ili reakcija na implantirane materijale dolazi do hronične inflamacije, koja ima destruktivni efekat na koštano tkivo. Ogroman trud se ulaže da bi se istražilo kako da se inflamatorni signal kontroliše i na taj način spreči oštećenje koštanog tkiva. Uporedo sa tim i dalje raste broj dokaza o tome da postoji kompleksna veza između skeletnog i imunskog sistema, ali i da sprečavanje inflamatorne faze reparacije ima negativan efekat na zarastanje fraktura kosti (Mountziaris i sar., 2011).

1.4. Makrofagi

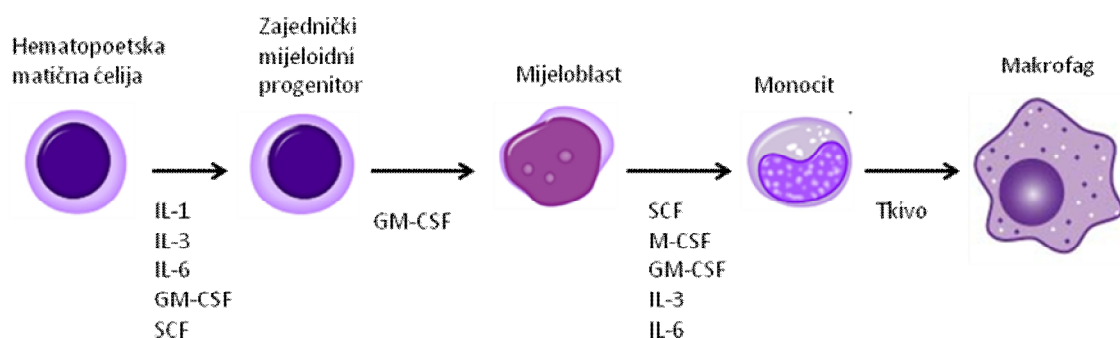
Makrofagi su ćelije koje imaju širok spektar morfoloških karakteristika koje odgovaraju stanju funkcionalne aktivnosti i mestu na kome se ove ćelije nalaze. Ove ćelije se karakterišu neravnom površinom sa ulegnućima, izbočenjima i izdancima koji predstavljaju morfološku osnovu njihove aktivne fagocitne sposobnosti. Ove ćelije imaju dobro razvijen Goldžijev kompleks, dosta lizozoma i izrazit endoplazmatski retikulum (Junquera and Carneiro, 2005). Makrofagi su jednojedarne ćelije koje vode poreklo od hematopoetskih matičnih ćelija mijeloidne linije (Hume i sar., 2002). Proces diferencijacije makrofaga počinje u kostnoj srži, formiranjem monocita (Slika 4) od pomenutih hematopoetskih matičnih ćelija preko većeg broja prekursora. Monociti se oslobađaju u krvotok gde ostaju 1 do 3 dana (Liaskou i sar., 2012).

U fiziološkim uslovima monociti migriraju u gotovo sva tkiva u organizmu i diferenciraju se u rezidentne tkivne makrofage, gde igraju važnu ulogu u homeostatskim procesima (Hume i sar., 2002; Gordon i Taylor, 2005). Tkivno-specifična adaptacija

makrofaga rezultuje heterogenošću različitih rezidentnih subpopulacija makrofaga u različitim tkivima (Gordon i Taylor, 2005; Taylor i sar., 2005; Hume, 2006).

Makrofagi su poznati i po tome što učestvuju u svim aspektima biologije i patologije koštanog tkiva. Oni su prisutni tokom više stupnjeva popravka fraktura gde produkuju različite faktore rasta (Bourque i sar., 1993) i učestvuju u formiranju stabilnog hrskavičavog kalusa (Hankemeier i sar., 2001).

Jedno interesantno svojstvo makrofaga je njihova sposobnost da se međusobno fuzionišu i formiraju višejedarne ćelije. Ove ćelije, ili polikarioni, mogu da resorbuju velike čestice koje pojedinačni makrofagi inače ne bi mogli. Ta sposobnost je stavila makrofage u centar pažnje evolucije i funkcije imunskog i skeletnog sistema, jer višejedarni makrofagi formiraju džinovske ćelije na mestima hronične inflamacije, a takođe u kostima formiraju osteoklaste. Da li će višejedarni makrofagi postati džinovske ćelije ili osteoklasti zavisi od citokina koji se nalaze u okolini i koji na njih deluju (Chen i sar., 2007).



Slika 4. Ključni molekularni signali tokom diferencijacija makrofaga. Preuzeto i modifikovano iz izvora: http://www.zazzle.com/diagram_of_hematopoietic_growth_factors_in_humans_poster-228795919604665078

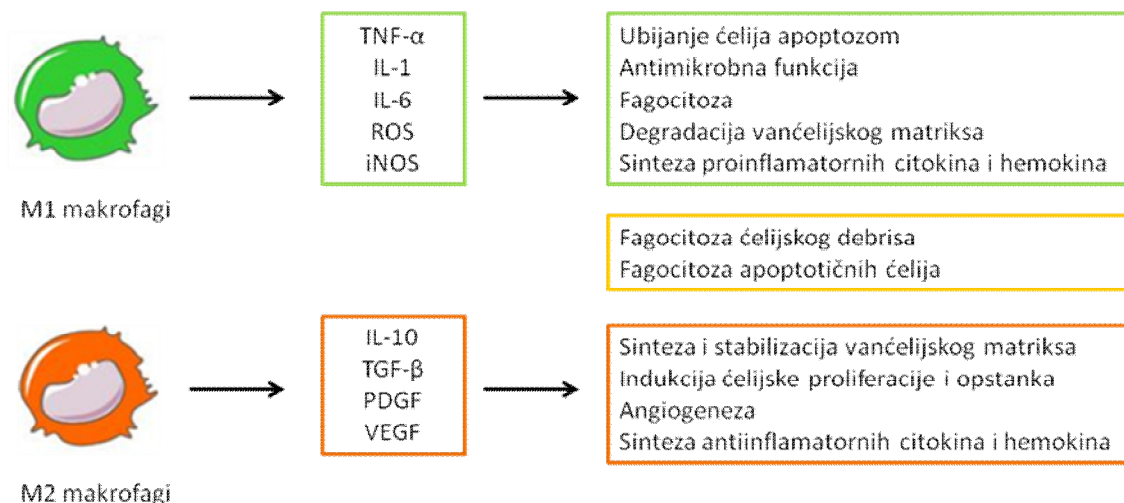
1.4.1. Podela makrofaga prema njihovim funkcionalnim karakteristikama

Makrofagi pokazuju izuzetnu plastičnost, što im omogućava da blagovremeno reaguju na signale iz okoline, menjajući svoj fenotip i funkciju. Povreda tkiva, infekcija ili reakcija tkiva na strano telo pobuđuju brz odgovor ovih ćelija. Nomenklatura

makrofaga potiče od njihovih funkcionalnih karakteristika, površinskih markera i produkcije citokina.

Prema funkcionalnim karakteristikama makrofagi se klasifikuju kao M1 ili M2, tj. klasično i alternativno aktivirani makrofagi (Slika 5). M1 tj. klasično aktivirani makrofagi se označavaju i kao inflamatorni, a aktiviraju ih i interferon - γ (IFN- γ – *Inteferon γ* , engl.), faktor nekroze tumora - α (TNF- α - *Tumor necrosis factor α* , engl.) i lipopolisaharid (LPS - *Lipopolysaccharide*, engl.). M2 tj. alternativno aktivirani makrofagi se označavaju i kao antiinflamatori i u okviru ovog funkcionalnog tipa makrofaga postoje tri podtipa ćelija sa različitim fiziološkim ulogama. M2a makrofagi su uključeni u kasnije procese reparacije tkiva, a aktiviraju ih citokini kao što su interleukin - 4 (IL-4 – *interleukine 4*, engl.) i IL-13. M2c podtip makrofaga indukuju IL-10 i glukokortikoidi, a ovaj podtip makrofaga ima i antiinflamatornu funkciju. M2b makrofagi takođe ostvaruju antiinflamatornu aktivnost preko IL-10, ali sintetišu i proinflamatorne citokine kao i M1 makrofagi npr. IL-1 i TNF- α , ali ne i IL-12 (Kharraz i sar., 2013).

Na mestu povrede tkiva se prvo mogu naći makrofagi M1 tipa, koji fagocituju nekrotični material i sintetišu proinflamatorne citokine, azot oksid sintazu (NOS - *Nitric oxide synthase*, engl.) i reaktivne metabolite kiseonika (ROS - *Reactive oxygen species*, engl.) Njih kasnije zamenjuju makrofagi M2c podtipa koji proizvode IL-10, TGF- β kao i druge antiinflamatorne citokine koji su esencijalni za pravilno zarastanje rana. Međutim, neki autori navode da ne bi trebalo generalizovati podelu makrofaga, s obzirom na njihovu heterogenost i činjenicu da se i rezidentni makrofagi u različitim tkivima međusobno razlikuju (Gautier i sar., 2012). Zato se generalno savetuje oprez u funkcionalnoj klasifikaciji makrofaga koji učestvuju u zarastanju rana, naročito kada se upoređuju sa makrofagima iz kulture. Takođe postoji predlog da se makrofagi koji učestvuju u zarastanju rana svrstaju u posebnu kategoriju, s obzirom da imaju karakteristike svih podtipova makrofaga (Brancato i Albina, 2011). Takođe, neki autori predlažu da se makrofagi klasifikuju prema njihovoj funkciji na npr. inflamatorne, reparatorne i druge (Mosser i Edwards, 2008).



Slika 5. Podela makrofaga prema njihovim funkcionalnim karakteristikama. Preuzeto i modifikovano iz Duffield, 2003. Clin Sci. 104: 27-38; Laskin, 2009. Chem Res Toxicol. 22: 1376-1385

1.5. Koštani defekti

U kliničkoj praksi često postoje situacije gde velike povrede, bolesti ili kongenitalne malformacije dovode do nastanka velikih koštanih defekata (Khan i sar., 2005). Njihova nadoknada je oduvek predstavljala izazov ne samo za ortopedsku hirurgiju, već i hirurgiju uopšte. S obzirom na produženje životnog veka ljudi širom planete, broj starijih osoba u okviru svetske populacije ljudi u stalnom je porastu. Povećani rizik od padova zajedno sa progresivnim gubitkom koštane mase (gustine) usled starenja predstavljaju glavne faktore povezane sa povećanom stopom fraktura u starijoj životnoj dobi. Procenjuje se da će samo incidenca fraktura kuka na svetskom nivou porasti sa 1.66 miliona (koliko je procenjeno 1990. godine) na 6.26. miliona do 2050. godine (Cooper i sar., 1992; Melton, 1995).

1.5.1. Reparacija koštanih defekata

Proces zarastanja kosti najčešće prolazi kroz tri dinamične faze koje se međusobno preklapaju. Na osnovu morfoloških karakteristika tkiva tokom ove tri faze, one su dobile nazive: faza inflamacije, faza obnove i faza remodeliranja (Slika 6).

Dakle, popravka koštanih defekata (fraktura) je okarakterisana inicijalnom inflamatornom reakcijom koja je praćena proliferacijom ćelija i remodeliranjem, što konačno vodi rekonstrukciji kosti do njene originalne forme (Brighton, 1984). Glavni akter u tom inflamatornom procesu su makrofagi koji migriraju do mesta povrede (Horowitz i sar., 1989). Ove ćelije oslobađaju faktore koji učestvuju i u resorpciji i u formiranju koštanog tkiva.

1.5.1.1. Faza inflamacije

Fraktura kosti je povreda koja ne podrazumeva samo narušavanje strukture koštanog tkiva, već oštećenje omotača kosti tj. periosta, mišićnih vlakana i krvnih sudova. Krv iz povređenih krvnih sudova akumulira se oko mesta frakture stvarajući hematom i ubrzano koaguliše, da bi se oformio krvni ugrušak. Osteociti na mestu povrede izumiru jer su lišeni kiseonika i hranljivih materija, što dovodi do stvaranja nekrotičnog tkiva. Prisutno nekrotično tkivo, PDGF iz pločica krvnog ugruška i faktori rasta iz vanćelijskog matriksa (npr. TGF- β) deluju kao hemoatraktanti za inflamatorne ćelije (makrofage, monocite, limfocite i neutrofile) i fibroblaste, pobuđujući brz i intenzivan akutni inflamatorni odgovor koji dostiže svoj maksimum 24-48 h nakon povrede i biva kompletiran za oko nedelju dana (Cho i sar., 2002). To dovodi do formiranja granulomatoznog tkiva, urastanja krvnih sudova i migracije mezenhimskih matičnih ćelija na mesto frakture. Upotreba antiinflamatornih ili citotoksičnih lekova tokom prve nedelje zarastanja frakture može promeniti inflamatornu fazu i inhibirati zarastanje kosti (Kalfas, 2001).

Tokom ovog perioda se dešava kompleksna kaskada proinflamatornih signala i faktora rasta koja je precizno kontrolisana (Gerstenfeld i sar., 2003), a nivoi nekoliko proinflamatornih citokina, uključujući TNF- α , IL-1, IL-6, IL-11 i IL-18 su značajno povišeni (Gerstenfeld i sar., 2003; Rundle i sar., 2006), mada oni igraju važnu ulogu i u kasnijim fazama zarastanja. Iako je poznato da proinflamatorni citokini imaju negativan efekat na kost, zglobove i implantirane materijale kada dođe do njihove produžene ili hronične ekspresije, kratkotrajna i visokoregulisana sekrecija ovih molekula je izuzetno važna za regeneraciju tkiva. (Marsell i Einhorn, 2011). Ovi signali regrutuju nove inflamatorne ćelije i promovišu angiogenezu (Gerstenfeld i sar., 2003; Sfeir i sar.,

2005). Tokom ovog perioda TNF- α proizvode i inflamatorne ćelije, pre svega makrofagi i veruje se da ovaj citokin posreduje u procesu indukcije sekundarnih proinflamatornih signala, a takođe deluje i kao hemoatraktant za regrutaciju potrebnih ćelija (Kon i sar., 2001). *In vitro* eksperimenti su pokazali da TNF- α indukuje osteogenu diferencijaciju mezenhimskih matičnih ćelija (Cho i sar., 2006).

Krvne pločice se takođe aktiviraju usled povrede krvnih sudova i oslobađaju TGF- β 1 i PDGF, dok osteoprogenitorske ćelije na mestu povrede sintetišu BMPs (Cho i sar., 2002; Lieberman i sar., 2002.). Ovi faktori, zajedno sa proinflamatornim citokinima, regrutuju mezenhimске matične ćelije i zatim služe kao vodiči njihovu diferencijaciji i proliferaciji (Barnes i sar., 1999; Dimitriou i sar., 2005; Doll i sar., 2005).

Vremenom akutni inflamatorni odgovor slabi i zamenjuje ga sledeća faza.

1.5.1.2. Faza obnove (reparacije)

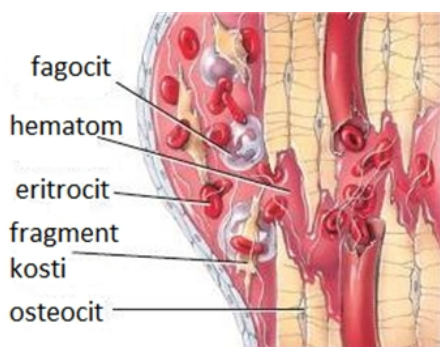
Prvi korak ove faze je identičan onom što se viđa tokom reparacije drugih tkiva. Prvo dolazi do organizacije hematoma. Hematom igra ulogu u imobilizaciji frakture i služi primarno kao fibrinski matriks za razne ćelije koje učestvuju u ovom procesu (Bielski i sar., 1993; Yücesoy i sar., 1999).

Ćelije koje su direktno uključene u ovu fazu popravke su mezenhimskog porekla i pluripotentne su. One se diferenciraju u različite tipove ćelija koje udruženim snagama formiraju kolagen, hrskavicu i na kraju kost. Neke od ovih ćelija potiču iz periosta i endosta i formiraju najraniju kost (što je naročito izraženo kod dece, kod kojih su ćelije periosta i endosta izuzetno aktivne). Osteociti ne učestvuju u ovom procesu, jer su fagocitovani tokom faze inflamacije (Tonna, 1972). Smatra se da većina ćelija koje su direktno uključene u zarastanje frakture dolaze na mesto defekta u okviru granulomatoznog tkiva, koje zaokuplja ovaj region iz okolnih krvnih sudova (Trueta, 1963). U toku ovog procesa se povećava broja kapilarnih pupoljaka. Ćelije infiltriraju hematom i ubrzano stvaraju tkivo poznato kao kalus, koga čine hrskavičavo i nezrelo koštano tkivo. Kalus ubrzano obavlja kost na mestu povrede i dovodi do povećanja stabilnosti frakture. Tako formirana hrskavica procesom koji se ne razlikuje od endohondralnog okoštavanja prelazi u kost. Kost će formirati one ćelije koje primaju

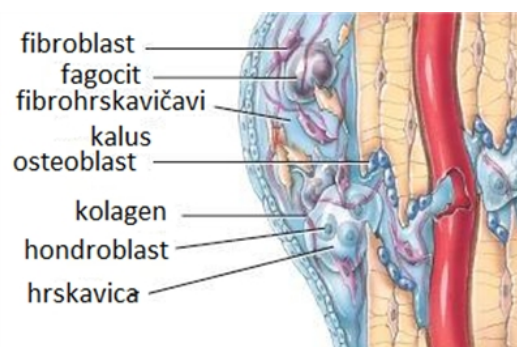
dovoljno kiseonika i koje su dovoljno mehanički stimulisane. U ranim fazama reparativnog procesa, hrskavica dominira, ali kasnije postepeno biva zamenjena koštanim tkivom pod uticajem TGF- β 2, TGF- β 3 i BMPs, kao i drugih signalnih molekula (Cho i sar., 2002; Gerstenfeld i sar., 2003). Inflamatorni medijatori su odsutni tokom ove faze.

1.5.1.3. Faza remodeliranja

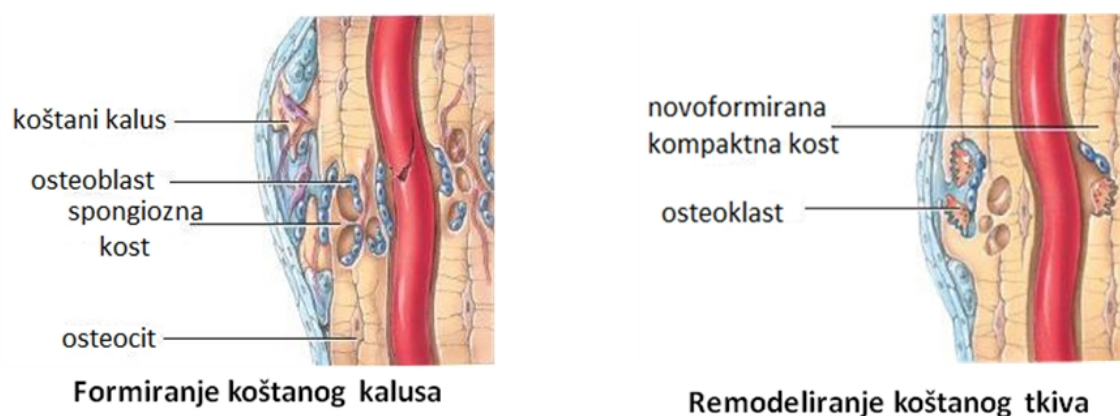
Osteoprogenitorske ćelije se diferenciraju u osteoblaste koji sintetišu IL-1, IL-6, IL-11, kao i druge faktore koji promovišu formiranje osteoklasta (Doll i sar., 2005). Aktivnost ova dva tipa ćelija dovodi do zamene inicijalne nezrele kosti zreloom, lamelarnom. Faza remodeliranja je regulisana od strane nekoliko proinflamatornih signala. Pored IL-1, IL-6 i IL-11, povišeni nivoi TNF- α , IL-12 i IFN- γ su takođe prisutni na mestu frakture (Gerstenfeld i sar., 2003; Rundle i sar., 2006). I iako se originalna struktura i mehaničke karakteristike skeleta vraćaju nakon nekoliko nedelja od povrede, molekularnoj i ćelijskoj signalizaciji može trebati i nekoliko godina da se vrate u normalno stanje (Yu-Yahiro i sar., 2001).



Formiranje hematoma



Formiranje fibrohrskavičavog kalusa



Slika 6. Faze reparacije fraktura kosti. Preuzeto i modifikovano iz izvora: http://higheredbcs.wiley.com/legacy/college/tortora/0470565101/hearthis_ill/pap13e_ch06_illustr_audio_mp3_am/simulations/hear/bone_fracture_repair.html

1.6. Pristupi rešavanju problema velikih koštanih defekata – uloga regenerativne medicine i tkivnog inženjerstva

Koštano tkivo najčešće spontano zarasta, ali u slučaju komplikacija tipa patoloških fraktura ili velikih lomova kostiju koji dovode do stvaranja velikih defekata, spontani proces zarastanja je onemogućen. Zbog toga pred ortopedskom hirurgijom još uvek stoji izazov saniranja i rekonstrukcije ovako velikih koštanih defekata i nesrastanja delova fraktura.

Danas se velika nada polaže na principe regenerativne medicine u rešavanju ovog problema. U poslednje dve decenije pristupi regenerativne medicine su intenzivno proučavani u cilju uticanja na poboljšanje procesa zarastanja fraktura, ili čak generisanja funkcionalnog koštanog tkiva za potrebe ortopedije i stomatologije. Regenerativna medicina između ostalog uključuje i principe tkivnog inženjerstva (Andrades i sar., 2013; Jose i sar., 2013). Brz razvoj tkivnog inženjerstva u poslednjih nekoliko godina doveo je do velikog napretka u istraživanju reparacije i regeneracije koštanog tkiva. Jedan od principa tkivnog inženjerstva je taj da se na dizajnirane 3D matrice od biomaterijala dodaju ćelije i faktori koji indukuju osteogenezu, a zatim se cela struktura implantira u koštani defekt.

1.6.1. Biomaterijali

Oko milion koštanih defekata na godišnjem nivou zahteva korišćenje koštanih zamenika, da bi se postiglo sjedinjavanje delova kosti (Yaszemski i sar., 1994). Trenutni tretmani su bazirani na auto-, alo- i ksenograftima, kao i nekim sintetskim materijalima (Yaszemski i sar., 1994; Petite i sar., 2000; Spitzer i sar., 2002; Simon i sar., 2002; Rose i Oreffo, 2002).

Upotreba koštanih zamenika u cilju reparacije frakture kosti pod uticajem je anatomskih, histoloških i biohemijskih karakteristika koštanog tkiva. Nekoliko fizioloških karakteristika koštanih zamenika direktno utiče na uspeh njegove inkorporacije. Te karakteristike su osteogeni potencijal, osteoindukcija i osteokondukcija (Prolo, 1990).

Osteogeni potencijal je sposobnost koštanog zamenika da stvori novu kost, i taj proces zavisi od prisustva živih ćelija koštanog tkiva na koštanom zameniku. Osteogeni koštani zamenici sadrže vijabilne ćelije koje imaju sposobnost da formiraju kost (osteoprogenitorske ćelije), ili potencijal da se diferenciraju u ćelije koje formiraju koštano tkivo (osteogene prekursorske ćelije). Osteogeni potencijal je osobina nađena jedino u svežoj autogenoj kosti i ćelijama kostne srži (Muschler i sar., 1990).

Osteoindukcija je sposobnost koštanog zamenika da indukuje matične ćelije ka diferencijaciji u zrele ćelije koštanog tkiva. Ovaj proces je obično povezan sa prisustvom faktora rasta kosti, koji mogu biti sastavni deo implantiranog materijala, ili se mogu njemu dodati. Morfogenetski proteini kosti i demineralizovan matriks kosti su osnovni osteoinduktivni materijali. U mnogo manjem obimu autografti i alografti imaju neke osteoinduktivne osobine (Muschler i sar., 1990).

Osteokondukcija je fizičko svojstvo koštanih zamenika da posluže kao matrice za zarastanje kosti. Osteokondukcija omogućava ulazak neovaskulature i infiltraciju osteogenih prekursorskih ćelija na mesto frakture. Osteokonduktivne karakteristike postoje u sunderastim autograftima i alograftima, demineralizovanom matriksu kosti, hidroksiapatitu, kolagenu i kalcijum-fosfatu (Muschler i sar., 1990).

1.6.1.1. Autograft

Autologni koštani graftovi predstavljaju kost uzetu sa drugog mesta samog pacijenta. Oni su dugo godina predstavljali „zlatni standard“ u saniranju koštanih defekata, jer su obezbeđivali osteogene ćelije i esencijalne osteoinduktivne faktore potrebne za zarastanje i regeneraciju kosti (Asahina i sar., 1999; Rose i Oreffo, 2002). Obično se dobijaju od suđeraste kosti ilijačne kreste pacijenta, mada se može koristiti i komaktna kost (Reece i Patrick, 1998; Rose i Oreffo, 2002). Idealni koštani zamenik bi trebalo da poseduje osteoinduktivna i osteokonduktivna svojstva, da bude biomehanički stabilan, da nije kontaminiran i da sadrži minimalnu količinu antigenih faktora. Autografti poseduju sve ove karakteristike. Međutim, iako je procenat uspešnosti ove metode relativno visok, postoji ograničenje njegove upotrebe i to s obzirom na ograničenu količinu autografta koji se može dobiti, preosetljivosti mesta sa kog se autograft dobija, potrebe za većim brojem rezova na telu pacijenta, produženo vreme operacije i gubitak krvi i rizik od komplikacija na mestu uzimanja donorne kosti (DePalma i sar., 1972; Whitecloud, 1976; Yaszemski i sar., 1994; Williams, 1999; Petite i sar., 2000; Spitzer i sar., 2002; Simon i sar., 2002; Rose i Oreffo, 2002).

1.6.1.2. Alograft

Alograft je kost koja je uzeta iz tela drugog pacijenta. Ona se takođe može koristiti u tretmanu koštanih defekata. Prednost ove tehnike je u izbegavanju morbiditeta povezane sa komplikacijama na mestu uzimanja grafta, kao i dobijanje željene količine uzorka. Međutim, procenat inkorporacije ovakvih graftova je manji nego kod autograftova. Takođe, postoji i rizik od imunske reakcije odbacivanja, kao i prenošenja patogena sa donora na recipijenta (Yaszemski i sar., 1994; Petite i sar., 2000; Spitzer i sar., 2002; Simon i sar., 2002; Rose i Oreffo, 2002). Danas su poboljšani standardi prikupljanja alografta, tako da iako navedeni problemi još uvek postoje, njihova incidenca je u velikoj meri smanjena.

1.6.1.3. Ksenograft

Ksenografti predstavljaju materijal uzet iz organizma jedne vrste koji je implantiran u drugu vrstu. Najčešće su u upotrebi ksenografti dobijeni iz korala, svinjske ili goveđe kosti. Ksenografti teorijski predstavljaju nepresušni izvor materijala u odnosu na autograft i alograft. Glavna zabrinutost pri korišćenju ksenografta je mogućnost slabe histokompatibilnosti (Poumarat i Squire, 1993), kao i transmisija zaraznih bolesti sa životinje na čoveka. U cilju sprečavanja transmisije zaraznih bolesti i uklanjanja antigenih komponenti, ksenografti se na razne načine tretiraju pre upotrebe i tom prilikom u većini slučajeva gube osteoinduktivna, a delom i osteokonduktivna svojstva (Oryan i sar., 2014).

2. PREDMET I CILJ ISTRAŽIVANJA

Iako je danas prihvaćeno da makrofagi imaju značajnu ulogu u zarastanju povreda kosti i njenoj regeneraciji, još uvek je malo literaturnih podataka o uticaju makrofaga na procese osteogeneze, reparacije i regeneracije koštanog tkiva. Ova doktorska disertacija je rađena na hipotezi da od funkcionalnog stanja i tipa makrofaga zavise početak, tok i ishod procesa osteogeneze i reparacije koštanog tkiva. Zasnovano na toj hipotezi predmet istraživanja ove doktorske disertacije je potencijalni modulatorni efekat različito tretiranih makrofaga na ektopični osteogeni proces, kao i delovanje makrofaga različitog porekla i posle različitih tretmana na diferencijaciju preostablastnih ćelija *in vitro*.

Shodno predmetu istraživanja su definisani sledeći ciljevi:

1) Ispitivanje uticaja različito tretiranih makrofaga, primenjenih kao komponente implanata na osteogenezu *in vivo* u sledećem eksperimentalnom dizajnu:

- sa nosačem od granula mineralnog matriksa kosti (MMK) pomešanih sa krvnim ugruškom u subkutanoj implantaciji Balb/c mišu;
- korišćenjem peritonealnih makrofaga posle elicitanje peritoneuma tioglikolatom ili makrofaga bez prethodne elicitanje ali tretiranih deksametazonom (5×10^{-6} M) ili lipopolisaharidom (5 ng/ml ili 500 ng/ml);
- ekstrakcijom implanata posle 1, 2, 4 i 8 nedelja od implantacije;
- procenjujući tok osteogenog procesa histološkim i imunohistohemijskim metodama.

2) Ispitivanje funkcionalnog stanja makrofaga različitog porekla i različito tretiranih mikroskopski, NBT testom i L929 bioesejem, kao i ispitivanje uticaja sekretornih proizvoda makrofaga na diferencijaciju preosteoblastnih ćelija MC3T3-E1 ćelijske linije procenjujući uticaj kondicioniranih medijuma makrofaga mišje ćelijske linije RAW 264.7 posle tretmana deksametazonom (10^{-6}) ili različitim dozama lipopolisaharida (1ng/ml i 100 ng/ml) na proliferaciju MC3T3-E1 ćelija metodom kristal-violet i njihovu diferencijaciju u osteoblaste u prisustvu osteogenih faktora bojenjem *Von Kossa* i imunocitohemijski.

3. MATERIJAL I METODI

3.1. Eksperimenti *in vivo*

3.1.1. Eksperimentalne životinje

Eksperimentalne životinje su nabavljene sa Vojnomedicinske Akademije (Beograd, Srbija), a zatim su uzgajane u Vivarijumu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu. Eksperimentalni rad na životinjama je obavljen u Laboratoriji za eksperimentalnu medicinu Naučnoistraživačkog centra za biomedicinu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu.

U eksperimentu su korišćeni singeni miševi Balb/c soja, muškog pola, starosti 10 do 12 nedelja i telesne mase 22 do 24 g. Životinje su držane u standardnim uslovima na temperaturi od $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ i svetlosnom režimu od 12/12 h svetlosti/mraka. Hranjene su i pojene *ad libitum*.

Eksperimenti na životinjama su odobreni odlukom Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu broj 01-5518-6. Eksperimentalni postupci na životinjama su izvedeni u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja i Pravilnikom o laboratorijskim životinjama Republike Srbije.

3.1.2. Implanti

Implanti su formirani od nosača za ćelije i makrofaga. Nosači su imali i funkciju skafolda (tkivne matrice) koji se koriste u inženjerstvu tkiva kosti. To su bili mineralni matriks kosti i krvni ugrušak. Implanti su se međusobno razlikovali po unetim peritonealnim makrofagima (PM). Kontrolni implanti nisu sadržavali makrofage, već samo nosače. Jedna životinja je nosila samo jednu vrstu implanta.

Prema vrsti unetih implanata formirane su sledeće grupe eksperimentalnih životinja:

- Grupa NM: Nosači + rezidentni (nestimulisani) PM
- Grupa TM: Nosači + tioglikolatom elicirani PM

- Grupa LM1: Nosači + PM tretirani nižom koncentracijom bakterijskog lipopolisaharida
- Grupa LM2: Nosači + PM tretirani višom koncentracijom bakterijskog lipopolisaharida
- Grupa DM: Nosači + PM tretirani deksametazonom
- Grupa K: Nosači MMK i krvni ugrušak
- Grupa B: Nosač MMK + fiziološki rastvor

3.1.2.1. Mineralni matriks kosti kao komponenta implanata

Kao komponenta svih ispitivanih imlanata služio je mineralni matriks kosti (MMK) u ulozi nosača ćelija i tkivnog skafolda. U eksperimentu je kao mineralni matriks kosti korišćen komercijalni biomaterijal Bio-Oss[®] (Geistlich-Pharma, Wolhusen, Switzerland), zrnaste strukture sa granulama veličine od 0.25 mm do 1 mm. Bio-Oss[®] je biokompatibilni biomaterijal koji je strukturno najbližiji hidroksiapatitu kosti. On je po svojoj strukturi mineralni matriks kosti dobijen deproteinizacijom goveđe kosti u alkalnom rastvoru na 300°C, čime su uklonjene organske komponente. Koristi se najviše u stomatologiji za popunu većih koštanih defekata (Schwartz i sar., 2000; Van Steenberghe i sar., 2000).

3.1.2.2. Krvni ugrušak kao komponenta implanata

Krvni ugrušak je korišćen kao komponenta svih ispitivanih implanata, osim implanata B tipa i imao je ulogu nosača ćelija. Inače, krvni ugrušak i srodni krvni derivati (kao što su fibrinski lepak ili plazma bogata krvnim pločicama) se često koriste za popunu koštanih defekata i kao nosači ćelija u kombinaciji sa biomaterijalima (Jeffrey i sar., 2004; Ajduković i sar., 2005; Hoemann i sar., 2005; Altaf i sar., 2013). Krv je dobijena potpunim iskrvavljenjem Balb/c miševa iz retroorbitalnog pleksusa, a zatim je razblažena ćelijskom suspenzijom PM ili fiziološkim rastvorom u odnosu 1:4. U periodu od 10-tak min razblažena krv koaguliše formirajući krvni ugrušak želatinozne konzistencije, koji drži sve ostale komponente implanta zajedno.

3.1.2.3. Makrofagi kao komponenta implanata

Uloga makrofaga u ektopičnom osteogenom procesu bila je ispitivana na taj način što su ove ćelije stavljene na nosače implanata. U našim eksperimentima su korišćeni PM Balb/c miševa. Ove ćelije su kolektovane iz peritonealne šupljine netretirane ili prethodno tretirane tioglikolatom. Makrofagi koji su izolovani iz netretirane peritonealne šupljine predstavljali su populaciju rezidentnih PM (RPM), a makrofagi koji su izolovani iz peritonealne šupljine prethodno tretirane tioglikolatom predstavljali su populaciju tioglikolatom elicitiranih PM (TEPM). Za formiranje nekih tipova implanata RPM su dovedeni u kontakt sa lipopolisaharidom (LPS) ili deksametazonom, nakon što su ove supstance prethodno stavljene na nosač MMK da budu apsorbovane.

Kolektovanje peritonealnih makrofaga

RPM su dobijeni procesom peritonealne lavaže eksperimentalnih životinja. Životinje su prethodno anestetizirane intramuskularnim ubrizgavanjem 0.2 ml 10% ketamidora (0.1 ml/10 g; Richer Pharma, Austria). Peritonealna lavaža je izvršena dva puta intraperitonealnim ubrizgavanjem po 5 ml hladnog RPMI 1640 medijuma (PAA Laboratories, Austria) kome je dodat heparin u koncentraciji 25 U/ml (Galenika, Srbija).

U cilju izazivanja peritonitisa i dobijanja TEPM, miševima je intraperitonealno ubrizgano po 0.5 ml 3% tioglikolata (Broth, Fluka, Germany). Nakon 4 dana od elicitacije izvršena je peritonealna lavaža životinja.

Nakon peritonealne lavaže, ćelije su dva puta centrifugirane u hepariniziranom RPMI medijumu, na 1200 o/min, u trajanju od 10 min, na 4°C, a zatim resuspendovane u Henkovom rastvoru (*Hank's*, engl.; PAA Laboratories, Austria).

3.1.3. Formiranje implanata

3.1.3.1. Formiranje kontrolnih implanata

Kontrolni implantati K tipa formirani su od nosača MMK i krvnog ugruška. Konkretno, implantati ovog tipa su sadržavali 10 mg MMK i 30 μ l krvi razblažene fiziološkim rastvorom.

Kontrolni implantati B tipa formirani su od nosača MMK i fiziološkog rastvora. Svaki implant je sadržavao 10 mg MMK i 30 μ l fiziološkog rastvora.

3.1.3.2. Formiranje implanata sa makrofagima

Implanti sa makrofagima su sadržavali MMK i krvni ugrušak kao nosače ćelija kojima su pridodati PM. Konkretno, svaki implant je sadržavao 10 mg MMK i 30 μ l krvi razblažene ćelijskom suspenzijom PM. Tako su se implantati međusobno razlikovali samo po unetim PM.

Nakon standardne procedure kolektovanja PM, u cilju pripreme implanata NM odnosno TM tipa, broj PM je kalibrisan tako da je u 60 μ l ćelijske suspenzije bilo po 5×10^5 nukleisanih ćelija. Za formiranje implanata NM tipa krv je razblažena ćelijskom suspenzijom RPM, dok je za formiranje implanata TM tipa krv razblažen ćelijskom suspenzijom TEPM.

U cilju pripreme implanata LM1, LM2 i DM tipa po 80 mg MMK je na 37°C inkubirano preko noći sa odgovarajućim koncentracijama bakterijskog lipopolisaharida (0111:B4 *Escherichia coli* LPS; Sigma-Aldrich, Germany) ili deksametazona (Galenika) i to:

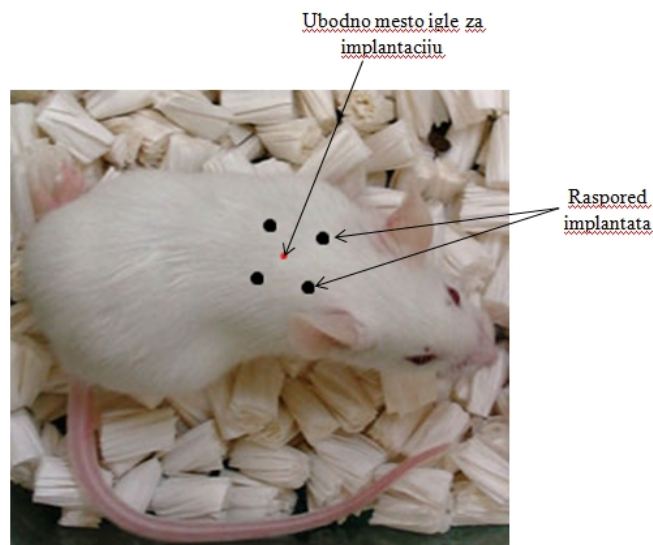
- za implante LM1 tipa MMK je inkubiran sa rastvorom LPS-a koncentracije 5 ng/ml
- za implante LM2 tipa MMK je inkubiran sa rastvorom LPS-a koncentracije 500 ng/ml
- za implante DM tipa MMK je inkubiran sa rastvorom deksametazona koncentracije 5×10^{-6} M

Nakon standardne metode kolektovanja RPM, ćelije su resuspendovane u Dulbekovoj modifikaciji Iglovog medijuma (DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, engl.; PAA Laboratories, Austria) obogaćenom sa 10% fetalnog telećeg seruma (FCS – *Fetal Calf Serum*, engl.; PAA Laboratories, Austria), 2 mM L-glutaminom i antibiotik/antimikotik rastvorom (PAA Laboratories, Austria) i posađene u sterilne Petrijeve šolje. Ćelije su inkubirane 1 h, na 37°C i u atmosferi zasićenoj sa 5% CO₂ da bi se zalepile za podlogu. Ćelije koje se nisu zalepile, nakon isteka perioda inkubacije, isprane su fosfatnim puferom (PBS – *Phosphate Buffered Saline*, engl.). Na taj način, zalepljene ćelije su predstavljale populaciju makrofaga.

Makrofagi su odvojeni od podloge skraperom, centrifugirani na 1200 o/min, u trajanju od 10 min, na 4°C i resuspendovani u čistom Henkovom rastvoru. Ćelijska gustina je podešena tako da je u 100 µl ćelijske suspenzije bilo 2×10^6 nukleisanih ćelija.

3.1.4. Implantacija i ekstrakcija implanata

Za implantaciju je korišćeno 168 Balb/c miševa. Životinje su nasumično podeljene u 7 eksperimentalnih grupa, sa 24 životinje po grupi. Implantacije su po tipu bile subkutane, a po mestu implantacije interskapularne. Pre eksperimenta su životinje anestetizirane 10% ketamidom (0.1 ml/ 10 g). Hirurško polje je obrijano i očišćeno penom i rastvorom povidon-joda. Implanati su uneti u subkutani džep kroz široku, sterilnu iglu za biopsiju. U svaku životinju su uneta po 4 implanta istog tipa, koja su raspoređena na 4 mesta u obliku X formacije (Slika 7).

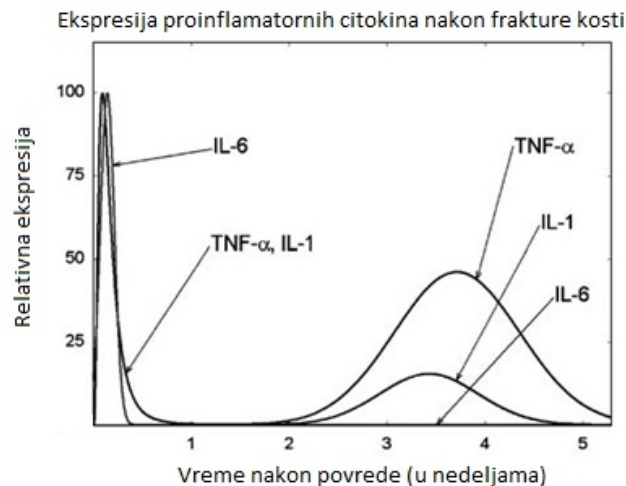


Slika 7. Prikaz položaja subkutanih implanata u Balb/c miševima.

Implanti su ekstrahovani nakon 1, 2, 4 i 8 nedelja od implantacije. U svakom terminu, u okviru svake grupe je bilo po 6 životinja sa po 4 implanta, što znači da je za svaki tip implanta i termin implantacije dobijeno po 24 implanta.

Termini ekstrakcija implanata su izabrani iz sledećih razloga prema literaturnim podacima (Slika 8):

1. nedelja: tokom prve nedelje zarastanja fraktura kosti dolazi do značajnog povećanja nivoa proinflammatoryh citokina,
2. nedelja: smatra se da se tokom 14 dana zarastanja frakture kosti završava inflamatorna faza,
4. nedelja: tokom četvrte nedelje zarastanja frakture kosti dolazi do drugog značajnog povećanja nivoa proinflammatoryh citokina,
8. nedelja: do kraja ovog perioda se očekuje formiranje novog koštanog tkiva (Mountziaris i Mikos, 2008; Shapiro, 2008)



Slika 8. Ekspresija proinflammatoryh citokina nakon frakture kosti. Preuzeto i modifikovano iz: Mountziaris i Mikos, 2008. Tissue Eng Part B Rev. 14: 179-186

3.1.5. Histomorfološka analiza svetlosnom mikroskopijom

Histomorfološka analiza implanata obuhvatila je svetlosno-mikroskopsku analizu preparata bojenih tehnikama hematoksilin-eozin (HE), trihromnim bojenjem po *Masson*-u (MTH) i toluidin-plavo bojenjem (TB), kao i imunohistohemijskim bojenjem (IHC) na osteopontin (OP) i osteokalcin (OC). Preparati su posmatrani i fotografisani na Leica DMSL svetlosnom mikroskopu (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

3.1.5.1. Priprema implanata za svetlosno-mikroskopsku analizu

Implanti su izolovani iz životinja, očišćeni od okolnog vezivnog i masnog tkiva i fiksirani najmanje 72h u 10% neutralnom formalinu. Uzorci su dekalcifikovani u 10% etilendiamintetrasirćetnoj kiselini (EDTA - *Ethylenediaminetetraacetic acid*, engl.; Sigma-Aldrich). Tkivo je sprovedeno do parafina dehidracijom u rastućim koncentracijama etanola (50%, 70%, 95%; Merck, Germany) sa svakim u trajanju od 120 min, a zatim preko noći u apsolutnom etanolu. Zatim su uzorci stajali u toluolu u trajanju od 240 min nakon čega su kalupljeni u paraplast.

Uzorci su sečeni mikrotomom (*Leica RM2255*, Leica Microsystems), a debljina preseka je bila 4 µm. Pločice sa presecima su stajale u termostatu 1h, da bi na kraju bile potopljene u ksilol u trajanju od 10 min.

Mikroskopske pločice sa tkivnim presecima su provučene kroz seriju etanola opadajuće koncentracije (100%, 95%, 70%, 50%) do destilovane vode. Zatim su bojene dole navedenih tehnikama i tkivni preseci su analizirani na Leica DMSL svetlosnom mikroskopu.

Hematoksilin-eozin bojenje

Tkivni preseci su bojeni *Harris*-ovim hematoksilinom 10 min, zatim su isprani tekućom vodom i bojeni eozinom 1 min. Nakon bojenja su mikroskopske pločice sa uzorcima sprovedene od destilovane vode kroz seriju etanola rastuće koncentracije do apsolutnog alkohola. Na kraju su prosvetljene u ksilolu najmanje 5 min, nakon čega su montirana pokrovna stakla.

Trihromno bojenje po Masson-u

Tkivni preseci su bojeni *Weigert*-ovim hematoksilinom 10 min i isprani u destilovanoj vodi. Zatim su 2 min bojeni mešavinom rastvora kiselog fuksina i Ponso 2R rastvora u odnosu 1:2 i opet isprani destilovanom vodom. Na pločice je naneta 1% fosfomolibdenska kiselina i to 2 puta po 1 min, a zatim preko nje rastvor Anilin plavog u trajanju od 5 min, nakon čega je vršeno ispiranje destilovanom vodom. Nakon bojenja su mikroskopske pločice sa uzorcima sprovedene od destilovane vode kroz seriju etanola rastuće koncentracije do apsolutnog alkohola. Na kraju su stajale u ksilolu najmanje 5 min, nakon čega su montirana pokrovna stakla.

Toluidin-plavo bojenje

Tkivni preseci su bojeni 1% rastvorom toluidin plavog u trajanju od 20 min, a zatim isprani u destilovanoj vodi. Nakon bojenja su mikroskopske pločice sa uzorcima sprovedene od destilovane vode kroz seriju etanola rastuće koncentracije do apsolutnog

alkohola. Na kraju su stajale u ksilolu najmanje 5 min, nakon čega su montirana pokrovna stakla.

Imunohistohemijska bojenja streptavidin-biotin metodom

Tkivni preseci su bojeni antitelima na osteokalcin (OC, ab93876, Abcam, USA) i osteopontin (OP, ab8448, Abcam, USA). Za imunohistohemijsku detekciju je korišćen HRP/DAB detekcioni IHC kit (ab64261 Abcam, USA), prema uputstvu proizvođača.

Preseci su deparafinisani ksilolom (2 x 3 min) i rehidratirani u seriji etanola opadajuće koncentracije (100%, 95%, 70%, 50%) svakim ponaosob u trajanju od 3 min, a zatim ispirani u tekućoj vodi.

Pozadinsko i nespecifično bojenje sprečeno je inaktivacijom endogene peroksidaze inkubacijom preseka sa vodonik peroksidom (*Hydrogen Peroxide Block*, engl.) 10 min na sobnoj temperaturi, i inkubacijom preseka u blokirajućem serumu (*Protein Block*, engl.) 5 min na sobnoj temperaturi.

Inkubacija sa primarnim antitelima je trajala 60 min i odvijala se na temperaturi od 37°C. Anti-OC i anti-OP antitela su razblažena u odnosu 1:200 u PBS-u.

Nakon inkubacije sa primarnim antitelima preseci su inkubirani sa biotinizovanim sekundarnim antitelom (*Biotinylated goat anti-rabbit IgG*, engl.) i to 10 min na sobnoj temperaturi, kao i streptavidin peroksidazom pod istim uslovima. Kompleks streptavidina i peroksidaze se vezuje za biotin na sekundarnom antitelu. Obojeni signal je dobijen inkubacijom sa DAB hromogenom i njegovim supstratom (20 µl DAB hromogena u 1 ml DAB supstrata) u trajanju od 10 min na sobnoj temperaturi.

Tkivni preseci su kontrastirani *Mayer*-ovim hematoksilinom, dehidratirani kroz seriju etil alkohola rastućih koncentracija i montirani u permauntu.

Za negativnu kontrolu su uzeti preseci kosti miša i svih grupa implanata tretiranih po navedenom protokolu, ali bez inkubacije sa primarnim antitelom.

Za pozitivnu kontrolu su uzeti preseci kosti miševa tretiranih po navedenom protokolu.

Pod svetlosnim mikroskopom jasno se uočava braon obojeni proizvod reakcije.

3.2. Eksperimenti *in vitro*

Eksperimentalni rad u *in vitro* uslovima podrazumevao je preliminarna istraživanja na PM, istraživanja na monocitno-makrofagnoj ćelijskoj liniji RAW 264.7 mišje leukemije i istraživanja osteogene diferencijacije preosteoblastne ćelijske linije MC3T3-E1. Eksperimenti ove vrste su urađeni na Odeljenju za ćelijsko i tkivno inženjerstvo Naučnoistraživačkog centra za biomedicinu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu.

3.2.1. Ćelijske linije

3.2.1.1. L929 ćelijska linija

L929 ćelije su mišja fibroblastna ćelijska linija dobijena iz Balb/c miševa. U našim eksperimentima L929 ćelije su kultivisane u DMEM-u obogaćenom sa 10% fetalnim goveđim serumom (FBS – *Fetal Bovine Serum*, engl.; PAA Laboratorie, Austria), 2 mM L-glutaminom i antibiotik-antimikotik rastvorom u inkubatoru na 37°C u atmosferi zasićenoj vlažnošći i u prisustvu 5% CO₂. Medijum je menjan na svaka 2-3 dana do dostizanja odgovarajuće konfluentnosti.

3.2.1.2. MC3T3-E1 ćelijska linija

MC3T3-E1 je preosteoblastna ćelijska dobijena iz C57BL/6 soja miševa, koja se često koristi kao model u ispitivanjima biologije kosti. Ova ćelijska linija je jedan od najkonvencionalnijih i fiziološki najrelevantnijih sistema za našu vrstu istraživanja. MC3T3-E1 ćelije su kultivisane u DMEM-u obogaćenom sa 10% FBS, 2 mM L-glutaminom i antibiotik-antimikotik rastvorom u inkubatoru na 37°C i 5% CO₂. Medijum je menjan na svaka 2-3 dana do dostizanja odgovarajuće konfluentnosti.

3.2.1.3. RAW 264.7 ćelijska linija

RAW 264.7 ćelijska linija je monocitno-makrofagna ćelijska linija miše leukemije Balb/c miševa. U našim eksperimentima RAW 264.7 ćelije su kultivisane u DMEM-u obogaćenom sa 10% FBS-om, 2 mM L-glutaminom i antibiotik-antimikotik rastvorom u inkubatoru na 37°C i 5% CO₂. Ćelije su pasažirane na svaka 2-3 dana.

3.2.2. Kratkotrajne ćelijske kulture makrofaga

U eksperimentima sa kratkotrajnim ćelijskim kulturama makrofaga su korišćeni RPM i TEPM kolektovani iz peritoneuma Balb/c miševa. RPM odnosno TEPM su zasađeni u gustini 2×10^6 nukleisanih ćelija u 1 ml RPMI 1640 medijuma obogaćenog sa 2% FCS, 2 mM L-glutaminom i antibiotik-antimikotik rastvorom u sterilnu ploču sa 12 bunara (Greiner Bio-One, Germany). Ćelije su inkubirane 3 h u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂ na 37°C da bi se zalepile za dno plastične posude. Nakon isteka perioda inkubacije su ćelije koje se nisu zalepile isprane PBS-om, a adherirane ćelije, koje su predstavljale popuaciju PM, su korišćene u daljem eksperimentu.

3.2.3. Tretman rezidentnih peritonealnih makrofaga lipopolisaharidom i kolektovanje kondicioniranog medijuma

RPM su tretirani LPS-om (0111:B4 *Escherichia coli*) rastvorenim u medijumu za kultivaciju. Napravljene su sledeće koncentracije LPS-a u DMEM-u: 100 ng/ml, 10 ng/ml i 1 ng/ml. Ćelije su inkubirane 24 h u sterilnoj ploči za kultivaciju sa 12 bunara u po 2 ml medijuma sa navedenim koncentracijama LPS-a, a kontrole su bile ćelije u medijumu bez LPS-a (0 ng/ml). Kondicionirani medijumi makrofaga su pripremljeni prema ranije publikovanim protokolima, uz modifikacije (Sassa i sar., 1983; McKenna i sar., 1988). Kondicionirani medijumi su aspirirani iz bunara i centrifugirani na 3000 o/min, 10 min, na sobnoj temperaturi. Zatim su filtrirani kroz filter sa porama veličine 0.2 µm (Minisart[®] Sartorius, Wien, Austria), alikvotirani i zamrznuti na -20°C do dalje upotrebe.

3.2.4. Tretman RAW 264.7 makrofaga lipopolisaharidom i deksametazonom i kolektovanje kondicioniranog medijuma

U ovom eksperimentu 2×10^5 RAW 264.7 ćelija je zasađeno po bunaru u sterilnoj ploči za kultivaciju sa 12 bunara u DMEM medijumu obogaćenom sa 10% FBS-om, 2 mM L-glutaminom i antibiotik-antimikotik rastvorom. Nakon 24 h inkubacije pod standardnim uslovima, stari medijum je uklonjen i ćelijama je dodat DMEM medijum sa odgovarajućom koncentracijom LPS-a ili deksametazona. LPS je korišćen u koncentraciji 100 ng/ml ili 1 ng/ml, dok je deksametazon korišćen u koncentraciji 10^{-6} M. Ukupno je dodato po 2 ml navedenih medijuma u kojima su ćelije inkubirane 4 h, a zatim su ovi medijumi uklonjeni, a svim ćelijama je dodat svež DMEM medijum u kome su ćelije inkubirane još 20 h. Kontrola su bile ćelije koje su tokom 4 h + 20 h inkubirane u standardnom DMEM-u, tj. sa zamenom medijuma nakon prva 4 h inkubacije. Kondicionirani medijumi su izdvojeni iz bunara i centrifugirani na 3000 o/min, u trajanju od 10 min, na sobnoj temperaturi, a zatim su filtrirani kroz filter sa porama veličine 0.2 μ m, alikvotirani i zamrznuti na -20°C do dalje upotrebe.

