

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Milda
ALKSNĖ

Nuo substrato priklausantis kamieninių ląstelių likimas: įžvalgos dirbtinio kaulinio audinio kūrimui

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
biochemija N 004

VILNIUS 2020

Disertacija rengta 2014 – 2019 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos institute.

Mokslinė vadovė:

dr. Virginija Bukelskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

VILNIUS UNIVERSITY

Milda
ALKSNĖ

Substrate-dependent fate of stem cells: insights into artificial bone fabrication

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Science,
Biochemistry N 004

VILNIUS 2020

This dissertation was written between 2014 and 2019 in Vilnius University Life Sciences Center, Institute of Biochemistry.

Academic supervisor:

Dr. Virginija Bukelskienė, Vilnius University, Natural Science, Biochemistry - N 004).

TURINYS

SANTRUMPOS	8
ĮVADAS	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	14
1.1 Kaulinis audinys.....	14
1.2 Kaulinio audinio ląstelės.....	15
1.3 Osteoblastų formavimasis ir diferenciacija.....	16
1.4 Kaulinio audinio ECM.....	21
1.4.1 Neorganinė kaulinio audinio ECM dalis.....	21
1.4.2 Organinė kaulinio audinio ECM dalis.....	21
1.5 Kaulinio audinio regeneracija.....	29
1.6 Audinių inžinerija kaulinio audinio regeneracijai.....	31
1.6.1 Kamieninės ląstelės kaulo regeneracijoje.....	31
1.6.2 Karkasų vaidmuo kaulinio audinio inžinerijoje.....	36
1.6.3 Signalinės molekulės kaulo regeneracijoje.....	46
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	50
2.1 Medžiagos.....	50
2.1.1 Reagentai.....	50
2.1.2 Dažai ir antikūnai.....	51
2.1.3 Ląstelės, jų auginimo terpės ir komponentai.....	52
2.1.4 Karkasų gamybai naudotos medžiagos.....	52
2.1.5 Tirpalai.....	52
2.2 Metodai.....	54
2.2.1 Pirminių ląstelių linijų gavimas ir charakterizavimas.....	54
2.2.1.1 Ląstelių išskyrimas, auginimas ir piminės kultūros gryninimas	54
2.2.1.2 Paviršiaus žymenų nustatymas.....	55
2.2.1.3 Multipotenciškumo vertinimas.....	56
2.2.1.4 Kraujagyslių formavimo testas.....	56
2.2.1.5 AcLDL endocitozės testas.....	57
2.2.2 Ląstelių genetinis modifikavimas.....	57

2.2.2.1	Lentiviruso dalelių surinkimas.....	57
2.2.2.2	Lentiviruso transdukcija į ląsteles.....	58
2.2.3	Karkasų paruošimas ir charakteristikos	58
2.2.3.1	Skirtingų mikrostruktūrų karkasų spausdinimas.....	58
2.2.3.2	Kompozitinio filamento paruošimas.....	58
2.2.3.3	Kompozitinių karkasų gamyba	59
2.2.3.4	PLA karkasų padengimas ECM baltymais	59
2.2.3.5	Karkasų SEM analizė.....	60
2.2.3.6	Karkasų hidrofobiškumo nustatymas.....	60
2.2.3.7	Baltymų adsorbcijos ant karkasų vertinimas	60
2.2.4	Ląstelių sąveikos su karkasu analizė.....	61
2.2.4.1	Ląstelių morfologijos ir adhezijos vizualizavimas....	61
2.2.4.2	Fokalinių adhezijų vertinimas.....	62
2.2.4.3	Migracijos analizė.....	63
2.2.4.4	Ląstelių dauginimosi vertinimas	64
2.2.4.5	Kokultūros analizė	65
2.2.4.6	Sekretomose esančių citokinų tyrimas.....	65
2.2.5	Ląstelių osteogenezės tyrimas.....	66
2.2.5.1	Osteogeninės diferenciacijos indukcija.....	66
2.2.5.2	ALP aktyvumo vertinimas	67
2.2.5.3	Kolageno kiekio nustatymas	67
2.2.5.4	Osteogeninėje diferenciacijoje dalyvaujančių baltymų genų raiškos analizė	68
2.2.5.5	TU mineralizacijos vertinimas	69
2.2.6	Statistinė duomenų analizė.....	69
3.	REZULTATAI	71
3.1	Ląstelių charakterizavimas.....	71
3.1.1	Dantų pulpos kamieninės ląstelės	71
3.1.2	Endotelinės ląstelės pirmtakės	72
3.2	Substrato topografijos įtaka ląstelių elgsenai	74
3.2.1	PLA karkasų makrostruktūra	74
3.2.2	PLA karkasų topografijos įtaka DPSC morfologijai ir proliferacijai.	75