3.2.5. Metode za funkcionalnu analizu makrofaga

3.2.5.1. L929 bioesej za determinaciju TNF- α

Prisustvo TNF- α u kondicioniranim medijumima je određeno testom citotoksičnosti na L929 ćelijskoj liniji. Ova ćelijska linija se najčešće koristi u tu svrhu zbog visoke osetljivosti na TNF- α (Shiau i sar., 2001). Nakon postizanja odgovarajuće konfluentnosti ćelije su odlepljene rastvorom Tripsin-EDTA (PAA Laboratoies, Austria) i centrifugirane na 1000 o/min, 10 min, na 4°C . U ovom eseju je zasađeno 2.5×10^4 ćelija po bunaru u sterilnu ploču za kultivaciju sa 96 bunara u DMEM -u obogaćenom sa 10% FBS-om, 2 mM L-glutaminom i antibiotik-antimikotik rastvorom. Nakon 24 h inkubacije pod standardnim uslovima, medijum je uklonjen i kondicionirani medijumi makrofaga sa sadržajem FBS-a u finalnoj koncentraciji od 10% i 2 mM L-glutaminom su dodati ćelijama. Standardni medijum sa sadržajem suplemenata kao što je iznad navedeno (kontrolni medijum) je dodat ćelijama koje su iskorišćene kao

kontrola. Čelije su inkubirane još 24 h sa kondicioniranim ili kontrolnim medijumom. Čelije su na kraju inkubacionog perioda mikroskopski analizirane pod invertnim svetlosnim mikroskopom (Observer Z1, Carl Zeiss, Nemačka), a zatim je izveden MTT test citotoksičnosti.

MTT test

MTT test citotoksičnosti je kolorimetrijski test baziran na redukciji žute tetrazolijumove soli 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2, 5-difeniltetrazolijum bromida (MTT, Carl Roth, Germany) od strane mitohondrijalnih dehidrogenaza vijabilnih ćelija, do ljubičasto obojenog formazana koji je nerastvoran u vodi. U našem eksperimentu test je izveden po osnovnim principima Mosmannove metode (Mosmann, 1983), sa modifikacijama. Nakon odgovarajućeg inkubacionog perioda, ćelije su isprane PBS-om i zatim je po 100 µl MTT rastvora u koncentraciji 1 mg/ml dodato u svaki bunar. Čelije su inkubirane u MTT rastvoru naredna 3 h na 37°C. Kristali formazana su rastvoreni sa 100 µl 2-propanola (Fischer Chemical, USA) i onda je merena absorbanca na ELISA reader-u (Thermo Labsystems) na 540 nm. Rezultati su prikazani kao procenat ćelijske vijabilnosti od kontrole koji je računat po sledećoj formuli: % ćelijske vijabilnosti = vrednost absorbance ćelija u kondicioniranom medijumu * 100 / vrednost absorbance ćelija u kontrolnom medijumu.

3.2.5.2. Mikroskopski NBT test

NBT (*Nitroblue tetrazolium*, engl.) test se konvencionalno koristi za određivanje unutarćelijske produkcije reaktivnih jedinjenja kiseonika (ROS; *Reactive oxygene species*, engl.) u fagocitima, kroz njihovu sposobnost da redukuju NBT supstancu (Choi i sar., 2006). Mikroskopski NBT test je izveden prema principima Gifford i Malawista metode (Gifford i Malawista, 1972) sa nekim modifikacijama. U ovom testu su korišćene kulture makrofaga u sterilnoj ploči za kultivaciju sa 12 bunara, koje su paralelno testirane na produkciju TNF-α. Medijumi u kojima su ćelije kultivisane su uklonjeni i ćelije su isprane svežim medijumom. NBT rastvor, pripremljen rastvaranjem NBT praha (*Nitrotetrazolium Blue chloride*, engl.; Sigma-Aldrich) u PBS-u (pH 7.4), je

filtriran kroz filter sa porama veličine 0.2 μm i dodat makrofagima u koncentraciji 0.1% (w/v). Da bi se stimulisala redukcija NBT-a, dodat je forbol miristat acetat (PMA; *Phorbol 12-myristate 13-acetate*, engl.; Sigma-Aldrich) u finalnoj koncentraciji 10^{-6} M. Čelije su inkubirane u NBT-PMA rastvoru 30 min na 37°C . Makrofagi su redukovali žuto obojeni NBT u vrlo tamne kristale formazana. Čelije su na kraju inkubacionog perioda isprane PBS-om i fiksirane 5 min u metanolu na sobnoj temperaturi. Fiksirane čelije su isprane destilovanom vodom i osušene na vazduhu. Čelije su analizirane pod invertnim svetlosnim mikroskopom, prethodno prekrivene malom količinom PBS-a kako bi se granule formazanskih kristala lepo videle bez kontrastnog bojenja. Za semikvantitativnu analizu NBT testa korišćena je skala od "0" do "3". Sa "0" su označene čelije bez depozita formazana, sa "1" čelije sa malom količinom praškastog formazana, sa "2" čelije sa nekoliko gustih formazanskih nakupina i sa "3" čelije potpuno ispunjene formazanskim kristalima. Procenat svake klase čelija je računat nakon brojanja najmanje 250 čelija u tetraplikatu. Klasa "0" predstavlja NBT negativne, a ostale klase su NBT pozitivne čelije.

3.2.6. Osteogena diferencijacija *in vitro*

U eksperimentima osteogene diferencijacije korišćene su MC3T3-E1 čelije, koje su kultivisane u kondicioniranim medijumima iz eksperimenata sa RAW 264.7 ćelijama. Prvo je urađen test proliferacije sa 100%, 50% i 25% razblaženjima ovih medijuma.

3.2.6.1. Test ćelijske proliferacije

U cilju ispitivanja ćelijske proliferacije u kondicioniranim medijumima korišćen je kristal-violet test, koji je baziran na sposobnosti kristal-violet boje da se veže za nasledni materijal živih ćelija koje su adherirale za dno plastične posude u kojoj se gaje (Flick i Gifford, 1984). To je zapravo metoda za kvantifikaciju broja ćelija u jednoslojnim kulturama, koja se izražava kao vrednost absorbance boje usvojene od strane ćelija. MC3T3-E1 čelije su zasađene u gustini od 5×10^3 ćelija/bunaru, u sterilnoj ploči za kultivaciju sa 96 bunara. Čelije su ostavljene 24 h u DMEM-u obogaćenom sa

10% FBS, 2 mM L-glutaminom i antibiotik/antimikotik rastvorom da adheriraju za podlogu. Zatim su dodati kondicionirani medijumi dobijeni u eksperimentima sa RAW 264.7 ćelijskom linijom u koncentracijama 100%, 50% i 25% i ćelije su inkubirane još 72 h. Svaka koncentracija kondicioniranog medijuma stavljana je u tetraplikatu a srednja vrednost uzeta je iz tri nezavisna eksperimenta. Nakon isteka inkubacionog perioda, ćelije su isprane PBS-om da bi se uklonile nežive, neadherentne ćelije. Preostale vijabilne, adherentne ćelije su fiksirane metanolom i bojene 1% rastvorom kristal-violeta na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 min. Zatim su ćelije isprane pod mlazom tekuće vode i boja kristal-violet je rastvorena 33% rastvorom sirćetne kiseline. Absorbanca rastvorene boje, koja je u korelaciji sa brojem vijabilnih ćelija je merena na ELISA reader-u (Thermo Labsystems) na 570 nm. Rezultati su predstavljeni kao procenat ćelijske proliferacije od kontrole koji je računat po sledećoj formuli: % ćelijske proliferacije = vrednost absorbance ćelija u kondicioniranom medijumu * 100 / vrednost absorbance ćelija u kontrolnom medijumu.

3.2.6.2. Osteogena diferencijacija MC3T3-E1 ćelija

Radi ispitivanja osteogene diferencijacije ćelija *in vitro*, MC3T3-E1 ćelije su posađene u gustini od 1000 ćelija/bunaru u sterilnu ploču za kultivaciju sa 24 bunara. Ćelije su kultivisane u DMEM medijumu obogaćenom sa 10% FBS, 2 mM L-glutaminom i antibiotik/antimikotik rastvorom da adheriraju za plastično dno bunara 24 h. Nakon isteka ovog perioda iz bunara sa ćelijama je uklonjen DMEM i zamenjen 100% i 25% razblaženjima kondicioniranih medijuma iz tretmana RAW 264.7 ćelija. Kondicioniranim medijumima su dodati osteogeni faktori i to: 50 µM askorbinske kiseline 2-fosfata i 2 mM β-glicerofosfata (Vunjak-Novakovic i Freshney, 2006; Wang i sar., 2010). Uporedo su ispitivane ćelije koje su rasle samo u osteogenom medijumu ili samo u DMEM medijumu. Eksperiment je rađen u tetraplikatu. Ćelijama je menjan medijum svakog trećeg dana. Osteogena diferencijacija je završena 6. dana fiksacijom ćelija u 10% formalinu u trajanju od 15 min.

3.2.7. Metode svetlosno-mikroskopskog ispitivanja osteogeno diferenciranih ćelija

Bojenje Von Kossa

Bojenje *Von Kossa* korišćeno je u cilju detekcije kristala fosfata u kulturama osteogeno diferenciranih ćelija. Pločice sa fiksiranim ćelijama su tretirane 2% rastvorom srebro-nitrata u trajanju od 30 do 60 min pod UV svetlom, a onda 5% rastvorom natrijum-tiosulfata u trajanju od 5 min. Zatim su kontrastirane rastvorom *Nuclear Fast Red* u trajanju od 1 min, isprane tekućom vodom, osušene i montirane na predmetna stakla.

Imunocitohemijska bojenja streptavidin-biotin metodom

Pločice sa ćelijama su bojene antitelima na osteokalcin (OC, ab93876, Abcam, USA) i osteopontin (OP, ab8448, Abcam, USA). Za imunocitohemijsku detekciju je korišćen HRP/DAB detekcioni IHC kit (ab64261 Abcam, USA), prema uputstvu proizvođača.

Pre bojenja su ćelije tretirane rastvorom 0.25% Triton X u trajanju od 10 min, radi permeabilizacije ćelijske membrane.

Pozadinsko i nespecifično bojenje sprečeno je inaktivacijom endogene peroksidaze vodonik peroksidom 10 min na sobnoj temperaturi, i inkubacijom pločica u blokirajućem serumu 5 min na sobnoj temperaturi.

Inkubacija sa primarnim antitelima je trajala 60 min i odvijala se na temperaturi od 37°C. Anti-OC i anti-OP antitela su razblažena u odnosu 1:500 u PBS-u.

Nakon inkubacije sa primarnim antitelima pločice sa ćelijama su inkubirane sa biotinizovanim sekundarnim antitelom i to 10 min na sobnoj temperaturi, kao i streptavidin peroksidaza pod istim uslovima. Kompleks streptavidina i peroksidaze se vezuje za biotin na sekundarnom antitelu. Obojeni signal je dobijen inkubacijom sa DAB hromogenom i njegovim supstratom (20 µl DAB hromogena u 1 ml DAB supstrata) u trajanju od 10 min na sobnoj temperaturi.

Ćelije su kontrastirane *Mayer*-ovim hematoksilinom u trajanju od 1 min i montirane.

Pod svetlosnim mikroskopom jasno se uočava braon obojeni proizvod reakcije. Svi imunocitohemijski obojeni preparati posmatrani su i fotografisani na Leica DMSL svetlosnom mikroskopu.

4. REZULTATI

U ovoj doktorskoj disertaciji eksperimenti su dizajnirani tako da se može pratiti i analizirati efekat makrofaga na proces ektopične osteogeneze u uslovima *in vivo* i različitim uslovima *in vitro*, pa su i rezultati prema tome podeljeni u dva odeljka.

4.1. Rezultati *in vivo* istraživanja

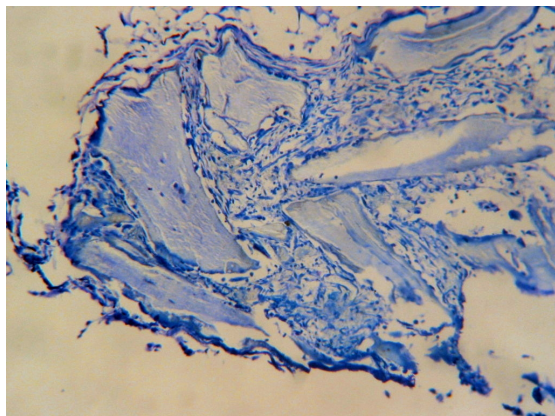
Subkutani implantati su ekstrahovani nakon 1, 2, 4 i 8 nedelja od implantacije. Nakon standardne obrade uzoraka i sečenja, preparati sa isečcima su bojeni histohemijskim i imunohistohemijskim tehnikama (IHC) i analizirani na nivou svetlosne mikroskopije.

4.1.1. Histološki nalaz nakon nedelju dana od implantacije

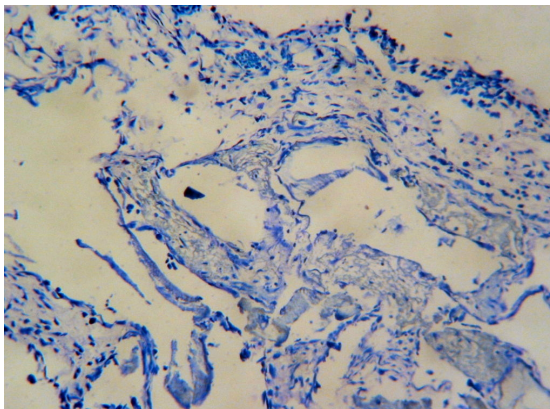
4.1.1.1. Implantati sa rezidentnim peritonealnim makrofagima - NM tip

Histološki nalaz na implantima NM tipa pokazuje da se oko njih nalazi višeslojna vezivna kapsula u kojoj su prisutne ćelije. Implantati poseduju kompaktnu strukturu (Slike 9a i b). Resorpcija granula mineralnog matriksa kosti (MMK) je generalno slaba, mada postoje mesta gde je izraženija. Pojedine granule fagociti ne razgrađuju samo površinski, već i iznutra. Na nekim mestima su se u granule MMK infiltrirale sitne ćelije, okruglog oblika, koje se jako boje HE bojenjem (Slika 9c). Mestimično se vidi distribucija boje koja odgovara regionima granula natopljenih ćelijskim sekretima (Slika 9a). Između granula MMK je vezivno tkivo koje je bogato ćelijama i vlaknima i njemu se mogu uočiti brojni krvni sudovi, uglavnom malog dijametra (Slika 9d). O prisustvu većih krvnih sudova koji su razvijeni da opskrbljuju implant može se zaključiti na osnovu hemoragije prisutne na dosta analiziranih isečaka implanata. I na periferiji i u unutrašnjosti implanata postoji nezrelo vezivno tkivo (Slika 9b). Vlakna kolagena zastupljena su pre svega u vezivnoj kapsuli. Na površini granula se ponegde mogu zapaziti spljoštene ćelije, vretenastog oblika, nalik preosteoblastima.

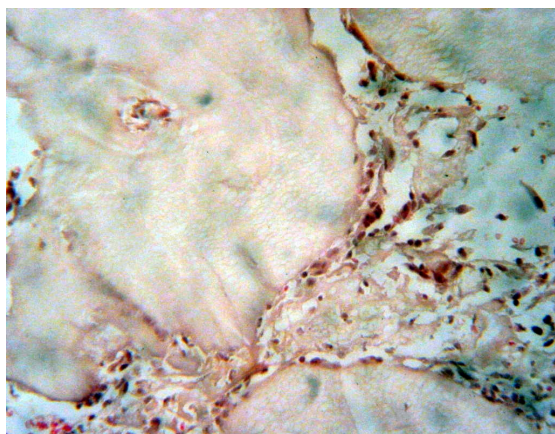
Imunoekspresija osteopontina (OP) je umerena (Slika 9e), dok je imunoekspresija osteokalcina (OC) slaba (Slika 9f).



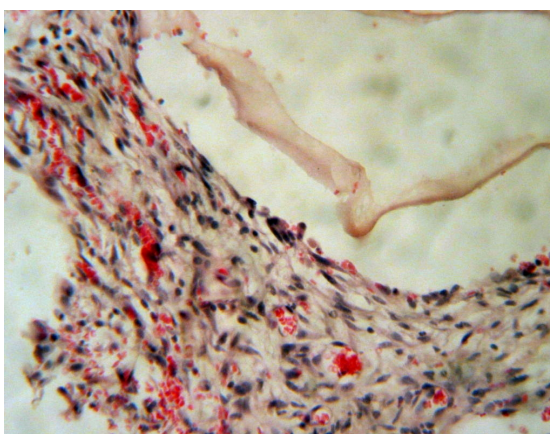
a



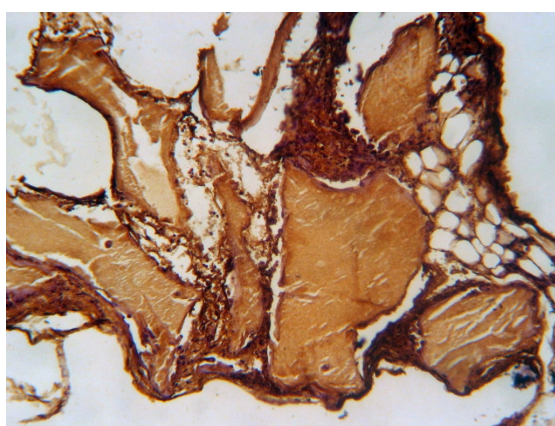
b



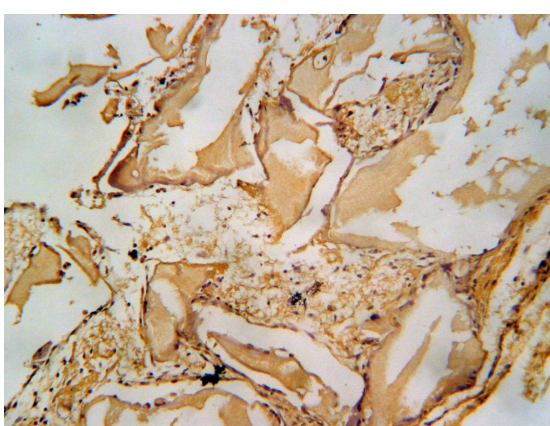
c



d



e



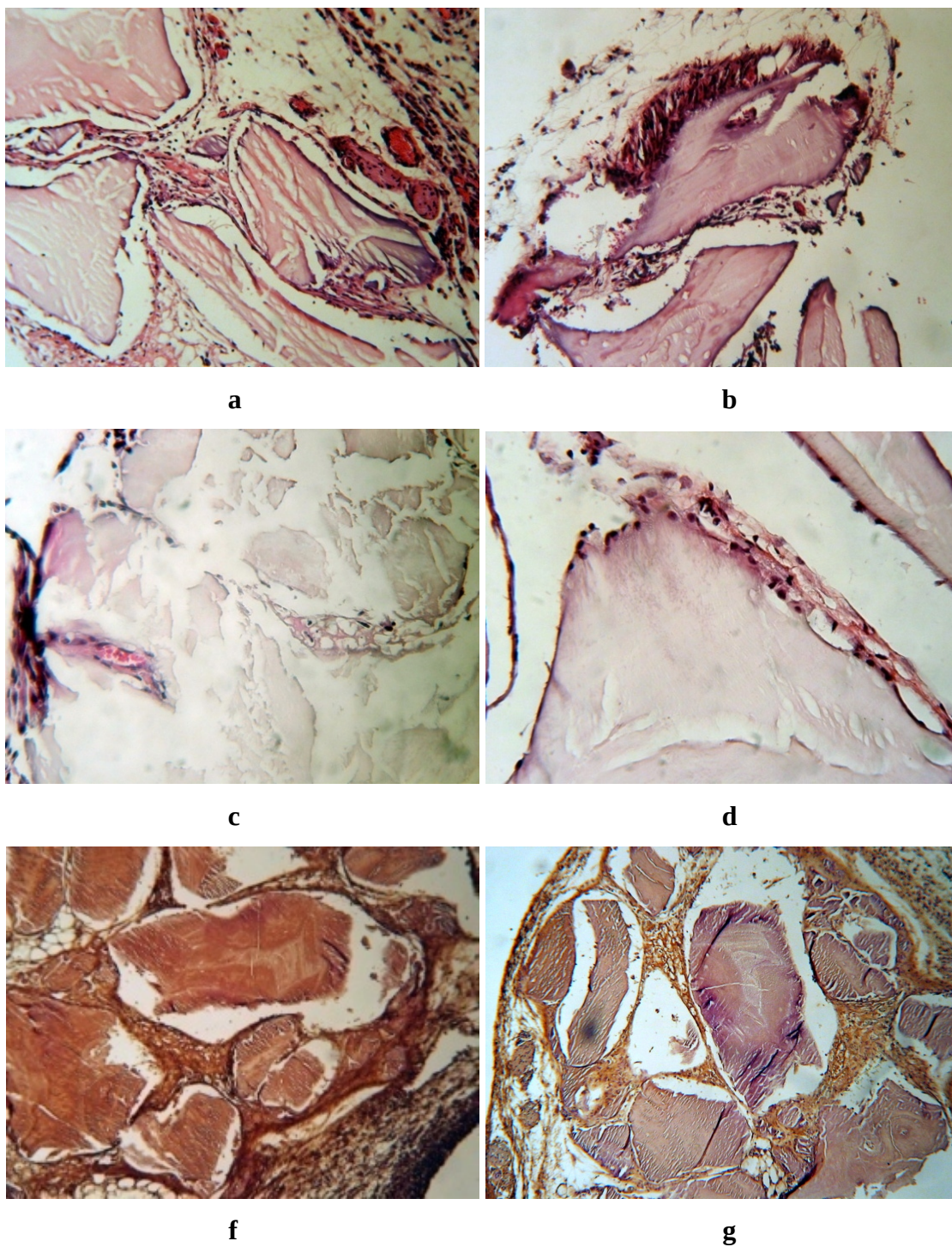
f

Slika 9. Implanti sa rezidentnim peritonealnim makrofagima nedelju dana nakon implantacije

- a. granule mineralnog matriksa kosti natopljene su ćelijskim sekretima; TB, 200x
- b. nezrelo vezivno tkivo razvijeno je i na periferiji i u unutrašnjosti implanta; TB, 200x
- c. ćelije naslojavaju površinu granula mineralnog matriksa kosti i infiltriraju njihovu unutrašnjost; HE 400x
- d. vezivno tkivo između granula mineralnog matriksa kosti bogato je ćelijama i krvnim sudovima; HE, 400x
- e. osteopontin; IHC, 200x
- f. osteokalcin; IHC, 100x

4.1.1.2. Implanti sa tioglikolatom elicitiranim peritonealnim makrofagima - TM tip

Oko implanata TM tipa postoji vezivna kapsula koja je dobro razvijena, bogata ćelijama i krvnim sudovima (Slika 10a). Granule MMK su krupne, a proces resorpcije, čiji su akteri mahom jednojedarni fagociti, je u početnoj fazi (Slika 10b). Na periferiji implanata prostori između granula su bogatiji ćelijama, vlaknima i sitnim krvnim sudovima, dok u unutrašnjosti implanata postoji fibrinska mreža sa retkim ćelijama (Slike 10a i c). Na periferiji implanata se zapaža i nezrelo vezivno tkivo, koje je bogato krvnim sudovima (Slika 10a). Ćelije naslojavaju granule MMK, a na nekim mestima ih infiltriraju. Manje ćelije sa krupnim okruglim jedrima na površini granula MMK nalikuju preosteoblastima (Slika 10d). Imunoekspresija osteopontina (OP) je jaka i on prožima i granule MMK i sam vanćelijski matriks (Slika 10f), dok je imunoekspresija osteokalcina (OC) slaba, skoncentrisana u vanćelijskom matriksu (Slika 10g).



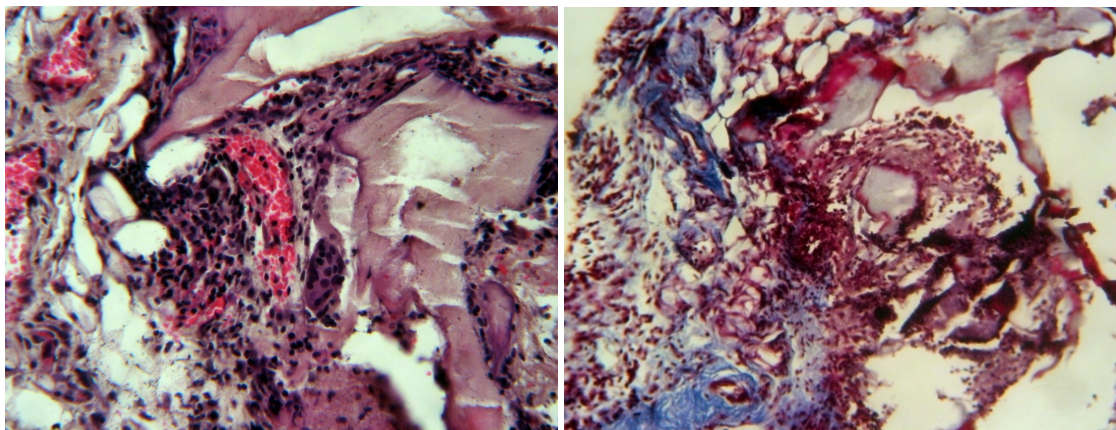
Slika 10. Implanti sa tioglikolatom elicitiranim peritonealnim makrofagima nedelju dana nakon implantacije:

- a.** oko implanta postoji vezivna kapsula bogata krvnim sudovima, dok se u prostorima među granulama u unutrašnjosti implanta vidi fibrinska mreža; HE, 200x

- b. granule mineralnog matriksa kosti u resorpciji; HE, 200x
- c. ćelije i krvni sud u granuli mineralnog matriksa kosti; HE, 400x
- d. ćelije na površini granula mineralnog matriksa kosti; HE, 400x
- e. osteopontin; IHC, 100x
- f. osteokalcin; IHC, 100x

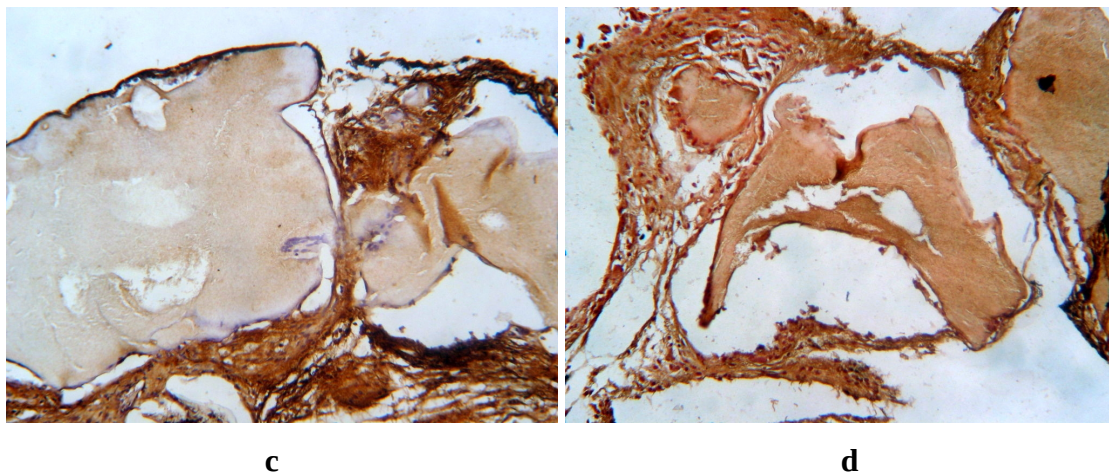
4.1.1.3. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim nižom koncentracijom lipopolisaharida - LM1 tip

Oko implanata LM1 tipa se uočava debela, ćelijama bogata vezivna kapsula, koja sadrži krvne sudove. Prisutne su krupne, višejedarne fagocitne ćelije, a granule MMK su redukovane i istanjene, zbog izraženog procesa resorpcije (Slika a). Vezivno tkivo između granula MMK je jako bogato ćelijama, među kojima se ističu neutrofili. U implantima se na pojedinim mestima može uočiti granulomatozna reakcija (Slika a). Vlakna kolagena su zastupljena pre svega u kapsuli i u perifernim regionima implanata (Slika b). Na pojedinim mestima se na površini granula MMK zapažaju jednojedarne ćelije raspoređene u jednom sloju, kao i ćelije koje su infiltrirale granule MMK (Slike 11a i b). Imunoekspresija osteopontina (Slika 11c) i osteokalcina je umerena (Slika 11d).



a

b



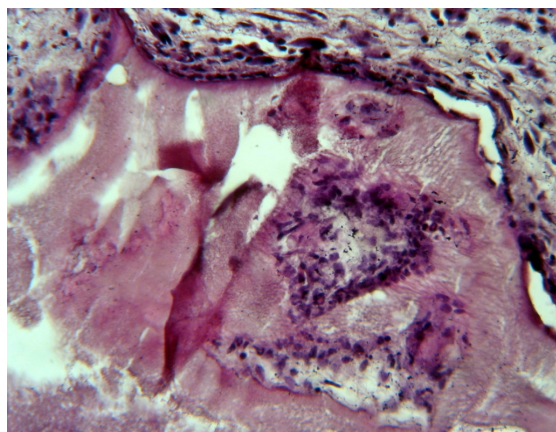
Slika 11. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim nižom koncentracijom lipopolisaharida nedelju dana nakon implantacije:

- a. na periferiji implanta je vezivna kapsula sa ćelijama, ispod koje se nalaze krvni sudovi. Granule mineralnog matriksa kosti su dosta resorbovane, a prisutna je i infiltracija neutrofila; HE, 400x
- b. vlakna kolagena rasuta su pretežno u vezivnoj kapsuli i periferiji implanta, a ispod nje se nalaze nezrelo vezivno i masno tkivo; MTH, 200x
- c. osteopontin; IHC, 200x
- d. osteokalcin; IHC, 200x

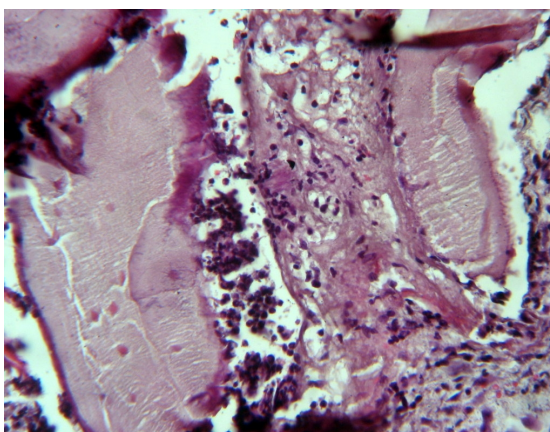
4.1.1.4. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim višom koncentracijom lipopolisaharida - LM2 tip

Oko implanata LM2 tipa prisutna je široka vezivna kapsula, bogata ćelijama. Izrazita resorpcija granula MMK je okarakterisana prisustvom krupnih višejedarnih fagocita. Granule MMK su jako resorbovane i u njih, sa periferije implanata, prodiru ćelijama bogato vezivno tkivo (Slika 12a). Između granula MMK u unutrašnjosti implanata može se videti fibrinska mreža sa retkim jednojedarnim ćelijama (Slika 12b). Primetna je jaka infiltracija neutrofila u implante, ali i u same granule MMK (Slika 12b). Krvni sudovi su retki. Vlakna kolagena su zastupljena prevashodno u vezivnoj kapsuli, a retka u samom matriksu implanata (Slika 12c). Na površini granula MMK se

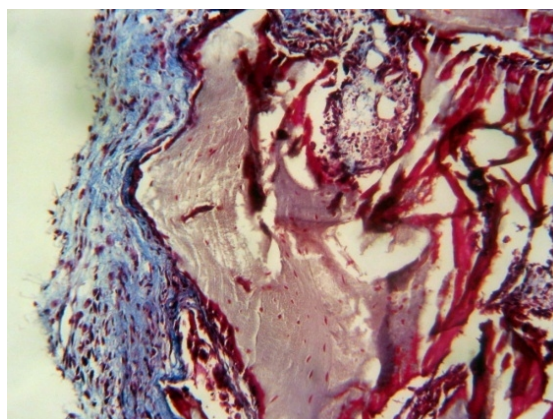
ponegde raspoređuju ćelije koje bi mogle biti prekursori osteoblasta ili osteoklasta (Slika 12a). Imunoekspresija OP (Slika 12d) je jaka, a OC slaba (Slika 12e).



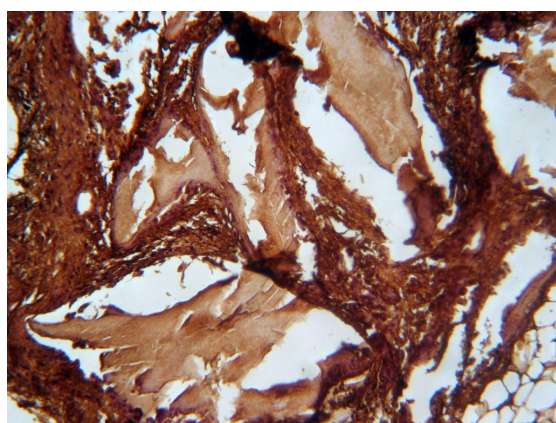
a



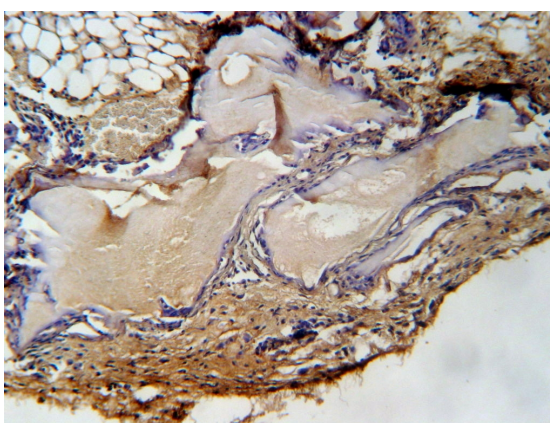
b



c



d



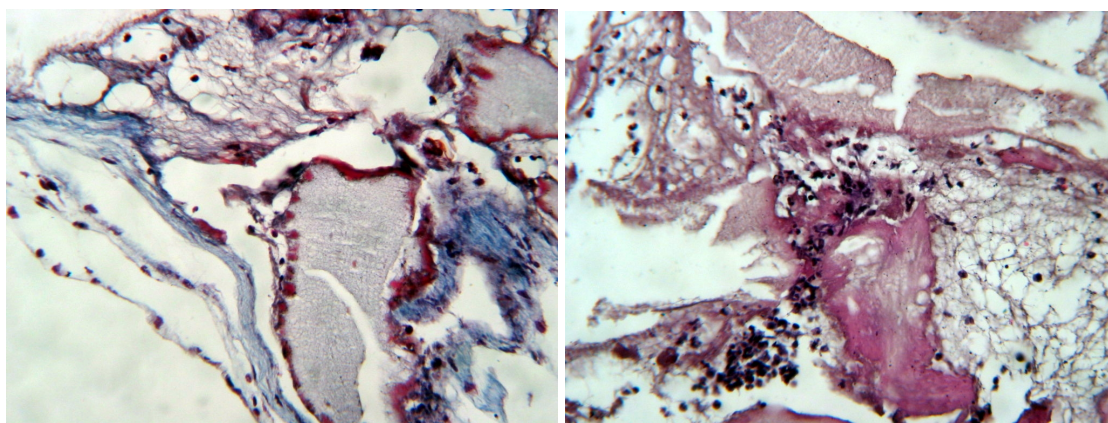
e

Slika 12. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim višom koncentracijom lipopolisaharida nedelju dana nakon implantacije:

- a. granule mineralnog matriksa kosti u resorpciji; HE, 400x
- b. fibrinska mreža u unutrašnjosti implanta; HE, 400x
- c. vezivna kapsula implanta bogata je kolagenom; MTH, 200x
- d. osteopontin; IHC, 100x
- e. osteokalcin; IHC, 200x

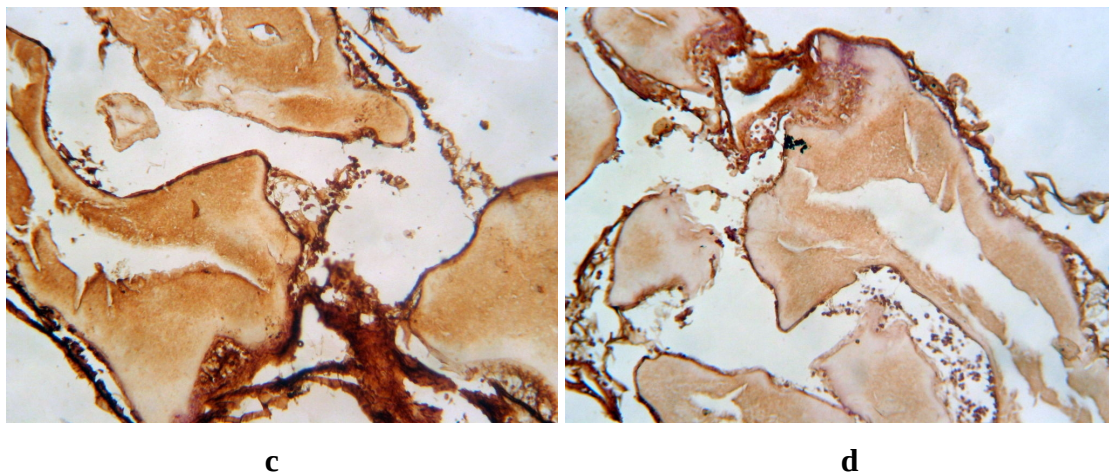
4.1.1.5. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim deksametazonom - DM tip

Tanka, rastresita, ćelijama siromašna vezivna kapsula obuhvata implante DM tipa (Slika 13a). Fagociti resorbuju granule MMK i spolja i iznutra. U unutrašnjosti implanata može se videti fibrinska mreža sa sitnim jednojedarnim ćelijama (Slika 13a i b). U implantima se na pojedinim mestima zapažaju i neutrofili (Slika 13b). Krvni sudovi su retki. Rastresita kolagena vlakna prisutna su prevashodno u vezivnoj kapsuli i u regionima ispod nje, dok su u unutrašnjosti implanata slabo zastupljena (Slika 13a). Imunoekspresija OP (Slika 13c) je umerena, a OC (Slika 13d) slaba.



a

b

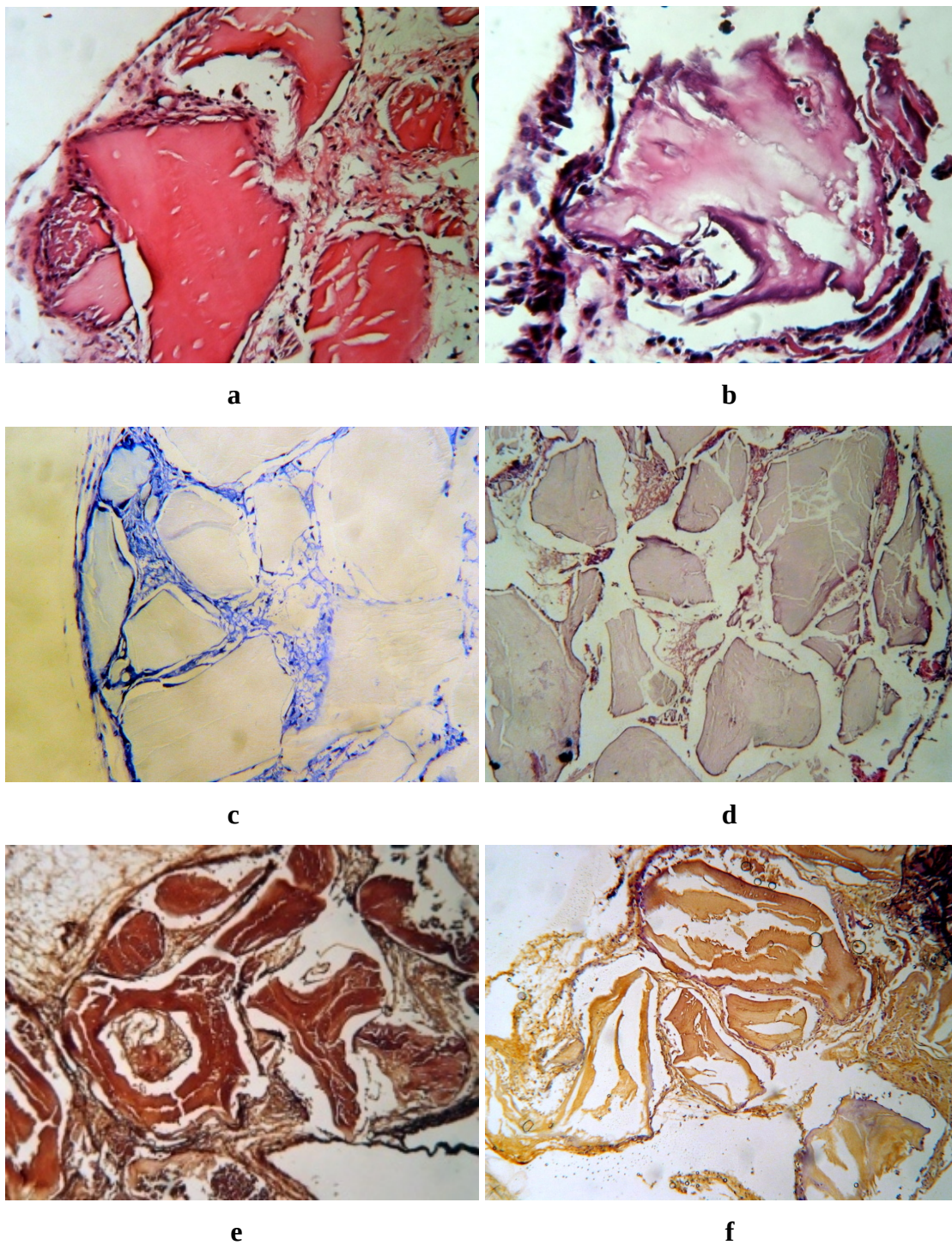


Slika 13. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim deksametazonom nedelju dana nakon implantacije:

- a. kolagena vlakna zastupljena su mahom u vezivnoj kapsuli; MTH, 200x
- b. prisustvo neutrofila u implantu; HE, 400x
- c. osteopontin; IHC, 200x
- d. osteokalcin; IHC, 200x

4.1.1.6. Implanti formirani kombinovanjem nosača makrofaga - K tip

Po površini implanata K tipa (koji su predstavljali kombinaciju krvnog ugruška i MMK) se nakon nedelju dana od implantacije opaža tanka vezivna kapsula (Slike 14a - 14d). Implanti još uvek imaju originalnu konzistenciju i granule MMK su krupne. Na periferiji implanata postoje znaci resorpcije granula (Slike 14a i b). Međutim, one nisu natopljene sekretima ćelija, verovatno zato što nema mnogo fagocita na njihovoj površini (Slika 14c). Između granula MMK se na periferiji implanata nalazi nezrelo vezivno vezivo, a u njihovoj unutrašnjosti je fibrinska mreža siromašna ćelijama (Slike 14a i d). U vezivnom tkivu na periferiji implanata postoje sitni krvni sudovi (Slika 14d). Ponegde se uočavaju ćelije koje naslojavaju površinu granula MMK (Slika 14a). Imunoekspresija OP je jaka (Slika 14e), dok je imunoekspresija OC slaba (Slika 14f).



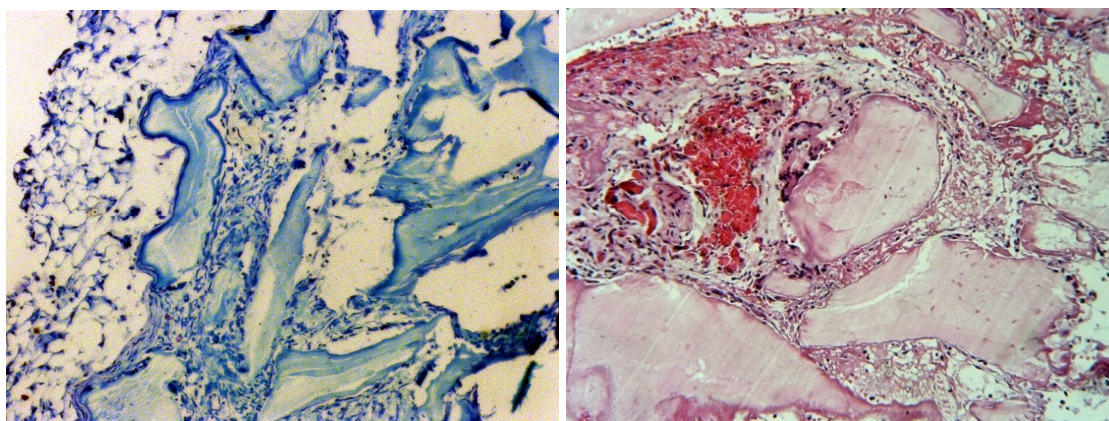
Slika 14. Implanti formirani kombinovanjem nosača makrofaga nedelju dana nakon implantacije:

- a. periferni deo implanta u kome se uočava proces resorpcije; HE, 200x
- b. granule mineralnog matriksa kosti infiltrirane jednojedarnim ćelijama; HE, 400x
- c. granule mineralnog matriksa kosti; TB, 200x

- d. ćelijama siromašna fibrinska mreža u unutrašnjosti implanta; HE, 100x
- e. osteopontin; IHC, 100x
- f. osteokalcin; IHC, 100x

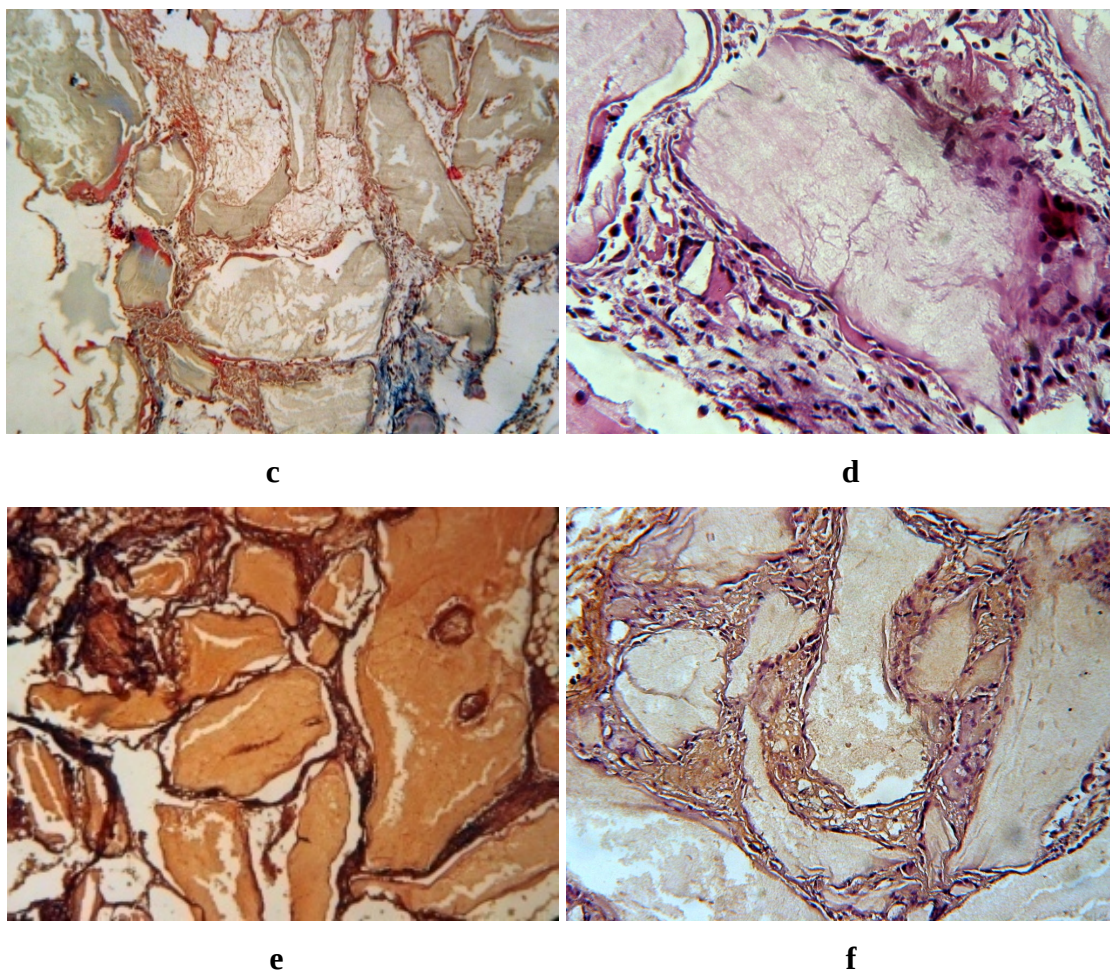
4.1.1.7. Implanti od mineralnog matriksa kosti - B tip

Vezivna kapsula oko implanata B tipa je tanka i sadrži ćelije, a na nekim mestima je prožeta masnim tkivom (Slika 15a). Granule MMK u implantima B tipa su krupne, a u procesu resorpcije učestvuju pojedinačni, višejedarni fagociti, koji resorbuju granule i spolja i iznutra (Slike 15b i d). Vezivno tkivo na periferiji implanata je bogatije ćelijama i u njemu su zastupljeni retki krvni sudovi malog dijametra, za razliku od unutrašnjosti implanata gde postoji ćelijama siromašna fibrinska mreža (Slike 15b i c). Tanka kolagena vlakna zastupljena su mahom u vezivnoj kapsuli (Slika 15c). Jednojedarne ćelije i vlakna prodiru u prostore unutar granula MMK koje su resorbovali višejedarni fagociti, a ćelije su raspoređene i na njihovoj površini i one bi mogle predstavljati prekursore osteoblasta ili osteoklasta (Slike 15b i d). Imunoekspresija OP je umerena (Slika 15e), dok je imunoekspresija OC slaba, primetna prevashodno u prostorima između granula (Slika 15f).



a

b



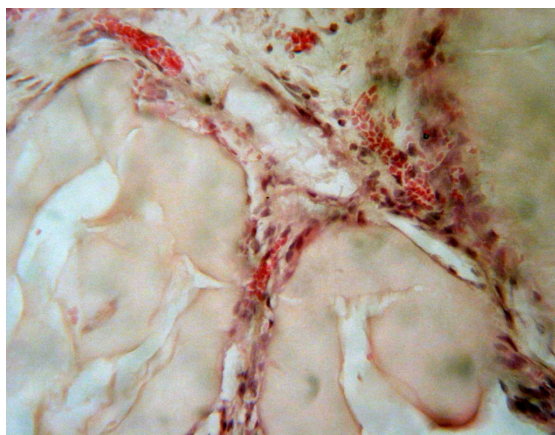
Slika 15. Implanti od mineralnog matriksa kosti nedelju dana nakon implantacije:

- a. vezivna kapsula implanta prožeta masnim tkivom; TB, 200x
- b. veća zastupljenost ćelija i krvnih sudova na periferiji implanta i prisustvo fibrinske mreže u njegovoj unutrašnjosti; HE, 200x
- c. kolagena vlakna u vezivnoj kapsuli i na periferiji implanta; MTH, 100x
- d. granula mineralnog matriksa kosti u resorpciji; HE, 400x
- e. osteopontin; IHC, 100x
- f. osteokalcin; IHC, 200x

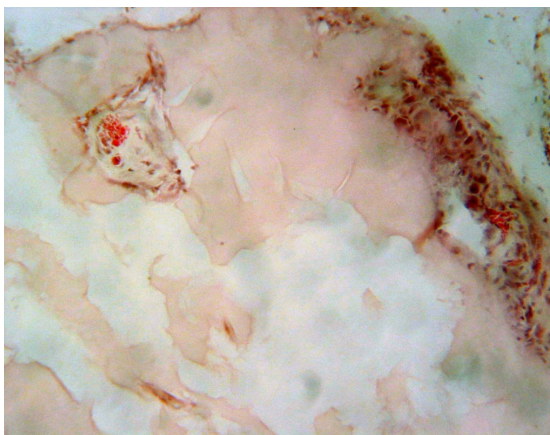
4.1.2. Histološki nalaz nakon dve nedelje od implantacije

4.1.2.1. Implanti sa rezidentnim peritonealnim makrofagima - NM tip

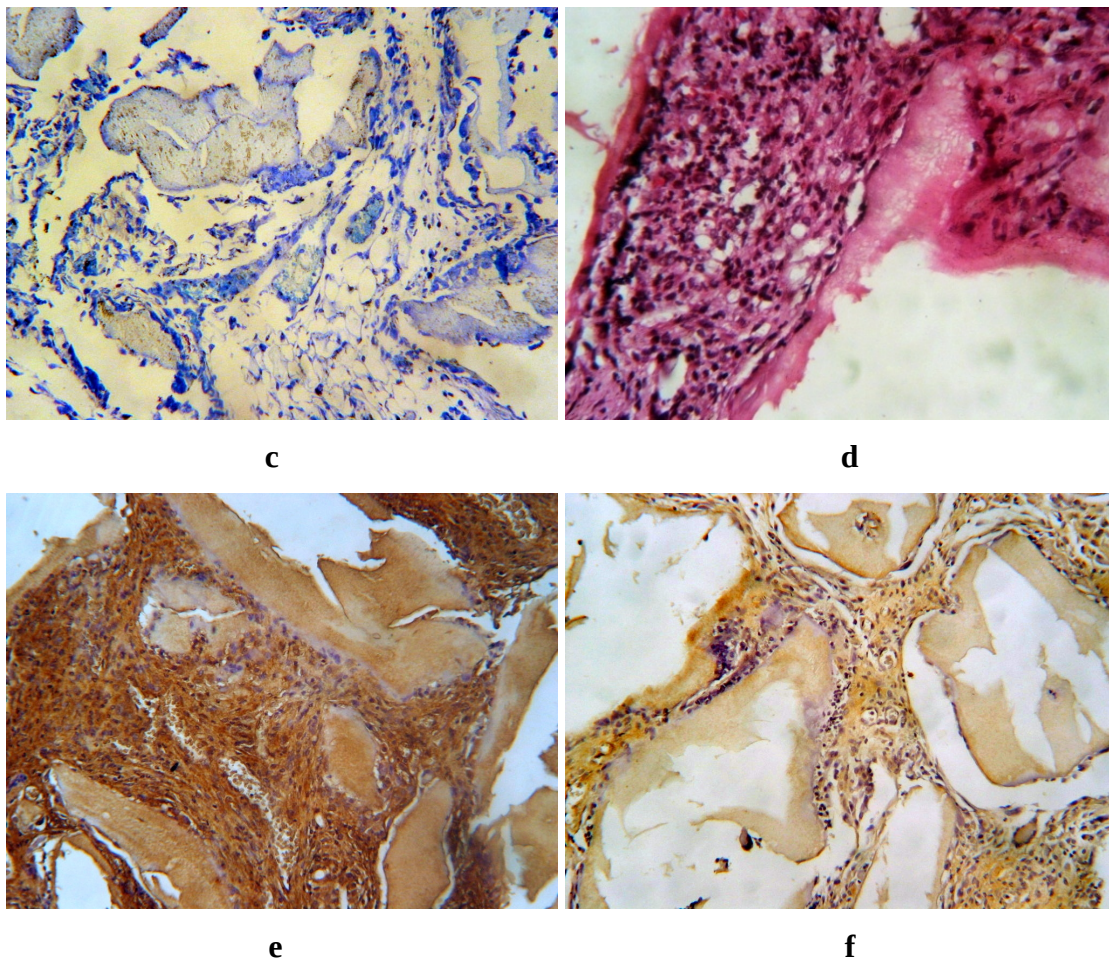
Oko implanata NM tipa postoji široka kapsula od nezrelog vezivnog tkiva. Granule MMK su primetno resorbovane i spolja i iznutra zahvaljujući brojnim, krupnim, višejedarnim fagocitima (Slike 16a i b). Na periferiji implanata je prisutno nezrelo vezivno tkivo, ali je u nekim perifernim regionima formirano masno tkivo (Slika 16c). Vezivno tkivo između granula MMK je bogato različitim tipovima ćelija. Prisutna je i infiltracija neutrofila u implante (Slika 16d). Proces angiogeneze je napredovao u odnosu na prethodni termin posmatranja, o čemu svedoči prisustvo brojnih krvnih sudova većeg dijametra (Slika 16a). Ponegde se mogu uočiti mesta gde krvni sud okružen ćelijama prodire u samu granulu MMK, što podseća na strukturu osteona (Slika 16b). Na površinu granula MMK naležu izdužene ćelije, koje nalikuju osteoblastima (Slika 16d). Imunoekspresija OP je umerena (Slika 16e), dok je imunoekspresija OC slaba (Slika 16f).



a



b



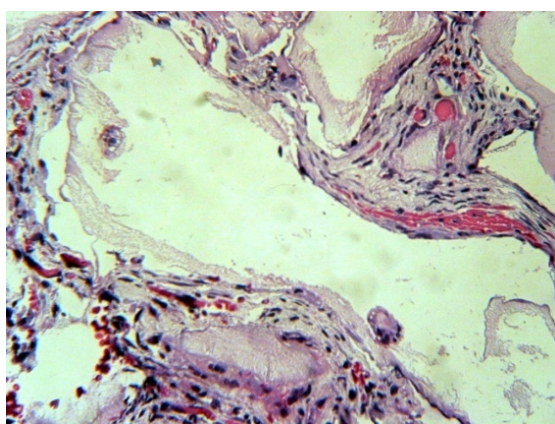
Slika 16. Implanti sa rezidentnim peritonealnim makrofagima dve nedelje nakon implantacije:

- a. veliki broj krvnih sudova prožima implant; HE, 400x
- b. struktura nalik osteonu u granuli mineralnog matriksa kosti; HE, 400x
- c. nezrelo vezivno i masno tkivo na periferiji implanta; TB, 200x
- d. infiltracija neutrofila u implant; HE, 400x
- e. osteopontin; IHC, 200x
- f. osteokalcin; IHC, 200x

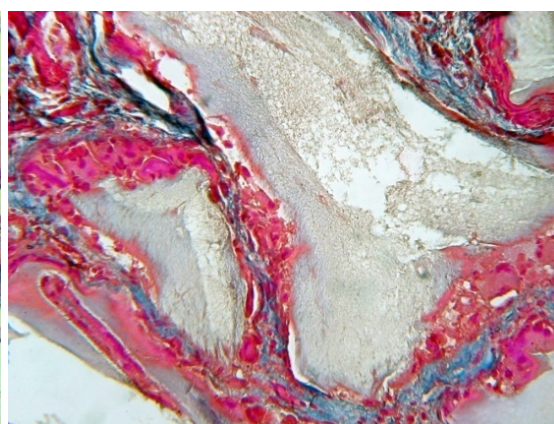
4.1.2.2. Implanti sa tioglikolatom elicitiranim peritonealnim makrofagima - TM tip

Vezivna kapsula oko implanata TM tipa je još uvek rastresita. Granule MMK su krupne, ali je proces resorpcije više odmakao u odnosu na prethodni termin

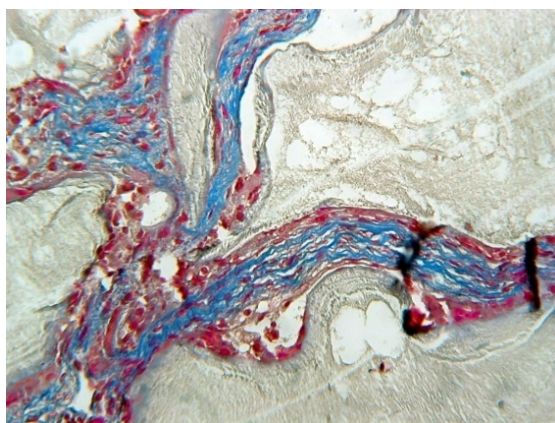
posmatranja. Na nekim mestima se mogu uočiti veoma aktivni višejedarni fagociti, koji resorbuju granule MMK i spolja i iznutra (Slike 17a i b). Implanti su prožeti krvnim sudovima uglavnom manjeg dijametra (Slike 17a, c i d). Između granula MMK je dobro razvijeno vezivno tkivo, koje je bogato ćelijama i kolagenom. Na površini granula MMK se mogu uočiti izdužene i kockaste ćelije nalik na osteoblaste. Vlakna kolagena su dobro razvijena i u unutrašnjosti implanata, pružaju se paralelno sa granulama MMK i uokviruju ih naležući na sloj ćelija koji je u direktnom kontaktu sa granulama (Slike 17c i d). Imunoekspresija OP (Slika 17e) i OC (Slika 17f) je umerena.



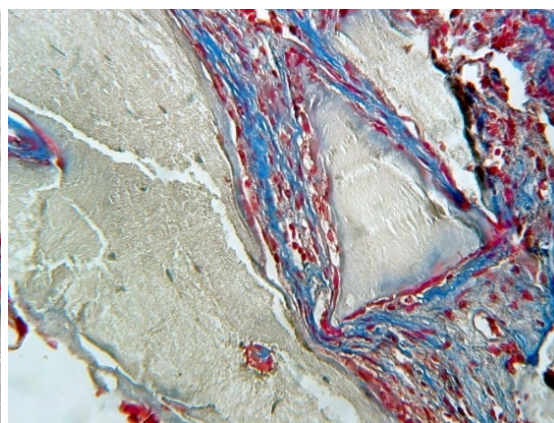
a



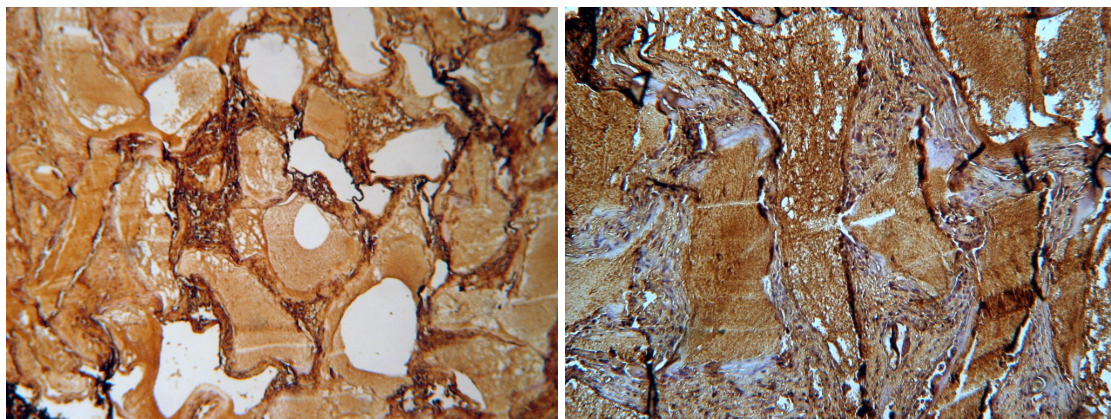
b



c



d



e

f

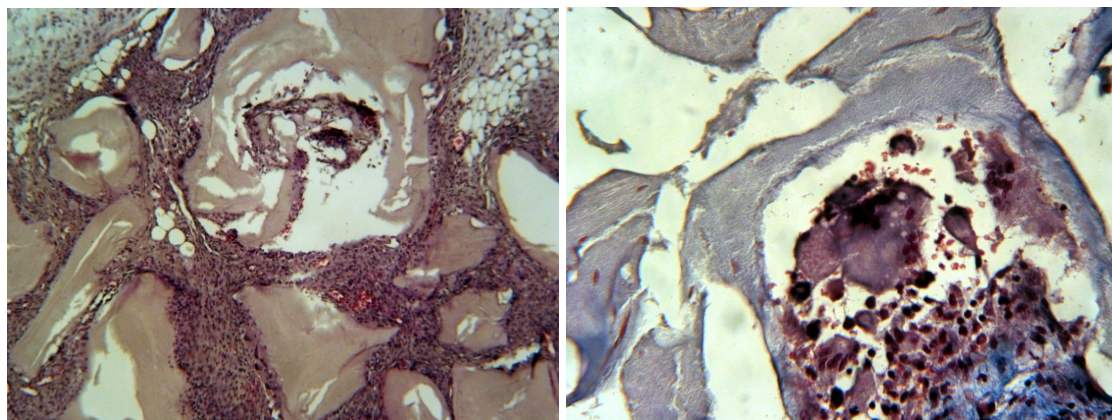
Slika 17. Implanti sa tioglikolatom elicitiranim peritonealnim makrofagima dve nedelje nakon implantacije:

- a. granule mineralnog matriksa kosti u resorpciji i prisustvo krvnih sudova u vezivu implanta; HE, 400x
- b. krupni višejedarni fagociti na površini mineralnog matriksa kosti; MTH, 400x
- c. ćelije raspoređene po površini granula mineralnog matriksa kosti; MTH, 400x
- d. jaka kolagena vlakna u implantu; MTH, 400x
- e. osteopontin; IHC, 100x
- f. osteokalcin; IHC, 200x

4.1.2.3. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim nižom koncentracijom lipopolisaharida - LM1 tip

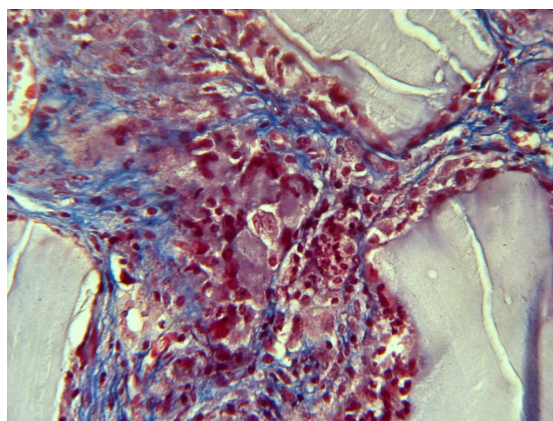
Oko implanata LM1 tipa postoji još uvek debela, ćelijama bogata vezivna kapsula, ispod koje se nalazi nezrelo vezivno tkivo, ili je formirano masno tkivo (Slika 18a). Proces resorpcije je izražen, o čemu svedoče džinovski višejedarni fagociti koji resorbuju granule MMK i spolja i iznutra (Slike 18a i b). Uočavaju se krvni sudovi kojih ima više nego u prethodnom terminu posmatranja, od kojih su mnogi većeg dijametra (Slike 18a). Vezivno tkivo između granula MMK odlikuje izrazito bogatstvo ćelijama. Postoji infiltracija neutrofila i epiteloidnih ćelija, a na više mesta i granulomatозна reakcija (Slika 18c). U vezivu, između granula MMK, zapažaju se sinusoidne šupljine koje mogu predstavljati mesta na kojima su bile nekada granule MMK, koje su u međuvremenu resorbovane (Slika 18a). Kolagena vlakna prate oblik

granula i prostiru se u snopovima oko njih (Slika 18c). Na nekim mestima su registrovane jednojedarne ćelija koje se po površini granula MMK raspoređuju u jednom sloju. Imunoekspresija OP (Slika 18d) je umerena, a OC (Slika 18e) slaba.

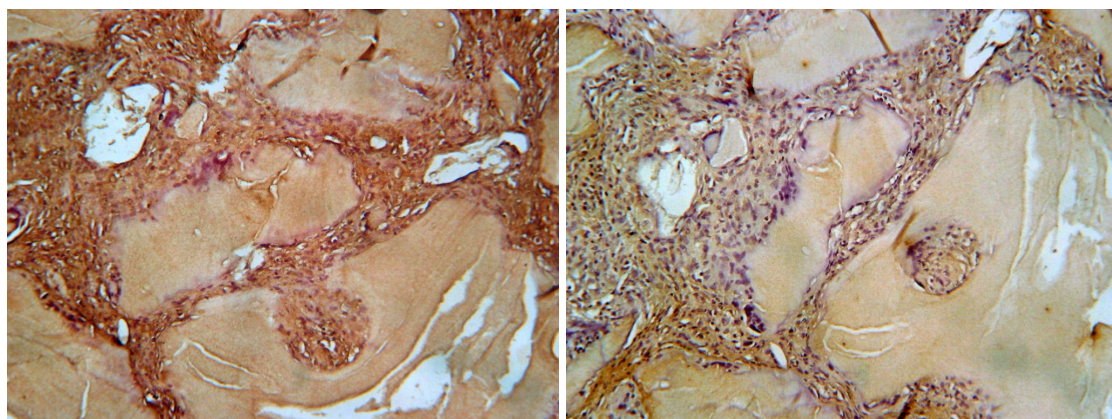


a

b



c



d

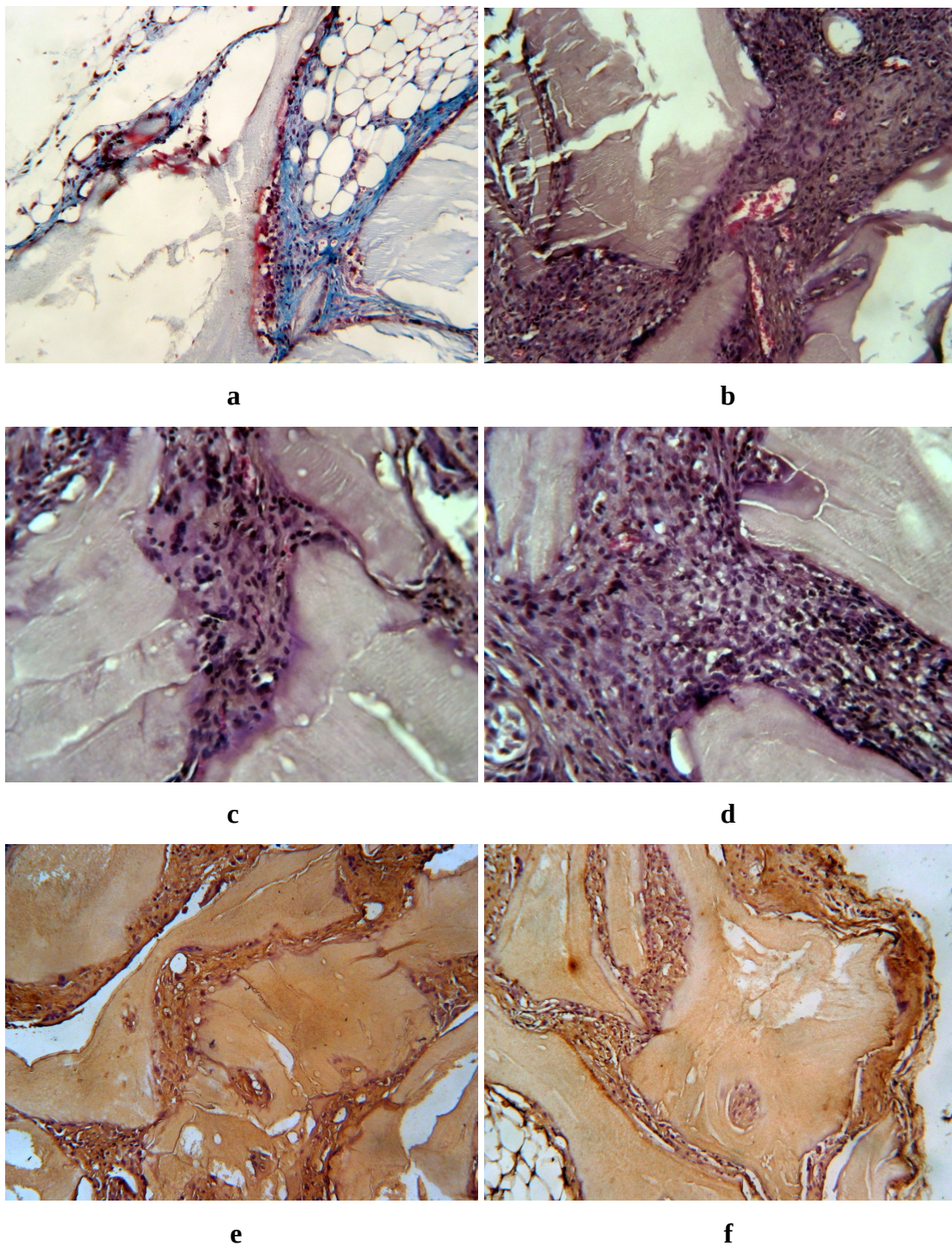
e

Slika 18. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim nižom koncentracijom lipopolisaharida dve nedelje nakon implantacije:

- a. prodor nezrelog vezivnog i masnog tkiva sa periferije implanta; HE, 100x
- b. granule mineralnog matriksa kosti u resorpciji; MTH, 400x
- c. granulomatozna reakcija u vezivu implanta i raspored kolagenih vlakana; MTH, 200x
- d. osteopontin; IHC, 200x
- e. osteokalcin; IHC, 200x

4.1.2.4. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim višom koncentracijom lipopolisaharida - LM2 tip

Vezivna kapsula oko implanata LM2 tipa široka je i bogata ćelijama. Postoji izuzetno jaka aktivnost džinovskih višejedarnih fagocita, koji rasparčavaju granule MMK celom dužinom, a te prostore ispunjava vezivno tkivo (Slike 19a, b i c). Tkivo između granula MMK je na nekim mestima izuzetno bogato ćelijama nalik na fibroblaste, epiteloidnim ćelijama, jednojedarnim i višejedarnim fagocitima (Slike 19c i d). U vezivnom tkivu implanata postoji granulomatozna reakcija. Vezivno tkivo između granula mineralnog matriksa kosti sadrži krvne sudove, a u njemu se nalaze i sinusoidne šupljine koje mogu predstavljati mesta na kojima su bile nekada granule MMK, koje su u međuvremenu resorbovane (Slika 19b). Na periferiji implanata ispod vezivne kapsule formira se masno tkivo (Slika 19a). Jake naslage kolagena na periferiji slabe idući ka unutrašnjosti implanata i prate oblik granula, a raspoređene su u paralelnim snopovima, naležući na sloj ćelija koje su u direktnom kontaktu sa granulama MMK (Slika 19a). Na površini granula MMK zapažaju se jednojedarne ćelije, koje mogu biti prekursori osteoblasta ili osteoklasta (Slike 19b, c i d). Imunoekspresija OP (Slika 19f) i OC (Slika 19g) je umerena.



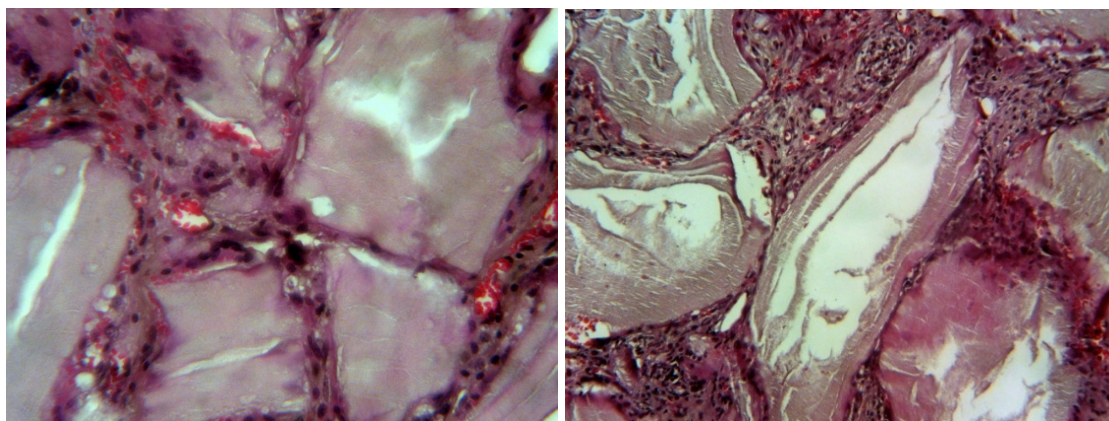
Slika 19. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim višom koncentracijom lipopolisaharida dve nedelje nakon implantacije:

- a. prodor perifernog masnog tkiva u unutrašnjost implanta; HE, 200x
- b. krvni sudovi u ćelijama bogatom vezivnom tkivu implanta; HE, 200x
- c. granulomatозна reakcija u vezivnom tkivu implanta; HE, 400x

- d. infiltracija neutrofila u unutrašnjost implanta; HE, 400x
- e. osteopontin; IHC, 200x
- f. osteokalcin; IHC, 200x

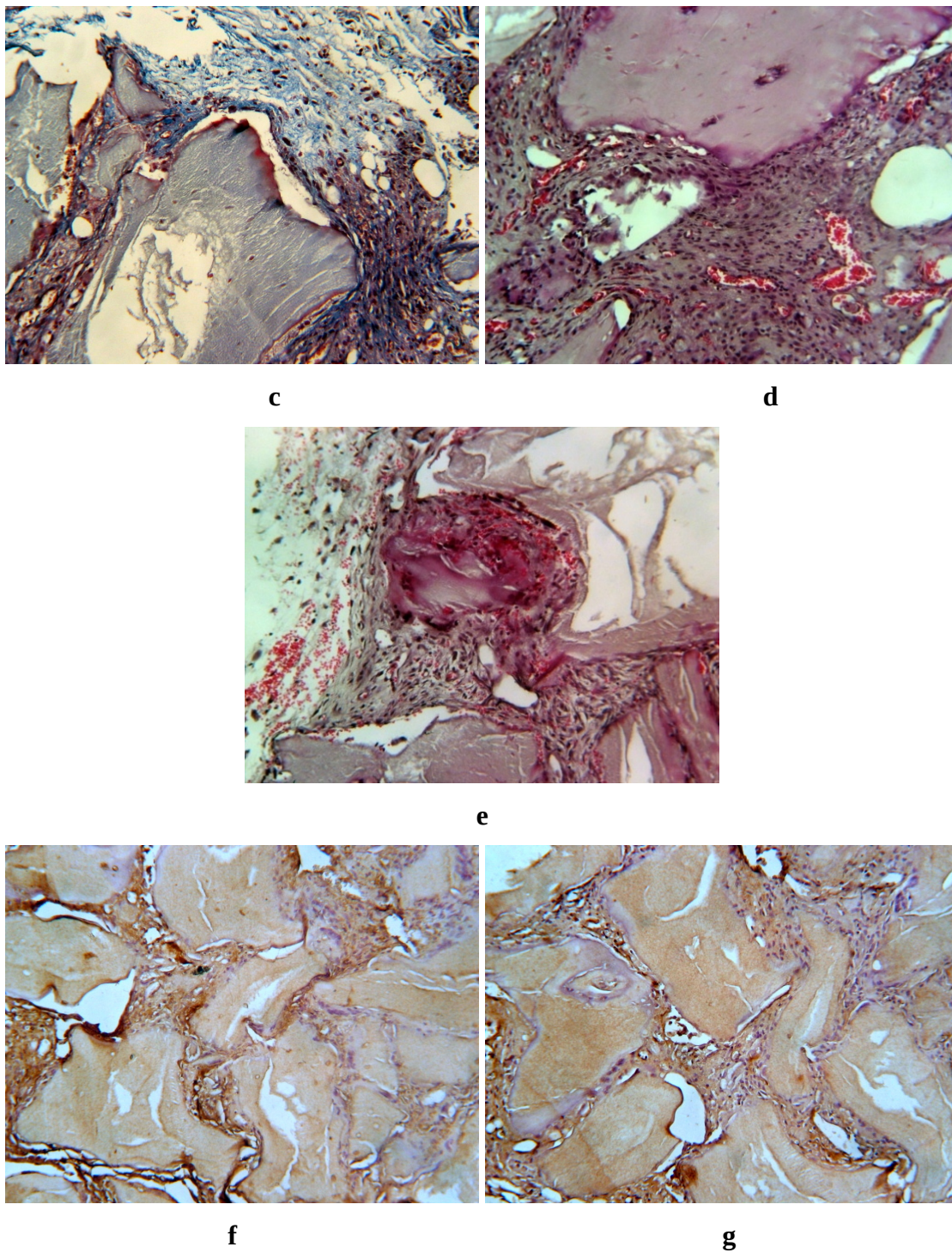
4.1.2.5. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim deksametazonom - DM tip

Oko implanata DM tipa postoji tanka, višeslojna vezivna kapsula. Proces resorpcije je izraženiji na periferiji implanata, gde su granule MMK isitnjene za razliku od onih u unutrašnjosti, mada se i unutar implanata na mnogim mestima mogu uočiti višejedarni fagociti (Slike 20a i b). Vezivno tkivo između granula je izuzetno bogato ćelijama i krvnim sudovima (Slike 20c i d). U vezivnom tkivu se na nekim analiziranim isečcima može zapaziti i granulomatozna reakcija sa infiltracijom neutrofila (Slika 20e). U vezivu se uočavaju i sinusoidne šupljine (Slika 20d). Na periferiji implanata se ponegde opažaju nezrelo vezivno ili masno tkivo (Slike 20c i e). Kolagen je izuzetno zastupljen kroz vezivno tkivo i među granulama MMK, a vlakna kolagena naležu i na same granule (Slika 20c). Na površini granula MMK se raspoređuju jednojedarne ćelije, koje bi mogle predstavljati prekursore osteoblasta (Slika 20a i d). Imunoekspresija OP (Slika 20g) i OC (Slika 20h) je slaba.



a

b



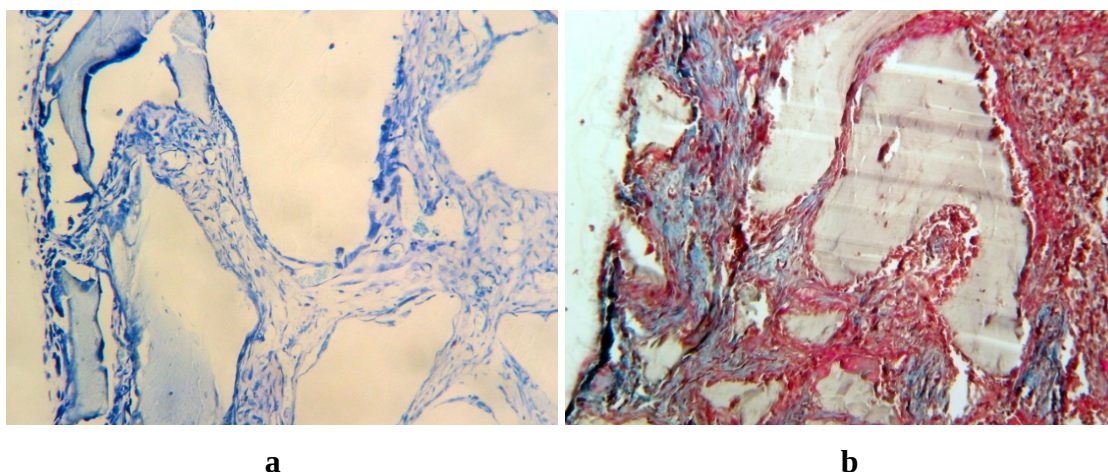
Slika 20. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim deksametazonom dve nedelje nakon implantacije:

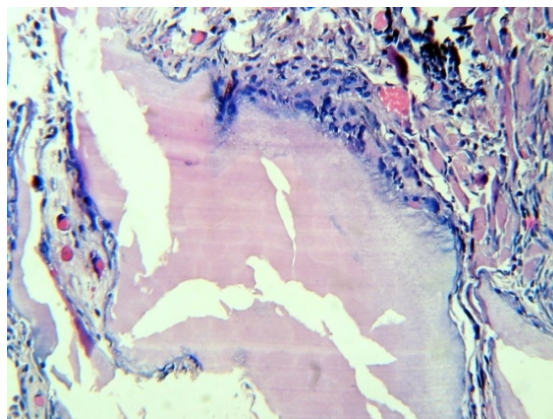
- a. granule mineralnog matriksa kosti u resorpciji; HE, 400x
- b. infiltracija neutrofila u implante; HE, 200x
- c. vlakna kolagena u implantu; MTH, 200x

- d. veliki broj krvnih sudova prožima vezivno tkivo implanta; HE, 200x
- e. granulomatозна reakcija i nezrelo vezivno tkivo na periferiji implanta; HE, 200x
- f. osteopontin; IHC, 200x
- g. osteokalcin; IHC, 200x

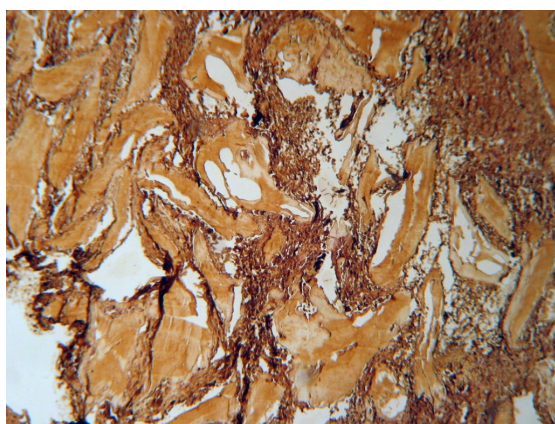
4.1.2.6. **Implanti formirani kombinovanjem nosača makrofaga - K tip**

U ovom terminu posmatranja oko implanata K tipa se vidi tanka, rastresita vezivna kapsula (Slike 21a i b). Proces resorpcije je izražen na periferiji implanata, zahvaljujući višejedarnim fagocitima, pa su granule MMK sa periferije implanata natopljene ćelijskim sekretima (Slika 21a). Međutim, u unutrašnjosti implanata je proces resorpcije primetno slabiji u odnosu na periferiju implanta. Vezivno tkivo razvijeno između čestica MMK karakteriše visoka gustina ćelija (Slike 21a i b). Na nekim analiziranim isečcima na periferiji implanata postoji inflamatorna reakcija u vidu granulomatoznog tkiva (Slika 21a). Implanti su prožeti krvnim sudovima uglavnom malog dijametra (Slika 21c). Kolagena vlakana se uočavaju između granula MMK, kao i u paralelnim snopovima oko njih (Slika 21b). Neke ćelije su infiltrirale granule. Imunoekspresija OP (Slika 21d) i OC je umerena (Slika 21e).

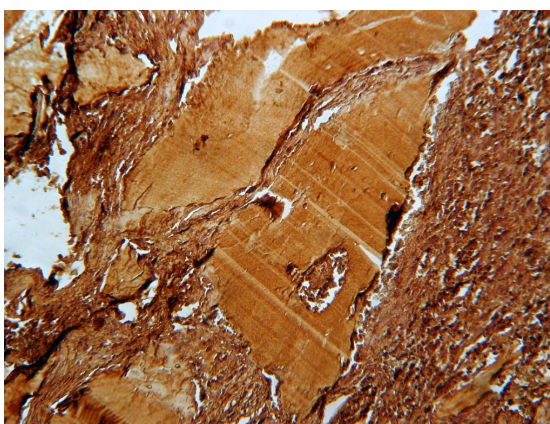




c



d



e

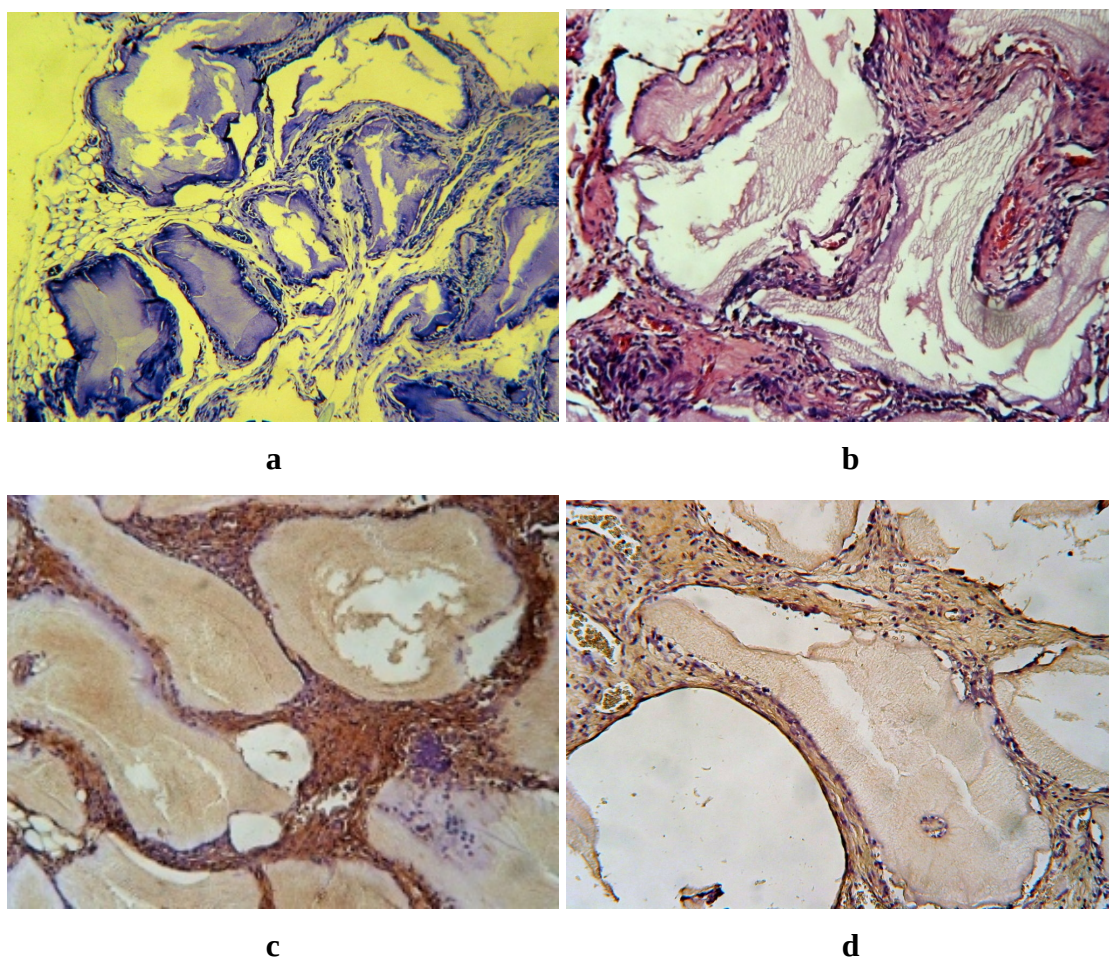
Slika 21. Implanti formirani kombinovanjem nosača makrofaga dve nedelje nakon implantacije:

- a.** ćelijskim sekretima natopljene granule mineralnog matriksa kosti na periferiji implanta; TB, 200x
- b.** debela kolagena vlakna na periferiji implanta; MTH, 200x
- c.** površinu granula mineralnog matriksa kosti u resorpciji; HE, 400x
- d.** osteopontin; IHC, 100x
- e.** osteokalcin; IHC, 200x

4.1.2.7. Implanti od mineralnog matriksa kosti - B tip

U implantima B tipa vezivna kapsula je rastresita, negde prožeta masnim tkivom i prodire u implante (Slika 22a). Granule MMK su krupne, proces resorpcije je nešto izraženiji u odnosu na prethodni termin, ali su fagociti retki i malih dimenzija. Vezivno

tkivo između granula MMK je bogatije ćelijama u odnosu na sliku viđenu nedelju dana nakon implantacije i prožeto je krvnim sudovima malog dijametra (Slika 22c). U implantima se na pojedinim analiziranim isečcima uočava granulomatozna reakcija. Na površini granula se na nekim mestima raspoređuju ćelije osteoblastolikog fenotipa. Sporadično se mogu uočiti pojedinačne, jednojedarne ćelije koje naseljavaju šupljine unutar granula MMK (Slike 22b). Imunoekspresija i OP (Slika 22c) i OC (Slika 22d) je slaba.



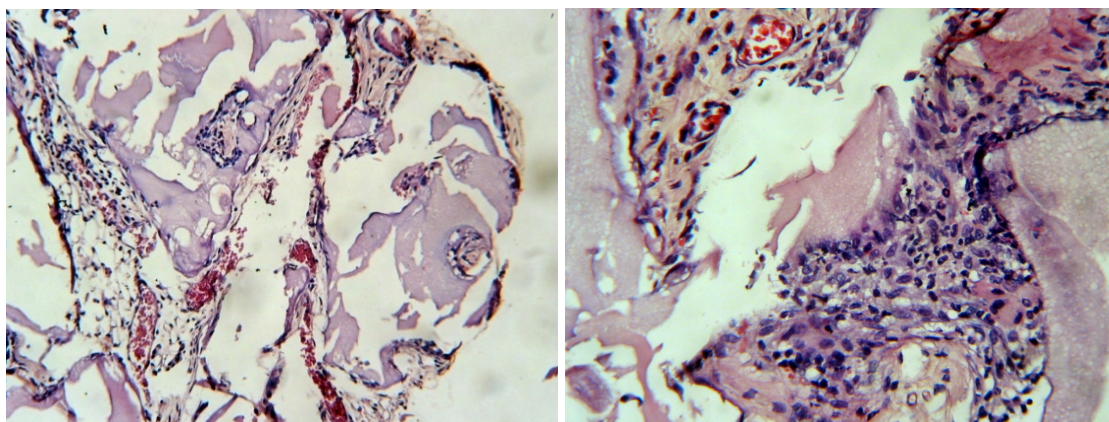
Slika 22. Implanti od mineralnog matriksa kosti dve nedelje nakon implantacije:

- a. prodor masnog tkiva u unutrašnjost implanta iz vezivne kapsule; TB, 100x
- b. granulomatozna reakcija u implantu; HE, 200x
- c. osteopontin; IHC, 200x
- d. osteokalcin; IHC, 200x

4.1.3. Histološki nalaz nakon četiri nedelje od implantacije

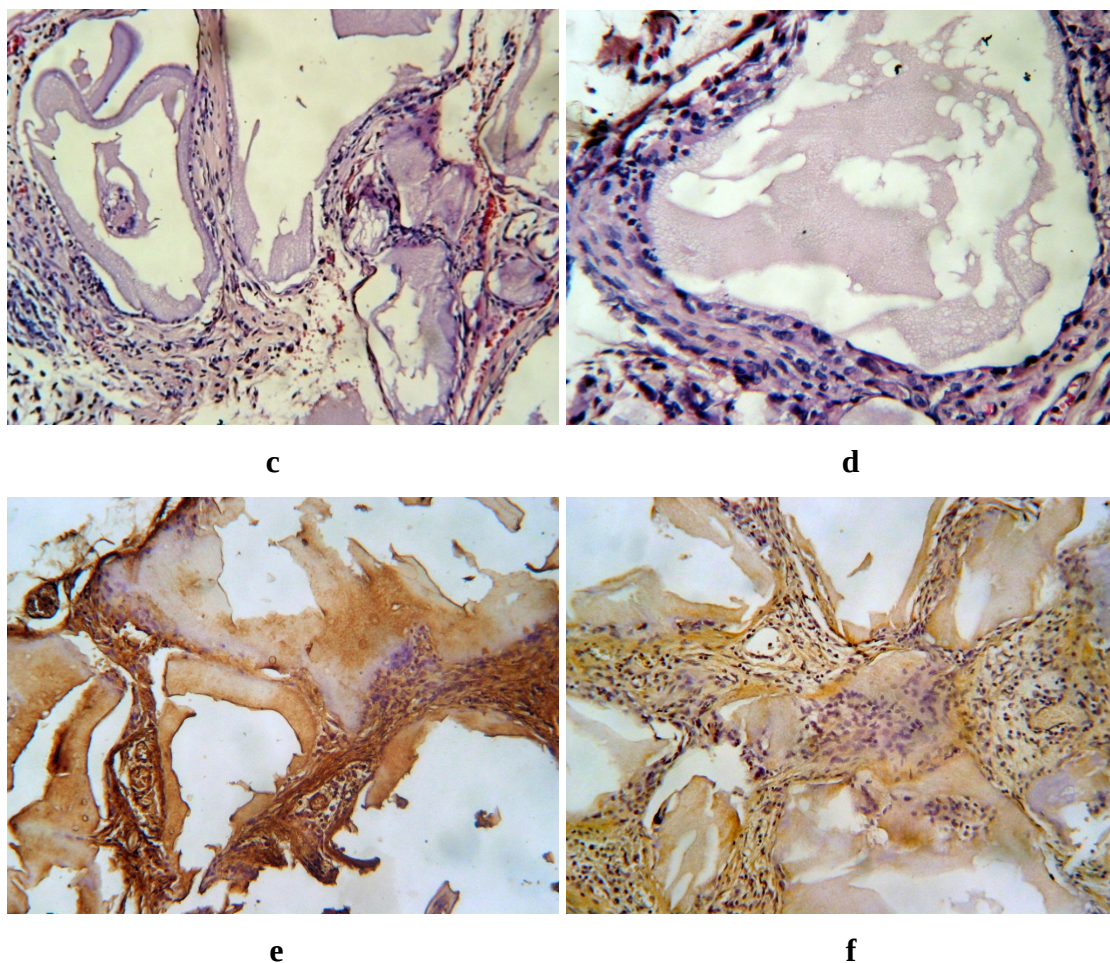
4.1.3.1. Implanti sa rezidentnim peritonealnim makrofagima - NM tip

Četiri nedelje nakon implantacije oko implanata NM tipa postoji tanka vezivna kapsula, koja sadrži ćelije (Slika 23a). Proces resorpcije granula MMK je intenzivan. Džinovski, višejedarni fagociti resorbuju granule MMK i spolja i iznutra (Slike 23a, b i c). Vezivo između granula je i dalje izuzetno bogato ćelijama. U vezivnom tkivu, na pojedinim isečcima ima i znakova granulomatozne reakcije (Slika 23b). Krvni sudovi su brojni i većeg su dijametra nego u implantima istog tipa nakon dve nedelje. U implante prodire kako masno, tako i nezrelo vezivno tkivo (Slike 23a i c). Jednojedarne ćelije infiltriraju granule MMK, raspoređujući se koncentrično i formirajući strukture nalik osteonima (Slike 23a i c). Na površini granula se uočavaju fibroblastolike ćelije u više slojeva, kao i osteoblastolike ćelije u jednom sloju (Slika 23d). Imunoekspresija OP (Slika 23e) je umerena, a OC (Slika 23f) slaba.



a

b



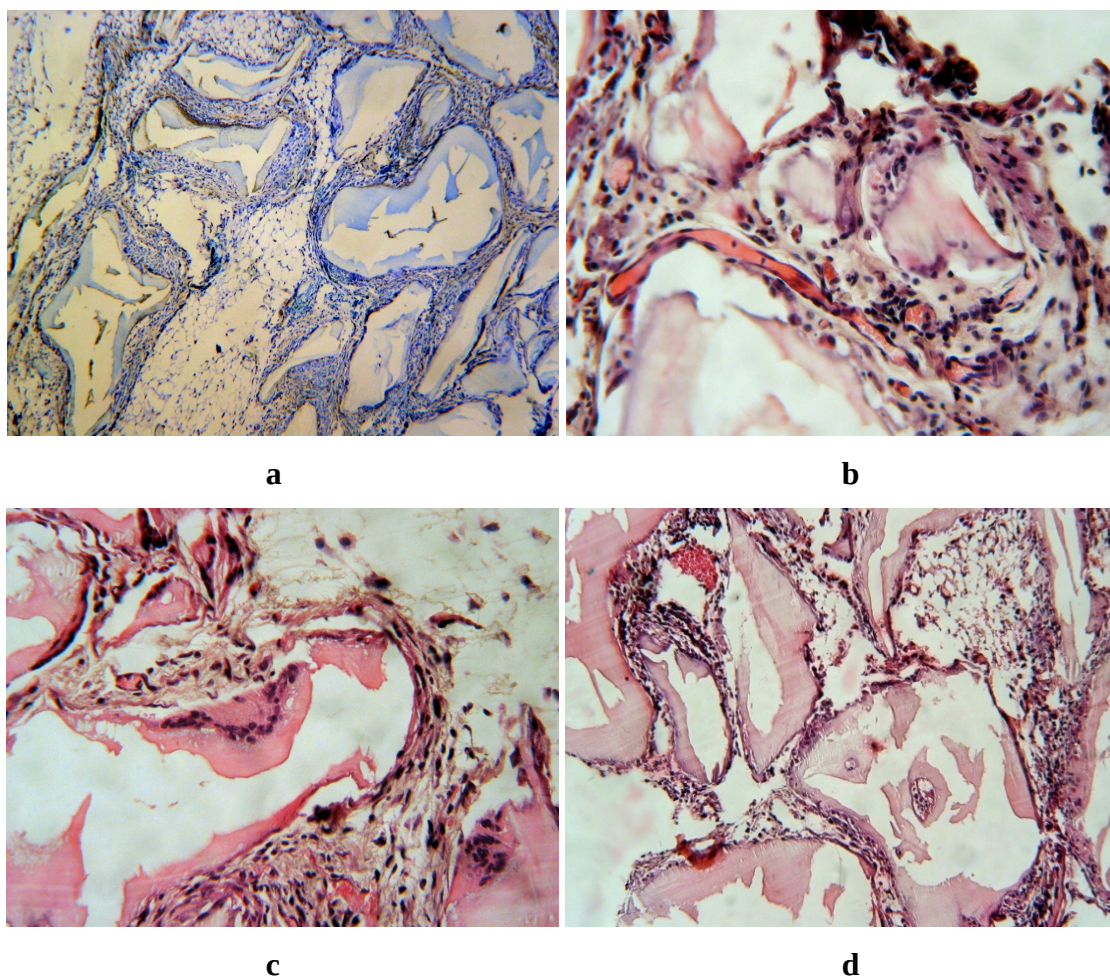
Slika 23. Implanti sa rezidentnim peritonealnim makrofagima četiri nedelje nakon implantacije:

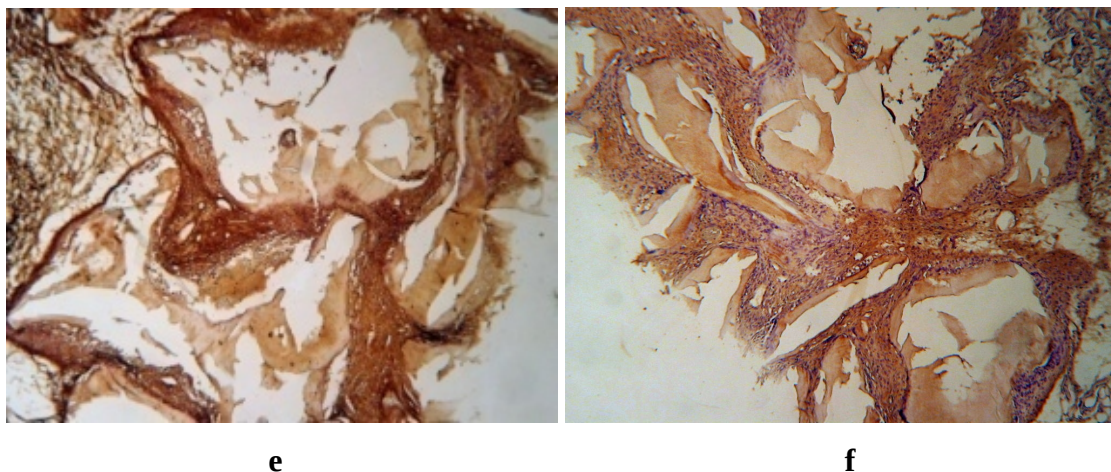
- a. prodor masnog tkiva u unutrašnjost implanta; HE, 200x
- b. infiltracija neutrofila i granulomatozna reakcija u implantu; HE, 400x
- c. strukture nalik osteonu u granulama mineralnog matriksa kosti; HE, 200x
- d. jednojedarne ćelije naslojavaju površinu granula; HE, 400x
- e. osteopontin; IHC, 200x
- f. osteokalcin; IHC, 200x

4.1.3.2. Implanti sa tioglikolatom elicitiranim peritonealnim makrofagima - TM tip

Oko implanata tipa TM postoji tanka vezivna kapsula, ispod koje se u nekim regionima zapaža nezrelo vezivno, a u nekim masno tkivo (Slika 24a). Krupne

višejedarne ćelije resorbuju granule MMK i spolja i iznutra (Slike 24b i c). Vezivno tkivo između granula je gusto, bogato ćelijama i u njemu se mogu uočiti krvni sudovi različitih dijametara (Slike 24b i d). Masno tkivo koje je iz vezivne kapsule prodrlo u unutrašnjost implanata, u pojedinim regionima degeneriše. U pojedinim delovima implanata se zapaža i granulomatозна reakcija. Na nekim mestima se na površini granula mogu uočiti jednojedarne, jako izdužene, pljosnate ćelije u jednom sloju, a na nekim mestima i jednojedarne ćelije vretenastog oblika raspoređene u više slojeva (Slike 24b, c i d). U okviru nekih analiziranih polja se uočavaju ćelije koje prodiru u granule MMK. Imunoekspresija OP (Slike 24e) i OC (Slike 24f) je umerena.