3.2.3 Paviršiaus topografijos vaidmuo ląstelių osteogenezėje	78
3.2.3.1 Indukuota osteogeninė diferenciacija	78
3.2.3.2 Spontaninė osteogeninė diferenciacija.....	82
3.3 Karkaso cheminės sudėties įtaka ląstelių likimui.....	87
3.3.1 Kompozitinių karkasų fizinės savybės.....	87
3.3.2 Biokeramikos priedų poveikis ląstelių adhezijai.....	89
3.3.3 Kompozitinių PLA karkasų įtaka DPSC migracijai ir proliferacijai..	92
3.3.4 Kompozitų poveikis osteogeninei ląstelių diferenciacijai.....	93
3.4 Paviršiaus dekoravimo įtaka ląstelių likimui	97
3.4.1 Ląstelių kilmės ECM baltymais padengtų karkasų fizinės savybės...	97
3.4.2 ECM baltymų įtaka ląstelių adhezijai	99
3.4.3 Biodekoravimo ECM baltymais poveikis ląstelių migracijai ir proliferacijai	101
3.4.4 ECM baltymais dengtų PLA karkasų įtaka osteogeninei ląstelių diferenciacijai.....	102
3.5 Tikėtinas organizmo atsakas į skirtingus dirbtinio kaulinio audinio konstruktus	106
3.5.1 Konstrukto (DPSC-karkasas) siunčiamas signalas organizmui	106
3.5.2 Konstrukto (DPSC-karkasas) įtaka angiogenezės indukcijai.....	108
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	111
IŠVADOS	125
MOKSLINIAI PASIEKIMAI	126
FINANSINĖ PARAMA	128
PADĖKA	129
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	130
PRIEDAI.....	159

SANTRUMPOS

- Ac LDL - acetilinti mažo tankio lipoproteinai (angl. *Acetylated low-density lipoproteins*)
- ALP – fermentas šarminė fosfatazė (angl. *Alkaline Phosphatase*)
- ARS – alizarino raudonasis S (angl. *Alizarin red S*)
- BG – bioaktyvus stiklas (angl. *bioglass*)
- BMP - kaulo morfogeninis baltymas (angl. *Bone morphogenetic protein*)
- BMSC – kaulų čiulpų kilmės kamieninės ląstelės (angl. *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells*)
- BSA – jaučio serumo albuminai (angl. *Bovine serum albumins*)
- BSP – kaulo sialo baltymas (angl. *Bone sialoprotein*)
- Cbfb – transkripcijos koaktyvatorius, pagrindinis prisitvirtinimo veiksnys β (angl. *Transcriptional coactivator core binding factor β*)
- CCL5 – chemokino (C-C motyvo) ligandas 5 (angl. *Chemokine (C-C motif) ligand 5*)
- CINC - citokinų-indukuojamų neutrofilų chemoatraktantų šeimos baltymai (angl. *cytokine-induced neutrophil chemoattractant*)
- CX3CL1 – chemokino (C-X-C motyvo) ligandas 1 (angl. *Chemokine (C-X-C motif) ligand 1*)
- CXCL10 – C-X-C motyvo chemokinas 10 (angl. *C-X-C motif chemokine 10*)
- DMEM – Dulbeco modifikuota Eagle'o terpė (angl. *Dulbecco's modified Eagle medium*)
- DMSO – dimetilsulfoksidas (angl. *Dimethyl sulfoxide*);
- DPSC – dantų pulpos kilmės kamieninės ląstelės (angl. *Dental pulp-derived stem cells*)
- ECM – tarpląstelinis užpildas (angl. *Extracellular matrix*)
- EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis (angl. *Ethylenediaminetetraacetic acid*)
- ESC - embrioninės kamieninės ląstelės (angl. *Embryonic stem cells*)
- PBS – fosfatinis buferinis tirpalas (angl. *Phosphate-buffered saline*)
- FFF - lydyto pluošto gamybos technologija (angl. *Fused Filament Fabrication*)
- FBS – fetalinis veršelių serumas (angl. *Fetal Bovine Serum*)
- GAPDH - glicerinaldehido 3-fosfato dehidrogenazė (angl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)
- HA – hidroksiapatitas (angl. *Hydroxyapatite*)
- HH – baltymų šeima (angl. *Hedgehog*)
- YAP – su *yes* baltymu sąveikaujantis baltymas (angl. *yes-associated protein*)
- iPSC - indukuotos pluripotentinės kamieninės ląstelės (angl. *Induced pluripotent stem cells*)
- IL-1ra - interleukinas 1ra (angl. *Interleukin-1ra*)
- IL-6 – interleukinas 6 (angl. *Interleukin-6*)
- IMDM – Iskovo modifikuota Dulbeco terpė (angl. *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*)