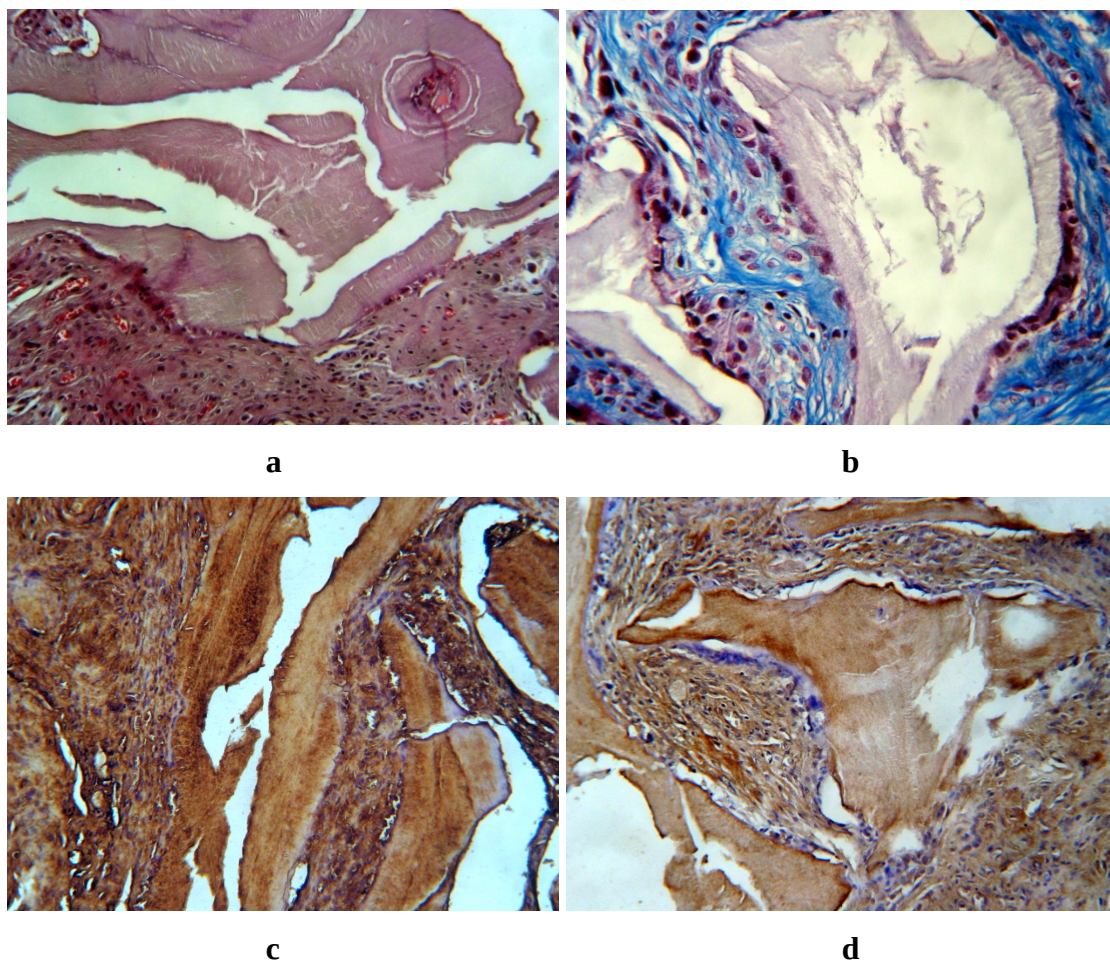


Slika 24. Implanti sa tioglikolatom elicitiranim peritonealnim makrofagima četiri nedelje nakon implantacije:

- a. prodor masnog tkiva u implant; TB, 200x
- b. krvni sudovi u implantu; HE, 400x
- c. intenzivan proces resorpcije; HE, 400x
- d. ćelije na površini i unutar granula mineralnog matriksa kosti; HE, 200x
- e. osteopontin; IHC, 100x
- f. osteokalcin; IHC, 100x

4.1.3.3. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim nižom koncentracijom lipopolisaharida - LM1 tip

Implanti LM1 tipa su i nakon četiri nedelje od implantacije obavijeni vezivnom kapsulom. Granule MMK resorbuju krupni višejedarni fagociti, ne samo po površini već i iznutra (Slike 25a i b). Fagociti se nalaze i u vezivnom tkivu. Vezivno tkivo između granula MMK je bogato ćelijama i kolagenom i u njemu se nalaze i mnogobrojni, dobro razvijeni krvni sudovi (Slika 25a). Naslage kolagena su izrazito jake i kolagena vlakna ne samo da obuhvataju granule MMK, već prodiru i u njihovu unutrašnjost (Slika 25b). Ćelije i vlakna, zajedno sa krvnim sudovima infiltriraju granule MMK stvarajući strukture slične osteonu (Slika 25a). Na nekim mestima na površini granula MMK se mogu naći i jednojedarne ćelije (Slika 25b). Imunoekspresija OP (Slika 25d) je jaka, dok je imunoekspresija OC (Slika 25e) umerena.



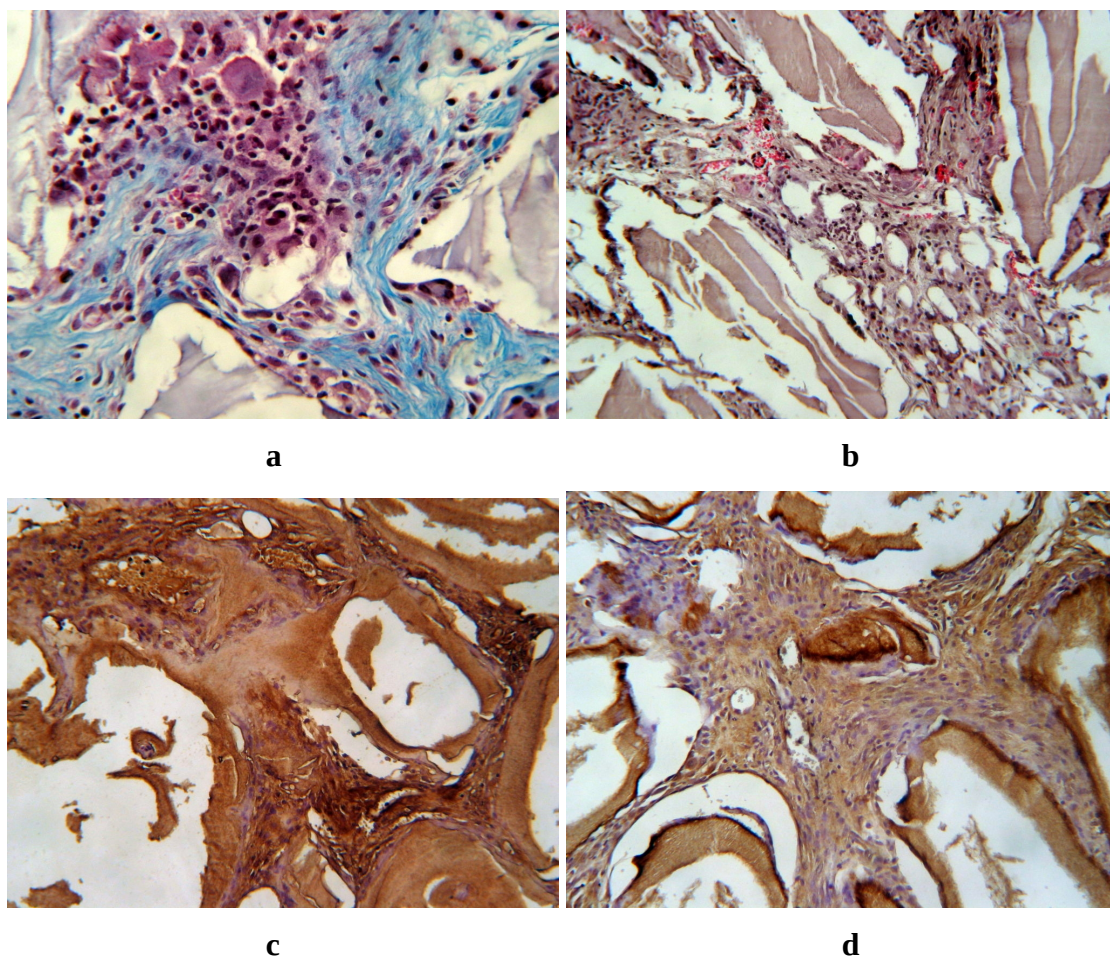
Slika 25. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim nižom koncentracijom lipopolisaharida četiri nedelje nakon implantacije:

- a. struktura nalik osteonu u granuli mineralnog matriksa kosti; HE, 200x
- b. intenzivno obojena kolagena vlakna u implantu; MTH, 400x
- c. osteopontin; IHC, 200x
- d. osteokalcin; IHC, 200x

4.1.3.4. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim višom koncentracijom lipopolisaharida - LM2 tip

Oko implanata LM2 tipa postoji višeslojna vezivna kapsula. Proces resorpcije granula MMK je intenzivan. Krupni višejedarni fagociti se uočavaju na površini granula, sporadično i u vezivnom tkivu između granula (Slika 26a). Ponegde fagociti prodiru i u unutrašnjost granula. Unutar implanata postoje znaci fibroze i ravića masnog

tkiva i krvni sudovi mlog dijametra (Slika 26b). U vezivnom tkivu se mogu zapaziti i šupljine sinusoidnog tipa koje su verovatno posledica resorpcije MMK. Kolagena vlakna se nalaze u paralelnim snopovima oko granula MMK (Slika 26a). U prostoru između granula ova vlakna se pružaju u više različitih pravaca. Imunoekspresija OP (Slika 26c) u implantima bi se mogla okarakterisati kao umerena sa tendencijom ka jakoj, dok je imunoekspresija OC (Slika 26e) umerena.

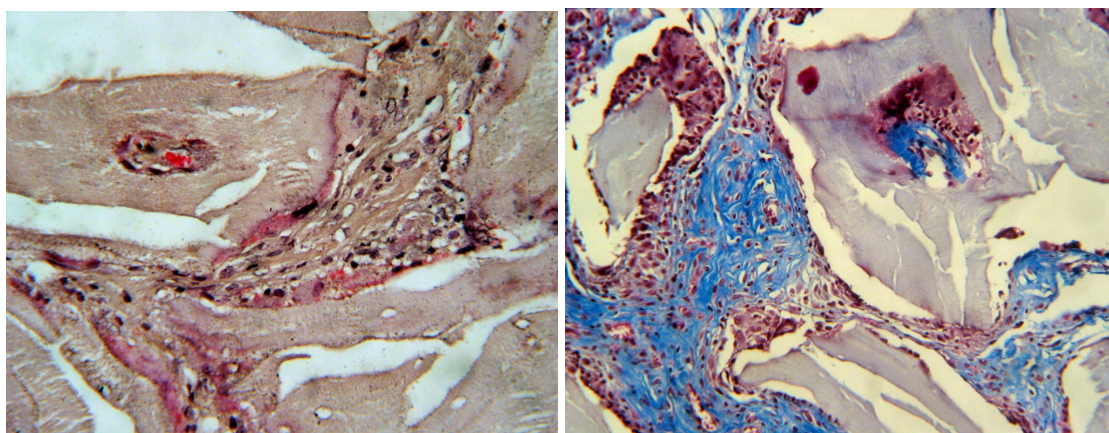


Slika 26. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim višom koncentracijom lipopolisaharida četiri nedelje nakon implantacije:

- a. vlakna kolagena u implantu; MTH, 400x
- b. krvni sudovi u vezivnom tkivu implanta; HE, 200x
- c. osteopontin; IHC, 200x
- d. osteokalcin; IHC, 200x

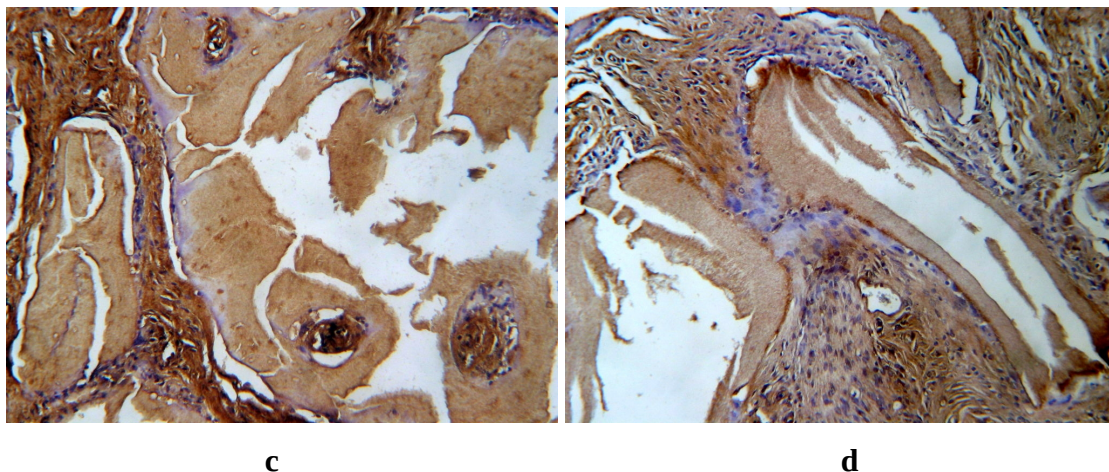
4.1.3.5. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim deksametazonom - DM tip

Na površini implanata DM tipa postoji tanka vezivna kapsula. Proces resorpcije i dalje se odvija, sudeći prema prisustvu krupnih višejedarnih fagocita koji se nalaze ne samo na površini granula MMK, već resorbuju granule i iznutra. Njih prati vezivno tkivo koje infiltrira granule, ponegde zajedno i sa krvnim sudovima (Slike 27a i b). Vezivno tkivo između granula MMK je bogato ćelijama, a u nekim regionima implanata prisutna je fibroza. Na periferiji implanata se uočava masno tkivo. U vezivnom tkivu ima i znakova granulomatozne reakcije i krvin sudova. U implantima postoje jake naslage kolagena. Kolagena vlakna se nalaze oko granula i u prostoru između njih (Slika 27b). Vlakna koja obuhvataju granule su organizovana u paralelne snopove, prateći površinu granula (Slika 27b). Na površini nekih granula MMK se mogu zapaziti jednojedarne ćelije koje su u jednom sloju. Imunoekspresija OP (Slika 27c) i OC (Slika 27d) je umerena.



a

b

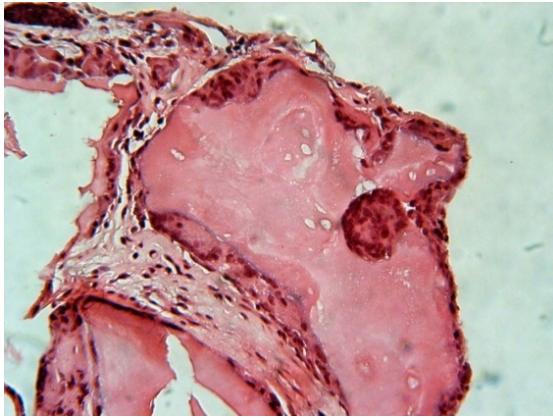


Slika 27. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim deksametazonom četiri nedelje nakon implantacije:

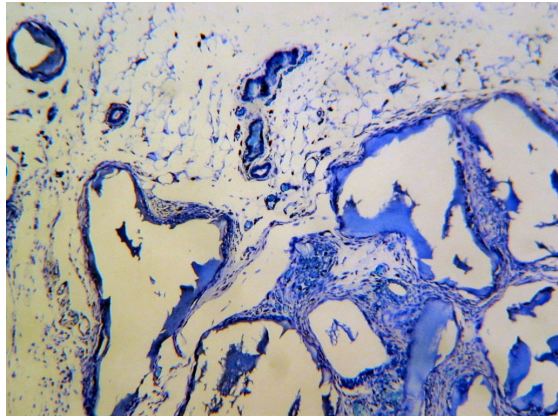
- a. ćelijama bogato vezivo između granula mineralnog matriksa kosti; HE, 100x
- b. dobro razvijena kolagena vlakna u implantu; MTH, 100x
- c. osteopontin; IHC, 200x
- d. osteokalcin; IHC, 200x

4.1.3.6. Implanti formirani kombinovanjem nosača makrofaga - K tip

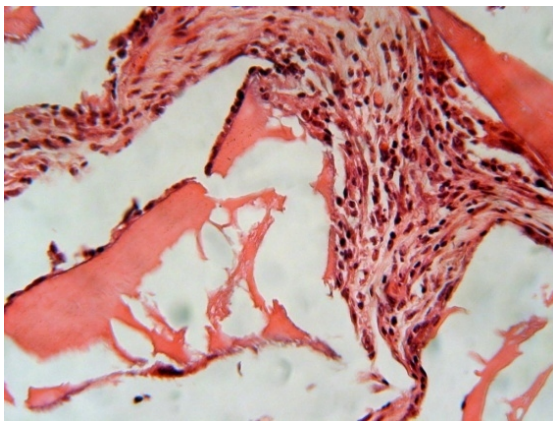
Oko implanata K tipa prisutna je tanka vezivna kapsula u kojoj se zapažaju ćelije. Krupni višejedarni fagociti razgradjuju i granule MMK pre svega u perifernim delovima implanata (Slika 28a). U vezivnom tkivu se uočavaju krvni sudovi uglavnom manjeg dijametra. U nekim perifernim delovima implanata uočava se degeneracija masnog tkiva (Slika 28b i c). Između granula MMK nalazi se dobro razvijeno, gusto vezivno tkivo bogato ćelijama. Na periferiji nekih implanata postoji granulomatозна reakcija. Sporadično u implantima postoje polja nezrelog vezivnog tkiva (Slika 28d). Granule MMK su „upile“ ćelijske sekrete, sudeći prema njihovoj obojenosti. Imunoekspresija OP (Slika 28e) i OC (Slika 28f) je slaba, registrovana prevashodno u vezivu između granula MMK.



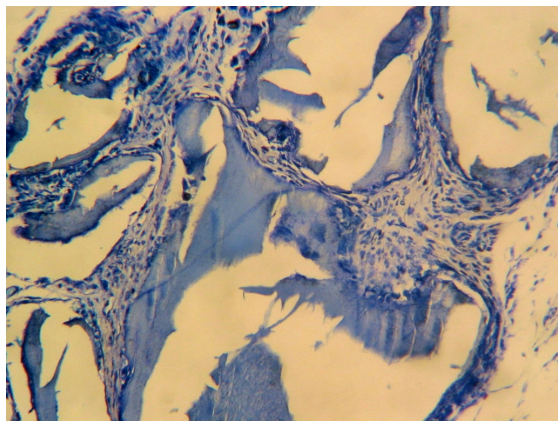
a



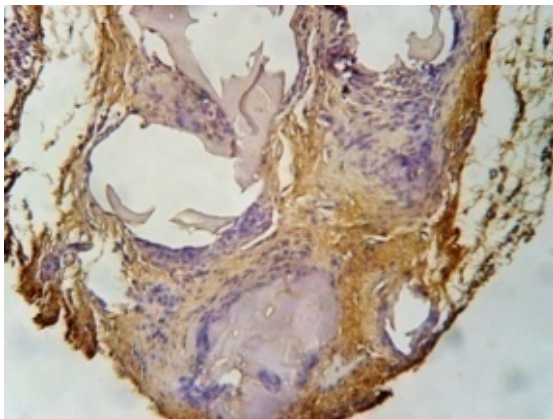
b



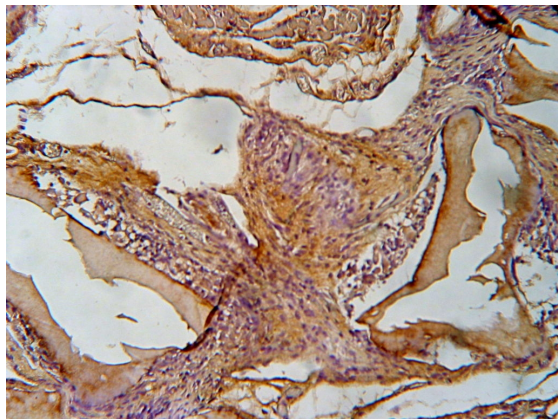
c



d



e



f

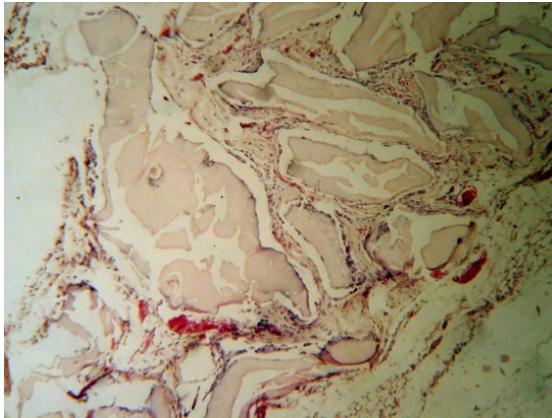
Slika 28. Implanti formirani kombinovanjem nosača makrofaga četiri nedelje nakon implantacije:

- a.** periferija implanata sa granulama mineralnog matriksa kosti u resorpciji; HE, 400x
- b.** masno tkivo na periferiji implanta u procesu degeneracije; TB, 100x

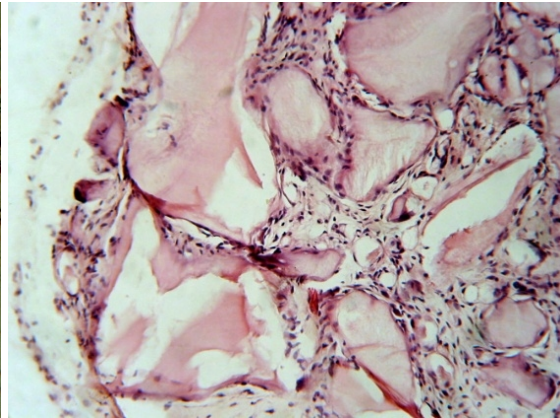
- c. vezivno tkivo implanta sa krvnim sudovima malog dijametra; HE, 400x
- d. granulomatозна reakcija i periferno nezrelo vezivno tkivo u implantu; TB, 200x
- e. osteopontin; IHC, 200x
- f. osteokalcin; IHC, 200x

4.1.3.7. Implanti od mineralnog matriksa kosti - B tip

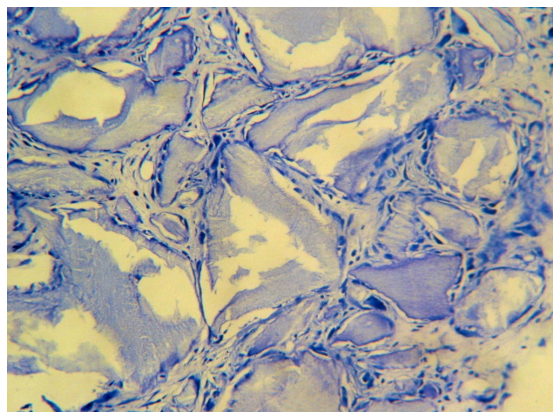
Vezivna kapsula oko implanata B tipa je rastresita i sadrži ćelije (Slike 29a i b). Fagocitne ćelije su krupne, ali ne tako zastupljene, a smanjena veličina granula ukazuje na to da se proces resorpcije postepeno odvijao tokom prethodnog perioda (Slika 29b). Vezivno tkivo je bogato ćelijama, ali se čini da je redukovano u odnosu na prethodni period. U vezivnom tkivu se uočavaju sitne šupljine koje su verovatno ostatak resorbovanih granula MMK (Slika 29b). U nekim delovima implanata dolazi do fibroze. Krvni sudovi su i dalje manjeg dijametra (Slika 29a). Jednojedarne ćelije infiltriraju granule ili se raspoređuju po površini granula MMK (Slika 29c). Imunoekspresija OP (Slika 29d) je umerena, a OC (Slika 29e) slaba.



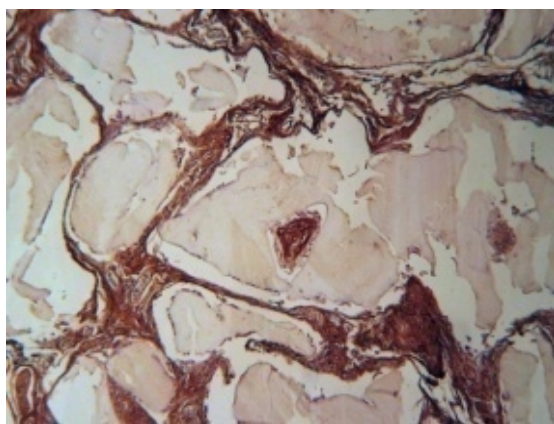
a



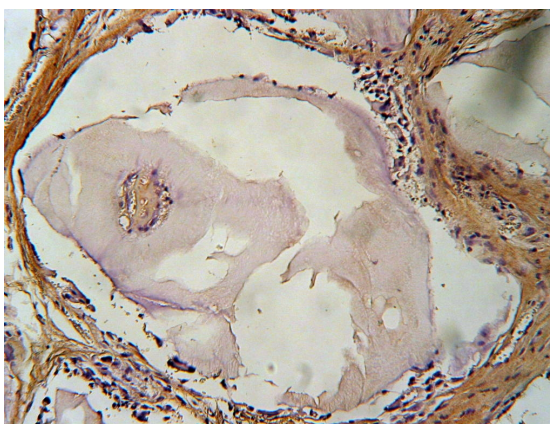
b



c



d



e

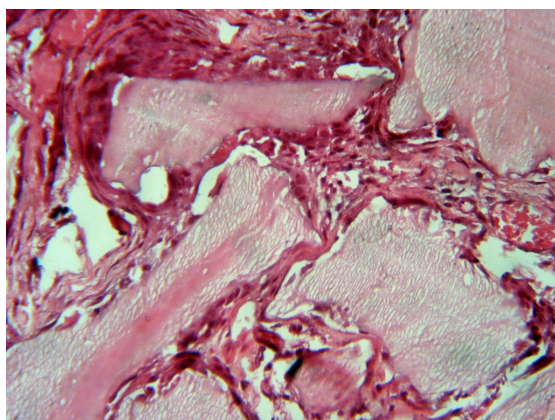
Slika 29. Implanti od mineralnog matriksa kosti četiri nedelje nakon implantacije:

- a.** prokrvljenost implanta; HE, 100x
- b.** sinusoidne šupljine u implantu; HE, 200x
- c.** ćelije na površini granula mineralnog matriksa kosti; TB, 200x
- d.** osteopontin; IHC, 100x
- e.** osteokalcin; IHC, 200x

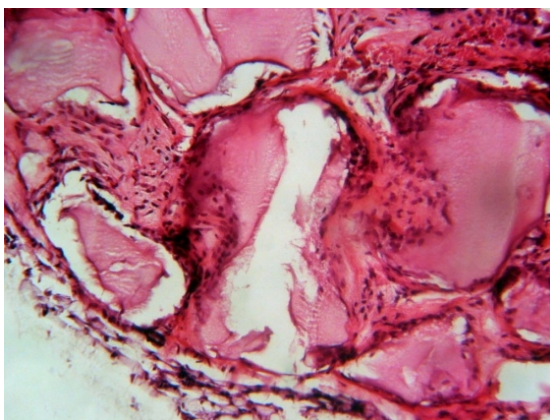
4.1.4. Histološki nalaz nakon osam nedelja od implantacije

4.1.4.1. Implanti sa rezidentnim peritonealnim makrofagima - NM tip

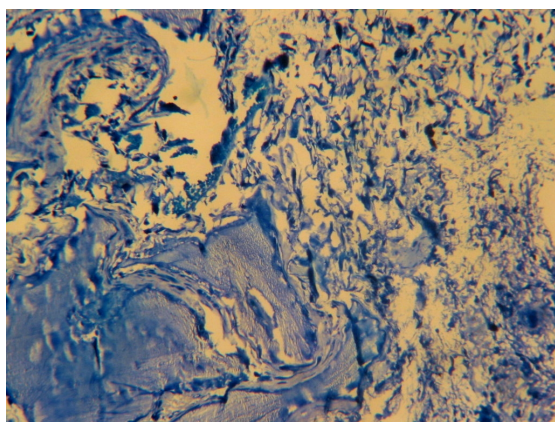
Vezivna kapsula oko implanata NM tipa je rastresita. U implantima je još uvek aktivan proces resorpcije. Granule MMK su dosta redukovane i nazubljenih ivica (Slike 30a i b). Vezivno tkivo između granula je bogato ćelijama, a nezrelo vezivno tkivo očuvano (Slike 30b i c). U vezivnom tkivu implanata se uočavaju krvni sudovi velikog dijametra. Kolagena vlakna su slaba u svojoj strukturi (Slika 30d). Na površinu granula MMK naležu izdužene ćelije fibroblastne morfologije u jednom ili više slojeva, ćelije osteoblastne morfologije u jednom sloju, a u same granule infiltriraju ćelije (ponegde i krvni sudovi) formirajući strukture slične osteonu (Slika 30c). Imunoekspresija OP (Slika 30e) je umerena, a OC (Slika 30f) slaba.



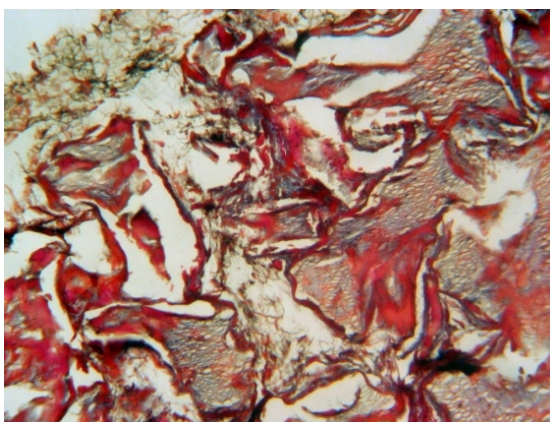
a



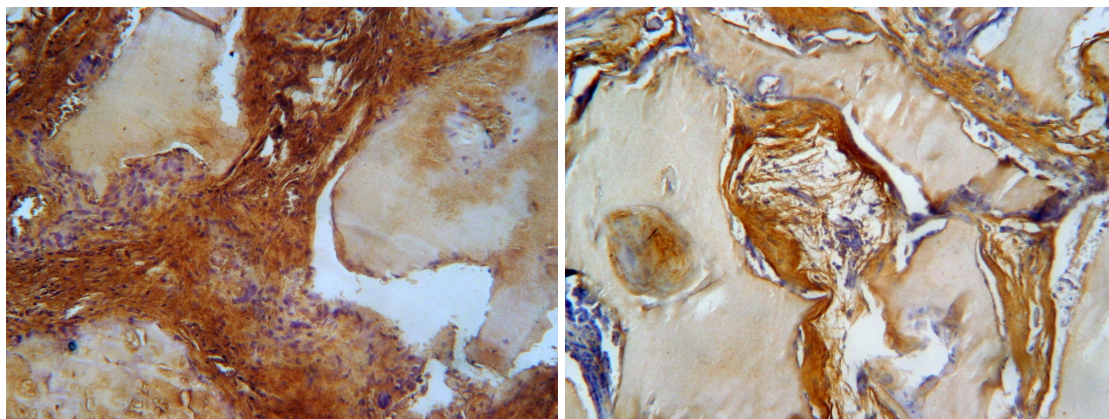
b



c



d



e

f

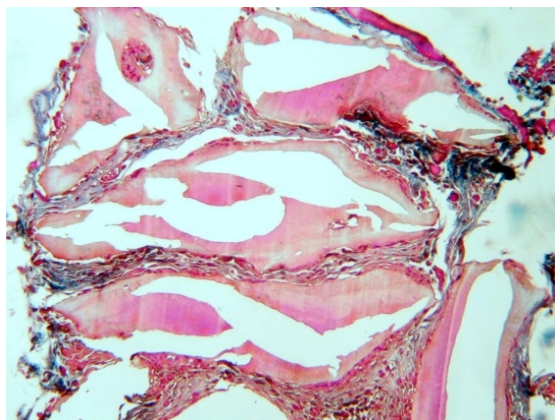
Slika 30. Implanti sa rezidentnim peritonealnim makrofagima osam nedelja nakon implantacije:

- a. prokrvljenost implanta; HE, 400x
- b. kontakt nezrelog vezivnog tkiva sa granulama mineralnog matriksa kosti; HE, 200x
- c. ćelije raspoređene po površini i unutrašnjosti granula mineralnog matriksa kosti; TB, 200x
- d. kolagena vlakna u implantu; MTH, 200x
- e. osteopontin; IHC, 200x
- f. osteokalcin; IHC, 200x

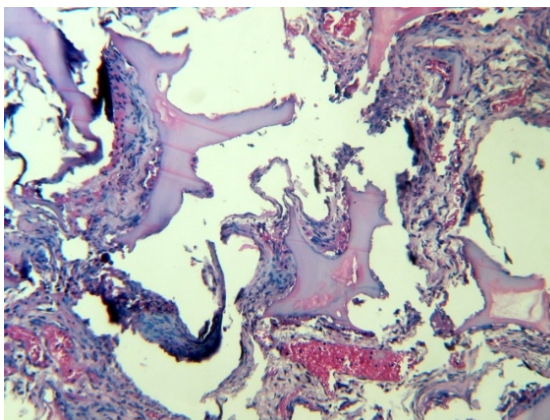
4.1.4.2. Implanti sa tioglikolatom elicitiranim peritonealnim makrofagima - TM tip

Vezivna kapsula oko implanata TM tipa je tanka i siromašna ćelijama (Slika 31a). Granule MMK nisu u potpunosti razgrađene, ali su vidno smanjene. Proces fagocitoza je intenzivan, a fagociti su izuzetno velikih dimenzija. Fagociti još resorbuju i površinu i unutrašnjost granula (Slike 31b i c). Vezivno tkivo između granula MMK je bogato ćelijama, mada manje u odnosu na prethodne termine posmatranja. Na nekim mestima postoje znaci fibroze. U vezivnom tkivu se uočavaju krvni sudovi velikog dijametra (Slika 31b). Kolagena vlakna su slabija u strukturi i više zastupljena u vezivnoj kapsuli, u odnosu na unutrašnjost implanata (Slike 31a i c). Osteoblastolike

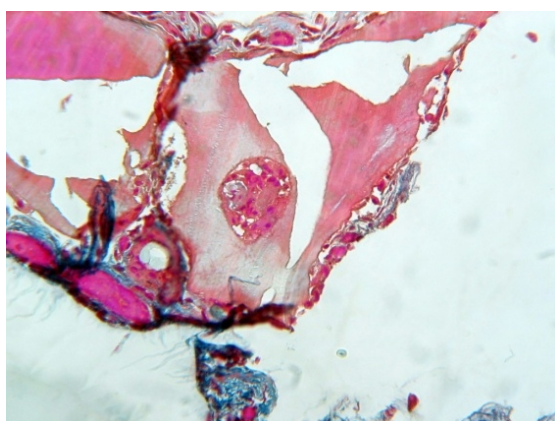
ćelije pokazuju palisadni raspored na površini granula MMK (Slika 31d). U implantima se mogu uočiti strukture koje podsećaju na koštano tkivo (Slika 31c). Imunoekspresija OP (Slika 31e) je slaba, a OC (Slika 31f) umerena.



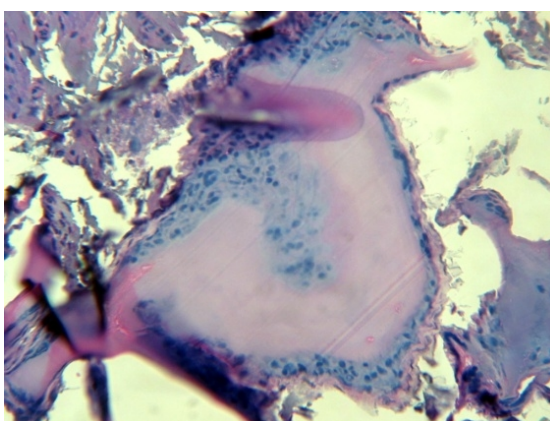
a



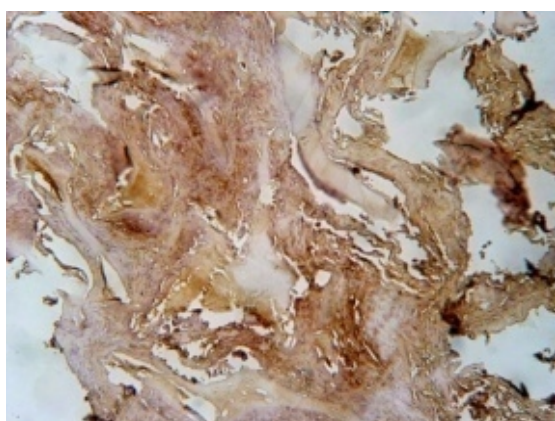
b



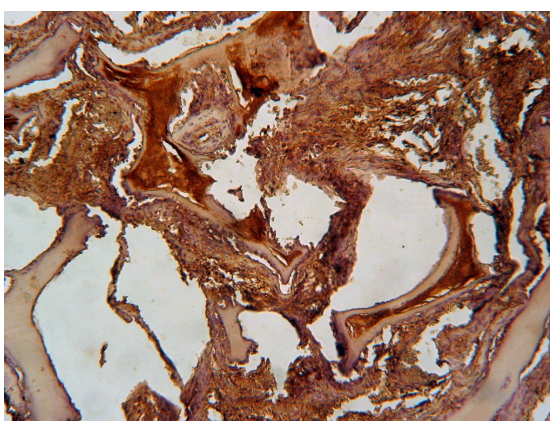
c



d



e



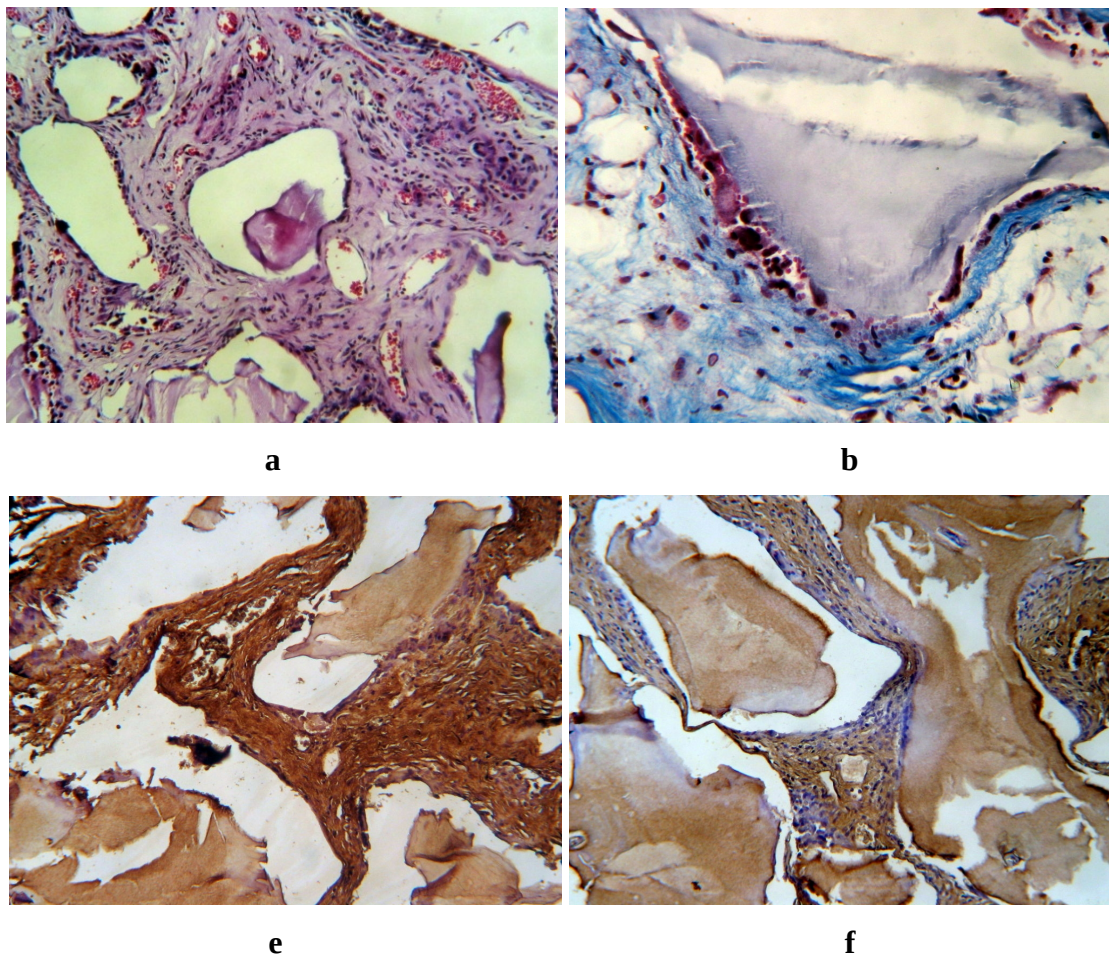
f

Slika 31. Implanti sa tioglikolatom elicitiranim peritonealnim makrofagima osam nedelja nakon implantacije:

- a. implant prožimaju slaba kolagena vlakna; MTH, 200x
- b. krvni sudovi velikog dijametra u vezivu implanta; HE, 200x
- c. struktura nalik osteonu u granuli mineralnog matriksa kosti; MTH, 200x
- d. jak proces resorpcije granula mineralnog matriksa kosti; HE, 400x
- e. osteopontin; IHC, 200x
- f. osteokalcin; IHC, 200x

4.1.4.3. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim nižom koncentracijom lipopolisaharida - LM1 tip

Implante LM1 tipa obuhvata vezivna kapsula, koja je na nekim mestima jako debela, bogata ćelijama i krvnim sudovima (Slika 32a). Proces resorpcije je aktivan, ali nije intenzivan kao u prethodnim terminima posmatranja (Slike 32a i b). Na periferiji implanata se mogu uočiti i masno i nezrelo vezivno tkivo (Slika 32b). U vezivnom tkivu implanata postoje prazni prostori tipa sinusoidnih šupljina, verovatno kao posledica jakog procesa resorpcije. Ponegde se u vezivnom tkivu implanata može uočiti granulomatozna reakcija. Krvnih sudova ima mnogo i na periferiji i u unutrašnjosti implanata (Slike 32a). Prostor između granula MMK je ispunjen vezivnim tkivom koje je bogato kolagenom, a postoje i znaci fibroze (Slike 32b). Imunoekspresija OP (Slika 32d) je umerena sa tendencijom prelaska u jaku, dok je imunoekspresija OC (Slika 32e) umerena.



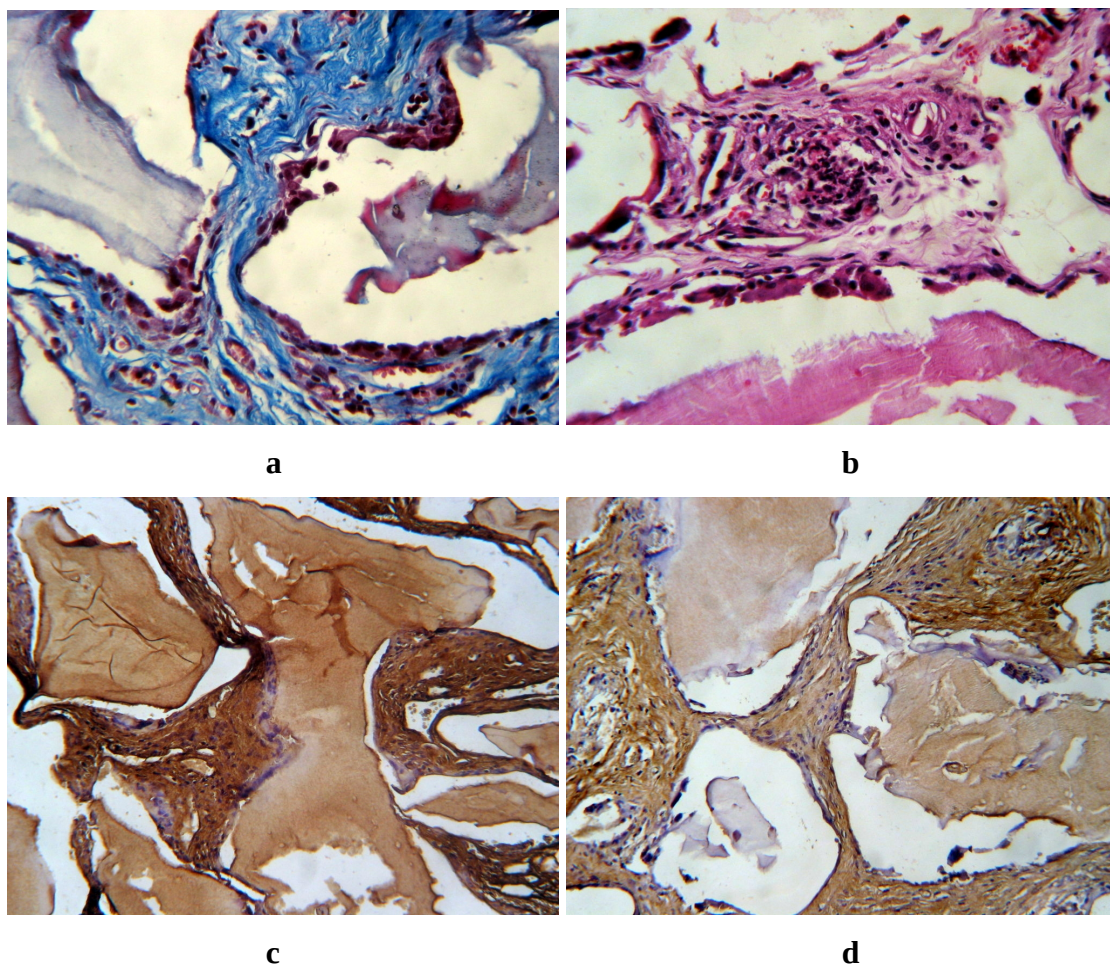
Slika 32. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim nižom koncentracijom lipopolisaharida osam nedelja nakon implantacije:

- a. dobra prokrvljenost implanta; HE, 200x
- b. proces resorpcije granula mineralnog matriksa kosti; MTH, 400x
- c. osteopontin; IHC, 200x
- d. osteokalcin; IHC, 200x

4.1.4.4. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim višom koncentracijom lipopolisaharida - LM2 tip

Oko implanata LM2 tipa postoji tanka vezivna kapsula bogata ćelijama. Fagocitorna aktivnost je smanjena, ali se zapaža da je tokom prethodnog perioda bila izražena, jer su granule MMK istanjene. Vezivno tkivo između granula MMK je dosta redukovano, a na mnogim mestima dolazi do njegove fibroze (Slika 33a). Na periferiji

implanata se uočava masno tkivo u procesu degeneracije. U vezivnom tkivu implanata još uvek postoji granulomatozna reakcija i infiltracija neutrofila (Slika 33b). Krvni sudovi su slabo zastupljeni, mahom u perifernom delu implanata. Kolagena vlakna između granula MMK su debela i intenzivno obojena (Slika 33a). Imunoekspresija OP (Slika 33c) je umerena, a OC (Slika 33d) je slaba.

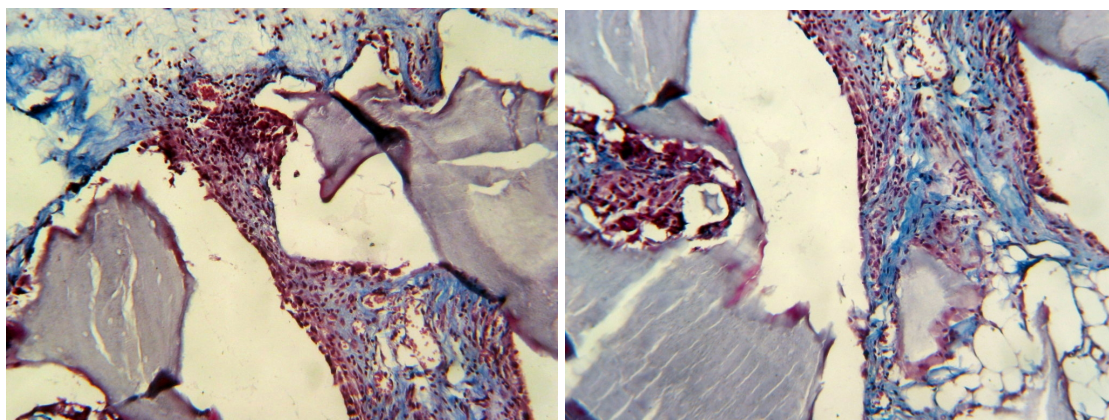


Slika 33. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim višom koncentracijom lipopolisaharida osam nedelja nakon implantacije:

- a. prisustvo neutrofila u vezivu implanta, između granula mineralnog matriksa kosti; HE, 400x
- b. kolagena vlakna u implantu; MTH, 400x
- c. osteopontin; IHC, 200x
- d. osteokalcin, IHC

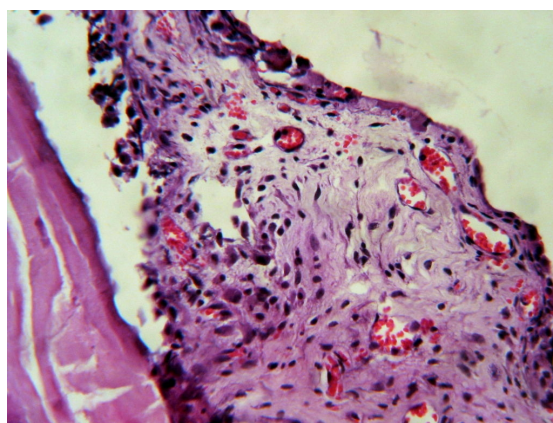
4.1.4.5. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim deksametazonom - DM tip

Vezivna kapsula oko implanata DM tipa tanka je i sadrži ćelije. Proces resorpcije je još uvek aktivan. Zapažaju se krupni višejedarni fagociti na površini granula MMK, u tkivu između granula, ali i oni koji prodiru u same granule praćeni vezivnim tkivom (Slike 34a i b). Na periferiji implanata je razvijeno masno tkivo koje prodire i u njegovu unutrašnjost. Takođe, na periferiji implanata postoji i lepo razvijeno nezrelo vezivno tkivo. Krvni sudovi su prisutni (Slika 34c). Vezivno tkivo među granulama MMK je u procesu remodeliranja. Imunoekspresija OP (Slika 34d) i OC (Slika 34e) je umerena.

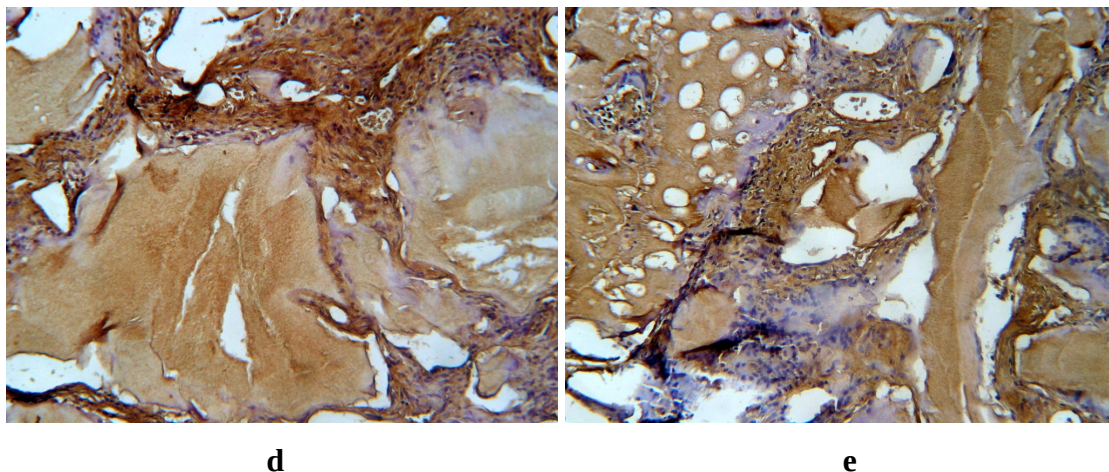


a

b



c

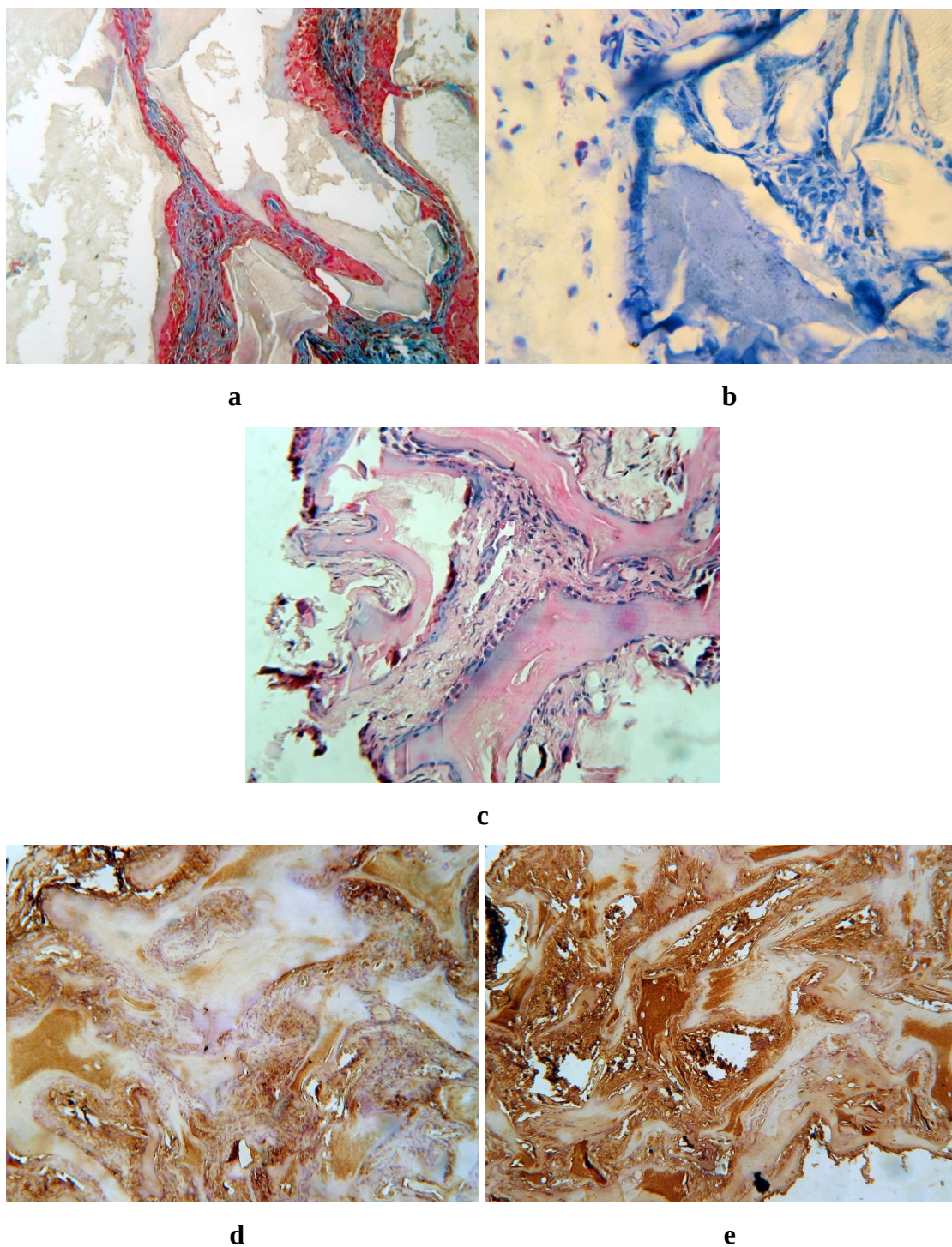


Slika 34. Implanti sa peritonealnim makrofagima tretiranim deksametazonom osam nedelja nakon implantacije:

- a. nezrelo vezivno tkivo na periferiji implanta; HE, 100x
- b. kolagena vlakna; MTH, 200x
- c. krvni sudovi u vezivnom tkivu implanta; HE, 400x
- d. osteopontin; IHC, 200x
- e. osteokalcin; IHC, 200x

4.1.4.6. Implanti formirani kombinovanjem nosača makrofaga - K tip

Oko implanata K tipa postoji tanka vezivna kapsula. Granule MMK su krupne i slabo resorbovane. Još uvek postoje neka mesta gde je proces resorpcije aktivan i on je izraženiji na periferiji implanata nego u njihovoj unutrašnjosti (Slika 35a). Vezivno tkivo između granula u nekim regionima sadrži dosta ćelija, ali su u analiziranim isečcima mnogo češća polja sa prisutnom fibrozom tkiva (Slika 35c). Na nekim analiziranim isečcima je registrovano nezrelo vezivno tkivo i to na periferiji implanata (Slika 35b). Implanti su prožeti dobro razvijenim kolagenom (Slika 35a). Jednojedarne osteoblastolike ćelije se nalaze na nekim mestima po površini granula MMK. Imunoekspresija OP (Slika 35d) i OC (Slika 35e) je slaba.



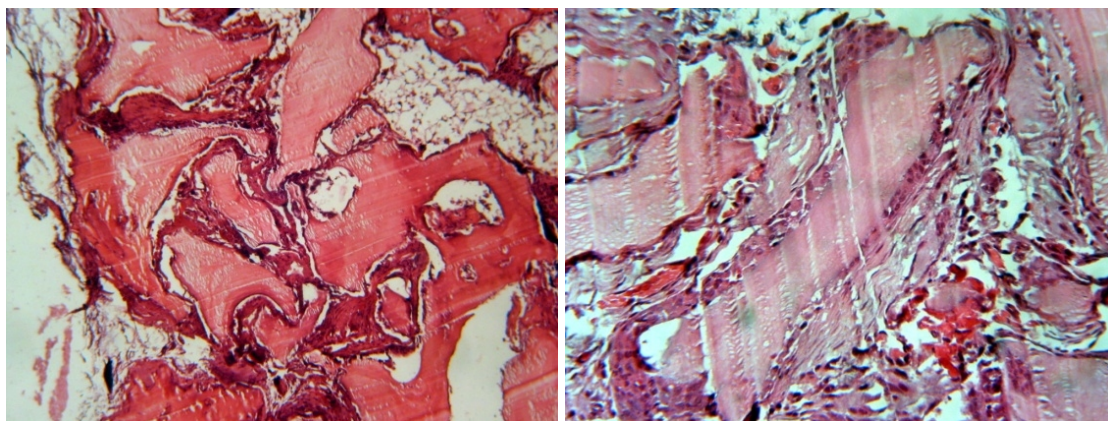
Slika 35. Implanti formirani kombinovanjem nosača makrofaga osam nedelja nakon implantacije:

- a. kolagena vlakna u implantu; MTH, 200x
- b. nezrelo vezivno tkivo na periferiji implanta; TB, 200x
- c. fibroza u implantu; HE, 400x

- d. osteopontin, IHC
- e. osteokalcin; IHC, 200x

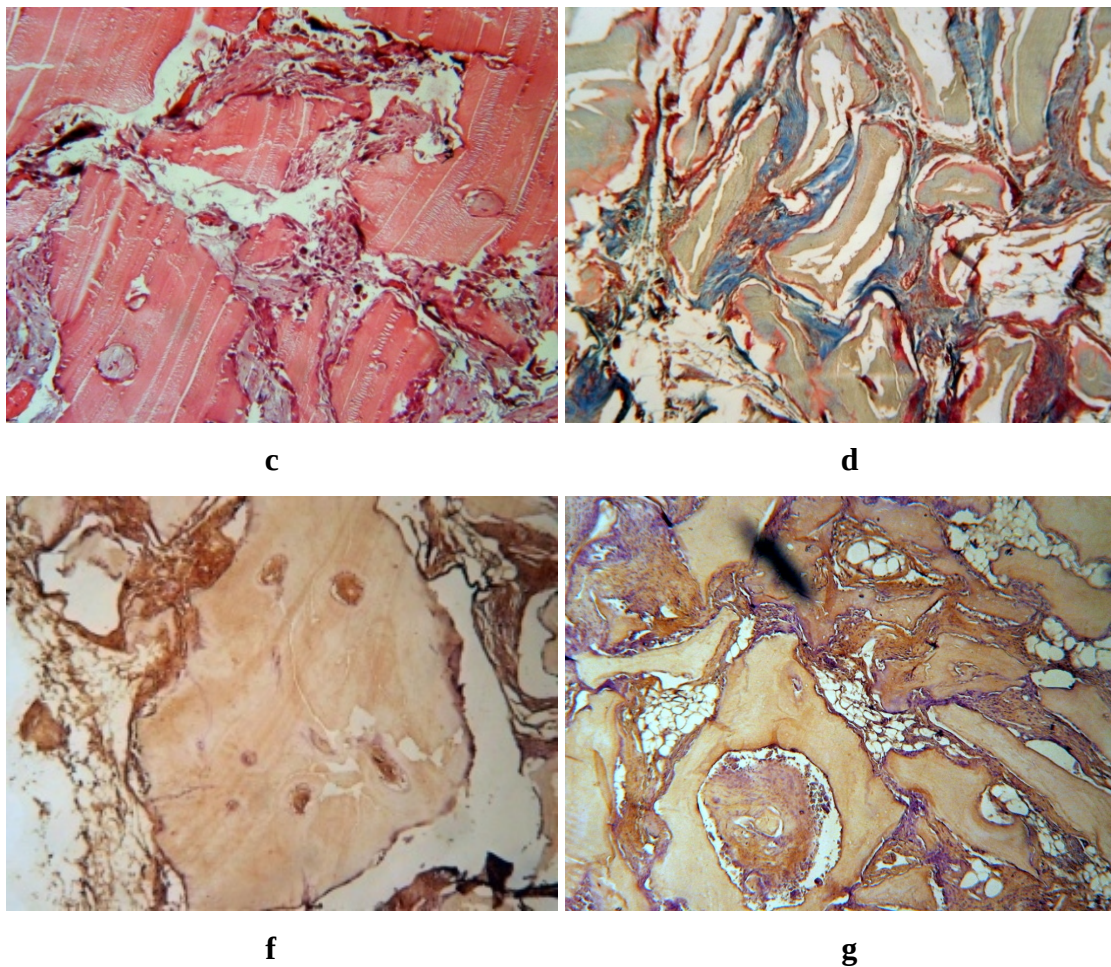
4.1.4.7. Implanti od mineralnog matriksa kosti - B tip

Vezivna kapsula oko implanata B tipa osam nedelja nakon implantacije je tanka i praktično bez ćelija (Slika 36a). Granule MMK nisu još uvek resorbovane i deluju najslabije redukovano u odnosu na ostale eksperimentalne grupe. Fagociti su retki i proces resorpcije progresivno gubi na snazi. Između granula MMK je zastupljeno uglavnom zrelo fibrozno tkivo, koje je siromašno ćelijama, a bogato kolagenom (Slike 36a, b, c i d). U implante prodire i masno tkivo koje zajedno sa fibroznim počinje da degeneriše (Slike 36a i c). Nezrelo vezivno tkivo, koje je u prethodnim terminima postojalo na periferiji implanata, degeneriše nakon osam nedelja od implantacije. Krvni sudovi su retki i uglavnom malog dijametra. Naslage kolagena su jake, a vlakna kolagena prodiru i u granule MMK (Slika 36c). Na nekim mestima se ćelije raspoređuju po površini granula MMK (Slika 36b). Imunoekspresija OP (Slika 36e) i OC (Slika 36f) je slaba.



a

b



Slika 36. Implanti od mineralnog matriksa kosti osam nedelja nakon implantacije:

- a. fibroza i masna degeneracija u implantima; HE, 100x
- b. ćelije na površini granula mineralnog matriksa kosti; HE, 400x
- c. prodor kolagena u unutrašnjost granula mineralnog matriksa kosti; HE, 200x
- d. znaci fibroze u implantima; HE, 100X
- e. osteopontin; IHC, 100x
- f. osteokalcin; IHC, 100x

4.2. Rezultati *in vitro* istraživanja

Rezultati *in vitro* dela istraživanja su podeljeni u tri kategorije: rezultate preliminarnih istraživanja, rezultate istraživanja na monocitno-makrofagnoj ćelijskoj liniji RAW 264.7 mišje leukemije i rezultate istraživanja osteogene diferencijacije preosteoblastne ćelijske linije MC3T3-E1.

4.2.1. Rezultati preliminarnih istraživanja

Preliminarna istraživanja u kulturi sa peritonealnim makrofagima (PM) služila su za analizu funkcionalnog stanja i morfologiju rezidentnih i tioglikolatom elicitiranih PM koji su korišćeni za formiranje implanta.

4.2.1.1. Morfološka i funkcionalna analiza rezidentnih i tioglikolatom elicitiranih peritonealnih makrofaga

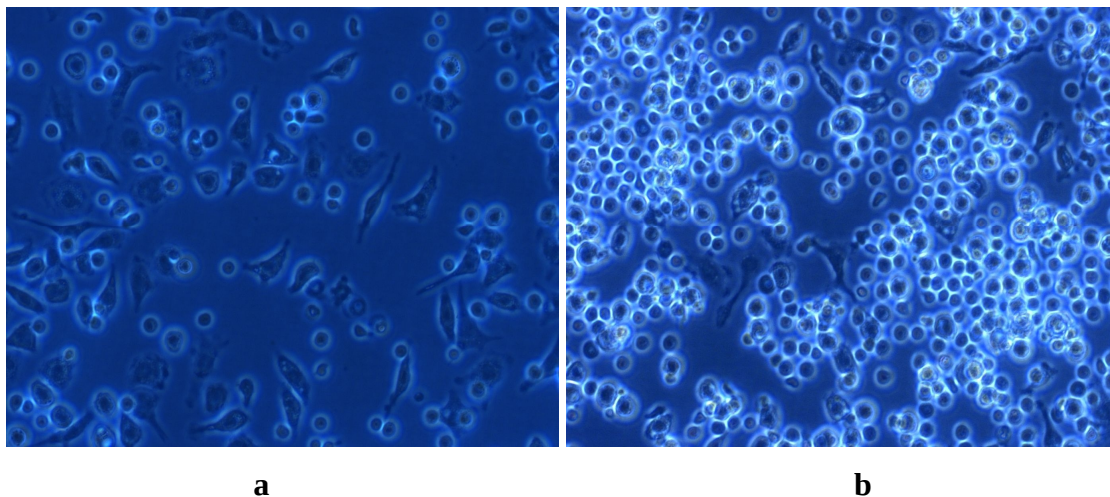
Morfološka i funkcionalna analiza PM podrazumevala je upoređivanje rezidentnih PM (RPM) i tioglikolatom elicitiranih PM (TEPM) koji su kao takvi korišćeni u eksperimentima na modelu ektopične osteogeneze *in vivo*. Morfologija ćelija je analizirana nakon 24 h kultivacije, zatim su sakupljeni kondicionirani medijumi koji su korišćeni za analizu nivoa produkcije TNF- α , a ispitivana je produkcija reaktivnih jedinjenja kiseonika od strane RPM i TEPM semikvantitativnim NBT testom.

4.2.1.1.1. Mikroskopska analiza

Nakon 24 h, u kulturi RPM podjednako su zastupljene ćelije fibroblastolikog oblika, kao i znatno manje ćelije ovalnog oblika. Ponegde se vide i široke, spljoštene ćelije epiteloidnog izgleda sa velikim jedrom, koje su čvrsto priljubljene uz podlogu. U pojedinim ćelijama se može uočiti po nekoliko vezikula/vakuola, dok su ćelije sa većim brojem ovih struktura retke (Slika 37a).

Upoređivanjem kultura RPM i TEPM nakon 24 h inkubacije u medijumu, uočljivo je da je kultura TEPM gušća. Dominiraju ćelije ovalnog oblika, jako

heterogene u pogledu veličine, koje su grupisane u klastere koji se ne zapažaju u kluturi RPM. Uočavaju se i ćelije fibroblastolikog oblika. Među TEPM se vide brojne ćelije u apoptozi, sa fragmentisanim jedrima. U TEPM postoje brojne vezikule/vakuole različitih veličina (Slika 37b).



Slika 37. Morfologija ćelija nakon 24 h inkubacije u medijumu:

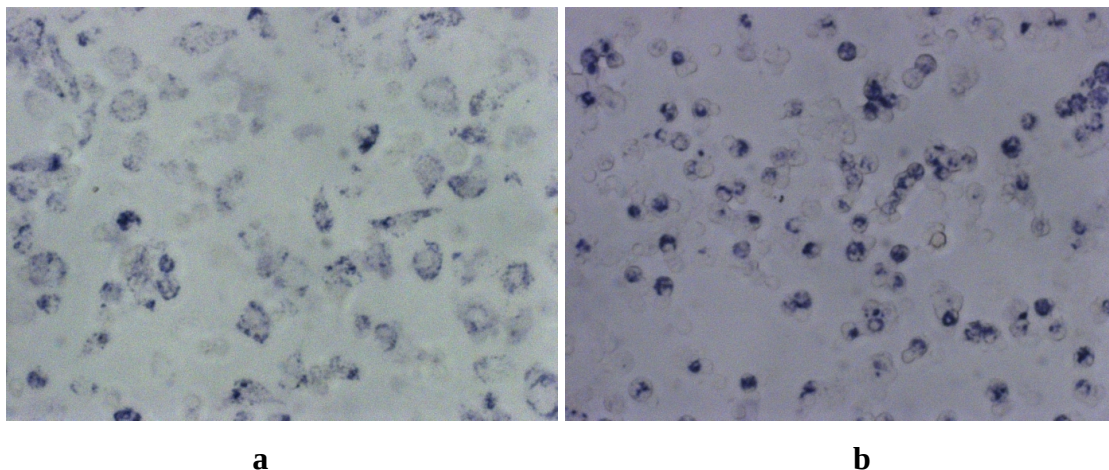
- a.** kultura rezidentnih peritonealnih makrofaga
- b.** kultura tioglikolatom elicitiranih peritonealnih makrofaga;
fazni kontrast, 400x

4.2.1.1.2. Funkcionalna analiza

Sposobnost redukcije NBT

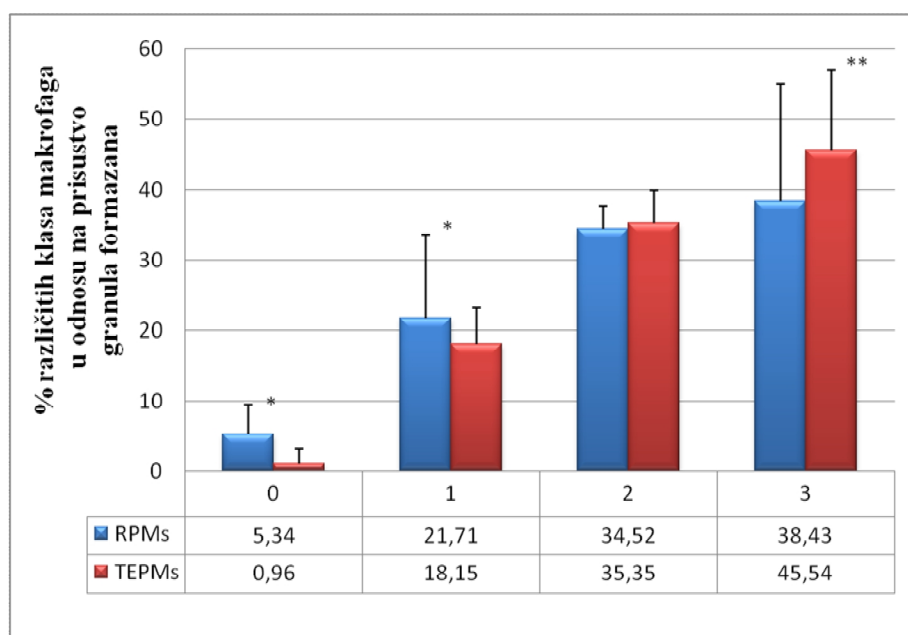
Produkcija reaktivnih jedinjenja kiseonika u PMA-stimulisanim TEPM bila je veća u odnosu na RPM. U kulturi TEPM je registrovan veći broj NBT pozitivnih ćelija generalno, kao i veći broj NBT pozitivnih ćelija potpuno ispunjenih formazanskim kristalima u odnosu na kulturu RPM (Slika 38).

Procenat NBT negativnih ćelija u kulturi RPM je iznosio 5.34%, za razliku od samo 0.96% u kulturi TEPM. Takođe, u kulturi RPM, statistički značajno ($p < 0.01$) je više ćelija koje pripadaju klasi „1“ u odnosu na kulturu TEPM, dok je u kulturi TEPM statistički značajno ($p < 0.05$) više ćelija iz klase „3“ u odnosu na RPM (Grafik 1).



Slika 38. Mikroskopski NBT test je primenjen nakon 24 h inkubacije ćelija u medijumu:

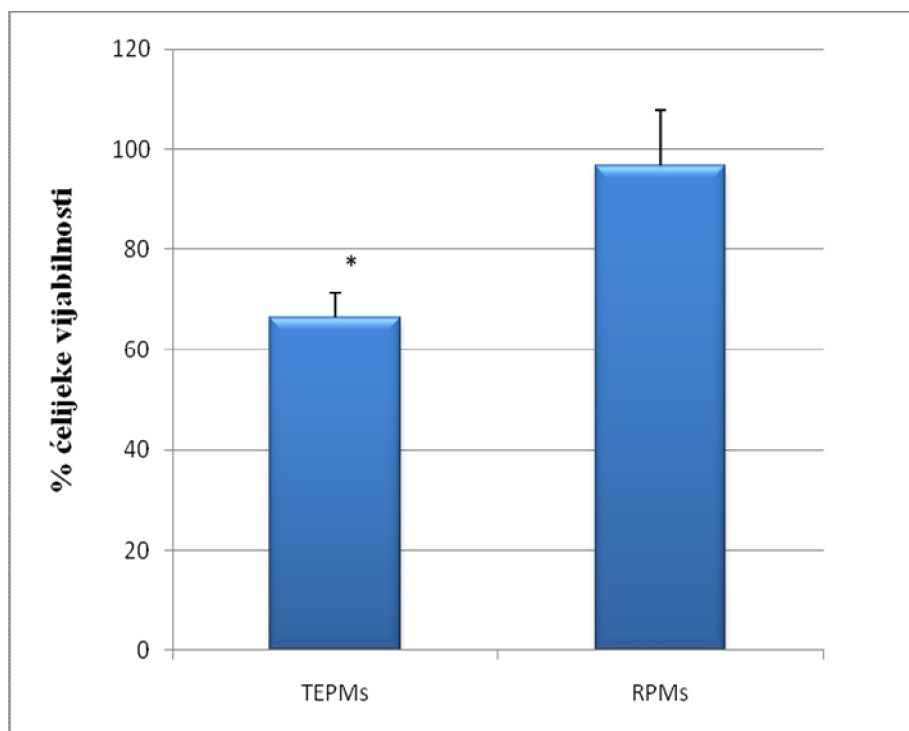
- a. rezidentni peritonealni makrofagi
 - b. tioglikolatom elicirani peritonealni makrofagi;
- svetlosni mikroskop, 400x



Grafik 1. Procenat različitih klasa makrofaga u odnosu na prisustvo granula formazana nakon 24 h inkubacije rezidentnih (RPM) i tioglikolatom eliciranih peritonealnih makrofaga (TEPM) u standardnom medijumu; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Citotoksična aktivnost kondicioniranih medijuma

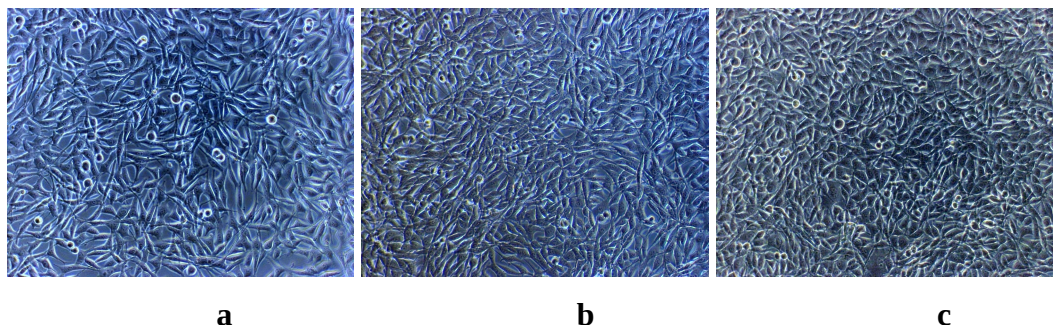
U ovom istraživanju je merena ćelijska vijabilnost MTT testom u okviru L929 bioeseja za merenje aktivnosti TNF- α , a rezultati su predstavljeni kao procenat vijabilnosti ćelija u kondicioniranim medijumima TEPM i RPM. Kondicionirani medijum TEPM je redukovao vijabilnost L929 ćelija za 33.6% i delovao je citotoksično, dok kondicionirani medijum RPM nije bio citotoksičan za L929 ćelije, jer je ćelijska vijabilnost smanjena za svega 3.3%. Na osnovu vrednosti absorbanci je izračunato da je citotoksičnost kondicioniranog medijuma TEPM statistički značajna ($p \leq 0.01$) u komparaciji sa kondicioniranim medijumom RPM i kontrolnim medijumom (Grafik 2).



Grafik 2. Procenat vijabilnosti L929 ćelija u kondicioniranim medijumima tioglikolatom elicitiranih (TEPM) i rezidentnih peritonealnih makrofaga (RPM);
* $p < 0.01$

Na slici 39 se može videti redukovani broj L929 ćelija u kondicioniranom medijumu TEPM (Slika 39a), dok je gustina L929 ćelija u kondicioniranom medijumu RPM (Slika 39b) slična kao u kontrolnom medijumu (Slika 39c). Veliki broj ćelija

inkubiranih u kondicioniranom medijumu TEPM su imale igličaste nastavke, koji ukazuju na citotoksični efekat ovog kondicioniranog medijuma.



Slika 39. Morfologija L929 ćelija nakon 24 h inkubacije u:

- a. kondicioniranom medijumu tioglikolatom elicitiranih peritonealnih makrofaga
 - b. kondicioniranom medijumu rezidentnih peritonealnih makrofaga
 - c. standardnom medijumu kao kontroli;
- fazni kontrast, 200x

4.2.1.2. Morfološka i funkcionalna analiza rezidentnih peritonealnih makrofaga tretiranih lipopolisaharidom

Deo preliminarnih eksperimenata se odnosio i na tretman RPM različitim koncentracijama lipopolisaharida (0111:B4 *Escherichia coli* LPS; 1 ng/ml, 10 ng/ml i 100 ng/ml). Ovi eksperimentima smo želeli da utvrdimo optimalne koncentracije LPS-a za eksperimente osteogene diferencijacije *in vitro*, kao i da potvrdimo stanje RPM tretiranih LPS-om koji su korišćeni za formiranje određenih tipova implanata.

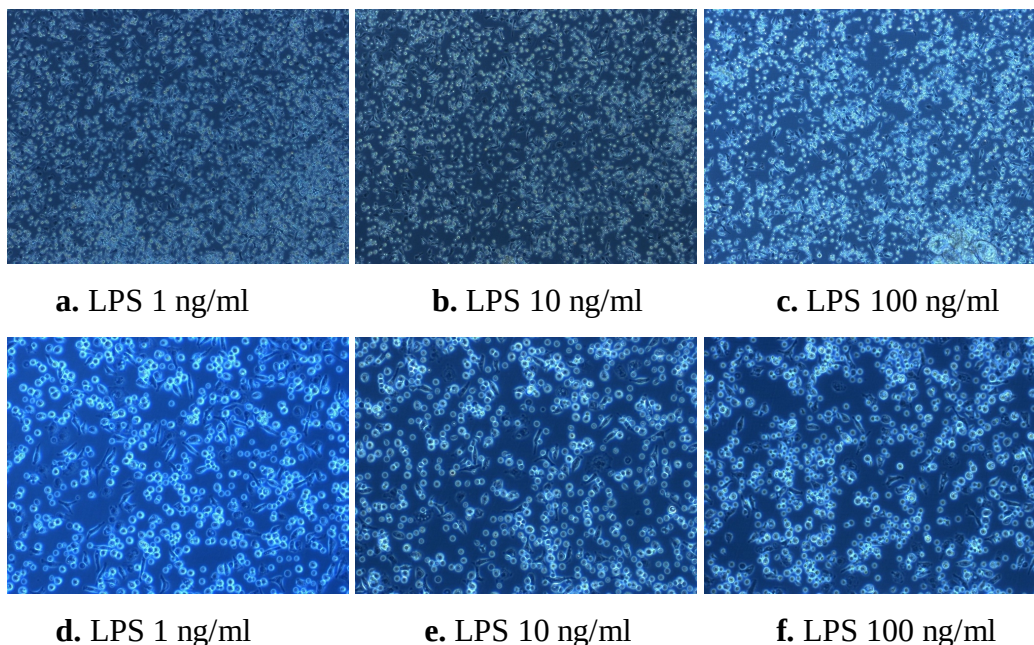
Nakon 24 h inkubacije u medijumu sa 1 ng/ml, 10 ng/ml i 100 ng/ml LPS-a pod mikroskopom je posmatrana ćelijska morfologija i urađena je funkcionalna analiza makrofaga semikvantitativnim mikroskopskim NBT testom, a određena je i citotoksičnost njihovih kondicioniranih medijuma MTT testom.

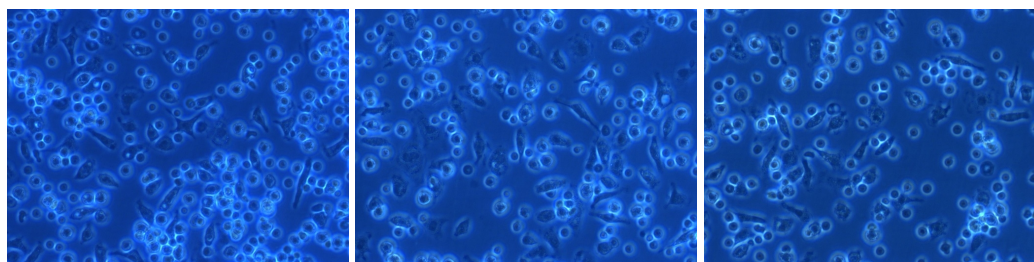
4.2.1.2.1. Mikroskopska analiza

U kulturi RPM inkubiranih 24 h u medijumu sa 1 ng/ml LPS-a ćelije su poprimile fibroblastoliku, ređe retikularnu morfologiju. Primećuje se veći broj sitnih, okruglih ćelija koje se grupišu u klastere, a među njima ima i ćelija u apoptozi. U širokim, spljoštenim ćelijama se mogu uočiti vezikule/vakuole (Slika 40a, d i g).

Ćelije inkubirane 24 h u medijumu sa 10 ng/ml LPS-a su poprimile fibroblastoliku i retikularnu morfologiju, ali ima i pojedinačnih širokih i spljoštenih ćelija sa krupnim jedrom. Manje, okrugle ćelije se grupišu u klastere, u okviru kojih ima dosta ćelija u apoptozi (više nego u kulturi makrofaga sa 1 ng/ml LPS-a). U ćelijama postoje mnogobrojne vezikule/vakuole (Slika 40b, e i h).

U kulturi RPM inkubiranih 24 h u medijumu sa 100 ng/ml LPS-a ćelije imaju fibroblastoliku i retikularnu morfologiju. Ćelijski klasteri sadrže veliki broj ćelija u apoptozi (više u odnosu na kulture RPM tretirane nižim koncentracijama LPS-a). Citoplazma širokih spljoštenih ćelija je celom zapreminom ispunjena vezikulama/vakuolama (Slika 40c, f i i).





g. LPS 1 ng/ml

h. LPS 10 ng/ml

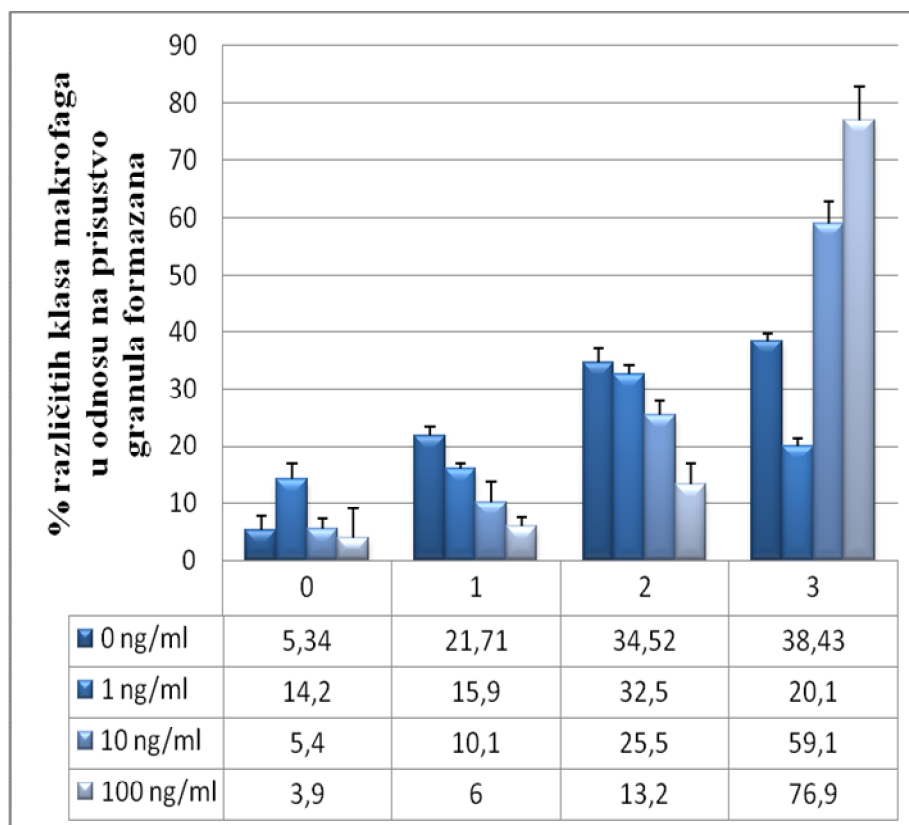
i. LPS 100 ng/ml

Slika 40. Morfologija rezidentnih peritonealnih makrofaga nakon 24 h inkubacije sa različitim koncentracijama lipopolisaharida (LPS); fazni kontrast, 100x (a, b, c); 200x (d, e, f); 400x (g, h, i)

4.2.1.2.2. Funkcionalna analiza

Sposobnost redukcije NBT

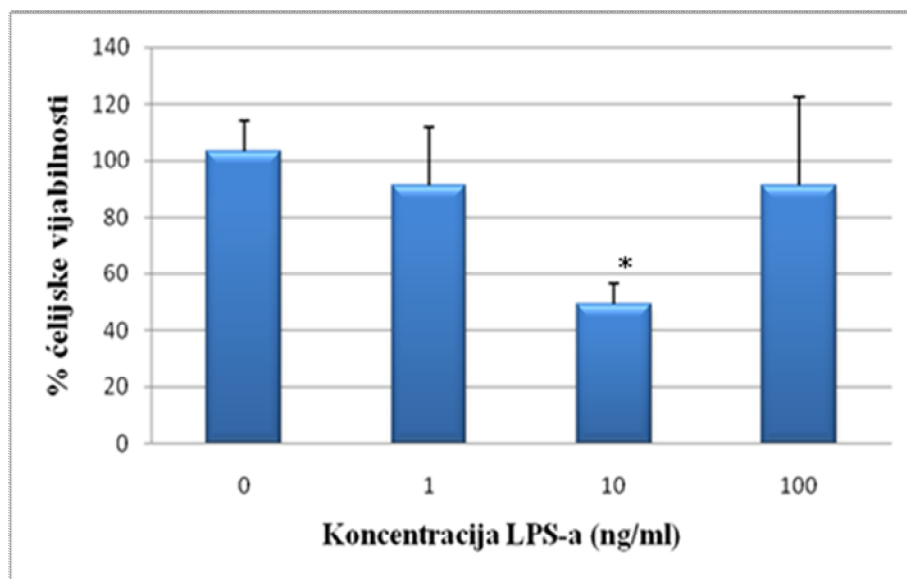
Nakon 24 h inkubacije sa LPS-om, ispitivana je produkcija reaktivnih jedinjenja kiseonika u PMA-stimulanim RPM, semikvantitativnim NBT testom. Ovim testom je pokazana pravilnost u stepenu redukcije NBT-a, u zavisnosti od koncentracije LPS-a kojom su ćelije prethodno tretirane. Ako se međusobno uporede ćelije tretirane različitim koncentracijama LPS-a, uočava se da je u grupi RPM tretiranih najnižom koncentracijom LPS-a (1 ng/ml) najveći broj ćelija u klasi „0“ i to 14,2%, a najmanji u grupi RPM tretiranih najvećom koncentracijom LPS-a (100 ng/ml) i to 3,9% i obrnuto, u grupi RPM tretiranih najnižom koncentracijom LPS-a (1 ng/ml) najmanji je broj ćelija u klasi „3“ i to 20,1%, dok je u grupi RPM tretiranih najvećom koncentracijom LPS-a (100 ng/ml) procenat ovih ćelija čak 76,9% (Grafik 3).



Grafik 3. Procenat različitih klasa makrofaga u odnosu na prisustvo granula formazana nakon 24 h inkubacije rezidentnih peritonealnih makrofaga tretiranih različitim koncentracijama lipopolisaharida

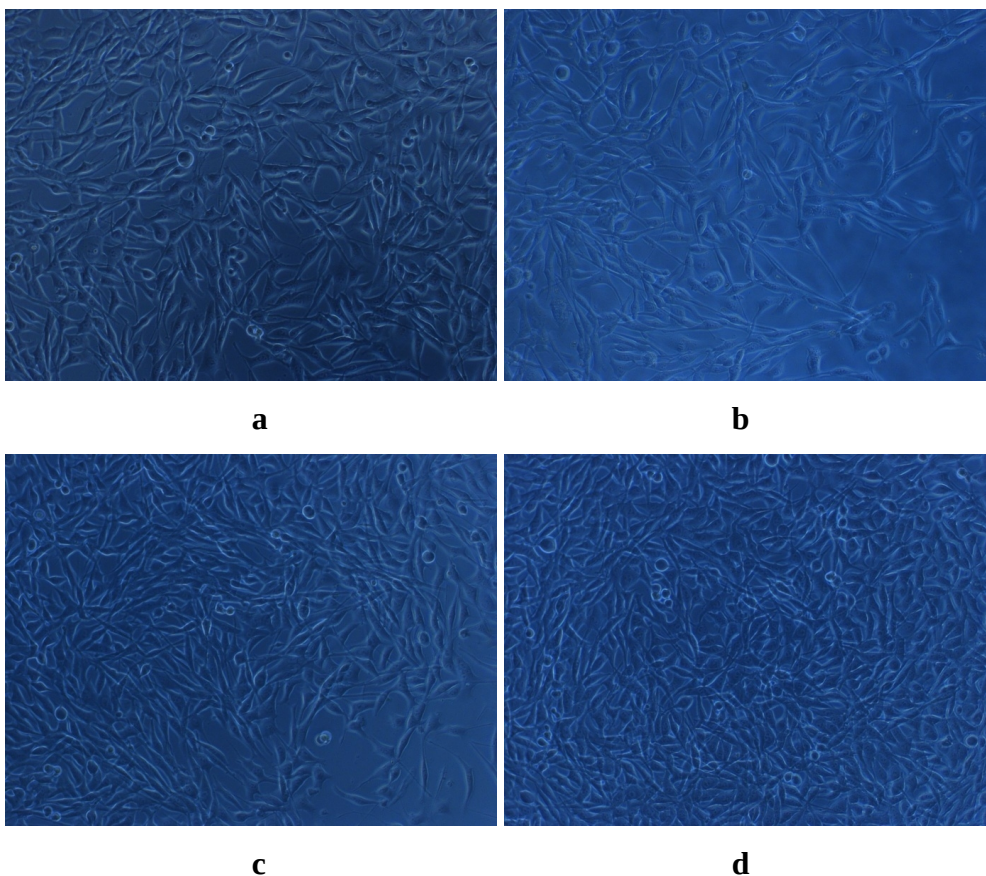
Citotoksična aktivnost kondicioniranih medijuma

U ovom istraživanju je merena vijabilnost L929 ćelija MTT testom što je vrsta bioeseja za determinaciju $\text{TNF-}\alpha$, a rezultati su predstavljeni kao procenat ćelijske vijabilnosti u kondicioniranim medijumima RPM tretiranih različitim koncentracijama LPS-a. Kondicionirani medijum RPM tretiranih LPS-om u koncentraciji od 10 ng/ml je statistički značajno ($p < 0.01$) smanjio vijabilnost ćelija i to za oko 50%. Kondicionirani medijumi RPM tretiranih LPS-om u koncentracijama od 1 ng/ml i 100 ng/ml su delovali slabo citotoksično (Grafik 4).



Grafik 4. Procenat vijabilnosti L929 ćelija u odnosu na negativnu kontrolu nakon 24 h inkubacije u kondicioniranim medijumima lipopolisaharidom tretiranih rezidentnih peritonealnih makrofaga; * $p < 0.01$

Na slici 41 se vidi da je broj živih ćelija redukovan najviše u kondicioniranom medijumu RPM tretiranih LPS-om u koncentraciji 10 ng/ml (Slika 41b), dok je ćelijska gustina u kondicioniranim medijumima RPM tretiranih LPS-om u koncentracijama 1 ng/ml (Slika 41a) odnosno 100 ng/ml (Slika 41c) slična onoj u kontrolnom medijumu (Slika 41d). U svim ispitivanim kondicioniranim medijumima L929 ćelije su imale igličaste nastavke, što ukazuje na citotoksičnost kondicioniranih medijuma. Ti igličasti nastavci su bili najizduženiji i najtanji u kondicioniranom medijumu RPM tretiranih sa 10 ng/ml LPS-a.



Slika 41. Morfologija L929 ćelija nakon 24 h inkubacije u:

- a.** kondicioniranom medijumu rezidentnih peritonealnih makrofaga tretiranih lipopolisaharidom u koncentraciji 1 ng/ml
- b.** kondicioniranom medijumu rezidentnih peritonealnih makrofaga tretiranih lipopolisaharidom u koncentraciji 10 ng/ml
- c.** kondicioniranom medijumu rezidentnih peritonealnih makrofaga tretiranih lipopolisaharidom u koncentraciji 100 ng/ml
- d.** standardnom medijumu kao kontrolom;
fazni kontrast, 200x

4.2.2. Istraživanja na RAW 264.7 ćelijskoj liniji

Monocitno-makrofagna ćelijska linija RAW 264.7 mišje leukemije, predstavlja standardnu ćelijsku liniju koja se često koristi u različitim istraživanjima. Nakon preliminarnih istraživanja koja su se odnosila na ispitivanje delovanja LPS-a na RPM, makrofagi RAW 264.7 su tretirani koncentracijama LPS-a koje su pokazale najslabije i najsnažnije delovanje tj. 1 ng/ml (grupa L1) i 100 ng/ml (grupa L100). RAW 264.7 makrofagi su tretirani i deksametazonom (grupa D), a kontrola su bili RAW 264.7 makrofagi uzgajani u DMEM medijumu (grupa K). Ćelije su tretirane u trajanju od 4 h navedenim koncentracijama LPS-a, deksametazonom ili su gajene u standardnom medijumu (DMEM). Zatim su medijumi uklonjeni i zamenjeni svežim standardnim medijumom u kome su ćelije kultivisane još 20 h. Nakon isteka ovog perioda analizirana je ćelijska morfologija i produkcija TNF- α MTT testom.

4.2.2.1. Morfološka i funkcionalna analiza RAW 264.7 makrofaga nakon tretmana

4.2.2.1.1. Mikroskopska analiza

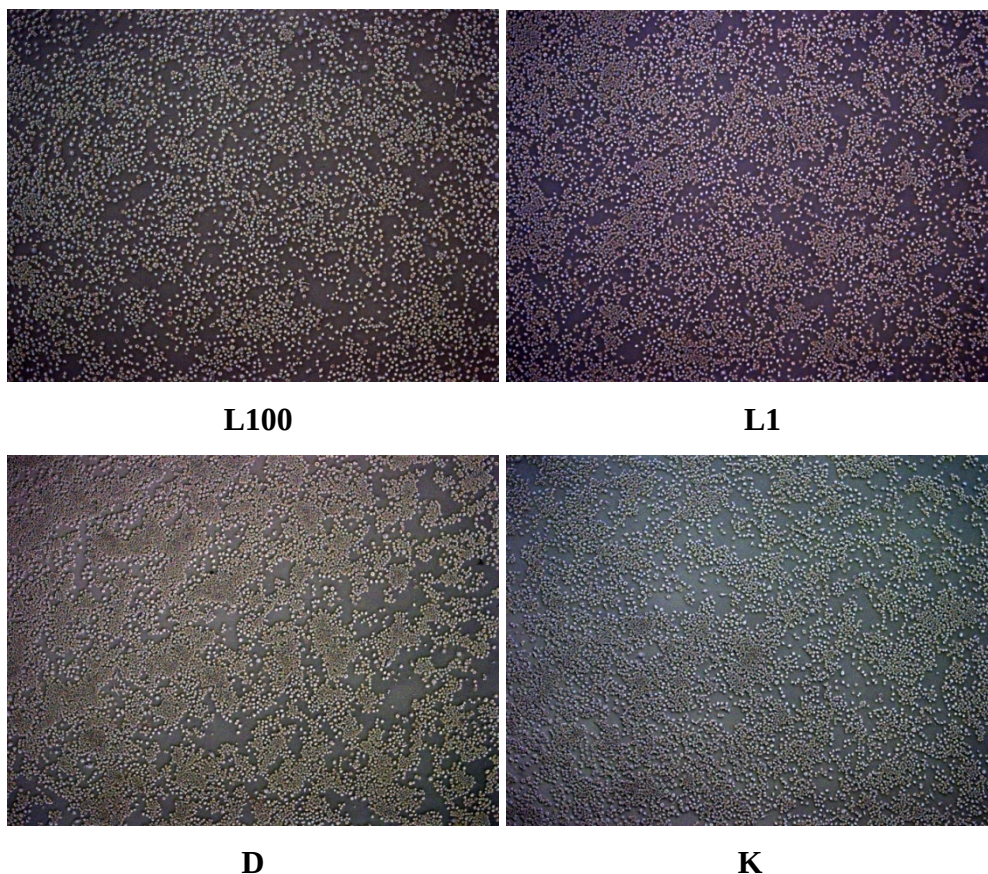
RAW 264.7 makrofagi iz grupe L100 imaju pretežno zvezdast, ređe fibroblastni fenotip. Sa okrugle osnove ćelija polaze brojni kraći nastavci, koji su često i razgranati. Na mestima gde su ćelije grupisane, one dobijaju okrugao ili poligonalan oblik. Klasteri ćelija su veoma razbijeni. U ćelijama se mogu zapaziti vezikule/vakuole. Sporadično se uočavaju i ćelije sa po dva jedra (Slike 42 i 43).

RAW 264.7 makrofagi iz grupe L1 imaju heterogeniju morfologiju, pa su tako zastupljene ćelije zvezdastog, fibroblastolikog, okruglog ili poligonalnog oblika, a sporadično se opažaju i krupne, spljoštene ćelije. Ćelijska gustina je velika, a ćelijski klasteri gusti. Sporadično se u kulturi vide široke spljoštene ćelije u kojima postoje vezikule/vakuole (Slike 42 i 43).

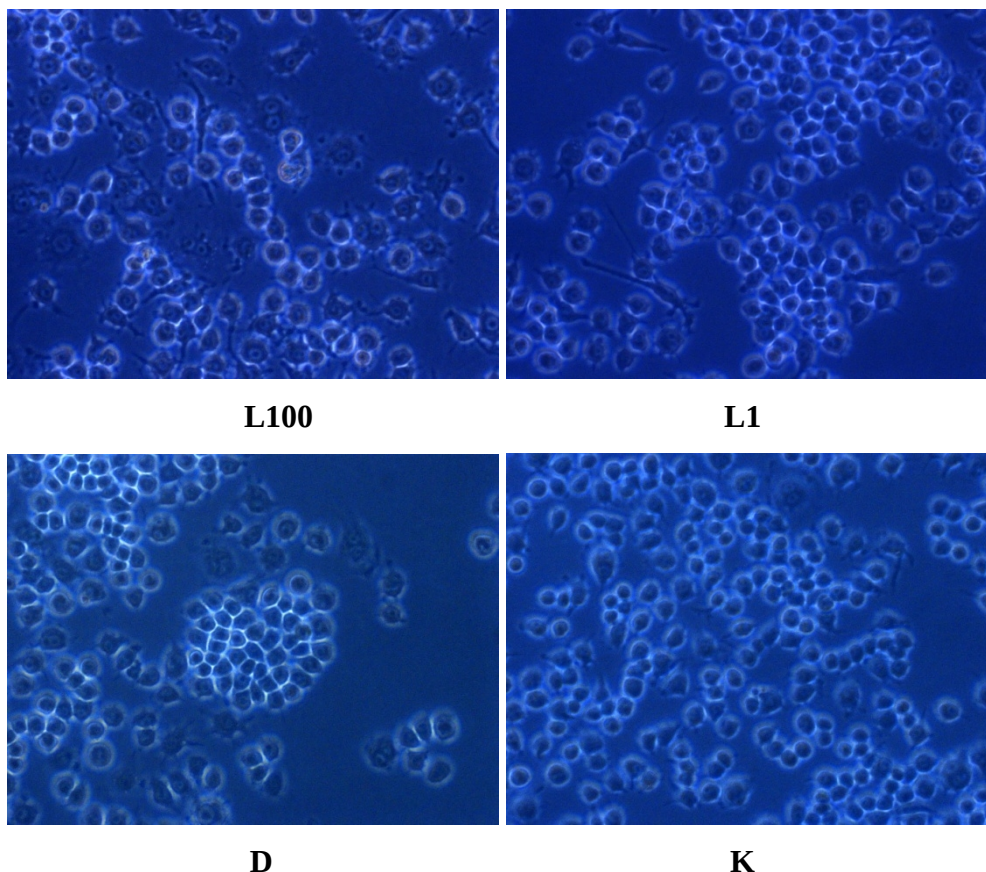
Ćelijska gustina u kulturi ćelija grupe D je izuzetno velika. RAW 264.7 makrofagi su grupisani u velike guste klasterne. Ćelije su pretežno okruglog oblika, ređe

fibroblastolik ili zvezdastog oblika, a u citoplazmi nekih ćelija se mogu uočiti vezikule/vakuole (Slike 42 i 43).

U grupi K gustina RAW 264.7 makrofaga je velika, a ćelije se međusobno udružuju formirajući gusta polja sa ćelijama okruglog ili poligonalnog oblika. Ćelije koje su izdvojene iz tih grupacija su po svom obliku obično fibroblastolike (Slike 42 i 43).



Slika 42. RAW 264.7 makrofagi su tretirani lipopolisaharidom u koncentraciji 100 ng/ml (grupa L100), ili 1 ng/ml (grupa L1), deksametazonom (grupa D), a kontrola su bili RAW 264.7 makrofagi kultivisani u standardnom medijumu DMEM (grupa K). Nakon 4 h tretmana, medijumi su zamenjeni standardnim medijumom i ćelije su inkubirane još 20 h. Slike prikazuju ćelije nakon ukupno 24 h inkubacije u kulturi; fazni kontrast, 50x



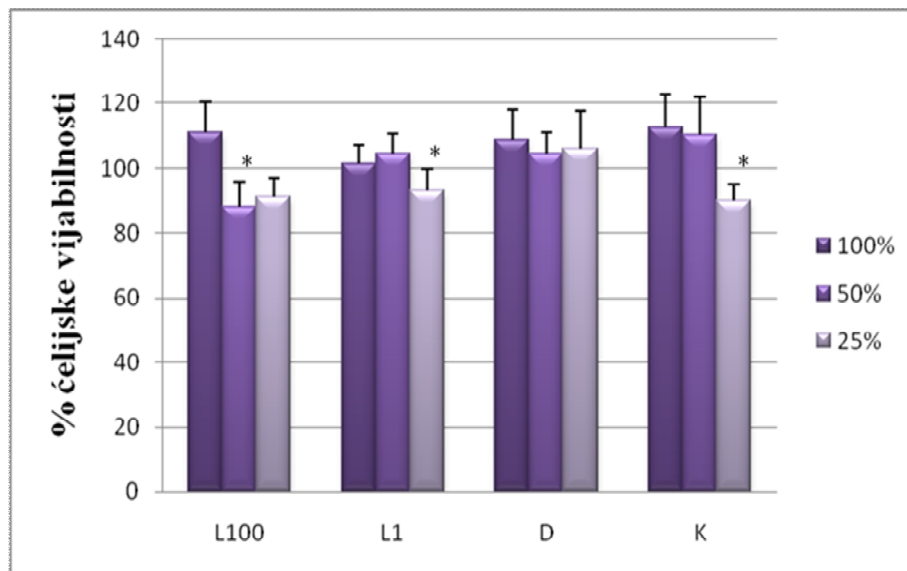
Slika 43. RAW 264.7 makrofagi su tretirani lipopolisaharidom u koncentraciji 100 ng/ml (grupa L100), ili 1 ng/ml (grupa L1), deksametazonom (grupa D), a kontrola su bili RAW 264.7 makrofagi kultivisani u standardnom medijumu DMEM (grupa K). Nakon 4 h tretmana, medijumi su zamenjeni DMEM-om i ćelije su inkubirane još 20 h. Slike prikazuju ćelije nakon ukupno 24 h inkubacije u kulturi; fazni kontrast, 400x

4.2.2.1.2. Funkcionalna analiza

Citotoksična aktivnost kondicioniranih medijuma

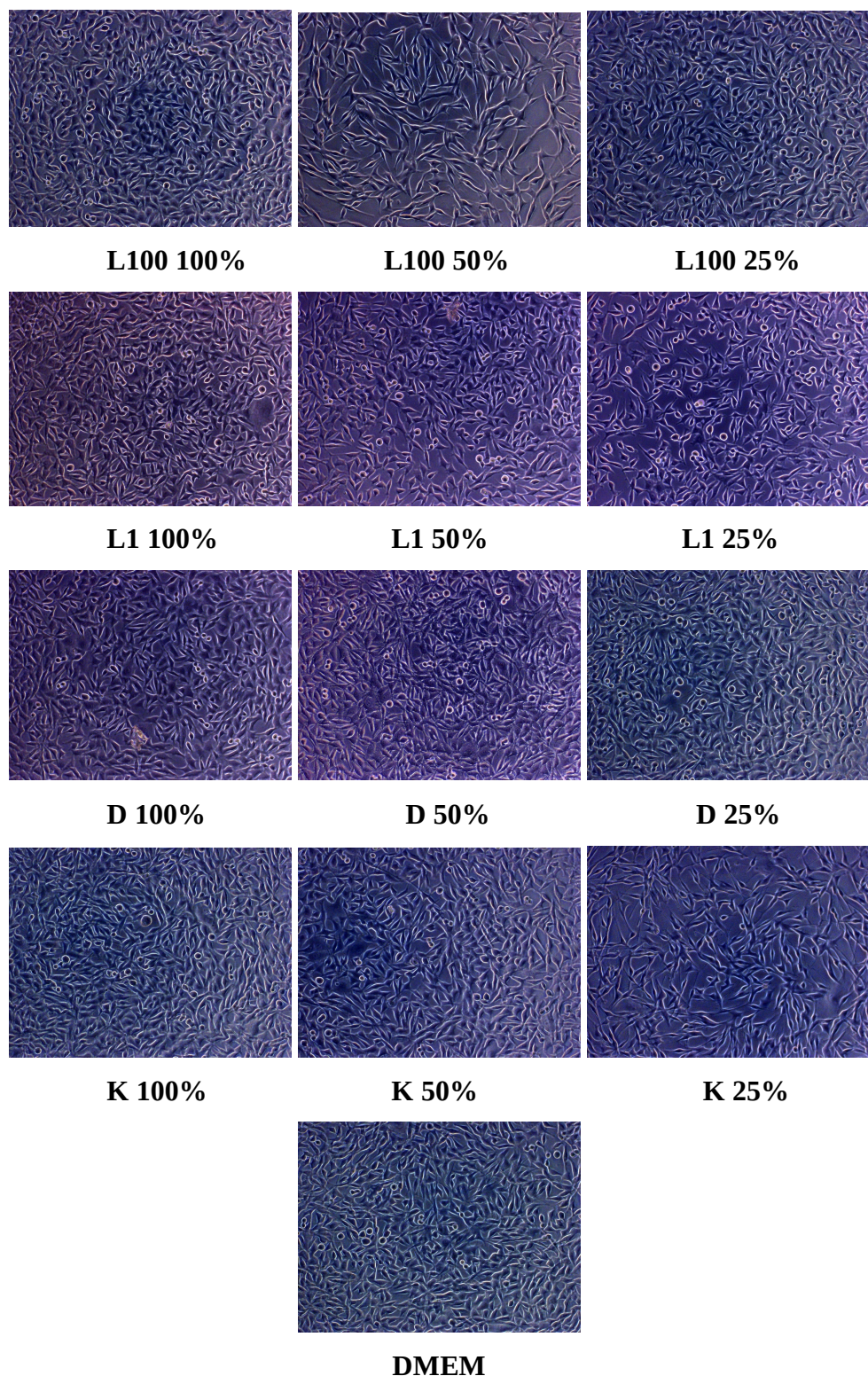
Nakon ukupno 24 h inkubacije (4 h + 20 h) nijedan 100% kondicionirani medijum RAW 264.7 makrofaga iz različitih tretmana ne pokazuje citotoksično delovanje na L929 ćelije. Kondicionirani medijum L100 u koncentraciji 50% pokazuje statistički značajno ($p < 0.05$) blago citotoksično delovanje (11,83%), dok ostali 50% kondicionirani medijumi nemaju citotoksičan efekat. Svi 25% kondicionirani medijumi

pokazuju slab citotoksičan efekat, osim 25% kondicioniranog medijuma grupe D (Grafik 5).



Grafik 5. Procenat vijabilnosti L929 ćelija u 100%, 50% i 25% kondicioniranim medijumima RAW 264.7 makrofaga u odnosu na standardni medijum DMEM. RAW 264.7 makrofagi su tretirani lipopolisaharidom u koncentraciji 100 ng/ml (grupa L100), ili 1 ng/ml (grupa L1), deksametazonom (grupa D), ili su kultivisani u DMEM medijumu (grupa K). Nakon 4 h tretmana, medijumi su zamenjeni DMEM-om i ćelije su inkubirane još 20 h, nakon čega su sakupljeni kondicionirani medijumi; * $p < 0.05$

Na slici 44 se može uočiti da u 50% kondicioniranom medijumu L100, ćelije dobijaju igličaste nastavke. To se takođe može uočiti i u svim 25% kondicioniranim medijumima, osim 25% kondicioniranog medijuma grupe D. Prisustvo i dužina igličastih ćelijskih nastavaka u saglasnosti su sa stepenom citotoksičnosti navedenih kondicioniranih medijuma, kako je već pokazano L929 bioesejem.



Slika 44: Morfologija L929 ćelija nakon 24 h inkubacije u 100%, 50% i 25% kondicioniranim medijumima RAW 264.7 makrofaga. RAW 264.7 makrofagi su tretirani lipopolisaharidom u koncentraciji 100 ng/ml (grupa L100), ili 1 ng/ml (grupa

L1), deksametazonom (grupa D), ili su kultivisani u DMEM medijumu (grupa K). Nakon 4 h tretmana, medijumi su zamenjeni standardnim medijumom DMEM i ćelije su inkubirane još 20 h, nakon čega su sakupljeni kondicionirani medijumi. Kontrola u ovom testu ćelijske vijabilnosti su bile L929 ćelije kultivisane u standardnom medijumu DMEM; fazni kontrast, 200x

4.2.3. Osteogena diferencijacija MC3T3-E1 ćelija u kondicioniranim medijumima

Eksperimenti osteogene diferencijacije podrazumevali su tretman preosteoblastnih MC3T3-E1 ćelija kondicioniranim medijumima RAW 264.7 makrofaga tretiranih LPS-om u koncentracijama 100 ng/ml (grupa L100) ili 1 ng/ml (grupa L1), deksametazonom (grupa D) ili kultivisanih u DMEM medijumu (grupa K). Kontrolne grupe su bile MC3T3-E1 ćelije kultivisane u osteogenom medijumu (OS) ili standardnom medijumu DMEM. Pre eksperimenta sa osteogenom diferencijacijom ćelija, urađen je MTT test proliferacije MC3T3-E1 ćelija gajenih u ispitivanim kondicioniranim medijumima u koncentracijama 100%, 50% i 25%.

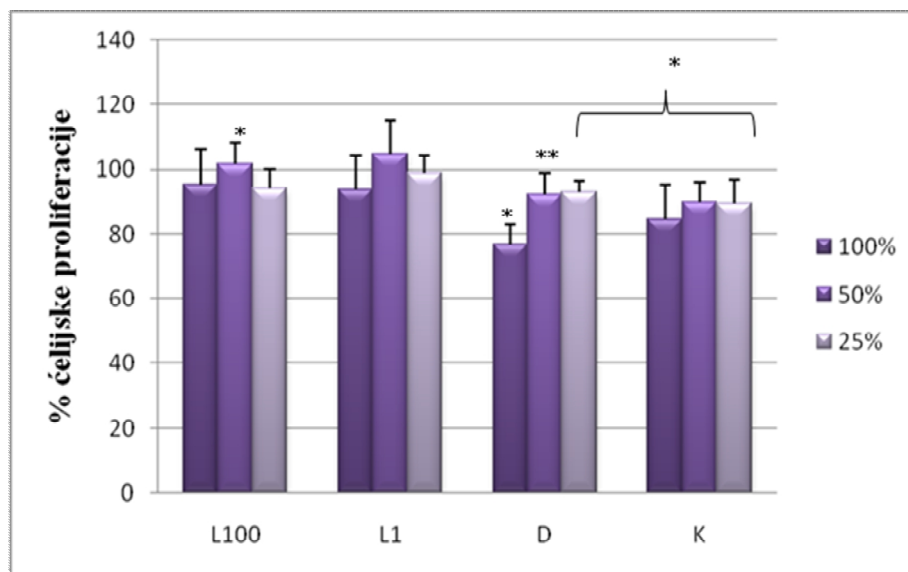
4.2.3.1. Test ćelijske proliferacije

Rezultati testa proliferacije MC3T3-E1 ćelija prikazani su na grafiku 6. U kulturi ćelija tretiranih 100% i 25% koncentracijama kondicioniranog medijuma L100, ćelijska proliferacija je blago smanjena, dok je njegovom 50% razblaženju statistički značajno ($p < 0.05$) blago povećana.

Kondicionirani medijum L1 u koncentraciji 100% blago je smanjio proliferaciju MC3T3-E1 ćelija, 50% kondicionirani medijum ju je blago povećao, dok je stepen ćelijske proliferacije u 25% kondicioniranom medijumu bio u nivou stepena proliferacije ćelija u DMEM-u.

Sva tri razblaženja kondicioniranog medijuma D grupe statistički značajno smanjuju stopu proliferacije MC3T3-E1 ćelija ($p < 0.05$ za D100% i 25%, $p < 0.01$ za D 25%), pri čemu je u tom smislu 100% D kondicionirani medijum najjače delovao.

Slično je bilo i sa efektom kondicioniranih medijuma K, a njihov inhibitorni efekat na proliferaciju MC3T3-E1 ćelija bio je statistički značajan ($p < 0.05$).



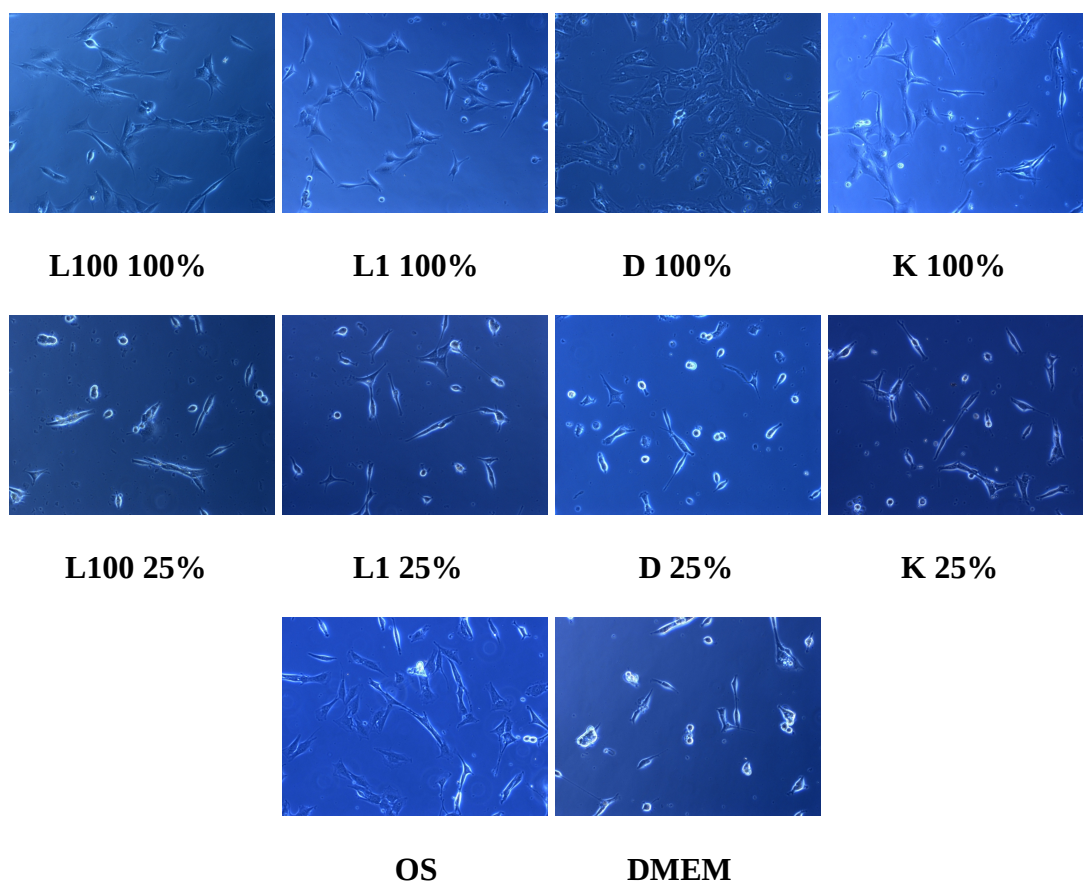
Grafik 6. Procenat proliferacije MC3T3-E1 ćelija nakon tretmana kondicioniranim medijumima RAW 264.7 makrofaga u odnosu na standardni medijum DMEM. RAW 264.7 makrofagi su tretirani lipopolisaharidom u koncentraciji 100 ng/ml (grupa L100), ili 1 ng/ml (grupa L1), deksametazonom (grupa D), ili su kultivisani u DMEM medijumu (grupa K). Nakon 4 h tretmana, medijumi su zamenjeni standardnim medijumom DMEM i ćelije su inkubirane još 20 h, nakon čega su sakupljeni kondicionirani medijumi; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

4.2.3.2. Mikroskopska analiza MC3T3-E1 ćelija u kulturi nakon 3. i 6. dana kultivacije u osteogenom medijumu

Na osnovu rezultata testa citotoksičnosti kondicioniranih medijuma i testa ćelijske proliferacije izabrani su 100% i 25% kondicionirani medijumi RAW 264.7 makrofaga iz različitih tretmana (kojima su dodati osteogeni faktori) za ispitivanje osteogene diferencijacije MC3T3-E1 ćelija. Kontrolne grupe su bile ćelije kultivisane u osteogenom medijumu (OS) ili u DMEM-u. Morfologija MC3T3-E ćelija u kulturi posmatrana je 3. i 6. dana kultivacije. Nakon 6 dana kulture ćelija su postale konfluentne, pa su fiksirane i bojene *Von Kossa* i imunocitohemijskim (ICC) metodama.

Nakon 3 dana kultivacije (Slika 45) ćelije u svim 100% kondicioniranim medijumima, kao i u OS poseduju prizmatičan izgled, a sa ćelijske osnove polaze

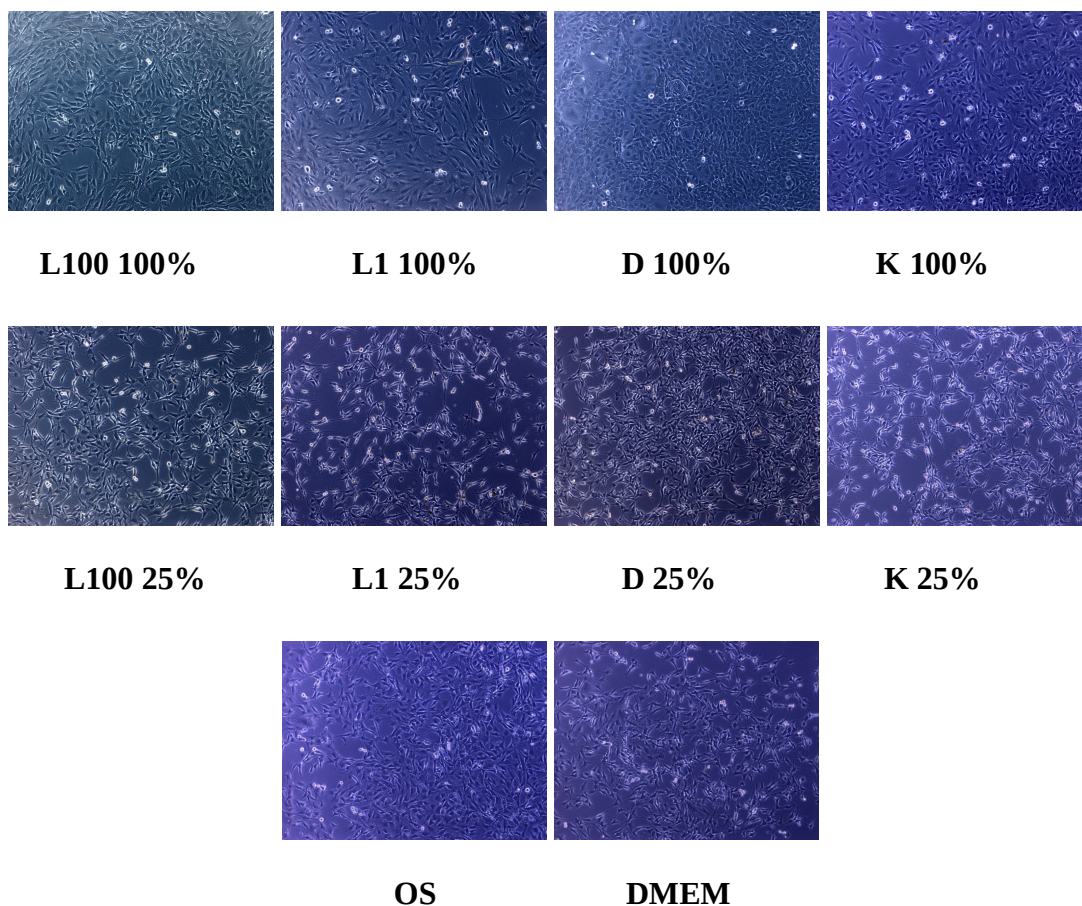
nastavci filopodijalnog tipa. Čelije se svojim nastavcima međusobno udružuju, pri čemu u grupi D formiraju oblike okna, i to u većoj meri nego ćelije iz OS. Kulture ćelija u ostalim 100% kondicioniranim medijumima imaju sličan izgled sa kulturom ćelija u OS. Kulture ćelija u svim 100% kondicioniranim medijumima i OS odlikuje veća ćelijska gustina, ćelije su široke i spljoštene i međusobno se udružuju za razliku od kontrolne kulture ćelija kultivisanih u DMEM-u. U 25% kondicioniranim medijumima ćelije svojom morfologijom nalikuju fibroblastima, izdužene su, a ređe retikularnog fenotipa sa dugim filopodijama. Primetan je i veći broj okruglih ćelija u odnosu na kulture ćelija u 100% kondicioniranim medijumima. Sve kulture ćelija u 25% kondicioniranim medijumima nalikuju kontrolnoj kulturi ćelija kultivisanih u DMEM-u i ćelijska gustina svima njima manja je od gustine ćelija u OS.



Slika 45: Treći dan osteogene diferencijacije MC3T3-E1 ćelija u 100% i 25% kondicioniranim medijumima RAW 264.7 makrofaga tretiranih lipopolisaharidom u

koncentraciji 100 ng/ml (grupa L100), ili 1 ng/ml (grupa L1), deksametazonom (grupa D) i netretiranih makrofaga (grupa K). Kontrolne grupe ćelija su kultivisane u osteogenom medijumu (OS) ili DMEM-u; fazni kontrast, 200x

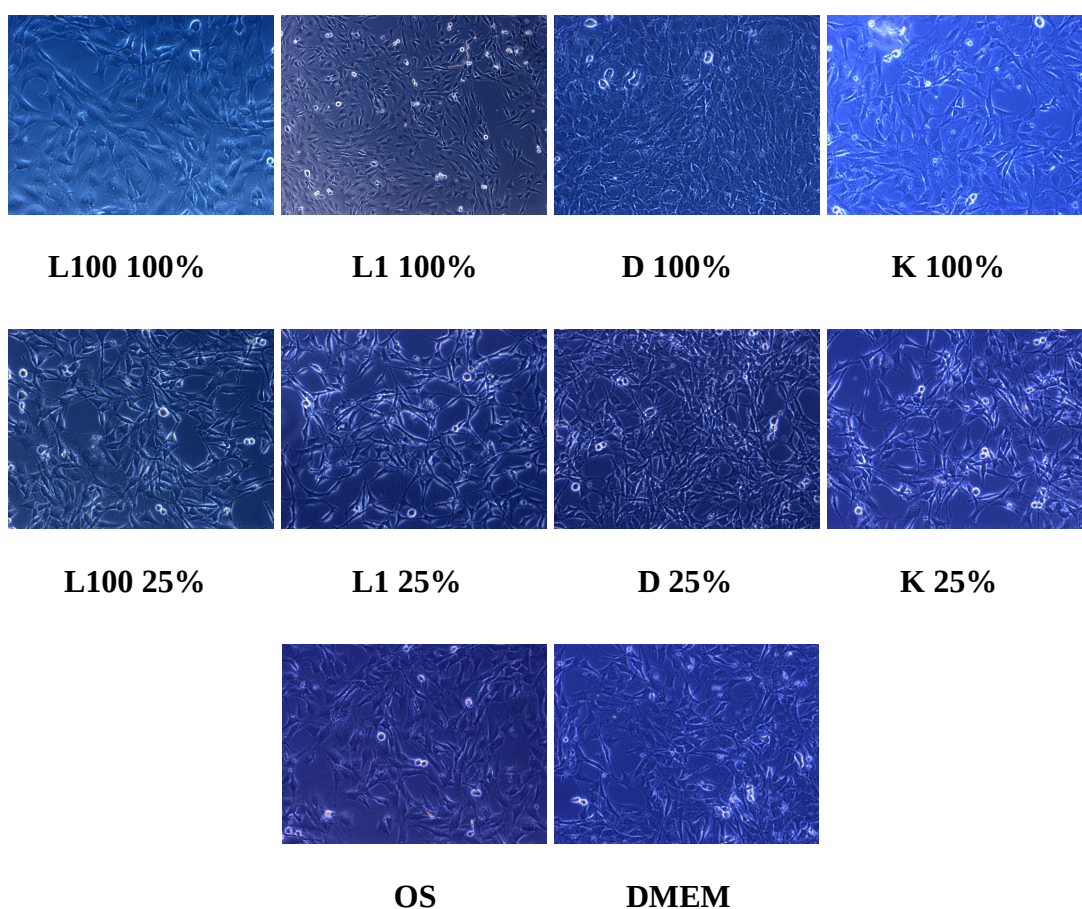
Nakon 6 dana kultivacije (Slika 46) se mogu uočiti velike promene u odnosu na prethodni period posmatranja. Kulture ćelija u 100% kondicioniranim medijumima su konfluentne sa velikim brojem ćelija u odnosu na kontrolne grupe ćelija u OS i DMEM-u. Konfluentnost ćelija najveća je u kulturi sa kondicioniranim medijumom D. Generalno, ćelije u prisustvu svih 100% kondicioniranih medijuma formiraju fokuse koji pokazuju strukturnu organizaciju kultura osteoblasta, a čiji je broj najveći u kulturama sa kondicioniranim medijumima D, a zatim i K. U grupi D se mogu uočiti i krupne prizmatične ćelije sa velikim jedrima, koje su uronjene u vanćelijski matriks.



Slika 46: Šesti dan osteogene diferencijacije MC3T3-E1 ćelija u 100% i 25% kondicioniranim medijumima RAW 264.7 makrofaga tretiranih lipopolisaharidom u

koncentraciji 100 ng/ml (grupa L100), ili 1 ng/ml (grupa L1), deksametazonom (grupa D) i netretiranih makrofaga (grupa K). Kontrolne grupe ćelija su kultivisane u osteogenom medijumu (OS) ili DMEM-u; fazni kontrast, 100x

Ćelije kultivisane u prisustvu 25% kondicioniranih medijuma dobijaju igličaste nastavke i njihova gustina je smanjena u odnosu na kontrolne grupe ćelija. U tom smislu se izdvaja kultura ćelije koje su rasle u prisustvu 25% kondicioniranog medijuma D grupe, koja je morfološki gotovo identična sa kontrolnim grupama.

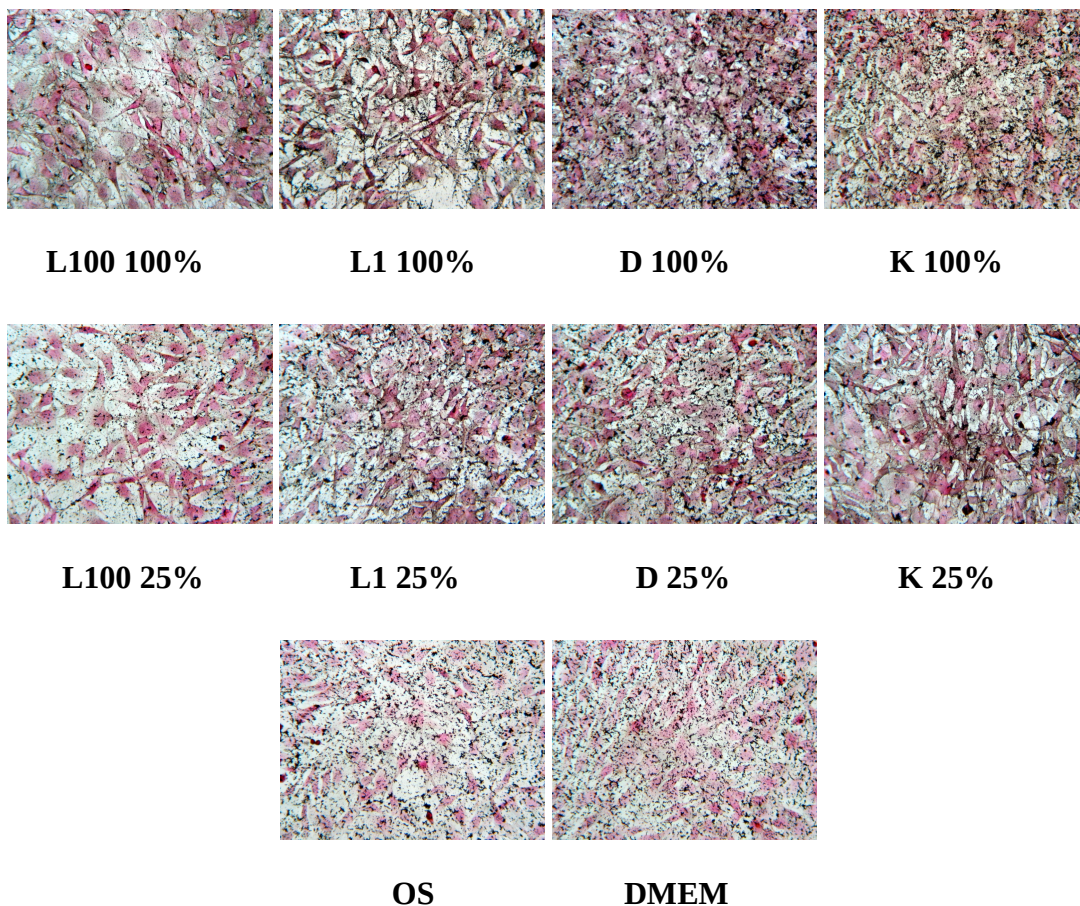


Slika 47: Šesti dan osteogene diferencijacije MC3T3-E1 ćelija u 100% i 25% kondicioniranim medijumima RAW 264.7 makrofaga tretiranih lipopolisaharidom u koncentraciji 100 ng/ml (grupa L100), ili 1 ng/ml (grupa L1), deksametazonom (grupa D) i netretiranih makrofaga (grupa K). Kontrolne grupe ćelija su kultivisane u osteogenom medijumu (OS) ili DMEM-u; fazni kontrast, 200x

Na slici 47 se vidi da su ćelije u 100% medijumima poprimile prizmatičan izgled i da poseduju nastavke lamelipodijalnog tipa u kulturama sa kondicioniranim medijumom D, ili mešano nastavke lamelipodijalnog i filopodijalnog tipa u kulturama sa ostalim 100% kondicioniranim medijumima. Nakon 6 dana kultivacije i u kulturama sa 25% kondicioniranim medijumima najveća gustina ćelija je u kondicioniranom medijumu D. Međutim ćelije u svim 25% kondicioniranim medijumima, osim u grupi D, pokazuju fibroblastnu morfologiju sa dugim igličastim nastavcima u odnosu na kontrolne ćelijske kulture koje su rasle u prisustvu OS i DMEM-a, što ukazuje na povećanu citotoksičnost ovih medijuma.

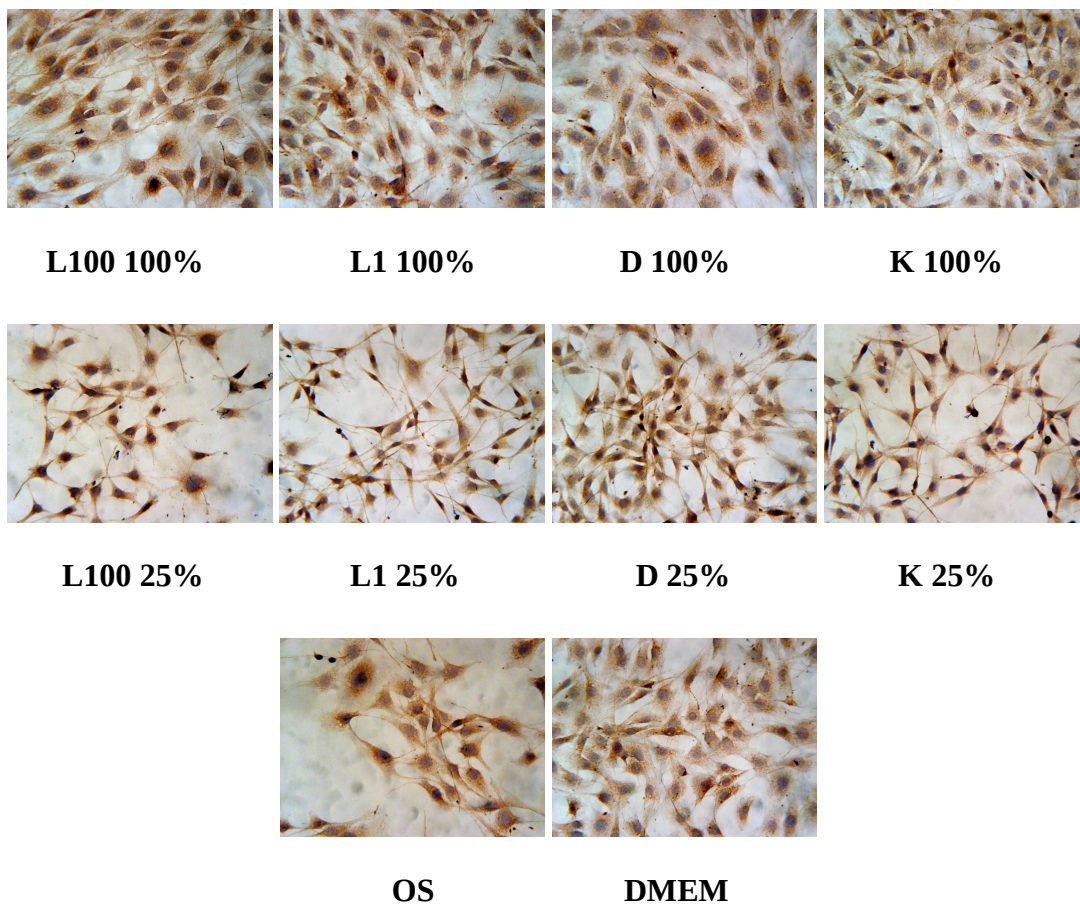
4.2.3.3. Ekspresija osteogenih markera posle osteogene indukcije MC3T3-E1 ćelija ispitivana bojenjem Von Kossa i imunocitohemijskim bojenjima

Von Kossa bojenje fosfata bilo je pozitivno u svim ispitivanim grupama. Nakupine fosfata obilno su prisutne u kulturama eksperimentalnih grupa ćelija koje su rasle u prisustvu 100% kondicioniranih medijuma D i K, nešto manje u 100% kondicioniranom medijumu L1, dok su u kulturi ćelija sa 100% kondicioniranim medijumom L100 ove nakupine slabije zastupljene, čak i u odnosu na kontrolne grupe ćelija. Isti obrazac prisustva nakupina fosfata važi i za kulture ćelija gajenih u 25% kondicioniranim medijumima, s tim da su ove nakupine generalno slabije prisutne nego u kulturama sa 100% kondicioniranim medijumima.



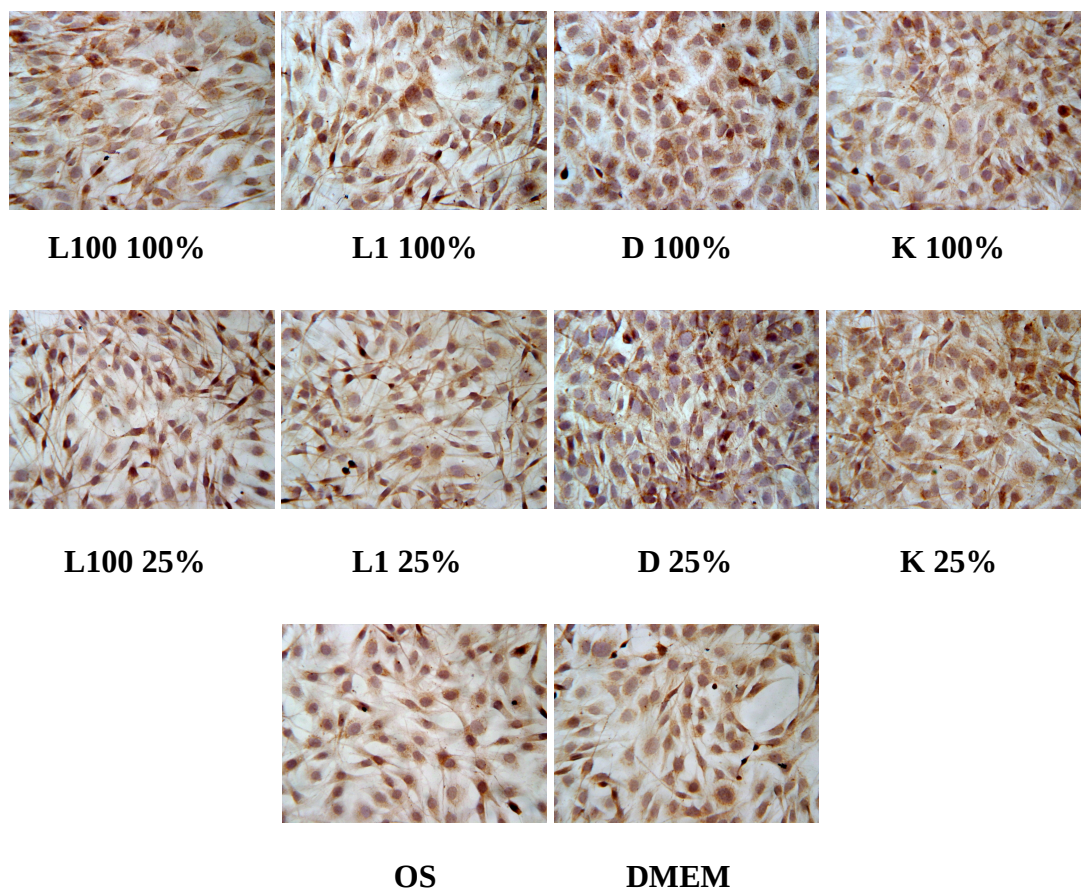
Slika 48: Prisustvo nakupina fosfata nakon 6 dana osteogene diferencijacije MC3T3-E1 ćelija u 100% i 25% kondicioniranim medijumima RAW 264.7 makrofaga tretiranih lipopolisaharidom u koncentraciji 100 ng/ml (grupa L100), ili 1 ng/ml (grupa L1), deksametazonom (grupa D) i netretiranih makrofaga (grupa K). Kontrolne grupe ćelija su kultivisane u osteogenom medijumu (OS) ili standardnom medijumu DMEM; Von Kossa, 400x

Ćelije u svim ispitivanim kondicioniranim medijumima, kao i ćelije kontrolnih grupa, pokazuju produkciju OP. Imunoekspresija OP u 100% kondicioniranim medijumima veća je nego u 25%.



Slika 49. Imunocitohemijska detekcija osteopontina u MC3T3-E1 ćelijama nakon 6 dana osteogene diferencijacije u 100% i 25% kondicioniranim medijumima RAW 264.7 makrofaga tretiranih lipopolisaharidom u koncentraciji 100 ng/ml (grupa L100), ili 1 ng/ml (grupa L1), deksametazonom (grupa D) i netretiranih makrofaga (grupa K). Kontrolne grupe ćelija su kultivisane u osteogenom medijumu (OS) ili standardnom medijumu DMEM; 400x

Najjača imunoekspresija OC uočena je u kulturama ćelija koje su rasle u prisustvu 100% kondicioniranog medijuma grupe D, zatim K, L1, pa L100 gde je imunoekspresija osteokalcina bila za nijansu jača od one u kontrolnim grupama ćelija. Kada su u pitanju kulture ćelija tretirane 25% razblaženjima kondicioniranih medijuma, najjaču imunoekspresiju OC pokazuju ćelije tretirane kondicioniranim medijumima D i K, dok je nivo imunoekspresije OC u grupama L1 i L100 sličan kao u kontrolnim grupama.



Slika 50. Imunocitohemijska detekcija osteokalcina u MC3T3-E1 ćelijama nakon šest dana osteogene diferencijacije u 100% i 25% kondicioniranim medijumima RAW 264.7 makrofaga tretiranih lipopolisaharidom u koncentraciji 100 ng/ml (grupa L100), ili 1 ng/ml (grupa L1), deksametazonom (grupa D) i netretiranih makrofaga (grupa K). Kontrolne grupe ćelija su kultivisane u osteogenom medijumu (OS) ili standardnom medijumu DMEM; 400x

5. DISKUSIJA

Nekoliko decenija unazad primećuje se rast incidence preloma kostiju koja dobija epidemiološku razmeru zbog sve većeg broja povreda u saobraćaju, na radu, u sportu i rekreaciji. Prelomi su sve teži, a njihovo lečenje sve komplikovanije, skuplje i dugotrajnije, jer sve veći broj preloma ne napreduje ka normalnom izlečenju. Uzroci i rizici za nastanak preloma su uglavnom poznati, međutim metode i postupci za rešavanje ovog velikog problema u ortopediji su i dalje daleko od adekvatnog rešenja (Gajdobranski i Živković, 2003).

Od sve tri faze reparacije kosti, inflamatorna faza je verovatno najkritičnija za zarastanje fraktura, slično onome što se dešava u mekim tkivima (Stewart i sar., 1975; Van Steenberghe i sar., 2000). Tokom ove faze dolazi do sekrecije proinflammatoryh citokina i faktora rasta, a nivoi nekoliko inflamatornih medijatora kao što su IL-1, IL-6, IL-18 i TNF- α su značajno povišeni. Većinu njih sintetišu upravo makrofagi (Sassa i sar., 1983; McKenna, 1988).

Većina fundamentalnog znanja o biologiji makrofaga potiče od ćelijskih analiza peritonealnih makrofaga (PM), koji su počeli masovno da se koriste nakon pionirskih istraživanja Cohn-a i saradnika 60-tih godina 20. veka (Steinman i Moberg, 1994). Intraperitonealna injekcija tioglikolata se često koristi da bi se povećao broj PM, koji se najčešće prikupljaju 4 dana nakon tretmana tioglikolatom i kao takvi dalje koriste u istraživanjima (Cohn, 1978; Lagasse i Weissman, 1996; Takahashi, 2009), a okarakterisani su kao inflamatorni makrofagi (Lech i Anders, 2013). U literaturi se, između ostalog, mogu naći podaci o tretmanu makrofaga bakterijskim lipopolisaharidom (LPS) ili glukokortikoidima npr. deksametazonom, koji dovode do generisanja različitih tipova makrofaga. Ti različiti tipovi makrofaga često su okarakterisani ili kao inflamatorni ili kao makrofagi koji učestvuju u reparaciji tkiva tj. reparatorni (Lee i sar., 2011).

S obzirom da je koštano tkivo dobro prokrvljeno, frakture obično dovode do krvarenja i obrazovanja hematoma na mestu povrede. U našim istraživanjima je krvni ugrušak uključen kao jedna od komponenti eksperimentalnih implanata kako bi se simulirao prirodni proces zarastanja fraktura. Na ovaj način i komponente krvnog ugruška kao i makrofagi utiču na inicijalni proces osteogeneze, što može biti simulacija

onoga što se dešava tokom zarastanja fraktura. Danas postoji mišljenje da su ćelije i molekuli inflamatorne faze zarastanja kosti zajedno sa komponentama krvnog ugruška esencijalni za inicijaciju procesa reparacije (Shapiro, 2008).

5.1. *In vivo* istraživanja uloge makrofaga u osteogenezi

Iako je danas prihvaćeno da makrofagi imaju značajnu ulogu u zarastanju koštanog tkiva, još uvek ne postoje radovi u kojima je konkretno i sistematski ispitivan uticaj makrofaga različitog porekla i tretiranih na različite načine, na procese reparacije i regeneracije koštanog tkiva. Zbog toga je jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bio ispitivanje uticaja različito tretiranih makrofaga i uključenih u strukturu implanata od mineralnog matriksa kosti (MMK) i krvnog ugruška, na osteogenezu *in vivo*. U tu svrhu korišćen je model subkutane implantacije i indukovane ektopične osteogeneze.

Implanti su se međusobno razlikovali po načinu tretmana makrofaga koji su bili njihova sastavna komponenta. Tako su MMK i krvni ugrušak, kao nosači ćelija, kombinovani sa rezidentnim (nestimulisanim) PM (NM tip implanata), tioglikolatom elicitim PM (TM tip implanata), nižom koncentracijom LPS-a tretiranim PM (LM1 tip implanata), višom koncentracijom LPS-a tretiranim PM (LM2 tip implanata) i deksametazonom tretiranim PM (D tip implanata). Kontrola su bili implant koji su činili kombinovani nosači makrofaga tj. MMK i krvni ugrušak (K tip implanata) i implant koji je činio samo MMK (B tip implanata). U ispitivanim implantima u svim terminima posmatranja (1, 2, 4, i 8 nedelja od implantacije) praćeni su procesi resorpcije, angiogeneze, kolagenogeneze, tkivna arhitektura, imunoekspresija osteopontina (OP) i osteokalcina (OC) i konačno proces osteogeneze.

5.1.1. Proces resorpcije u ektopičnim implantima

Koštano tkivo je izuzetno dinamično tkivo za koje su karakteristični konstantni procesi resorpcije i izgradnje, koji omogućavaju njegovo održavanje, popravku oštećenja i homeostazu fosfora i kalcijuma u organizmu (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, 2006). Osteoklasti će na mestu frakture resorbovati oštećeni matriks kosti zajedno sa ćelijama i stvoriti uslov da osteoblasti na tom mestu izgrade novu kost,

ali će kasnije učestvovati i u procesu remodeliranja koštanog tkiva i njegovog sazrevanja do konačne strukture lamelarne kosti. Procesi resorpcije i izgradnje koštanog tkiva moraju biti usklađeni. Tako npr. kod naslednog oboljenja osteopetroze je poremećena diferencijacija ili funkcija osteoklasta, pa dolazi do smanjene resorpcije kosti i do povećanja koštane mase, ali su kosti krte i sklone frakturi. To je najverovatnije posledica nesposobnosti remodeliranja primarne, nezrele kosti ka lamelarnoj koja je mehanički jača (Gerritsen i sar., 1994; Katić, 1997). Sa druge strane i prekomerna resorpcija je štetna za normalno funkcionisanje koštanog tkiva, kao u slučaju osteoporoze ili familijarne ekspanzivne osteolize (Wallace i sar., 1989; Manolagas, 2000).

Makrofagi reaguju na implantirane biometarijale grupisanjem u džinovske višejedarne fagocite koji učestvuju u procesima biodegradacije i resorpcije materijala procesom fagocitoze (Xia i Triffitt, 2006). Resorpcija je obično prvi korak procesa remodeliranja kosti (Najman i sar., 2004).

U našim istraživanjima MMK u svim ispitivanim implantima čak i nakon osam nedelja od implantacije nije u potpunosti resorbovan, mada postoje jasni znaci procesa biodegradacije, a njen stepen se razlikuje od tipa do tipa implanta. Prisustvo dugotrajne resorpcije granula MMK, čak dva meseca nakon implantacije, može biti posledica čvrstine biomaterijala (Mizuno i sar., 1990; Rundle i sar., 2006; Najman i sar., 2004; Vasiljević i sar., 2009). Naša istraživanja pokazuju da je proces resorpcije u implantima koji su inicijalno sadržavali makrofage konstantan. Čak i osam nedelja nakon implantacije u ovim implantima postoje brojni, krupni, višejedarni fagociti, a proces resorpcije sve vreme "tinja" za razliku od kontrolnih implanata B i K tipa, gde je ovaj proces nakon osam nedelja gotovo potpuno obustavljen.

U implante NM tipa inicijalno su uneti rezidentni PM (RPM), koji su pod delovanjem ostalih komponenti implanta (faktora pločica krvnog ugruška i samog MMK), mogli biti stimulisani na fagocitozu. U implantima TM tipa su makrofagi već intraperitonealnim tretmanom tioklikolatom bili indukovani na fagocitozu kao makrofagi inflamatornog karaktera, što je podržano našim *in vitro* rezultatima, ali i literaturnim podacima (Lech i Anders, 2013). Fagocitna aktivnost tioglikolatom elicitiranih peritonealnih makrofaga (TEPM) je mogla biti podržana citokinima i faktorima rasta krvnog ugruška. Takođe, postoje literaturni podaci koji govore u prilog

tome da deksametazon, koji je u našim istraživanjima inicijalno postojao u implantima DM tipa, i LPS koji je inicijalno postojao u implantima LM1 i LM2 tipa, takođe indukuju fagocitozu. Tako, inkubacija humanih monocita sa deksametazonom u trajanju od 48 h trostruko povećava njihovu sposobnost fagocitoze u *in vitro* uslovima (Van de i sar.r Goes, 2000), dok inkubacija makrofaga kostne srži miša sa LPS-om takođe dovodi do povećanja fagocitozne sposobnosti i ova korelacija je dozno zavisna (Cooper i sar., 1984). Dozno zavisni efekat LPS-a na indukciju fagocitoze mogao bi biti razlog većeg resorpcionog efekta u implantima LM2 tipa u odnosu na implante LM1 tipa, pokazanog u našim istraživanjima. I rezultati naših *in vitro* istraživanja, koji se odnose na morfološke i funkcionalne razlike LPS-om tretiranih PM, pokazuju da PM koji su tretirani višom koncentracijom LPS-a imaju veći broj vezikula/vakuola u citoplazmi u odnosu na PM tretirane nižom koncentracijom LPS-a, što je u direktnoj korelaciji sa njihovom fagocitnom aktivnošću. Konačno, veći stepen resorpcije i prisustvo fagocita u svim terminima posmatranja u implantima gde su inicijalno postojali makrofagi, može biti posledica same sposobnosti makrofaga da sintetišu i otpuštaju mnoge citokine koji, između ostalog, privlače nove fagocite. Jedan od njih je npr. TNF- α (Heidenreich i sar., 1988; Boyce i sar., 2005).

U kontrolnim implantima K tipa su već u startu postojali monociti krvi koji su se diferencirali u makrofage, ali i različiti citokini i faktori rasta krvnog ugruška, koji podstiču makrofage na fagocitozu, pa je i proces resorpcije bio izraženiji u odnosu na kontrolne implante B tipa. Tako npr. postoje literaturni podaci koji govore o tome da PDGF, VEGF, FGF-2, kao i proinflamatorni citokini pločica krvog ugruška direktno utiču na osteoklaste i podržavaju proces resorpcije (Zhang i sar., 1998; Chikazu i sar., 2000; Yang i sar., 2008; Zupan i sar., 2013; Amable i sar., 2013;). U implantima K tipa je primećen i veći broj krvnih sudova u odnosu na implante B tipa, što je povećalo šansu implantima K tipa da do njih direktno iz krvotoka dospeju monociti i diferenciraju se u nove fagocite. Objašnjenje niže stope fagocitoze u implantima K tipa u odnosu na implante sa inicijalno unetim makrofagima može biti to što su u implantima K tipa bili neelicitirani makrofagi, koji su po svom poreklu i funkcionalnim karakteristikama bliži monocitima.

U kontrolnim implantima B tipa su granule MMK čak i osam nedelja nakon implantacije veoma krupne. Ovo je bilo očekivano, s obzirom da je potrebno neko

vreme da fagociti dospeju iz okolnih tkiva, vezivne kapsule i krvnih sudova u implante B tipa, aktiviraju se i otpočinu fagocitozu.

Na osnovu svega iznetog, veći stepen resorpcije u implantima koji su sadržavali makrofage u odnosu na kontrolne implante bez makrofaga mogao bi biti posledica:

1. inicijalnog postojanja makrofaga u ovim tipovima implanata
2. postojanja krvnog ugruška sa različitim faktorima rasta i citokinima koji utiču na aktivnost fagocita
3. delovanja deksametazona odnosno LPS-a na makrofage
4. delovanja faktora koje produkuju sami makrofagi

5.1.2. Angiogeni potencijal ektopičnih implanata

Koštano tkivo je dobro prokrvljeno, a bliska prostorna i vremenska povezanost krvnih sudova sa ćelijama koštanog tkiva omogućava održavanje integriteta celokupnog skeletnog sistema (Kanczler i Oreffo, 2008). Krvnim sudovima se transportuju gasovi, hranljive materije, faktori rasta i različite ćelije. Uspostavljanje stabilne mreže krvnih sudova predstavlja jedan od najranijih događaja generalno u organogenezi (Coultas i sar., 2005). Angiogeneza i vaskularizacija su esencijalne za održavanje i regeneraciju koštanog tkiva, jer bez njih ono brzo degeneriše (Schmid i sar., 1997). Takođe, angiogeneza je važna komponenta inflamatornog odgovora i reparatornog procesa (Kajdaniuk i sar., 2011; Nucera i sar., 2011). Dakle, angiogeneza igra ključnu ulogu i tokom razvića skeleta i tokom reparacije fraktura kostiju. Neadekvatno snabdevanje frakture krvlju može dovesti do pseudoartroze, stanja koje je definisano kao nespajanje delova frakture zbog stopiranja procesa reparacije. U tom slučaju dolazi do stvaranja vlaknaste hrskavice i gusto organizovanog vezivnog tkiva na mestu preloma (Helfet i sar., 2003).

Formiranje novih kapilara je proces koji prolazi kroz više koraka (Ausprunk i Folkmanb, 1977). Jedan od njih je i migracija endotelskih ćelija privučenih odgovarajućim hemoatraktantima. Fibrin, koji se često nalazi na mestu povrede tkiva, služi kao migratorni matriks za endotelske i druge ćelije (Brown i sar., 1989; Liu i sar., 1990). Za izduživanje novih kapilara, endotelske ćelije koje su migrirale moraju da se

zamene novopodeljenim endotelskim ćelijama. Zatim bi deoba ovih ćelija trebalo da prestane tokom diferencijacije u zrele kapilare sa novim bazalnim membranama.

Rezultati naših istraživanja su pokazali da je vaskularizovanost implanata koji su inicijalno sadržavali PM u svim terminima posmatranja bila bolja u odnosu na kontrolne implante. Polverini i sar. (1977) su na osnovu analiza stimulisanih makrofaga i njihovih kondicioniranih medijuma zaključili da oni indukuju neovaskularizaciju, dok nestimulisani PM nemaju proangiogene sposobnosti. To znači da je angiogena aktivnost makrofaga povezana sa njihovom sekretornom aktivnošću i da makrofagi sami po sebi nisu proangiogeni, već prethodno zahtevaju stimulaciju. Specijalizacija i stimulacija makrofaga je determinisana lokalnim citokinima i adhezivnim molekulima, ili interakcijom sa stranim telom i infektivnim agensima. U literaturi je poznato da su makrofagi sposobni da utiču na sve faze angiogeneze svojim sekretornim produktima (Moldovan i Moldovan, 2005). Stimulisani makrofagi otpuštaju ne samo seriju angiogenih citokina i faktora rasta (Sunderkötter i sar., 1991), već i proteolitičke enzime (Shapiro i sar., 1991) koji “kopaju kanale” koji će zatim biti naseljeni endotelskim ćelijama i formirati kapilare. Takođe, makrofagi delujući svojim enzimima na vanćelijski matriks oslobađaju različite faktore rasta (bFGF, TGF-beta, GM-CSF), koji su inače vezani za komponente vanćelijskog matriksa (Sunderkötter i sar., 1991), a koji imaju proangiogenu aktivnost.

U našim istraživanjima je u konstrukcije svih implanata, osim implanata B tipa, bio uključen i krvni ugrušak. Jedna od komponenti krvnog ugruška je fibrin, protein koji inače podržava angiogenezu, jer služi kao migratorni matriks za endotelske ćelije i leukocyte (Brown i sar., 1989; Knighton i sar., 1982; Liu i sar., 1990;), ali i za sve inflamatorne ćelije, kao i druge tipove ćelija koje učestvuju u procesu ozdravljenja tkiva (Van Hinsbergh i sar., 2001). Stoga, neovaskularizacija može biti posledica deponovanja fibrina. Međutim, fibrin sam po sebi nije proangiogen, već ova njegova sposobnost dolazi do izražaja tek nakon digestije plazminom koga inače sintetišu makrofagi (Thompson i sar., 1985; Thompson i sar., 1992). Makrofagi u kombinaciji sa fibrinom sa jedne strane promovišu koagulaciju (Adams i Hamilton, 1992), dok sa druge strane degradacijom fibrina plazminom oslobađaju fragmente koji imaju angiogeni potencijal (Thompson i sar., 1985). Zato, jedan od razloga bolje vaskularizovanosti u implantima iz naših eksperimenata u čiju su konstrukciju bili u

startu uključeni makrofagi može biti i međusobna interakcija makrofaga i fibrina krvnog ugruška.

U našim eksperimentima, između različitih tipova implanata sa inicijalno unetim makrofagima postoje razlike u vaskularizovanosti. S obzirom da su se ovi implanti razlikovali jedino po tipu inicijalno unetih makrofaga, možemo pretpostaviti da je različit stepen prokrvljenosti implanata bio posledica delovanja tih makrofaga na proces angiogeneze. Razlike u proangiogenoj aktivnosti makrofaga bi mogle biti pripisane njihovim različitim razvojnim i funkcionalnim stanjima.

Implanti NM tipa sa rezidentnim PM (RPM) bili su u svim terminima posmatranja dobro prokrvljeni. Okruženje RPM u ovim implantima (pre svega komponenti krvnog ugruška) moglo je da utiče na stimulaciju RPM i usmeri njihovo delovanje na angiogenezu.

Naši *in vitro* rezultati, koji su se odnosili na determinaciju produkcije TNF- α od strane tioglikolatom elicitiranih peritonealnih makrofaga (TEPM), pokazali su da oni sekretuju značajnu količinu ovog citokina. S obzirom da je TNF- α proangiogeni faktor (Leibovich i sar., 1987), on je mogao biti induktor procesa angiogeneze u implantima TM tipa, što je moglo biti dodatno potpomognuto komponentama krvnog ugruška.

Na osnovu literaturnih podataka je poznato da LPS indukuje diferencijaciju makrofaga u inflamatorni tip (Pelegrin i Surprenant, 2009; Lapara i Kelly, 2010). Implanate LM2 tipa iz naših istraživanja osam nedelja nakon implantacije odlikuje siromašna vaskularizovanost. Suprotno od njih, implanti LM1 tipa su i nakon osam nedelja od implantacije bogato vaskularizovani. Poznato je da LPS-om aktivirani makrofagi sintetišu TNF- α i pretpostavlja se da je proangiogena aktivnost makrofaga posredovana primarno preko ovog citokina (Leibovich i sar., 1987; Naldini i Carraro, 2005). Međutim, njegovo delovanje na proces angiogeneze je dozno zavisno, pa tako niže doze deluju proangiogeno, a više inhibitorno na proces angiogeneze, pa čak i oštećuju tkivo. Viša koncentracija LPS-a u implantima LM2 tipa iz naših istraživanja indukovala je makrofage na sekreciju veće količine TNF- α (kako je i potvrđeno u našim *in vitro* eksperimentima u kojima su PM tretirani različitim koncentracijama LPS-a), što je konačno rezultiralo inhibicijom angiogeneze. U implantima LM1 tipa situacija bila obrnuta rezultirajući konstantnim i izraženim angiogenim procesom. LPS, koji aktivira proangiogenu akciju makrofaga, takođe stimuliše i transkripciju trombospodina 1 (TSP

1) koji je inhibitor angiogeneze (Jaffe i sar., 1985; DiPietro i Polverini, 1993). S obzirom da TSP 1 ima i neke druge funkcije tokom zarastanja rana (služi kao migratorni matriks, pojačava hemotaksu neutrofila, inhibira proteaze), njegova uloga u angiogenezi najverovatnije zavisi od regulatornih efekata drugih medijatora prisutnih tokom inflamacije (DiPietro i Polverini, 1993).

Poznato je da glukokortikoidi usmeravaju makrofage ka diferencijaciji u anti-inflamatorne tj. reparatorne makrofage koji su, između ostalog, okarakterisani kao proangiogeni (Sica i Mantovani, 2012; Jetten i sar., 2014). Jedan od njihovih sekretornih produkata je i TNF- β . Niske koncentracije ovog citokina indukuju migraciju i proliferaciju endotelskih ćelija, dok visoke inhibiraju ove procese, a stimulišu formiranje tubularnih struktura i deponovanje bazalne lamine (Sunderkötter i sar., 1994). U našim istraživanjima, prisustvo deksametazonom tretiranih PM u implantima DM tipa verovatno je rezultiralo bogatom prokrvljenošću ovih implanata u svim periodima posmatranja.

Histološkom analizom implanata iz naših istraživanja primećena je i infiltracija neutrofila u one implante koji su inicijalno sadržavali makrofage. Tako su u implantima sa makrofagima tretiranim LPS-om ili deksametazonom (LM1, LM2 i DM tip) neutrofili uočeni već nedelju dana nakon implantacije. Neke studije su pokazale da je prisustvo ne samo makrofaga, već i granulocita (Fromer i Klintwonth, 1975), preduslov za neovaskularizaciju. Supresija (Simpson i sar., 1972) ili smanjenje broja (Fromer i Klintwonth, 1975) bilo kog od ova dva ćelijska tipa suprimira formiranje novih krvnih sudova. Međutim, angiogena aktivnost granulocita je inferiorna u odnosu na makrofage (Moore i Sholley, 1985). Takođe, poluživot neutrofila je kratak.

Vaskularizovanost kontrolnih implanata K tipa je bila slabija u odnosu na implante sa inicijalno unetim makrofagima, a veća u odnosu na implante koji su sadržavali čist MMK (B tip). Proangiogeni efekti u implantima K tipa bi mogli biti pripisani pločicama krvnog ugruška, za koje je pokazano da sintetišu brojne faktore koji podstiču zarastanje rana i angiogenezu, a među njima su PDGF, IGF-1, VEGF, angiopoetin, MMP-1, 5 i 9. VEGF i FGF imaju hemoatraktantno delovanje na endotelske ćelije, dok PDGF promoviše rast novih krvnih sudova (Brill i sar., 2004). U našim istraživanjima, makrofagi nisu bili primarno u sastavu implanata K tipa. Međutim monociti su deo krvnog ugruška koji je bio sastavna komponenta ovih implanata i koji

su se diferencirali u makrofage. Takođe, makrofagi su mogli na još najmanje dva načina dospeti do implanta i to ili iz vezivne kapsule, ili iz okolnih krvnih sudova. Međutim, ovi makrofagi su po svom stepenu diferencijacije u startu bili mnogo bliži monocitima iz kojih su nastali pa je njihov uticaj proces angiogeneze bio manje intenzivan (Sunderkötter i sar., 1994).

Kontrolne implante B tipa odlukuje dobra vaskularizovanost dve nedelje od implantacije, a zatim ona slabi počevši od četvrte nedelje, tako da u osmoj nedelji krvni sudovi gotovo da nisu uočeni. Ovakva dinamika razvića krvnih sudova u pomenutom tipu implanta je u skladu sa literaturnim podacima, koji ukazuju na to da je stopa proliferacije endotelskih ćelija normalno u tkivu jako niska (Hobson, 1984) i da je tokom rasta i procesa reparacije neovaskularizacija pojačana u toku jednog kraćeg perioda, a zatim kompletno inhibirana (Sunderkötter i sar., 1994).

5.1.3. Vezivno-tkivna arhitektura u ektopičnim implantima

Prisustvo i broj različitih tipova ćelija u implantima izuzetno je važan parametar za praćenje procesa osteogeneze, jer upravo od vrste inicijalno unetih ćelija i onih koje su migrirale u implante, kao i njihove aktivnosti i međusobnih interakcija u kombinaciji sa prisustvom i brojem krvnih sudova, zavisi celokupan osteogeni proces.

Posmatrajući implante počevši od periferije, oko implanata svih tipova, i u svim opservacionim terminima postoji vezivna kapsula. Idealni rezultat implantacije bila bi potpuna restauracija normalne tkivne arhitekture i funkcije nakon zarastanja povrede. Međutim, formiranje fibrozne kapsule je obično finalni korak u reakciji organizma na biomaterijal (Anderson i McNally, 2011). Razlog ovome leži u tome što makrofagi i drugi fagociti ne mogu u potpunosti da razlože implantirani materijal, pa ga organizam prepoznaje kao strano telo koje bi trebalo izolovati. To se najbolje postiže formiranjem tanke, uglavnom neprokrvljene kapsule koja sprečava dalju interakciju između implanta i domaćina (Konttinen i sar., 2005).

Razlike u morfologiji vezivne kapsule postoje između različitih tipova implanata. U prvom terminu opservacije oko implanata sa inicijalno unetim makrofagima postoji nešto deblja kapsula. Debljina vezivne kapsule je naročito izražena oko implanata LM1 i LM2 tipa, a odlikuje je bogatstvo ćelijama. Prisustvo deblje

vezivne kapsule oko ovih implanata može ukazivati na jak inflamatorni odgovor (El-Warrak i sar. , 2001; El-Warrak i sar., 2004; El-Warrak i sar., 2004a), što bi moglo biti posledica delovanja LPS-a. Oko kontrolnih implanata K i B tipa praktično u svim terminima posmatranja vezivna kapsula je tanka, građena pretežno od rastresitog vezivnog tkiva, sa malobrojnim, međusobno udaljenim ćelijama. U svim tipovima implanata u kasnijim terminima opservacije debljina i ćelijska gustina vezivne kapsule slabe. Smanjivanje debljine vezivne kapsule prati povećana aktivnost fagocita. Prisustvo jednojedarnih i džinovskih višejedarnih fagocita zajedno sa granulomatoznom reakcijom može se smatrati normalnim odgovorom na prisustvo biometarijala u implantu. Za razgradive biomaterijale ovakva aktivnost se čak smatra neophodnom, s obzirom da bi u suprotnom rezultat implantacije bio debela kapsula, sa svim negativnim posledicama po proces osteogeneze. Tanka vezivna kapsula se čak može tolerisati i oko implanata koji se implantiraju direktno u kost (Nuss i Rechenberg, 2008).

Kolagen je važna i najzastupljenija organska komponenta koštanog tkiva (Viguet-Carrin i sar., 2006; Tzaphlidou, 2008) i kao takva jedan od bitnih parametara tokom praćenja osteogenog procesa. Dinamika razvića kolagenih vlakana u svim tipovima implanata prati određenu šemu tokom prve, druge i četvrte nedelje od implantacije. Tako se u svim tipovima ispitivanih implanata kolagen u prvoj nedelji nakon implantacije može uočiti prevashodno u njihovim perifernim delovima i vezivnoj kapsuli, dok se u ostalim terminima uočava i u unutrašnjosti implanata. Tokom druge i četvrte nedelje od implantacije kolagen prožima implante, a najveće razlike u zastupljenosti kolagena uočene su osam nedelja nakon implantacije.

Nedelju dana nakon implantacije, nasuprot ostalim tipovima implanata, u implantima NM, LM1 i LM2 tipa vezivno tkivo između granula MMK odlikuje velika gustina ćelija i na periferiji i u unutrašnjosti ovih implanata. Ćelije su tokom prve nedelje od implantacije u implante verovatno infiltrirale iz okolnog tkiva i okolnih krvnih sudova, kao i vezivne kapsule. To može biti razlog što naseljavanje implanata ćelijama počinje od periferije. RPM inicijalno uneti u implante NM tipa mogli su biti aktivirani ostalim komponentama NM implanata (MMK, komponente krvnog ugruška) i kao takvi sekretovati određene faktore koji su hemoatraktanti za ćelije. Takođe, krvni sudovi koji su već nedelju dana nakon implantacije uočeni i u unutrašnjosti implanata NM tipa, su omogućili da različite ćelije iz krvotoka dospeju do svih delove ovog tipa

implanata. Zapravo, postoje literaturni podaci koji govore u prilog tome da interakcija pločica sa makrofagima u *in vitro* uslovima podstiče sekreciju proinflammatoryh citokina od strane makrofaga (Scull i sar., 2010), koji su hemoatraktanti za razne tipove ćelija (Nielsen i sar., 1994; Kon i sar., 2001; Torrente i sar., 2003;). Nakon nedelju dana od implantacije periferija implanata TM tipa je bila naseljena ćelijama, za razliku od njihove unutrašnjosti. TEPM, koji su inicijalno uneti u ovaj tip implanata, prema literaturnim podacima (Lech i Anders, 2013), sintetišu proinflammatoryh citokine koji su hemoatraktanti za ćelije. Mala gustina ćelija u unutrašnjosti implanata TM tipa mogla bi biti posledica nepostojanja krvnih sudova u ovim regionima (Yannas, 2001). Na stepen infiltracije ćelija u implante DM, LM1 i LM2 tipa, mogli su uticati i reagensi u koje je MMK bio potopljen preko noći. Tako postoje literaturni podaci da deksametazon inhibira ćelijsku migraciju (Pross i sar., 2002; Tsai i sar., 2003; Luo i sar., 2009), dok je LPS aktivira (Tajima i sar., 2008; Moon i sar., 2012). Konačno, prema histološkoj analizi, u implantima sa makrofagima postojalo je sinergističko dejstvo sekretornih produkata makrofaga, komponenti krvnog ugruška i samog MMK, koji su delovali hemoatraktantno za ćelije (Macaulay i sar., 2005; Senzel i sar., 2009) odnosno samog MMK (Tapety i sar., 2004). Za kontrolne implante K i B tipa takođe važi da je veća gustina ćelija registrovana na periferiji implanta. I ovde bi uzrok tome mogao biti hemoatraktantni učinak komponenti krvnog ugruška (Macaulay i sar., 2005; Senzel i sar., 2009) i u manjoj meri samog MMK (Tapety i sar., 2004).

Dve i četiri nedelje nakon implantacije gustina ćelija u vezivnom tkivu je znatno povećana u svim ispitivanim tipovima implanata, što može biti povezano sa razvićem krvnih sudova u implantima tokom ovog perioda, kojima su nove ćelije migrirale u implante. I različiti sekretorni faktori ćelija implanata tj. komponente krvnog ugruška i sekretorni produkti samih makrofaga, kao i novopridošlih ćelija, verovatno su imali hemoatraktantni učinak. Deksametazon, koji je nedelju dana nakon implantacije mogao inhibirati migraciju ćelija u implante DM tipa, sa druge strane je mogao indukovati makrofage u smeru diferencijacije ka reparatornom tipu, pa se izrazita gustina ćelija u ovim implantima može pripisati delovanju faktora ovog funkcionalnog tipa makrofaga (Postlethwaite i sar., 1987).

Gustina ćelija u svim tipovima implanata je smanjena nakon osam nedelja od implantacije u odnosu na prethodni opservacioni period, što može biti posledica

dugotrajne izolacije implanata vezivnom kapsulom. Gustina ćelija je naročito smanjena u implantima B tipa, na šta je moglo uticati i smanjenje broja krvnih sudova, što je limitiralo migraciju novih ćelija, kao i ishranu već postojećih. Gustina ćelija ostalih tipova implanata je veća u ovom terminu opservacije u odnosu na ovu kontrolu.

Granulomatozna reakcija je pratilac svih procesa u ispitivanim implantima. Mahom se zapaža nakon dve i četiri nedelje od implantacije u vidu skupine fagocitnih ćelija, neutrofila i krvnih sudova u vezivu oko ostataka resorbovanih granula MMK. Granulomatozna reakcija je normalan proces koji se viđa tokom zarastanja fraktura kosti i deo je inflamatorne faze reparacije (Kalfas, 2001). Međutim, prisustvo granulomatozne reakcije i osam nedelja nakon implantacije u implantima LM1 i LM2 tipa može ukazivati na hroničnu inflamaciju (Williams i Williams, 1983). Granulomatozna reakcija u prvim nedeljama osteogenih procesa u eksperimentalnim implantima potpomognuta je i fibrinom koji je hemoatraktant za neutrofile, monocite i limfocite (Bar-Shavit i sar., 1983; Bizios i sar., 1986).

Fibrin krvnog ugruška u svim implantima, osim implanata B tipa, je dobra početna potpora za adheziju ćelija koje su migrirale u implante, pri čemu postepeno dolazi do njegove razgradnje (Yasuda i sar., 2010). Pored toga i trombin iz krvnog ugruška se ponaša kao hemoatraktant privlačeći neutrofile, monocite i limfocite koji doprinose regeneraciji oštećenog mesta (Bar-Shavit i sar., 1983; Bizios i sar., 1986). Makrofagi privučeni fibrinskom mrežom je i razgrađuju, što prvo deluje proinflamatorno a kasnije i reparatorno (Szaba and Smiley, 2002).

Fibrinsku mrežu zamenjuje nezrelo vezivno tkivo (Erofeev and Shchepkina, 2008). Ovo nezrelo vezivno tkivo sadrži nezrele fibroblaste (koji se često označavaju i kao mezenhimske matične ćelije) koji se mogu diferencirati u razne ćelijske tipove (Alberts i sar., 2002), pa je postojanje ovog tkiva od velikog značaja za proces reparacije i regeneracije uopšte. Nezrelo vezivno tkivo se u svim terminima opservacije zadržalo u implantima NM i DM tipa. Ovaj tip tkiva naročito je lepo razvijen u implantima NM tipa, gde je registrovano i na periferiji i u unutrašnjosti implanata. Nezrelo vezivno tkivo je do osme nedelje uočeno i na periferiji implanata tretiranih nižom koncentracijom LPS-a (LM1 tip), međutim, ovi regioni su jako male površine i stiče se utisak da je njihova diferencijacija krenula ka fibroznom i masnom tkivu. Jaka fibroza, bez prisustva nezrelog vezivnog tkiva, uočena je nakon osam nedelja i u

implantima tretiranih višom koncentracijom LPS-a (LM2 tip) i može biti pripisana snažnom inflamatornom procesu tokom svih osam nedelja, koja je usmerila ćelije ka izrazitoj produkciji kolagena koji je popunjavao velike šupljine u implantima (Williams i Williams, 1983). Masna degeneracija, koja je uočena na periferiji implanata LM2 tipa, mogla bi biti posledica nepostojanja adekvatne vaskularne potpore u tim delovima implanata. U implantima LM1 i DM tipa se nezrelo vezivno tkivo održalo, ali su uz njega prisutna fibrozno i masno tkivo. Naime kao i kod implanta LM2 tipa, jaka resorpcija u implantima LM1 i DM tipa dovodi do razvića masnog ili fibroznog tkiva na mestima resorpcije, što je prisutno i kod nekih bolesti (familijarna ekspanzivna osteoliza). Takođe, razviću fibroznog tkiva pomažu PDGF kojeg proizvode pločice krvnog ugruška i TGF- β kojeg proizvode makrofagi (Bataller i Brenner, 2005). Razviće fibroznog tkiva i u implantima sa krvnim ugruškom (K tip) može biti zbog uticaja nekih faktora krvnog ugruška kao što je PDGF, koji stimuliše proliferaciju aktiviranih kolagen-produkujućih ćelija (Friedman i Arthur, 1989). Nezrelo vezivno tkivo koje je postojalo u prvim terminima opservacije u implantima B tipa, do kraja osme nedelje degeneriše i njega zamenjuju fibrozno i masno tkivo. Međutim u osmoj nedelji je uočena degeneracija ovih tkiva, što može biti posledica nerazvijenosti vaskularne mreže u ovim implantima.

U većini implanata sa inicijalno unetim makrofagima naslage kolagena osam nedelja nakon implantacije su tanje nego u prethodnim terminima posmatranja. Literaturni podaci iz *in vivo* i *in vitro* istraživanja pokazuju da makrofagi sintetišu različite faktore koji ili podstiču kolagenogenezu ili razgrađuju kolagen. Tako makrofagi generišu solubilne medijatore koji moduliraju proliferaciju fibroblasta i produkciju vanćelijskog matriksa, a među njima su ključni TGF- β i PDGF (Bonner i sar., 1991; Clouthier i sar., 1997; Bonner 2004). Makrofagi sintetišu i različite enzime tipa metaloproteinaza koji razgrađuju vanćelijski matriks (Yaguchi i sar., 1998). To bi moglo biti objašnjenje rezultata naših eksperimenata koji pokazuju slabljenja naslaga kolagena osam nedelja nakon implantacije u većini tipova implanta sa inicijalno unetim makrofagima. U ovom pogledu se izdvajaju implanti koji su podrazumevali tretman LPS-om u nižoj ili višoj koncentraciji (LM1 i LM2 tip). Produkcija veće količine kolagena u implantima LM1 i LM2 tipa može se dovesti u vezu sa prisustvom velikog broja višejedarnih fagocita u prethodnim periodima i izraženim procesom resorpcije

(Osterberg i sar., 1988; Helfrich, 2003). Takođe dugotrajna inflamacija koja je registrovana naročito u implantima LM2 tipa, prema literaturnim podacima vodi ka gubljenju osnovnog tkiva i fibrozi (Sivakumar i Das, 2008; Ueha i sar., 2012; Lech i Anders, 2013).

Fibroza je u poslednjem terminu opservacije prisutna i u kontrolnim implantima K tipa. Poznato je da neke komponente krvnog ugruška favorizuju fibrozu, kao npr. PDGF (Bonner, 2004; Trojanowska, 2008) VEGF i FGF (Chaudhary i sar., 2007), pa bi se ovakav konačni rezultat mogao pripisati njihovom delovanju.

5.1.4. Imunohistohemijska analiza ektopičnih implanata

Najčešće korišćeni indikatori progresije osteogene diferencijacije su osteopontin (OP), osteokalcin (OC) i drugi nekolageni i kolageni proteini. Sve ove proteine sintetišu osteoblasti i oni igraju važnu ulogu u procesima mineralizacije koštanog tkiva i homeostazi kalcijumovih jona (Trubiani i sar., 2010).

Iako je prvobitno izolovan iz kosti, kasnije se pokazalo da se OP može locirati i u bubrezima, epitelnim ćelijama, ali i u telesnim tečnostima kao što su krv, urin i mleko (Chen i sar., 1993). U tkivima je OP lociran u ograničenim regionima, međutim njegova zastupljenost je znatno povećana na mestima inflamacije i remodeliranja tkiva (O'Brien i sar., 1994; Liaw i sar., 1998). Poznato je da OP može biti i komponenta vanćelijskog matriksa, ali i solubilni citokin. OP može direktno da interaguje sa proteinima vanćelijskog matriksa kao što su fibronektin i kolagen I (Chen i sar., 1992; Martin i sar., 2004). Imajući ovo u vidu, kao i činjenicu da se u svim tipovima implanata u svim terminima anti-OP antitelom boje i granule MMK i vanćelijski matriks, moguće je da ta obojenost potiče od solubilnog OP koga su granule "upile", odnosno koji je interagovao sa vlaknima vanćelijskog matriksa.

Regulacija ekspresije OP nije u potpunosti objašnjena i varira među različitim tipovima ćelija. OP je uključen u procese fiziološke i patološke mineralizacije tkiva. Njega eksprimiraju i osteoblasti i osteoklasti, što ukazuje da ovaj protein učestvuje u remodeliranju koštanog tkiva. Tokom fiziološke mineralizacije kosti, OP koji potiče od osteoklasta inhibira formiranje hidroksiapatitnih kristala. OP je uključen i u procese resorpcije koštanog tkiva, a podržava i ćelijsku adheziju različitih tipova ćelija (Gao i

sar., 2004; Xuan i sar., 1994). OP i MMP su kolokalizovani tokom zarastanja rana i tumorogeneze, ukazujući da postoji možda i *in vivo* uloga proteolizovanih formi OP. OP-*knockout* miševi pokazuju defektno zarastanje rana na koži sa abnormalnom produkcijom kolagena, što znači da je ekspresija OP povezana i sa fibrozom. Ta povezanost je verovatno sekundarna i povezana sa infiltracijom makrofaga i produkcijom TGF- β . Međutim, neka skorija istraživanja ukazuju na to da OP privlači fibroblaste, potencira njihovu proliferaciju i modulira fibroblastnu sekreciju MMP (Mazzali i sar., 2002).

OP tokom akutne i hronične inflamacije gde može biti eksprimiran od strane epitelnih, endotelnih i glatkih mišićnih ćelija, kao i makrofaga i T limfocita. On privlači inflamatorne ćelije na mesto povrede tkiva i deluje kao adhezivni protein. OP učestvuje i u proinflamatornim i antiinflamatornim akcijama (Mazzali i sar., 2002).

Generalno, svi tipovi implanata sa inicijalno unetim makrofagima (NM, TM, LM1, LM2 i DM tip) kao i kontrolni implantati K tipa, pokazuju veću imunoekspresiju OP u odnosu na kontrolne implante B tipa. Svi navedeni tipovi implanata, osim B tipa, sadržavali su kao komponentu krvni ugrušak, pa veća imunoekspresija OP u njima može biti i zbog prisustva OP iz krvi, kao i veće gustine različitih tipova ćelija. Takođe, u svim tipovima implanata sa makrofagima imunoekspresija OP ostaje izraženija u odnosu na kontrolne implante K i B tipa. To bi moglo biti objašnjeno prisustvom fagocita u ovim implantima tokom svih perioda posmatranja, izraženijim inflamatornim procesom i raznovrsnošću ćelijskih tipova u vezivnom matriksu ovih implanata.

Imunoekspresija OP je naročito intenzivna u implantima LM1, LM2 i D tipa u odnosu na kontrolne implante B tipa, osam nedelja nakon implantacije. Jača imunoekspresija OP u implantima LM1 i LM2 tipa podržana je činjenicom da su u njima tokom svih perioda posmatranja uočeni znaci inflamatorne reakcije. Postoje i literaturni podaci koji govore u prilog tome da proinflamatorni citokini LPS-om tretiranih makrofaga aktiviraju ekspresiju OP (Mazzali i sar., 2002). Jača imunoekspresija u implantima D tipa u odnosu na kontrolu, osam nedelja nakon implantacije, može se povezati sa procesom remodeliranja tkiva konstatovanim u ovom periodu.

OC je nekolageni protein koji se može naći u kostima i dentinu. Njega sintetišu i sekretuju osteoblasti. Učestvuje u procesima mineralizacije kosti i homeostaze jona

kalcijuma u organizmu (Lee i sar., 2007). I sam MMK koji je korišćen kao materijal za implantaciju indukuje ekspresiju OC, što je konstantovano u istraživanjima drugih autora analizom implanata sinusnih šupljina kunića već dve nedelje nakon implantacije. Pri tome je imunohistološkim analizama OC registrovan i u granulama MMK i u samom vanćelijskom matriksu implanata (Chaves i sar. 2012).

Činjenica je da je generalno imunoekspresija OC bila jača u implantima sa tretiranim makrofagima (TM, LM1, LM2, DM tip) u odnosu na implante sa RPM i oba tipa kontrolnih implanata (NM, K, B tip). Iako slaba, imunoekspresija OC u implantima NM tipa ipak je nešto jača u odnosu na kontrolne implante B tipa.

Ne postoje podaci o tome kako rezidentni i različito tretirani makrofagi utiču na osteogeni proces i indukciju sinteze OC u uslovima *in vivo* na modelu ektopične osteogeneze. U literaturi se mogu naći podaci o uticaju makrofaga na diferencijaciju osteoblasta u *in vitro* uslovima, u eksperimentima sa kokulturama. Tako npr. humane mezenhimske ćelije kostne srži u kokulturi sa monocitima/ makrofagima periferne krvi pokazuju bržu osteogenu diferencijaciju uz jaču ekspresiju alkalne fosfataze, osteopontina i osteokalcina, a pokazano je da je ovakav uticaj makrofaga posredovan preko BMP-2 (Pirraco i sar., 2013).

5.1.5. Osteogeni potencijal ispitivanih ektopičnih implanata

Među ispitivanim implantima dobar osteogeni potencijal pokazuju implanti NM tipa, jer u njima od početka postoji dobra vaskularna potpora, a nezrelo vezivno tkivo se održalo tokom svih termina posmatranja. Ono se do kraja osme nedelje ne uočava samo na periferiji implanata, već i u njihovoj unutrašnjosti. Već dve nedelje od implantacije se mogu uočiti ćelije koje naslojavaju granule MMK, kao i strukture nalik osteonu koje prodiru u unutrašnjost granula, a sadrže ne samo ćelije i vlakna, već i centralno postavljen krvni sud. U implantima NM tipa u poslednjem terminu nije uočeno razviće masnog ili fibroznog tkiva. Resorpcija je sve vreme bila umerena pa se MMK održao. Implanate NM tipa karakteriše i umerena imunoekspresija OP i slaba imunoekspresija OC, koja je ipak intenzivnija u odnosu na kontrolne implante B tipa. Na osnovu svega iznetog, moglo bi se reći da su stvoreni svi uslovi za postepeno razviće koštanog tkiva.

U implantima TM tipa se nezrelo vezivno tkivo održalo do kraja osme nedelje, a implanti su tokom celokupnog perioda bili dobro vaskularizovani. Već od druge nedelje na granulama MMK su primećene naslagane ćelije, a u kasnijim terminima i strukture u granulama MMK koje podsećaju na građu osteona. Imunoekspresija OC je ovde bila jača u odnosu na oba tipa kontrolnih implanata. Na osnovu svega se može reći da je i u implantima TM tipa podržan osteogeni proces. Ovakvi histološki nalazi i zaključci donešeni na osnovu njih su podržani i literaturnim podacima koji govore u prilog tome da je u sterilnim ranama inflamatorna faza kratkotrajna, pa ovakve rane zarastaju brže, jer inflamatorni odgovor ubrzo biva utišan i zamenjen fazom reparacije (Lech i Anders, 2013).

U implantima LM1 tipa tokom svih osam nedelja postoji dobra vaskularna potpora. U implant sa periferije prodire masno tkivo, a u unutrašnjosti se razvijaju nakupine kolagena koje vode fibrozi. Međutim, na periferiji implanta ostaje očuvano nezrelo vezivno tkivo, a postoje i regioni sa dobro očuvanom ćelijskom gustinom. Granulomatozna reakcija postoji i nakon 8 nedelja od implantacije, što bi moglo da ukazuje na hroničnu inflamaciju. Na inflamatorni proces ukazuje i jača imunoekspresija OP tokom svih perioda posmatranja. Diskutabilan je dalji tok osteogenog procesa, budući da se stiče utisak da nezrelo vezivno tkivo ide u smeru diferencijacije ka masnom ili fibroznom tkivu. Takođe, ne postoje literaturni podaci sa kojima bi se mogli komparirati dobijeni rezultati.

Od prve nedelje opservacije, za implante LM2 tipa bio je karakterističan jak proces resorpcije, infiltracija neutrofila čak i osam nedelja nakon implantacije, kao i slabljenje vaskularne potpore na kraju ispitivanog perioda. Ova pojava je konačno dovela do indukcije stvaranja perifernog masnog tkiva, a kasnije i njegove degeneracije zbog nedostatka perifernih krvnih sudova, dok je u unutrašnjosti implanata došlo do fibroze. Moglo bi se reći da je dugotrajna inflamatorna reakcija u implantima LM2 tipa bila kočnica za osteogeni proces. Iz literature je poznato da dugotrajna inflamacija može preći u hroničnu koja sprečava reparaciju i dovodi do gubitka tkiva (Lech i Anders, 2013).

U implantima DM tipa, već u prvim terminima opservacije je postojala dobra vaskularizovanost, dobra interakcija ćelija sa granulama MMK koje su se raspoređivale u osteoblastolikom maniru, a ovakav trend se zadržao do kraja osme nedelje od

implantacije. Već od druge, a naročito u četvrtoj nedelji od implantacije se u granulama MMK primećuju strukture nalik osteonima koštanog tkiva, od kojih neke sadrže i centralni krvni sud. U svim terminima opservacije je očuvana dobra gustina ćelija u vezivu. U nekim delovima implanata osam nedelja nakon implantacije između vezivne kapsule i nezrelog vezivnog tkiva postoji i masno tkivo, što može biti posledica izražene resorpcije koja je postojala u prethodnim terminima. Debela vlakna kolagena koja su uočena u četvrtoj nedelji, do kraja osme nedelje su remodelirana zahvaljujući fagocitima koji se uočavaju u vezivnom tkivu. Može se reći da je proces osteogeneze u ovakvim uslovima podržan.

U našim eksperimentima je u strukturu svih eksperimentalnih grupa implanata sa inicijalno unetim makrofagima bio uključen i krvni ugrušak, pa je sigurno da su i njegove komponente zajedno sa makrofagima uticale na osteogeni potencijal ektopičnih implanata. U tom smislu se pre svega izdvaja fibrin, protein za koji je dokazano da ima pozitivnu ulogu u procesima reparacije (Karp i sar., 2004) Takođe i pločice krvnog ugruška imaju isto tako pozitivan efekat (Ajduković i sar., 2005). Naime, poznato je da su faktori BMP-2, 4, i 6 koji se sintetišu u megakariocitima, a otpuštaju ih pločice, esencijalni za formiranje kosti (Sipe i sar., 2004). Takođe i IGF-1 koga sintetišu pločice direktno stimuliše formiranje koštanog matriksa i proliferaciju osteoblasta i njihovih prekursora (Taylor i Spencer, 2001) Zato je stanje osteogenog procesa u ispitivanim ektopičnim implantima rezultat ne samo samostalnog delovanja ćelija, već i složenih ćelijskih interakcija i sekretornih faktora.

Generalno, svi tipovi implanata sa inicijalno unetim makrofagima, osim LM2 tipa, su tokom osmonedeljne opservacije pokazali bolju osteogenu indukciju u odnosu na kontrolne implante. Iako do kraja osme nedelje od implantacije u kontrolnim implantima K tipa postoje znaci fibroze, na periferiji se održalo nezrelo vezivno tkivo, implant prožimaju sitni krvni sudovi, a postoje i mesta gde su ćelije nalik osteoblastima raspoređene po površini granula MMK. Ovakav sled događaja mogao bi se, između ostalog, pripisati faktorima poreklom iz pločica krvnog ugruška (Taylor i Spencer, 2001; Sipe i sar., 2004).

U kontrolnim implantima građenim od samog MMK (B tip) osteogeni proces je u početku napredovao, što je podržano činjenicom da su u ovom periodu ćelije uspostavile dobru interakciju sa granulama MMK, raspoređujući se na njihovoj površini

i infiltrirajući ih. Takođe je primećeno i prisustvo nezrelog vezivnog tkiva u implantima. Međutim, nakon osam nedelja dolazi do celokupne degeneracije tkiva u implantima B tipa, pre svega nezrelog vezivnog, ali gustog vezivnog i masnog tkiva koja su se tokom prethodnog perioda razvijala. Dakle, evolucija nezrelog vezivnog tkiva je išla ka razviću ili masnog ili fibroznog tkiva, pa nema struktura koštanog tkiva kao konačnog produkta u ovim implantima. Osam nedelja nakon implantacije, masno i fibrozno tkivo degenerišu. Sve navedeno može biti posledica odsustva najmanje dve komponente u implantima B tipa: inicijalno unetih ćelija i njihovih sekretornih faktora koji bi podržali ektopičnu osteogenezu, kao i nerazvijene mreže krvnih sudova.

5.2. Analiza povezanosti funkcionalnog stanja makrofaga i osteoreparatornog procesa na modelima *in vitro*

Istraživanje ćelijskih interakcija nakon povrede tkiva i tokom reparacije i regeneracije od velike je važnosti za tkivno inženjerstvo. Nakon frakture kosti, monociti dolaze na mesto povrede gde se diferenciraju u inflamatorne makrofage, dok regrutovanje monocita tokom normalnih fizioloških uslova dovodi do njihove diferencijacije u makrofage specifične za koštano tkivo. Makrofagi produkuju različite osteogene faktore i prema nekim literaturnim podacima imaju jak uticaj na osteogenu diferencijaciju i funkciju osteoblasta (Pirraco i sar., 2013). U kokulturi makrofaga i osteoblasta, makrofagi su čak neophodni osteoblastima za efikasan proces mineralizacije vanćelijskog matriksa (Chang i sar., 2008).

Uticaj makrofaga različitog porekla i tretiranih na različite načine, kao i njihovih sekretornih proizvoda na procese osteogeneze ispitivali smo na modelima *in vitro*. Ovi eksperimentalni modeli omogućavaju isključivanje sporednih uticaja ćelija koji postoje *in vivo*, a služili su za ispitivanje uticaja kondicioniranih medijuma makrofaga na proliferaciju i diferencijaciju preosteoblastnih ćelija u kulturi.

5.2.1. Rezidentni i tioglikolatom elicitirani peritonealni makrofagi imaju različite morfološke i funkcionalne karakteristike

Rezidentni i tioglikolatom elicitirani peritonealni makrofagi (RPM i TEPM) su korišćeni kao komponente nekih tipova implanata iz *in vivo* studije, pa se nametnula potreba da se oni definišu na morfološkom, a pre svega funkcionalnom nivou. Morfološke razlike RPM i TEPM u kulturi bile su očigledne. TEPM su se za razliku od RPM udruživali u ćelijske klastere, a njihova citoplazma je bila ispunjena većim brojem vezikula/vakuola. Ovakve morfološke karakteristike u literaturi se pripisuju stimulisanim makrofagima (Petricevich i sar., 2008; Figueiredo i sar., 2009). Funkcionalna karakterizacija makrofaga je podrazumevala analizu produkcije reaktivnih jedinjenja kiseonika i sekrecije TNF- α . NBT test je konvencionalni metod koji se koristi u esejima aktivnosti fagocitnih ćelija u cilju određivanja stepena produkcije reaktivnih jedinjenja kiseonika. Reaktivni produkti NADPH/oksidaze redukuju žuto obojeni NBT do tamno plavo obojenih formazanskih kristala (Choi i sar., 2006). Ukupna aktivnost ovog enzima raste proporcionalno sa povećanjem nivoa ćelijskog metabolizma, jer to vodi povećanoj konverziji tetrazolijumove soli do formazana, pri čemu se ćelije intenzivnije boje. Jedna od karakteristika inflamatornih makrofaga je povećana produkcija proinflamatornih citokina, uključujući TNF- α . L929 ćelijska linija je najčešće korišćena za procenu citotoksičnosti, zbog svoje velike osetljivosti na TNF- α . (Shiau i sar., 2001). Primenom ove metode želeli smo da ocenimo nivo produkcije TNF- α u kondicioniranim medijumima iz kultura RPM i TEPM, nakon 24 h kultivacije. Relativan broj NBT pozitivnih ćelija i veća količina depozita formazana u ćelijama TEPM, kao i jači citotoksični efekat kondicioniranog medijuma TEPM u odnosu na kondicionirani medijum RPM, zajedno sa morfološkim razlikama između ova dva tipa ćelija, ukazuju na to da su TEPM u ovom istraživanju imali karakteristike inflamatornih ćelija. Ova konstatacija je podržana i literaturnim podacima (Lech i Anders, 2013) koji govore o tome da makrofagi iz tzv. sterilnih rana, kakve su i one indukovane tioglikolatom, predstavljaju inflamatorne makrofage.

5.2.2. Uticaj lipopolisaharida na morfološke i funkcionalne karakteristike rezidentnih peritonealnih makrofaga u kulturi zavisi od njegove koncentracije

Sve tri ispitivane koncentracije LPS-a (1, 10 i 100 ng/ml) dovode do morfoloških promena tretiranih RPM u smislu njihovog grupisanja u klastere, granulisanja citoplazme i prisustva ćelija u apoptozi. Morfološke promene LPS-om tretiranih RPM postaju izraženije sa povećanjem koncentracije LPS-a. Shodno tome, najveće morfološke promene ćelija uočene su u grupi RPM tretiranih najvišom koncentracijom LPS-a (100 ng/ml). U ovoj grupi je, između ostalog, bilo najviše ćelija u apoptozi, što može biti posledica autokrinog delovanja TNF- α samih LPS-om tretiranih makrofaga u kulturi (Xaus i sar., 2000). Dokaz najveće stimulisnosti makrofaga u grupi tretiranoj LPS-om u koncentraciji 100 ng/ml je i relativan broj NBT pozitivnih ćelija iz klase „3“, koji je bio veći u odnosu na ostale eksperimentalne grupe ćelija, dok je relativan broj NBT negativnih ćelija bio najmanji u odnosu na ostale eksperimentalne grupe. Morfološke opservacije i rezultati dobijeni NBT testom potvrdili su nam da su tokom 24 h tretmana makrofagi tretirani sa 100 ng/ml LPS-a bili najviše stimulisani. Međutim, kondicionirani medijum RPM iz ove grupe pokazao se slabo citotoksičnim. Objašnjenje ovakvog rezultata možda leži u činjenici da jaka stimulacija makrofaga LPS-om indukuje izrazitu produkciju TNF- α , što je moglo dovesti do pojačane autocitotoksičnosti. Tako su (Bedoui i sar. 2005) pokazali da LPS stimuliše makrofage na produkciju TNF- α u dozno-zavisnom maniru. U kulturi RPM tretiranih LPS-om u koncentraciji 100 ng/ml, sekretovani TNF- α makrofaga mogao je delovati i na njih same, što je vodilo apoptozi ovih ćelija. Naime, istraživanja drugih autora pokazala su da TNF- α dovodi do apoptoze makrofaga već tokom prvih 6 h svog delovanja (Xaus i sar., 2000). I zaista, u grupi RPM tretiranih sa LPS-om u koncentraciji 100 ng/ml bilo je najviše ćelija u apoptozi. Ćelije u apoptozi nisu više proizvele TNF- α , što je generalno smanjilo nivo ovog citokina u kulturi, pa se kondicionirani medijum ove grupe pokazao kao slabo citotoksičan.

MTT testom ćelijske vijabilnosti (grafik 4) pokazano je da je najviše citotoksičan kondicionirani medijum RPM iz grupe tretirane sa 10 ng/ml LPS-a. RPM iz ove eksperimentalne grupe bili su manje stimulisani u odnosu na grupu RPM tretiranih

višom koncentracijom LPS-a, sudeći po manjoj zastupljenosti vezikula/vakuola u njihovoj citoplazmi i manjem broju ćelija u apoptozi. Kao takvi, oni su produkovali manju koncentraciju TNF- α , imajući u vidu već navedene tvrdnje drugih autora (Bedoui i sar., 2005). I u ovoj eksperimentalnoj grupi je bilo najviše NBT pozitivnih ćelija iz klase „3“ ali u manjoj meri (za oko 20% manje) u odnosu na RPM tretirane LPS-om u koncentraciji 100 ng/ml, dok je relativan broj NBT negativnih ćelija bio veći u odnosu na pomenutu eksperimentalnu grupu. Dakle, koncentracija TNF- α koju su produkovali RPM tretirani LPS-om u koncentraciji 10 ng/ml nije delovala u toj meri proapoptotski na njih same, kao u slučaju RPM tretiranih višom koncentracijom LPS-a. Zahvaljujući većem broju vijabilnih ćelija, sposobnih za produkciju TNF- α , kondicionirani medijum RPM tretiranih LPS-om u koncentraciji 10 ng/ml je delovao citotoksično na L929 ćelije.

Konačno, koncentracija LPS-a od 1 ng/ml je u najmanjoj meri stimulisala makrofage, a ovu činjenicu potkrepljuju morfološke opservacije kao i činjenica da je ovde bilo najmanje NBT pozitivnih ćelija iz klase „3“, a najviše NBT negativnih ćelija u odnosu na ostale eksperimentalne grupe (Slika 40; Grafik 3). To mogu biti razlozi što se kondicionirani medijum ove eksperimentalne grupe pokazao kao slabo citotoksičan.

5.2.3. Lipopolisaharid i deksametazon imaju različit efekat na RAW 264.7 makrofage u kulturi

Tretmani RAW 246.7 makrofaga LPS-om i deksametazonom imali su za cilj generisanje dva funkcionalno različita tipa makrofaga: inflamatornih (M1) i reparatornih (M2), kako bi se kasnije ispitalo njihovo delovanje na proces osteogeneze *in vitro*. Na osnovu rezultata preliminarnih eksperimenata na RPM kojima je potvrđeno da LPS ima dozno-zavisni efekat na stimulaciju makrofaga i produkciju TNF- α , odlučili smo da RAW 246.7 makrofage tretiramo najvećom i najmanjom primenjenom koncentracijom LPS-a, budući da su ove dve koncentracije delovale najviše odnosno najmanje na stimulaciju makrofaga u preliminarnim eksperimentima. Makrofagi su tretirani LPS-om u koncentraciji 100 ng/ml (grupa L100), LPS-om u koncentraciji 1 ng/ml (grupa L1), ili deksametazonom (grupa D), a kontrola su bile ćelije inkubirane u DMEM-u (grupa K). Tretman navedenim reagensima trajao je 4 h, što je prema literaturnim podacima dovoljno za generisanje željenih klasa makrofaga (Pelegri i

Surprenant, 2009), nakon čega su medijumi sa reagensima uklonjeni, a ćelijama je dodat svež DMEM. Ćelije su inkubirane još 20 h, nakon čega je inkubacija prekinuta sakupljanjem kondicioniranih medijuma koji su dalje korišćeni u eksperimentima osteogene diferencijacije ćelija. Na taj način je izbegnut uticaj samog LPS-a i deksametazona na proces osteogene diferencijacije, a dobijeni rezultati su bili rezultat delovanja samo sekretornih faktora makrofaga.

Makrofagi iz eksperimentalne grupe L100 u kulturi poprimaju morfološke karakteristike inflamatornih makrofaga, što znači da su rašireni, čvrsto priljubljeni uz podlogu, poseduju brojne nastavke lamelipodijalnog i filopodijalnog tipa, a neretko su i višejedarni (Slika 43). Makrofagi iz eksperimentalne grupe L1 poseduju navedene karakteristike, ali u manjoj meri, što ukazuje na manji stepen stimulacije. Makrofagi iz eksperimentalne grupe D pokazuju sličnu morfologiju kao oni iz kontrolne grupe K, s tim da su nešto veći, uglavnom okruglog oblika, retko poseduju nastavke (i ako ih imaju oni su kratki), a ovakve morfološke karakteristike odgovaraju reparatornim makrofagima. Makrofagi kontrolne grupe K su pretežno okruglog oblik i sitniji su, što je karakteristika nestimuliranih ćelija (Akassoglou i sar., 2004; Pelegrin i Surprenant, 2009; Kang i sar., 2011).

Nakon sakupljanja kondicioniranih medijuma makrofaga iz različitih tretmana, rađen je MTT test citotoksičnosti ovih kondicioniranih medijuma i njihovih 50% i 25% razblaženja.

100% kondicionirani medijum iz grupe L100 nema citotoksičan efekat na L929 ćelije, dok njegovo 50% i 25% razblaženje deluju blago citotoksično. Kondicionirani medijum iz grupe L1 deluje blago citotoksično jedino u 25% razblaženju. Iz literature je poznato da pod delovanjem LPS-a makrofagi dobijaju karakteristike inflamatornih ćelija i kao takvi sintetišu TNF- α (Leibovich i sar., 1987). Ovaj citokin je generalno citotoksičan za ćelije, ali da li će TNF- α i u kojoj meri delovati citotoksično zavisi od njegove koncentracije. TNF- α u fiziološkim koncentracijama čak stimuliše rast i proliferaciju ćelija, što je potvrđeno u eksperimentima drugih autora rađenih na intestinalnim ćelijama miša, dok ih u patološkim koncentracijama inhibira (Kaiser i Polk, 1997). Takođe, TNF- α deluje citotoksično i na same makrofage. Trebalo bi imati u vidu i to da se uticaj TNF- α na ćelije ostvaruje preko dva receptora: TNF- α R1 i TNF- α R2. Vezivanje TNF- α za ove receptore može pokrenuti jedan od tri signalna puta, pri

čemu su neki proapoptotski, a neki antiapoptotski (Karin i Lin, 2002). Postoji verovatnoća da je TNF- α iz kondicioniranih medijuma aktivirao različite signalne puteve L929 ćelija utičući tako na njihovu vijabilnost.

Blag citotoksičan efekat 25% razblaženja kondicioniranog medijuma grupe K može se objasniti činjenicom da RAW 264.7 makrofagi i bez stimulacije proizvode izvesnu količinu TNF- α (Su-Yun i Won-Bong, 2005).

Rezultati dobijeni MTT testom citotoksičnosti ne odražavaju isključivo efekat TNF- α na ćelijsku vijabilnost. Naime, makrofagi sintetizuju i druge faktore koji utiču na nivo sinteze TNF- α (Baer i sar., 1998) i citokine sa kojima TNF- α interaguje, ali i citokine koji deluju na različite načine na vijabilnost ćelija. Heterogenosti rezultata doprinose i različita razblaženja kondicioniranih medijuma u kojima se molekularni odnos TNF- α i drugih citokina menja, što utiče na stepen citotoksičnosti ovih kondicioniranih medijuma. Dakle, rezultati dobijeni MTT testom citotoksičnosti predstavljaju zbirni efekat svih mogućih vrsta produkata makrofaga koji deluju na različite načine i različitim putevima na ćelije, kao i same makrofage. Neki od njih deluju stimulatorno, a neki inhibitorno.

Prema literaturnim podacima produkciju TNF- α inhibirana je kod deksametazonom tretiranih makrofaga (Crinelli i sar., 2000.). I naši rezultati dobijeni MTT testom citotoksičnosti u skladu su sa ovim navodima drugih istraživača, jer nijedno razblaženje kondicioniranog medijuma D grupe nije pokazalo citotoksičan efekat na L929 ćelije, što znači da makrofagi tretirani deksametazonom nisu proizvodili TNF- α ili su ga proizvodili u zanemarljivoj količini.

5.2.4. Modulatorni efekat makrofaga na osteogenu diferencijaciju ćelija *in vitro*

Test proliferacije kristal-violet metodom je jednostavna test, koji se koristi da bi se dobila kvantitativna informacija o relativnoj gustini ćelija koje su adherirale za podlogu, jer su količina i intenzitet boje koju absorbuje ćelijski jednosloj proporcionalni broju ćelija (Vega-Avila i Pugsley, 2011). Test ćelijske proliferacije sproveden je na preosteoblastnoj kulturi MC3T3-E1 ćelija kultivisanih u 100%, 50% i 25%

kondicioniranih medijuma različito tretiranih RAW 264.7 makrofaga (grupe L100, L1, D i K).

Testom ćelijske proliferacije je pokazano da je stopa ćelijske proliferacije niža u kondicioniranim medijumima D i K grupe u odnosu na kulture ćelija iz grupa L100 i L1. U tom kontekstu 100% kondicionirani medijum D grupe najznačajnije smanjuje stopu ćelijske proliferacije u odnosu na sve ostale grupe kondicioniranih medijuma i njihova razblaženja.

Na osnovu rezultata testa citotoksičnosti i testa ćelijske proliferacije odlučili smo da ispitamo efekat 100% i 25% kondicioniranih medijuma RAW 264.7 makrofaga iz različitih tretmana (kojima su dodati osteogeni faktori) na osteogenu diferencijaciju MC3T3-E1 ćelija. Kao kontrola su poslužile ćelije kultivisane u osteogenom medijumu (OS) ili u DMEM-u.

Morfologija ćelija u kulturi analizirana je 3. i 6. dana eksperimenta osteogene diferencijacije. Nakon 6 dana kultivacije, kulture su postale konfluentne, pa su ćelije fiksirane. U cilju karakterizacije osteogenog fenotipa bojene su nakupine fosfata *Von Kossa* metodom, dok je produkcija osteopontina (OP) i osteokalcina (OC) određivana imunocitohemijskim metodama. Iz literature je poznato da je sinteza OP povećana tokom faze aktivne proliferacije osteoblasta, a u postproliferativnoj fazi se smanjuje, da bi opet porasla i dostigla najveći nivo tokom faze mineralizacije vanćelijskog matriksa. Za razliku od njega, osteoblasti ekspiriraju OC jedino u postproliferativnoj fazi, a maksimalna ekspresija ovog proteina uočava se tokom faze mineralizacije, pa se smatra da je on marker zrelih osteoblasta (Neve i sar., 2011).

Imunocitohemijska analiza MC3T3-E1 ćelija nakon osteogene diferencijacije u kulturi sa različitim kondicioniranim medijumima, pokazala je da preosteoblasti iz svih eksperimentalnih grupa, kao i iz kontrolnih kultura sintetišu OP. Naime, MC3T3-E1 ćelije predstavljaju preosteoblastnu ćelijsku liniju u kojoj su već pokrenuti mehanizmi osteogene diferencijacije, samim tim i sinteze svih komponenti vanćelijskog matriksa. OP je jedan od prvih nekolagenih proteina koga osteoblasti sintetišu, pa je zato detektovan u kulturama svih eksperimentalnih grupa (Quarles i sar., 1992).

Preosteoblaste kultivisane u 100% kondicioniranom medijumu L100 karakteriše veća ćelijska gustina u odnosu na kontrolne kulture ćelija kultivisanih u OS i DMEM-u, dok je njihova gustina u 25% kondicioniranom medijumu L100 slična onoj u kontrolnoj

kulturi ćelija. Preosteoblasti iz kultura sa 100% i 25% kondicioniranim medijumom L100 pokazuju slabiju imunoekspresiju OC i slabiju mineralizaciju vanćelijskog matriksa u odnosu na kontrole. Takođe, 100% i 25% kondicionirani medijum L100 izuzetno blago je smanjio stopu proliferacije preosteoblastnih ćelija. Slična situacija je i sa imunoekspresijom OC u kulturi preosteoblasta kultivisanih u 100% kondicioniranom medijumu L1, dok je stepen mineralizacije vanćelijskog matriksa i imunoekspresije OC u kulturi preosteoblasta kultivisanih u 25% kondicioniranom medijumu L1 sličan onoj u kontrolnim kulturama. Kondicionirani medijum L1 u koncentraciji 100% izuzetno blago je smanjio stopu ćelijske proliferacije, dok njegovo 25% razblaženje nije imalo učinak. Prethodno je naglašeno da su LPS-om tretirani makrofagi indukovani na sekreciju TNF- α . *In vitro* istraživanja drugih autora su pokazala da ovaj citokin inhibira sazrevanje i funkciju osteoblasta, što se manifestuje kroz redukciju aktivnosti alkalne fosfataze, OC i kolagena I. Takođe, osteoblasti tretirani TNF- α nisu u mogućnosti da regulišu mineralizaciju vanćelijskog matriksa (Neve i sar., 2011).

Preosteoblasti kultivisani u 100% i 25% kondicioniranim medijumima D grupe imaju morfologiju najbližnju osteoblastima i to već 3. a naročito 6. dana osteogene diferencijacije, u odnosu na ostale eksperimentalne i kontrolne grupe. Mineralizacija vanćelijskog matriksa i nivo imunoekspresije OC u kulturama preosteoblasta sa 100% i 25% kondicioniranim medijumom D izraženiji su u odnosu na kontrolne i sve druge eksperimentalne grupe. Kondicionirani medijum D nije pokazao citotoksični efekat ni u jednoj koncentraciji, ali je zato značajno uticao na smanjenje stope ćelijske proliferacije MC3T3-E1 ćelija. U literaturi se mogu naći podaci da diferencijaciju osteoblastnih prekursora ka zrelim osteoblastima karakteriše upravo inhibicija njihove proliferacije, a sa druge strane veći nivo produkcije komponenti vanćelijskog matriksa (Maes i sar., 2010).

Preosteoblasti iz kultura sa 100% i 25% kondicioniranim medijumima K grupe pokazuju osteoblastima sličnu morfologiju 6. dana osteogene diferencijacije. Mineralizacija vanćelijskog matriksa i nivo imunoekspresije OC u kulturama preosteoblasta sa 100% i 25% kondicioniranim medijumom K izraženiji su u odnosu na kontrolne i druge eksperimentalne grupe, a nešto slabiji u odnosu na eksperimentalnu grupu D. Takođe, obe koncentracije kondicioniranog medijuma K smanjuju stopu

ćelijske proliferacije, što se uz kombinaciju sa ostalim rezultatima može povezati sa višim nivoom osteogene diferencijacije ćelija.

5.3. Mogućnosti za kontrolisanje osteogenog procesa pomoću delovanja na makrofage

Napredak u nauci i bolje razumevanje plejotropne uloge makrofaga u različitim biološkim i patološkim procesima stavila je makrofage na sam vrh ćelijske piramide zbog njihovog velikog uticaja na sve aspekte tkivne reparacije. U odnosu na obilje literaturnih podataka o ulozi makrofaga u procesima zarastanja mekih tkiva, malo je podataka o njihovoj ulozi u procesima reparacije kosti. Za optimalni tretman koštanih fraktura potrebno je poznavanje kompleksnih fizioloških procesa njihovog zarastanja. Proces reparacije kosti prolazi kroz tri faze definisane kao inflamatorna, faza obnove i faza remodeliranja. Smatra se da su ćelije, pre svega makrofagi, kao i molekuli koje sintetišu tokom inflamatorne faze ključni za uspešnu reparaciju koštanog tkiva (Brighton, 1984; Horowitz i sar., 1989).

Rezidentni peritonealni makrofagi (RPM) nakon 24 h kultivacije imaju karakteristike nestimuliranih ćelija, sudeći prema njihovim morfološkim i funkcionalnim karakteristikama koje su prikazane i o kojima je bilo reči u ovoj tezi. Implante NM tipa, čija su sastavna komponenta bili RPM, karakteriše dobar angiogeni i osteogeni potencijal, prisustvo nezrelog vezivnog tkiva tokom svih termina posmatranja, ćelije koje se po površini granula MMK raspoređuju u osteoblastnom maniru, kao i strukture nalik osteonu. Sve ove karakteristike bile su intenzivnije u odnosu na kontrolne implante K i B tipa. Implante NM tipa karakteriše i umerena imunoekspresija OP i slaba imunoekspresija OC, koja je ipak intenzivnija u odnosu na kontrolne implante B tipa. I osteogena diferencijacija preosteoblastne MC3T3-E1 ćelijske linije u prisustvu kondicioniranog medijuma RAW 264.7 makrofaga bila je više izražena u odnosu na osteogenu diferencijaciju ćelija u osteogenom medijumu i DMEM-u, sudeći po morfološkim analizama ćelija, pojačanoj mineralizaciji vanćelijskog matriksa i sintezi OC.

Naše analize morfoloških i funkcionalnih karakteristika tioglikolatom elicitiranih peritonealnih makrofaga (TEPM) pokazale su da oni imaju karakteristike

inflamatornih makrofaga. Njihovo uključivanje u sastav implanata TM tipa povoljno je uticalo na osteogeni proces u poređenju sa kontrolnim implantima K i B tipa, budući da su se u ovom tipu implanata nezrelo vezivno tkivo, vaskularna mreža i strukture nalik osteonu održali do kraja osme nedelje. Imunoekspresija OC je ovde bila jača u odnosu na oba tipa kontrolnih implanata, što takođe govori u prilog intenzivnijem osteogenom procesu.

Iz literature je poznato da LPS i njime tretirani makrofagi negativno utiču na osteogeni proces (Li i sar., 2002; Kobayashi i sar., 2012). Međutim, u prikazanim literaturnim modelima LPS-om je delovano konstantno tokom praćenja procesa reparacije kosti i u većim koncentracijama. U eksperimentalnom modelu prikazanom u ovoj doktorskoj disertaciji LPS-om je na makrofage delovano jednokratno. Kondicionirani medijum RPM tretiranih niskom koncentracijom LPS-a (1 ng/ml) pokazao se kao blago citotoksičan. U implantima LM1 tipa tokom svih osam nedelja postoji dobra vaskularna potpora i ostaje očuvano nezrelo vezivno tkivo, kao i ćelijska gustina u pojedinim regionima. Međutim, ovde se uočavaju i znaci hronične inflamacije, fibroze i razviće masnog tkiva. Eksperimentima osteogene diferencijacije preosteoblastne ćelijske linije u prisustvu kondicioniranog medijuma RAW 264.7 makrofaga tretiranih sa 1 ng/ml LPS-a dokazano je intenziviranje ovog procesa u odnosu na kontrolne kulture ćelija. Navedeni rezultati pokazuju da bi održavanje bazalnog nivoa inflamatornog procesa moglo imati povoljan efekat na osteogeni proces. Međutim, konkretniji zaključci zahtevaju i dodatne analize.

Kondicionirani medijum RPM tretiranih sa LPS-om u koncentraciji 100 ng/ml pokazao se kao izrazito citotoksičan, što ukazuje na veću produkciju proinflamatornog citokina TNF- α . Za implante LM2 tipa u koje su uključeni RPM tretirani ovom koncentracijom LPS-a, bio je karakterističan hronični inflamatorni proces, jak proces resorpcije, slabljenje vaskularne potpore, stvaranja masnog tkiva i process fibroze. Kultura preosteoblasta u prisustvu kondicioniranog medijuma RAW 264.7 makrofaga tretiranih LPS-om u koncentraciji 100 ng/ml pokazuje manji stepen osteogene diferencijacije u odnosu na kontrolne kulture ćelija u osteogenom medijumu, pa čak i samom DMEM-u. Moglo bi se reći da je intenzivna stimulacija makrofaga kočnica za osteogeni proces.

Postoji dosta literaturnih dokaza da deksametazon negativno utiče na osteogeni proces *in vivo*, ali je u prikazanim literaturnim modelima njime delovano konstantno tokom praćenja procesa reparacije kosti (Advani i sar., 1997; Braem i sar., 2012). U našem eksperimentalnom modelu deksametazonom je delovano jednokratno, a cilj je bio pre svega generisanje reparatornog tipa makrofaga koji će dalje delovati na osteogeni proces. Implanti DM tipa su bili bogato vaskularizovani, histomorfološkom analizom je uočen raspored ćelija po granulama MMK u osteoblastolikom maniru, prisustvo struktura nalik osteonu, a očuvana je dobra gustina ćelija u vezivu. Imunoekspresija OC je u odnosu na kontrolne grupe implanata. Osteogena diferencijacija preosteoblastne ćelijske linije u prisustvu kondicioniranog medijuma RAW 264.7 makrofaga tretiranih deksametazonom izraženija je u odnosu na sve ostale eksperimentalne i kontrolne grupe. Naši rezultati pokazuju da bi jednokratni tretman makrofaga deksametazonom mogao imati povoljan efekat na osteogeni proces i reparaciju koštanog tkiva, što je od posebnog značaja za kliničko zbrinjavanje fraktura kosti u uslovima tretmana pacijenta kortikosteroidima.

S obzirom da nema literaturnih podataka o modulatornom efektu rezidentnih i različito tretiranih peritonealnih makrofaga na osteogeni proces u ektopičnom *in vivo* modelu, a da je malo literaturnih podataka o njihovom uticaju na osteogeni proces u različitim *in vitro* uslovima, eksperimentalni rezultati ove doktorske disertacije doprinose boljem razumevanju mogućnosti kako da se pomoću delovanja na makrofage upravlja procesima osteogeneze i reparacije koštanog tkiva. Oni predstavljaju dokaz da makrofagi imaju modulatorni efekat na osteogeni proces u ektopičnom *in vivo* modelu. Činjenica je i da se promene intenziteta osteoreparatornog procesa ne mogu pripisati čistom uticaju makrofaga, već i složenim interakcijama ovih ćelija sa ostalim sastavnim delovima implanta: komponentama krvnog ugruška i samog MMK. Te interakcije su zapravo dvosmerne, jer kako makrofagi utiču na ćelijsko okruženje u implantima, tako i to okruženje utiče na funkcionalne karakteristike samih makrofaga. S toga je konačna slika viđena u implantima predstavljala ukupan rezultat složenih ćelijskih interakcija.

Rezultati *in vitro* dela istraživanja bili su u saglasnosti sa rezultatima *in vivo* dela istraživanja, ukazavši na to da makrofagi moduliraju osteogeni proces, jer je on u kulturama preosteoblasta kultivisanih u kondicioniranim medijumima rezidentnih ili

različito tretiranih makrofaga bio modifikovan u odnosu na onaj viđen u kontrolnim kulturama.

Eksperimentalni rezultati iz ove doktorske disertacije ukazuju na to da moduliranje inflamatorne faze reparacije koštanog tkiva utiče na konačni rezultat osteogenog, a samim tim i reparatornog procesa. Inflamatorna faza je izuzetno značajna, jer od sekretornih produkata ćelija, pre svega sekretornih produkata makrofaga, tokom ove faze zavise i dalja dešavanja u fazi reparacije i na kraju remodeliranja. Takođe, ti sekretorni produkti i međućelijske interakcije utiču i na same makrofage, koji u skladu sa tim menjaju svoje funkcionalne karakteristike. U tom smislu jak inflamatorni proces tokom ove faze dovodi do defektnog osteogenog procesa, ali isto tako i kočenje ili preskakanje inflamatorne faze ima isti efekat na proces osteogeneze.

Svi navedeni eksperimentalni rezultati potvrđuju da upravljanje odgovorom makrofaga može biti sredstvo za usmeravanje procesa osteogeneze. Na ovaj način proširuju se mogućnosti aktivnog delovanja na poboljšanje procesa obnavljanja koštanog tkiva posle povrede, što može biti od velikog značaja u tkivnom inženjerstvu i kliničkoj praksi.

6. ZAKLJUČCI

Proces resorpcije mineralnog matriksa kosti *in vivo* na modelu ektopične osteogeneze u subkutanim implantima u Balb/c mišu pokazuje sledeće karakteristike:

- U implantima koji su inicijalno sadržavali makrofage, proces resorpcije je prisutan u svim ispitivanim periodima tokom osam nedelja eksperimenta.
- Elicitacija makrofaga tioglikolatom, tretman lipopolisaharidom ili deksametazonom pojačavaju fagocitnu aktivnost ovih ćelija.
- Implanate sa makrofagima tretiranim lipopolisaharidom u koncentraciji 500 ng/ml karakteriše najizraženiji proces resorpcije u odnosu na ostale grupe implanata.

Angiogeni proces u subkutanim implantima karakteriše sledeće:

- Između različitih tipova implanata sa inicijalno unetim makrofagima postoje razlike u stepenu angiogene aktivnosti, u zavisnosti od prethodnog tretmana ovih ćelija.
- Implanate sa inicijalno unetim rezidentnim, tioglikolatom elicitiranim, lipopolisaharidom tretiranim u koncentraciji 5 ng/ml ili deksametazonom tretiranim makrofagima karakteriše izražen angiogeni proces tokom svih osam nedelja eksperimenta.
- U implantima koji su sadržavali makrofage tretirane lipopolisaharidom u koncentraciji 500 ng/ml vaskularizovanost je slabija na osam nego na četiri nedelje.
- U implantima formiranim samo od kombinacije nosača makrofaga (mineralnog matriksa kosti i krvnog ugruška) vaskularizovanost je slabija u odnosu na implanate sa makrofagima, ali izraženija u odnosu na implanate od samog mineralnog matriksa kosti.
- Najslabiju vaskularizovanost nakon osam nedelja od implantacije pokazuju implanati sastavljeni od samog mineralnog matriksa kosti.

Dinamika promena vezivno-tkivne arhitekture implanata zavisi od tipa implanta.

- Dve i četiri nedelje nakon implantacije gustina ćelija u vezivnom tkivu je znatno povećana u svim ispitivanim tipovima implanata, a do kraja osme nedelje od implantacije opada.
- Deponovanje kolagena u prvoj nedelji nakon implantacije se može uočiti prevashodno u perifernim delovima implanata i vezivnoj kapsuli, dok se u ostalim

terminima uočava i u unutrašnjosti implanata. Tokom druge i četvrte nedelje od implantacije kolagen prožima implante, a najveće razlike u zastupljenosti kolagena uočene su osam nedelja nakon implantacije.

- Implants sa rezidentnim peritonealnim makrofagima karakteriše očuvana ćelijska gustina, prisustvo nezrelog vezivnog tkiva, kao i odsustvo masnog tkiva i fibroze.
- Nezrelo vezivno tkivo očuvano je u implantima sa tioglikolatom elicitiranim peritonealnim makrofagima tokom svih osam nedelja eksperimenta.
- U implantima sa makrofagima tretiranim lipopolisaharidom infiltracija neutrofila postoji svih osam nedelja od implantacije, a to je naročito izraženo u implantima sa peritonealnim makrofagima tretiranim lipopolisaharidom u koncentraciji 500 ng/ml.
- Implants sa makrofagima tretiranim lipopolisaharidom u koncentraciji 5 ng/ml karakteriše razviće masnog tkiva i proces fibroze, ali i opstanak nezrelog vezivnog tkiva tokom osam nedelja eksperimenta.
- U implantima sa makrofagima tretiranim lipopolisaharidom u koncentraciji 500 ng/ml gustina ćelija značajno opada na kraju eksperimenta, uočava se izrazita fibroza, kao i razviće masnog tkiva.
- Gustina ćelija u vezivnom tkivu implanata sa deksametazonom tretiranim peritonealnim makrofagima najniža je nakon nedelju dana od implantacije, nezrelo vezivno tkivo se zadržalo tokom svih osam nedelja eksperimenta, ali ga prati i razviće masnog tkiva.

Osteogeni proces u implantima pokazuje sledeće karakteristike:

- Najizraženiju osteogenu aktivnost pokazali su implanati sa rezidentnim, a zatim i deksametazonom tretiranim peritonealnim makrofagima.
- U implantima sa makrofagima tretiranim sa 500 ng/ml lipopolisaharida znaci osteogenog procesa se gube u kasnijim opservacionim periodima.
- Mineralni matriks kosti nema sposobnost da sam podrži ektopičan osteogeni proces.

Na osnovu *in vitro* ispitivanja makrofaga i njihovih sekretornih produkata može se zaključiti sledeće:

- Tioglikolatom elicitirani peritonealni makrofagi pokazuju morfološke i funkcionalne karakteristike inflamatornih makrofaga.

- Lipopolisaharid dovodi do morfoloških i funkcionalnih promena rezidentnih peritonealnih makrofaga na dozno zavisani način.
- Diferencijacija MC3T3-E1 preosteoblastnih ćelija prema osteoblastima najbrža je u kondicioniranom medijumu RAW 264.7 makrofaga tretiranih deksametazonom.
- Kondicionirani medijum RAW 264.7 makrofaga tretiranih lipopolisaharidom u koncentraciji 100 ng/ml usporava diferencijaciju MC3T3-E1 preosteoblasta prema osteoblastima.

7. LITERATURA

Aarden, EM, Nijweide, PJ, Van der Plas A, Alblas MJ, Mackie EJ, Horton MA and Helfrich MH. (1996) Adhesive properties of isolated chick osteocytes in vitro. *Bone* 18: 305-313

Adams DO and Hamilton TA. (1992) Macrophages as destructive cells in host defense. In: Gallin UI, Goldstein IM and Snyderman R (eds). *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Raven Press, NY

Advani S, LaFrancis D, Bogdanovic E, Taxel P, Raisz LG and Kream BE. (1997) Dexamethasone suppresses in vivo levels of bone collagen synthesis in neonatal mice. *Bone* 20:41-46

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

Akassoglou K, Adams RA, Bauer J, Mercado P, Tseveleki V, Lassmann H, Probert L and Strickland S. (2004) Fibrin depletion decreases inflammation and delays the onset of demyelination in a tumor necrosis factor transgenic mouse model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6698-6703

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P. (2002) *Molecular Biology of the Cell* (4th ed). Garland Science, NY

Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, Da Cruz Pacheco I, Corrêa do Amaral RJ, Granjeiro JM and Borojevic R. (2013) Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther* 4: 67 [Epub ahead of print]

Anderson JM and McNally AK. (2011) Biocompatibility of implants: lymphocyte/macrophage interactions. *Semin Immunopathol* 33: 221-233

Andrades JA, Narváez-Ledesma L, Cerón-Torres L, Cruz-Amaya AP, López-Guillén D, Mesa-Almagro ML and Moreno-Moreno JA. (2013) Bone Engineering: A Matter of Cells, Growth Factors and Biomaterials, Regenerative Medicine and Tissue Engineering. InTech, DOI: 10.5772/56389

Asagiri M and Takayanagi H. (2007) The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 40: 251-264

Asahina I, Seto I, Oda M, Marukawa E, Imranul A and Enomoto MS. (1999) *Bone Engineering* (1st ed). Elsevier, Toronto

Ausprunk DH and Folkman J. (1977) Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 14: 53-65

Baer M, Dillner A, Schwartz RC, Sedon C, Nedospasov S and Johnson PF. (1998) Tumor necrosis factor- α transcription in macrophages is attenuated by an autocrine factor that preferentially induces NF- κ B p50. *Mol Cell Biol* 18: 5678-5689

Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC and Einhorn TA. (1999) Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 14: 1805-1815

Baron R and Rawadi G. (2007) Targeting the Wnt/ β -catenin Pathway to Regulate Bone Formation in the Adult Skeleton. *Endocrinology* 148: 2635-2643

Bar-Shavit R, Kahn A, Fenton JW 2nd and Wilner GD. (1983) Chemotactic response of monocytes to thrombin. *J Cell Biol* 96: 282-285

Battaller R and Brenner DA. (2005) Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115: 209-218

Bedoui S, Velkoska E, S Bozinovski, Jones JE, Anderson GP and Morris MJ. (2005) Unaltered TNF- α production by macrophages and monocytes in diet-induced obesity in the rat. *J Inflamm* 2: 2

Bhat A, Wooten RM and Jayasuriya AC. (2013) Secretion of growth factors from macrophages when cultured with microparticles. *J Biomed Mater Res Part A* 101: 3170-3180

Bielski RJ, Bassett GS, Fideler B and Tolo VT. (1993) Intraosseous infusions: effects on the immature physis-an experimental model in rabbits. *J Pediatr Orthop* 13: 511-515

Bizios R, Lai L, Fenton JW 2nd and Malik AB. (1986) Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils. *J Cell Physiol* 128: 485-490

Bodine PV and Komm BS. (2002) Tissue culture models for studies of hormone and vitamin action in bone cells. *Vitam Horm* 64: 101-151

Bonewald LF. (2002) Transforming Growth Factor- β , In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds). *Principles of Bone Biology*. Academic Press Publishers

Bonner JC, Osornio-Vargas AR, Badgett A and Brody AR. (1991) Differential proliferation of rat lung fibroblasts induced by the platelet-derived growth factor-AA, -AB, and BB isoforms secreted by rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5: 539-547

Bonner JC (2004) Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 255-273

Boskey AL. (1996) Matrix proteins and mineralisation: an overview. *Connect Tissue Res* 35: 357-363

Bourque WT, Gross M and Hall BK. (1993) Expression of four growth factors during fracture repair. *Int J Dev Biol* 37: 573-579

Boyce BF, Li P, Yao Z, Zhang Q, Badell IR, Schwarz EM, O'Keefe RJ and Xing L. (2005) TNF-alpha and pathologic bone resorption. *Keio J Med* 54:127-131

Braem K, Deroose CM, Luyten FP and Lories RJ. (2012) Inhibition of inflammation but not ankylosis by glucocorticoids in mice: further evidence for the entheseal stress hypothesis. *Arthritis Res Ther* 14: R59

Brancato SK and Albina JE. (2011) Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *Am J Pathol* 178: 19-25

Brighton CT. (1984) Principles of fracture healing. Part I. The biology of fracture repair. In: Murray JA, ed. *AAOS International Course Lectures*. CV Mosby, St Louis

Brill A, Elinav H and Varon D. (2004) Differential role of platelet granular mediators in angiogenesis. *Cardiovasc Res* 63: 226-235

Brown LF, Dvorak AM and Dvorak HF. (1989) Leaky vessels, fibrin deposition, and fibrosis: a sequence of events common to solid tumors and to many other types of disease. *Am Rev Respir Dis* 140: 1104-1107

Chang MK, Raggatt LJ, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Schroder K, Maylin ER, Ripoll VM, Hume DA and Allison R. Pettit. (2008) Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *J Immunol* 181: 1232-1244

Champagne CM, Takebe J, Offenbacher S and Cooper LF. (2002) Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. *Bone* 30: 26-31

Chaudhary NI, Roth GJ, Hilberg F, Müller-Quernheim J, Prasse A, Zissel G, Schnapp A and Park JE. (2007) Inhibition of PDGF, VEGF and FGF signalling attenuates fibrosis. *Eur Respir J* 29: 976-985

Chaves MD, de Souza Nunes LS, de Oliveira RV, Holgado LA, Filho HN, Matsumoto MA and Ribeiro DA. (2012) Bovine hydroxyapatite (Bio-Oss) induces osteocalcin, RANK-L and osteoprotegerin expression in sinus lift of rabbits. *J Craniomaxillofac Surg* 40: e315-320

Chen Y, Bal BS and Gorski JP. (1992) Calcium and collagen binding properties of osteopontin, bone sialoprotein, and bone acidic glycoprotein-75 from bone. *J Biol Chem* 267: 24871–24878

Chen J, Singh K, Mukherjee BB and Sodek J. (1993) Developmental expression of osteopontin (OPN) mRNA in rat tissues: evidence for a role for OPN in bone formation and resorption. *Matrix* 13: 113-123

Chen EH, Grote E, Mohler W and Vignery A. (2007) Cell-cell fusion. *FEBS Lett* 581: 2181-2193

Chikazu D, Hakeda Y, Ogata N, Nemoto K, Itabashi A, Takato T, Kumegawa M, Nakamura K and Kawaguchi HJ. (2000) Fibroblast growth factor (FGF)-2 directly stimulates mature osteoclast function through activation of FGF receptor 1 and p42/p44 MAP kinase. *Biol Chem* 275: 31444-31450

Cho TJ, Gerstenfeld LC and Einhorn TA. (2002) Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 17: 513-520

Cho HH, Kyoung KM, Seo MJ, Kim YJ, Bae YC and Jung JS. (2006) Overexpression of CXCR4 increases migration and proliferation of human adipose tissue stromal cells. *Stem Cells Dev* 15: 853-864

Choi HS, Kim JW, Cha YN and Kim C. (2006) A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells. *J Immunoassay Immunochem* 27: 31-44

Clarke B. (2008) Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3 Suppl 3: S131-139

Cohn ZA. (1978) Activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. *J Immunol* 121: 813-816

Clouthier DE, Comerford SA and Hammer RE. (1997) Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCK-TGF- β transgenic mice. *J Clin Invest* 100: 2697-2713

Conover CA. (1996) The role of insulin-like growth factors and binding proteins in bone cell biology. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds). *Principles of Bone Biology*. Academic Press, San Diego, CA

Cooper PH, Mayer P and Baggiolini MJ. (1984) Stimulation of phagocytosis in bone marrow-derived mouse macrophages by bacterial lipopolysaccharide: correlation with biochemical and functional parameters. *J Immunol* 133: 913-922

Cooper C, Campion G and Melton LJ. (1992) 3rd Hip fractures in the elderly: A world-wide projection. *Osteoporos Int* 2: 285-289

Coultas L, Chawengsaksophak K and Rossant J. (2005) Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* 438: 937-945

Crinelli R, Antonelli A, Bianchi M, Gentilini L, Scaramucci S and Magnani M. (2000) Selective inhibition of NF- κ B activation and TNF- α production in macrophages by red blood cell-mediated delivery of dexamethasone. *Blood Cells Mol Dis* 26: 211-222

Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP and Varanasi SS. (2008) The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 61: 577-587

DePalma AF, Rothman RH, Lewinnek GE, Canale ST. (1972) Anterior interbody fusion for severe cervical disc degeneration. *Surg Gynecol Obstet* 134: 755-758

Dimitriou R, Tsiridis E and Giannoudis PV. (2005) Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36: 1392-1404

DiPietro LA and Polverini PJ. (1993) Angiogenic macrophages produce the angiogenic inhibitor thrombospondin I. *Am J Pathol* 143: 678-684

Doll BA, Sfeir C, Azari K, Holland S and Hollinger JO. (2005) Craniofacial repair. In: Lieberman JR and Friedlaender GE (eds). *Bone Regeneration and Repair*. Humana Press, Totowa, NJ

Dong L and Wang C. (2013) Harnessing the power of macrophages/monocytes for enhanced bone tissue engineering. *Trends Biotechnol* 31: 342-346

El-Warrak A, Olmstead M and Rechenberg Bv. (2001) A review of aspects of loosening in total hip prosthesis. *Vet Comparative Ortho Traumatol* 3:115

El-Warrak A, Olmstead M and Apelt D. (2004) An animal model for interface tissue formation in cemented hip replacements. *Vet Surg* 33: 495-504

El-Warrak A, Olmstead M, Schneider R, Meinel L, Bettschart-Wolfisberger R, Akens MK, Auer J and von Rechenberg B. (2004a) An experimental animal model of aseptic loosening of hip prostheses in sheep to study early biochemical changes at the interface membrane. *BMC Musculoskelet Disord* 5:7

Erofeev SA and Shchepkina EA. (2008) Features of reparative osteogenesis and the management of distraction osteogenesis in external fixation. In: Solomin L. The basic principles of external skeletal fixation using the Ilizarov and other devices (ed). Springer, NY

Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto Pingarrón M and Blanco-Jerez L. (2006) Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11: E151-157

Figueiredo KA, Rossi G and Cox ME. (2009) Relaxin promotes clustering, migration, and activation states of mononuclear myelocytic cells. *Ann NY Acad Sci* 1160: 353-360

Flick DA and Gifford GE. (1984) Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* 68:167-75

Friedman SL and Arthur MJ. (1989) Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J Clin Invest* 84: 1780-1785

Fromer CH and Klintworth CK. (1975) An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal vascularization. II. Studies on the effect of leukocytic elimination on corneal vascularization. *Am J Pathol* 81: 531-544

Gajdobranski Đ and Živković D. (2003) Poremećaj zarastanja preloma. *Med Pregl* 56: 146-51

Ganss B, Kim RH and Sodek J. (1999) Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med* 10: 79-98

Gao YA, Agnihotri R, Vary CP and Liaw L. (2004) Expression and characterization of recombinant osteopontin peptides representing matrix metalloproteinase proteolytic fragments. *Matrix Biol* 23:457-466

Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, Helft J, Chow A, Elpek KG, Gordonov S, Mazloom AR, Ma'ayan A, Chua WJ, Hansen TH, Turley SJ, Merad M and Randolph GJ. (2012) Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol* 13: 1118-1128

Gerritsen EJ, Vossen JM, Van Loo IH, Hermans J, Helfrich MH, Griscelli C and Fischer A. (1994) Autosomal recessive osteopetrosis: variability of findings at diagnosis and during the natural course. *Pediatrics* 93: 247-253

Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT and Einhorn TA. (2003) Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 88: 873-884

Gifford RH and Malawista SE. (1972) The Nitroblue Tetrazolium Reaction in Human Granulocytes Adherent to a Surface. *Yale J Biol Med* 45: 119-132

Gordon S and Taylor PR. (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5: 953-964

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

Hankemeier S, Grassel S, Plenz G, Spiegel HU, Bruckner P and Probst A. (2001) Alteration of fracture stability influences chondrogenesis, osteogenesis and immigration of macrophages. *J Orthop Res* 19: 531-538

Harada S and Rodan GA. (2003) Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423: 349-355

Hedgecock NL, Hadi T, Chen AA, Curtiss SB, Martin RB and Hazelwood SJ. (2007) Quantitative regional associations between remodeling, modeling, and osteocyte apoptosis and density in rabbit tibial midshafts *Bone* 40: 627-637

Heidenreich S, Weyers M, Gong JH, Sprenger H, Nain M and Gerns D. (1988) Potentiation of lymphokine-induced macrophage activation by tumor necrosis factor- α . *J Immunol* 140: 1511-1518

Helfet DL, Kloen P, Anand N and Rosen HS. (2003) Open reduction and internal fixation of delayed unions and nonunions of fractures of the distal part of the humerus. *J Bone Joint Surg Am* 85-A: 33-40

Helfrich MH. (2003) Osteoclast Diseases. *Microsc Res Tech* 61:514-532

Hobson B and Denekamp J. (1984) Endothelial proliferation in tumors and normal tissues: continuous labeling studies. *Br J Cancer* 49: 405-413

Hoemann CD, Hurtig M, Rossomacha E, Sun J, Chevrier A, Shive MS and Buschmann MD. (2005) Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *J Bone Joint Surg Am* 87: 2671-2686

Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Robey PG, Poole AR, Pidoux I, Ward JM and Birkedal-Hansen H. (1999) MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 99: 81-92

Holmbeck K, Bianco P, Pidoux I, Inoue S, Billingham RC, Wu W, Chrysovergis K, Yamada S, Birkedal-Hansen H and Poole AR. (2005) The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *J Cell Sci* 118: 147-156

Horowitz MC, Coleman DL, Ryabry JT and Einhorn TA. (1989) Osteotropic agents induce the differential secretion of granulocyte-macrophage colony stimulating factor by the osteoblast cell line MCT3-E1. *J Bone Mineral Res* 4: 911-921

Hume DA, Ross IL, Himes SR, Sasmono RT, Wells CA and Ravasi T. (2002) The mononuclear phagocyte system revisited. *J Leukoc Biol* 72: 621-627

Hume DA. (2006) The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol* 18:49-53

Jaffe EA, Ruggiero JT and Falcone DJ. (1985) Monocytes and macrophages synthesize and secrete thrombospondin. *Blood* 65: 79-84

Jetten N, Verbruggen S, Gijbels MJ, Post MJ, De Winther MP and Donners MM. (2014) Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* 17: 109-118

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

Junquera LC and Carneiro J. (2005) Osnovi histologije: tekst i atlas. Data Status, Beograd

Kaiser GC and Polk DB. (1997) Tumor necrosis factor alpha regulates proliferation in a mouse intestinal cell line. *Gastroenterology* 112: 1231-1240

Kajdaniuk D, Marek B, Foltyn W and Kos-Kudła B. (2011) Vascular endothelial growth factor (VEGF) - part 2: in endocrinology and oncology. *Endokrynol Pol* 62: 456-464

Kalfas IH. (2001) Principles of bone healing. *Neurosurg Focus* 10: E1

Kanczler JM and Oreffo ROC. (2008) Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater* 15: 100-114

Kang SR, Han DY, Park KI, Park HS, Cho YB, Lee HJ, Lee WS, Ryu CH, Ha YL, Lee do H, Kim JA and Kim GS. (2011) Suppressive effect on lipopolysaccharide-induced proinflammatory mediators by citrus aurantium L. in macrophage RAW264.7 cells via NF- κ B signal pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*, doi: 10.1155/2011/248592

Karin M and Lin A. (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3:221-227

Karp JM, Sarraf F, Shoichet MS and Davies JE. (2004) Fibrin-filled scaffolds for bone-tissue engineering: An in vivo study. *J Biomed Mater Res* 71A: 162-171

Katić V. (1997) Specijalna patologija-skripta. Medicinski fakultet, Niš

Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP and Lane JM. (2005) The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 13: 77-86

Kharraz Y, Guerra J, Mann CJ, Serrano AL and Muñoz-Cánoves P. (2013) Macrophage Plasticity and the Role of Inflammation in Skeletal Muscle Repair. *Mediators Inflamm*, doi: 10.1155/2013/491497

Knighton DR, Hunt TK, Thakral KK, and Goodson WH, 3rd. (1982) Role of platelets and fibrin in the healing sequence: an in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis. *Ann Surg* 196: 379–388

Kobayashi M, Watanabe K, Yokoyama S, Matsumoto C, Hirata M, Tominari T, Inada M and Miyaura C. (2012) Capsaicin, a TRPV1 Ligand, Suppresses bone resorption by inhibiting prostaglandin E production of osteoblasts, and attenuates the inflammatory bone loss induced by lipopolisaccharide. *ISRN Pharmacol* doi: 10.5402/2012/439860

Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC and Einhorn TA. (2001) Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB

ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 16: 1004-1014

Konttinen YT, Zhao D, Beklen A, Ma G, Takaqi M, Kivelä-Rajamäki M, Ashammakhi N and Santavirta S. (2005) The microenvironment around total hip replacement prostheses. *Clin Orthop Relat Res* 430: 28-38

Lacey DC, Simmons PJ, Graves SE and Hamilton JA. (2009) Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation. *Osteoarthritis Cartilage*. 17: 735-742

Lagasse E and Weissman IL. (1996) Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *J Immunol Methods* 197:139-150

Lanyon LE. (1993) Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int* 53: S102-6 discussion S106-7

Lapara NJ 3rd and Kelly BL. (2010) Suppression of LPS-induced inflammatory responses in macrophages infected with *Leishmania*. *J Inflamm (Lond)* 7: 8

Lech M and Anders HJ. (2013) Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochim Biophys Acta* 1832: 989-997

Lee MH, Kim YJ, Kim HJ, Park HD, Kang AR, Kyung HM, Sung JH, Wozney JM, Kim HJ and Ryoo HM. (2003) BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *J Biol Chem* 278: 34387-34394

Lee MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM and Ryoo HM. (2003a) BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun* 309: 689-694

Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P and Karsenty G. (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130: 456-469

Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi BS, Ruhrberg C and Cantley LG. (2011) Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol* 22: 317-326

Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V and Nuseir N. (1987) Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis factor- α . *Nature* 329: 630-632

Li L, Khansari A, Shapira L, Graves DT and Amar S. (2002) Contribution of interleukin-11 and prostaglandin(s) in lipopolysaccharide-induced bone resorption in vivo. *Infect Immun* 70: 3915-3922

Li M, Amizuka N, Oda K, Tokunaga K, Ito T, Takeuchi K, Takagi R and Maeda T. (2004) Histochemical evidence of the initial chondrogenesis and osteogenesis in the periosteum of a rib fractured model: implications of osteocyte involvement in periosteal chondrogenesis. *Microsc Res Tech* 64: 330-342

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

Liaskou E, Wilson DV and Oo YH. (2012) Innate Immune Cells in Liver Inflammation. *Mediators Inflamm*, doi: 10.1155/2012/949157

Liaw L, Birk DE, Ballas CB, Whitsitt JS, Davidson JM and Hogan BL. (1998) Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *J Clin Invest* 101: 1468-1478

Lieberman JR, Daluiski A and Einhorn TA. (2002) The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 84-A: 1032-1044

Liu MM, Wang DL and Liu DY. (1990) Interactions between fibrin, collagen and endothelial cells in angiogenesis. *Adv Exp Med Biol* 281: 319-331

Luo JC, Cho CH, Ng KM, Hsiang KW, Lu CL, Chen TS, Chang FY, Lin HC, Perng CL and Lee SD. (2009) Dexamethasone inhibits tumor necrosis factor- α -stimulated gastric epithelial cell migration. *J Chin Med Assoc.* 72:509-514.

Macaulay IC, Carr P, Gusnanto A, Ouwehand WH, Fitzgerald D and Watkins NA. (2005) Platelet genomics and proteomics in human health and disease. *J Clin Invest* 115: 3370-3377

Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, Carmeliet G and Kronenberg HM. (2010) Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell* 19: 329-344

Malik AH, Tabasum R, Ahmad M, Shah AA and Ahmad I. (2013) Autogenous platelet rich plasma in healing of bone defects. *World J Med Med Sci Res* 1: 82-84

Manolagas SC. (2000) Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21: 115-137

Marotti G. (2000) The osteocyte as a wiring transmission system. *J Musculoskeletal Neuronal Interact* 1: 133-136

Marsell R and Einhorn TA. (2011) The biology of fracture healing. *Injury* 42: 551-555

Martin SM, Schwartz JL, Giachelli CM and Ratner BD. (2004) Enhancing the biological activity of immobilized osteopontin using a type-1 collagen affinity coating. *J Biomed Mater Res A* 70:10-19

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

McKenna TM, Reusch DW and Simpkins CO. (1988) Macrophage-conditioned medium and interleukin 1 suppress vascular contractility. *Circ Shock* 25: 187-196

Melton LJ. (1995) Epidemiology of fractures. In: Riggs BL, Melton LJ (eds). *Osteoporosis Etiology, Diagnosis and Management* (2nd ed). Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa

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

Moldovan L and Moldovan NI. (2005) Role of monocytes and macrophages in angiogenesis. *EXS* 94: 127-146

Moon H, Lee JG, Shin SH and TJ Kim. (2012) LPS-Induced Migration of Peritoneal B-1 Cells is Associated with Upregulation of CXCR4 and Increased Migratory Sensitivity to CXCL12. *J Korean Med Sci* 27: 27-35

Moore JW III and Sholley MM. (1985) Comparison of the neovascular effects of stimulated macrophages and neutrophils in autologous rabbit corneas. *Am J Pathol*. 120: 87-98

Mosmann T. (1983) Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods*. 65: 55-63

Mosser DM and Edwards JP. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8: 958-969

Mountziaris PM and Mikos AG. (2008) Modulation of the Inflammatory Response for Enhanced Bone Tissue Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 14: 179-186

Mountziaris PM, Spicer PP, Kasper FK and Mikos AG. (2011) Harnessing and Modulating Inflammation in Strategies for Bone Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 17: 393-402

Muschler GF, Lane JM and Dawson EG. (1990) The biology of spinal fusion. In: Cotler JM and Cotler HP (eds). *Spinal Fusion Science and Technique*. Springer-Verlag, Berlin

Najman S, Savic V, Djordjevic Lj, Ignjatovic N, Uskokovic D. (2004) Biological evaluation of hydroxyapatite/poly-L-lactide (HAp/PLLA) composite biomaterials with poly-L-lactide of different molecular weights intraperitoneally implanted into mice. *Biomed Mater Eng* 14: 61-70

Nakamura H. (2007) Morphology, Function, and Differentiation of Bone Cells. *J Hard Tissue Biology* 16: 15-22

Naldini A and Carraro F. (2005) Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4: 3-8

Neve A, Corrado A and Cantatore FP. (2011) Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res* 343: 289-302

Nielsen BW, Mukaida N, Matsushima K and Kasahara T. (1994) Macrophages as producers of chemotactic proinflammatory cytokines. *Immunol Ser* 60: 131-142

Noble BS, Stevens H, Loveridge N and Reeve J. (1997) Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone. *Bone* 20: 273-282

Nucera S, Bizziato D and De Palma M. (2011) The interplay between macrophages and angiogenesis in development, tissue injury and regeneration. *Int J Dev Biol* 55: 495-503

Nuss KM. and von Rechenberg B. (2008) Biocompatibility Issues with Modern Implants in Bone - A Review for Clinical Orthopedics. *Open Orthop J* 2: 66-78

O'Brien ER, Garvin MR, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM and Giachelli CM. (1994) Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and

endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb* 14: 1648–1656

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

Osterberg PH, Wallace RG, Adams DA, Crone RS, Dickson GR, Kanis JA, Mollan RA, Nevin NC, Sloan J and Toner PG. (1988) Familial expansile osteolysis. A new dysplasia. *J Bone Joint Surg Br* 70: 255-260

Pelegriin P and Surprenant A. (2009) Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1b release through pyrophosphates. *EMBO J* 28: 2114–2127

Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L and Guillemain G. (2000) Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 18: 959-963

Petricevich VL, Reynaud E, Cruz AH and Possani LD. (2008) Macrophage activation, phagocytosis and intracellular calcium oscillations induced by scorpion toxins from *Tityus serrulatus*. *Clin Exp Immunol* 154: 415-423

Pirracco RP, Reis RL and Marques AP. (2013) Effect of monocytes/macrophages on the early osteogenic differentiation of hBMSCs. *J Tissue Eng Regen Med* 7: 392-400

Polverini PJ, Cotran RS, Gimbrone MA Jr, Unanue, ER. (1977) Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* 269: 804-806

Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL and Kang AH. (1987) Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 165: 251-256

Poumarat G and Squire P. (1993) Comparison of mechanical properties of human, bovine bone and a new processed bone xenograft. *Biomaterials* 14: 337-340

Prolo DJ. (1990) Biology of bone fusion. *Clin Neurosurg* 36: 135-146

Pross C, Farooq MM, Angle N, Lane JS, Cerveira JJ, Xavier AE, Freischlag JA, Law RE and Gelabert HA. (2002) Dexamethasone inhibits vascular smooth muscle cell migration via modulation of matrix metalloproteinase activity. *J Surg Res* 102: 57-62

Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R and Wenstrup RJ. (1992) Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* 7: 683-692

Reece GP and Patrick Jr. CW. (1998) *Frontiers in Tissue Engineering* (1st ed). Pergamon, Oxford

Robey PG. (2002) Bone Matrix Proteoglycans and Glycoproteins. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA (eds) *Principles of Bone Biology*. Academic Press Publishers

Rose FR and Oreffo RO. (2002) Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem Biophys Res Commun* 292: 1-7

Rundle CH, Wang H, Yu H, Chadwick RB, Davis EI, Wergedal JE, Lau KH, Mohan S, Ryaby JT and Baylink DJ. (2006) Microarray analysis of gene expression during the inflammation and endochondral bone formation stages of rat femur fracture repair. *Bone* 38: 521-529

Sabolinski ML, Alvarez O, Auletta M, Mulder G and Parenteau NL. (1996) Cultured skin as a 'smart material' for healing wounds: experience in venous ulcers. *Biomaterials* 17: 311-320

Sassa S, Kawakami M and Cerami A. (1983) Inhibition of the growth and differentiation of erythroid precursor cells by an endotoxin-induced mediator from peritoneal macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 1717-1720

Schmid J, Wallkamm B, Hammerle CH, Gogolewski S and Lang NP. (1997) The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment. *Clin Oral Implants Res* 8: 244-248

Schwartz Z, Weesner T, Van Dijk S, Cochran DL, Melloning JT, Lohmann CH, Carnes DL, Goldstein M, Dean DD and Boyan BD. (2000) Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. *J Periodontol* 71: 1258-1269

Scully CM, Hays WD and Fischer TH. (2010) Macrophage pro-inflammatory cytokine secretion is enhanced following interaction with autologous platelets. *J Inflamm* 7: 53

Senzel L, Gnatenko DV and Bahou WF. (2009) The platelet proteome. *Curr Opin Hematol* 5: 329-333

Sfeir C, Ho L, Doll BA, Azari K and Hollinger JO. (2005) Fracture repair. In: Lieberman JR and Friedlaender GE (eds). *Bone Regeneration and Repair*. Humana Press

Shapiro SD, Campbell EJ, Senior RM and Welgus HG. (1991) Proteinases secreted by human mononuclear phagocytes. *J Rheumatol Suppl* 27: 95-98

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

Shiau MY, Chiou HL, Lee YL, Kuo TM and Chang YH. (2001) Establishment of a consistent L929 bioassay system for TNF- α quantitation to evaluate the effect of lipopolysaccharide, phytomitogens and cytodifferentiation agents on cytotoxicity of TNF- α secreted by adherent human mononuclear cells. *Mediators Inflamm* 10: 199-208

Sica A and Mantovani A. (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122: 787-795

Simon CG Jr, Khatri CA, Wight SA and Wang FW. (2002) Preliminary report on the biocompatibility of a moldable, resorbable, composite bone graft consisting of calcium phosphate cement and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *J Orthop Res* 20: 473-482

Simpson DM and Ross R. (1972) The neutrophilic leukocyte in wound repair. A study with antineutrophil serum. *J Clin Invest*. 51: 2009-2023

Sipe JB, Zhang J, Waits C, Skikne B, Garimella R and Anderson HC. (2004) Localization of bone morphogenetic proteins (BMPs)-2, -4, and -6 within megakaryocytes and platelets. *Bone* 35: 1316-1322

Sivakumar P and Das AM. (2008) Fibrosis, chronic inflammation and new pathways for drug discovery. *Inflamm Res* 57: 410-418

Soltan M, Rohrer MD and Prasad HS. (2012) Monocytes: super cells for bone regeneration. *Implant Dent* 21: 13-20

Spitzer RS, Perka C, Lindenhayn K and Zippel H. (2002) Matrix engineering for osteogenic differentiation of rabbit periosteal cells using α -tricalcium phosphate particles in a three-dimensional fibrin culture. *J Biomed Mater Res* 59: 690-696

Steinman RM and Moberg CL. (1994) Zanvil Alexander Cohn 1926-1993. *J Exp Med* 179: 1-30

Stewart CC, Lin H and Adles C. (1975) Proliferation and colony-forming ability of peritoneal exudate cells in liquid culture. *J Exp Med* 141: 1114-1132

Sunderkötter C, Goebeler M, Schulze-Osthoff K, Bhardwaj R and Sorg C. (1991) Macrophage-derived angiogenesis factors. *Pharmacol Ther* 51: 195-216

- Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R and Sorg C. (1994) Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Bio* 55: 410-422
- Su-Yun L and Won-Bong P. (2005) Production of Cytokine and NO by RAW 264.7 Macrophages and PBMC In Vitro Incubation with Flavonoids. *Arch Pharm Res* 28: 573-581
- Szaba FM and Smiley ST. (2002) Roles for thrombin and fibrin(ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo. *Blood* 99: 1053-1059
- Tajima T, Murata T, Aritake K, Urade Y, Hirai H, Nakamura M, Ozaki H and Hori MJ. (2008) Lipopolysaccharide induces macrophage migration via prostaglandin D(2) and prostaglandin E(2). *Pharmacol Exp Ther* 326: 493-501
- Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, Martin TJ, Suda T. (1988) Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 123: 2600-2602
- Takahashi M, Galligan C, Tessarollo L and Yoshimura T. (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), not MCP-3, is the primary chemokine required for monocyte recruitment in mouse peritonitis induced with thioglycollate or zymosan A. *J Immunol* 183: 3463-3471
- Tapety FI, Amizuka N, Uoshima K, Nomura S and Maeda T. (2004) A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. *Clin Oral Implants Res* 15: 315-324
- Taylor VL and Spencer EM. (2001) Characterization of insulin-like growth factor-binding protein-3 to a novel receptor on human platelet membranes. *J Endocrinol* 168: 307-313
- Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD and Gordon S. (2005) Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol* 23: 901-944
- Thompson WD, Campbell R and Evans T. (1985) Fibrin degradation and angiogenesis: quantitative analysis of the angiogenic response in the chick chorioallantoic membrane. *J Pathol* 145: 27-37
- Thompson WD, Smith EB, Stirk CM, Marshall FI, Stout AJ, Kocchar A. (1992) Angiogenic activity of fibrin degradation products is located in fibrin fragment E. *J Pathol* 168: 47-57

- Torrente Y, El Fahime E, Caron NJ, Del Bo R, Belicchi M, Pisati F, Tremblay JP and Bresolin N. (2003) Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) Stimulates Chemotactic Response in Mouse Myogenic Cells. *Cell Transplant* 12: 91-100
- Totowa, NJ Shapiro SD, Campbell EJ, Senior RM and Welgus HG. (1991) Proteinases secreted by human mononuclear phagocytes. *J Rheumatol Suppl* 27: 95-98
- Tonna EA. (1972) Electron microscopic study of osteocyte release during osteoclasts in mice of different ages. *Clin Orthop* 87: 311-317
- Trojanowska M. (2008) Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatology* 47 (suppl 5): v2-v4
- Trubiani O, Fulle S, Traini T, Paludi M, la Rovere R, Orciani M, Caputi S and Piattelli A. (2010) Functional assay, expression of growth factors and proteins modulating bone-arrangement in human osteoblasts seeded on an anorganic bovine bone biomaterial. *Eur Cell Mater* 20: 72-83
- Trueta J. (1963) The role of the vessels in osteogenesis. *J Bone Joint Surg* 45B: 402-418
- Tsai WC, Tang FT, Wong MK and Pang JH. (2003) Inhibition of tendon cell migration by dexamethasone is correlated with reduced α -smooth muscle actin gene expression: a potential mechanism of delayed tendon healing. *J Orthop Res* 21: 265-271
- Tzaphlidou M. (2008) Bone Architecture: Collagen Structure and Calcium/Phosphorus Maps. *J Biol Phys* 34: 39-49
- Ueha S, Shand FH and Matsushima K. (2012) Cellular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis. *Front Immunol* 3:71
- Väänänen HK and Laitala-Leinonen T. (2008) Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys* 473: 132-138
- Van der Goes A, Hoekstra K, Van den Berg TK and Dijkstra CDJ. (2000) Dexamethasone promotes phagocytosis and bacterial killing by human monocytes/macrophages in vitro. *Leukoc Biol* 67: 801-807
- Van Hinsbergh VW, Collen A and Koolwijk P. (2001) Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 936: 426-437
- Van Steenberghe D, Callens A, Geers L and Jacobs R. (2000) The Clinical use of deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration in conjunction with immediate implant installation. *Clin Orthop Relat Res* 11: 210-216

Vasiljevic PJ, Najman SJ, Djordjevic LjB, Savic VP, Vukelic MD., Zivanov-Curlis JZ, Ignjatovic NL and Uskokovic DP. (2009) Ectopic osteogenesis and hematopoiesis after implantation of bone marrow cells seeded on HAp/PLLA scaffold. *Hem Ind* 63: 301-307

Vega-Avila E and Pugsley MK. (2011) An Overview of Colorimetric Assay Methods Used to Assess Survival or Proliferation of Mammalian Cells. *Proc West Pharmacol Soc* 54: 10-14

Verborgt O, Gibson GJ and Schaffler MB. (2000) Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *J Bone Miner Res* 15: 60-67

Viguet-Carrin S, Garnero P and Delmas PD. (2006) The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int* 17: 319-336

Vunjak-Novakovic G and Freshney RI. (2006) *Culture of Cells for Tissue Engineering* (1st ed). John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey

Vynios DH, Papageorgakopoulou N, Sazakli H and Tsiganos CP. (2001) The interactions of cartilage proteoglycans with collagens are determined by their structures. *Biochimie* 83: 899-906

Walker DG and Nicolas Andry. (1973) Experimental osteopetrosis. *Clin Orthop Relat Res* 97: 158-174

Wallace RGH, Barr RJ, Osterberg PH and Mollan RAB. (1989) Familial expansile osteolysis. *Clin Orthop Rel Res* 248: 265-277

Wang A, Ding X, Sheng S and Yao Z. (2010) Bone morphogenetic protein receptor in the osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. *Yonsei Med J* 51: 740-745

Whitecloud TS. (1976) Complications of anterior cervical fusion. *Instr Course Lect* 27: 223-227

Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW Jr, Ahmed-Ansari A, Sell KW, Pollard JW, Stanley ER. (1990) Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4828-4832

Williams DF. (1999) *Bone Engineering* (1st ed). Emsquared, Toronto

Williams GT and Williams WJ. (1983) Granulomatous inflammation - a review. *J Clin Pathol* 36: 723-733

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM and Wang EA. (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-1534

Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, López-Soriano F, Argilés JM, Bogdan C and Celada A. (2000) LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF- α . *Blood*. 95: 3823-3831

Xia Z and Triffitt JT. (2006) A review on macrophage responses to biomaterials. *Biomed Mater* 1: R1-9

Xuan JW, Hota C and Chambers AF. (1994) Recombinant GST-human osteopontin fusion protein is functional in RGD-dependent cell adhesion. *J Cell Biochem* 54:247-255

Yaguchi T, Fukuda Y, Ishizak, M and Yamanaka N. (1998) Immunohistochemical and gelatin zymography studies for matrix metalloproteinases in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Pathol Int* 48: 945-963

Yang Q, McHugh KP, Patntirapong S, Gu X, Wunderlich L and Hauschka PV. (2008) VEGF enhancement of osteoclast survival and bone resorption involves VEGF receptor-2 signaling and beta3-integrin. *Matrix Biol* 27: 589-599

Yannas IV. (2001) *Tissue and Organ Regeneration in Adults*. Springer-Verlag, NY

Yaszemski MJ, Oldham JB, Lu L and Currier BL. (1994) 'Bone Engineering (1st ed). Em squared, Toronto

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N and Suda T. (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/ RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3597-3602

Yasuda H, Kuroda S, Shichinohe H, Kamei S, Kawamura R and Iwasaki Y. (2010) Effect of biodegradable fibrin scaffold on survival, migration and differentiation of transplanted bone marrow stromal cells after cortical injury in rats. *J Neurosurg* 112: 336-344

Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD and Nishikawa S. (1990) The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345: 442-444

You LD, Weinbaum S, Cowin SC, Schaffler MB. (2004) Ultrastructure of the osteocyte process and its pericellular matrix. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 278: 505-513

Yücesoy K, Mertol T, Ozer H and Ozer E. (1999) An infantile intraosseous hematoma of the skull. Report of a case and review of the literature. *Childs Nerv Syst* 15:69-72

Yu-Yahiro JA, Michael RH, Dubin NH, Fox KM, Sachs M, Hawkes WG, Hebel JR, Zimmerman SI, Shapiro J and Magaziner J. (2001) Serum and urine markers of bone metabolism during the year after hip fracture. *J Am Geriatr Soc* 49: 877- 883

Zebboudj A, Imura M and Bostrom K. (2002) Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 277: 4388-4390

Zhang Z, Chen J and Jin D. (1998) Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB stimulates osteoclastic bone resorption directly: the role of receptor beta. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 190-194

Zhao S, Zhang YK, Harris S, Ahuja SS and Bonewald LF. (2002) MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res* 17: 2068-2079

Zupan J, Jeras M and Marc J. (2013) Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. *Biochem Med* 23: 43-63

BIOGRAFIJA AUTORA

Jelena Živković (rođena Janićijević) rođena je 14. februara 1983. godine u Nišu, Republika Srbija. Diplomirala je septembra 2006. godine na Odseku Biologija i ekologija Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu sa prosečnom ocenom tokom studija 9.65. Tokom osnovnih studija bila je stipendista Ministarstva prosvete Republike Srbije za 2002/03. godinu i stipendista Fonda za mlade talente grada Niša za 2004/05. i 2005/06. godinu. Proglašena je za najboljeg studenta u školskoj 2004/05. godini i najboljeg diplomiranog studenta u školskoj 2005/06. godini na Odseku biologija i ekologija Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu.

Odmah nakon diplomiranja, 2006. godine upisuje doktorske studije, modul Biologija ćelija i tkiva na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Položila je sve programom predviđene ispite sa maksimalnim ocenama. Od 2007. godine bila je zaposlena kao istraživač-pripravnik na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu, a od 2008. kao saradnik u nastavi, a zatim od 2010. godine kao asistent na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu. Od 2007. do 2011. godine učestvovala je u radu na projektu Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Regeneracija skeletnih tkiva potpomognuta biomaterijalima kao tkivnim matricama - *in vivo* i *in vitro* studija“, a od 2011. na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Virtuelni koštano zglobovi čoveka i njegova primena u pretkliničkoj i kliničkoj praksi“.

U saradnji sa drugim autorima je objavila: tri rada u časopisima međunarodnog značaja (M23), jedan rad u časopisu nacionalnog značaja (M52), dvanaest saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova štampanih u izvodu (M34) i tri saopštenja sa nacionalnih naučnih skupova štampanih u izvodu (M64).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Јелена М. Живковић

број индекса БО 060199

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

“Модулаторни ефекат макрофага на остеогени процес у ектопичном *in vivo* моделу и у различитим условима *in vitro*”

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

Потпис докторанда

У Београду, 27.05.2014.

Јелена Живковић

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора	Јелена М. Живковић
Број индекса	БО 060199
Студијски програм	Биологија ћелија и ткива
Наслов рада	Модулаторни ефекат макрофага на остеогени процес у ектопичном <i>in vivo</i> моделу и у различитим условима <i>in vitro</i>
Ментори	Др Стево Најман, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу Др Маја Чакић-Милошевић, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду
Потписана	Јелена М. Живковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 27.05.2014.

Јелена Живковић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

“Модулаторни ефекат макрофага на остеогени процес у ектопичном *in vivo* моделу и у различитим условима *in vitro*”

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 27.05.2014.

Јелена Нивковић