SC – kamieninės ląstelės (angl. *Stem cells*)
 ColI – I tipo kolagenas (angl. *Collagen type I*)
 ColIV - V tipo kolagenas (angl. *Collagen type V*)
 MSC – mezenchiminės kamieninės ląstelės (angl. *Mesenchymal stem cells*)
 SDS – natrio dodecilsulfatas (angl. *Sodium dodecyl sulfate*)
 NELL-1 – į Nel panašus baltymas 1 (angl. *(Nel)-like protein type 1*)
 OCN – osteokalcinas (angl. *Osteocalcin*)
 ONN – osteonektinas (angl. *Osteonectin*)
 OPN – osteopontinas (angl. *Osteopontin*)
 PCL – polikaprolaktonas (angl. *polycaprolactone*)
 PDGF – trombocitų kilmės augimo veiksnys (angl. *Platelet-Derived Growth Factor*)
 PDSC – antkaulio kilmės kamieninės ląstelės (angl. *Periosteum-derived stem cells*)
 PGA – poliglikolinė rūgštis (angl. *polyglycolic acid*)
 PESC – plaučių kamieno kraujagyslės endotelio kamieninės ląstelės (angl. *Pulmonary trunk blood vessels endothelial stem cells*)
 PLA – polilaktinė rūgštis (angl. *polylactic acid*)
 Runx2 - su Runt baltymo domenu susijęs transkripcijos veiksnys 2 (angl. *Runt-related transcription factor 2*)
 SEM - skenuojantis elektronų mikroskopas (angl. *scanning electron microscope*)
 SIBLINGs – glikoproteinų grupė, aptinkama kaulinio audinio tarpląsteliniam užpilde (angl. *Small Integrin-Binding Ligands with N-linked Glycosylation*)
 sICAM-1 – tirpi tarpląstelinė adhezijos molekulė 1 (angl. *Soluble intercellular adhesion molecule-1*)
 SKL - suaugusio organizmo kamieninės ląstelės;
 Sp7 – transkripcijos veiksnys Sp7 (angl. *Transcription factor Sp7*)
 SSC – natrio citrato tirpalas (angl. *Saline sodium citrate*);
 TCP - trikalcio fosfatas ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)
 TGF- β - transformuojantis augimo veiksnys β (angl. *Transforming growth factor β*)
 TIMP-1 – TIMP metalopeptidazės slopiklis 1(angl. *TIMP metallopeptidase inhibitor 1*)
 ECM – tarpląstelinis užpildas
 VEGF – kraujagyslių endotelio augimo veiksnys (angl. *Vascular endothelial growth factor*)
 WNT – baltymų šeima (angl. *Wingless-Type*)

ĮVADAS

Gyvo audinio ląstelės, sąveikaudamos tarpusavyje bei su užląsteline aplinka, užtikrina pagrindinius fiziologinius procesus ir darnų daugialąsčio organizmo funkcionavimą. Normalioms, gyvoms ląstelėms reikia daugiau, nei tik laikytis tarpusavyje ar tvirtintis prie substrato, joms būtina stebėti savo aplinką ir reaguoti į kaimyninių ląstelių elgesį bei tarpląstelinės aplinkos pasikeitimus. Ypatingas vaidmuo audiniuose tenka kamieninėms ląstelėms, kurių sąveikos su aplinka metu vyksta organizmo atsinaujinimo procesai.

Siekiant suprasti visų šių biologinių procesų mechanizmus, kuriami įvairūs *in vitro* modeliai, kurie imituoja daugybę biologinių reiškinių, tokių kaip ląstelių-ląstelių sąveika, ląstelių-aplinkos sąveika, vidiniai ląstelių tinklai bei kt. Žinios apie biologinius kontaktus ir jų įtaką ląstelių likimui yra svarbios tiek teoriniu, tiek ir praktiniu aspektu. Viena iš galimų praktinio taikymo sričių – dirbtinio audinio formavimas, panaudojant ląstelių sąveikos su išoriniu pasauliu mechanizmus.

Organų bei audinių funkcijų sutrikimas ar praradimas, kuris didele dalimi gali priklausyti nuo „neteisingų“ ląstelių sąveikų, yra viena opiausių problemų medicinoje. Iki šiol tokie susirgimai yra gydomi atliekant organų/audinių transplantaciją. Nors ši procedūra jau padėjo šimtams tūkstančių pacientų, tačiau po transplantacijos medikai iki šiol vis dar negali garantuoti sėkmingo audinio ar organo prigijimo bei pilno jų funkcijų atkūrimo. Tiesa, šiuo atveju susiduriama su dar viena svarbia problema - donorinių audinių ar organų trūkumu - Nacionalinio transplantacijos biuro prie Sveikatos apsaugos ministerijos duomenimis 2019 metų gruodžio 16 dieną Lietuvoje transplantacijos laukė 475 pacientai, iš kurių net 19 yra vaikai. Tuo tarpu efektyvių donorų per šiuos metus buvo tik 51.

Transplantuojama daug ir įvairių organų bei audinių. Vienas iš tokių – kaulinis audinys. Nors pastarasis geba puikiai regeneruoti savaime, jo reikmė transplantacinėse operacijose yra ne išimtis. Milijonai žmonių visame pasaulyje kenčia nuo patologijų, susijusių su kaulų retėjimu, genetiniais susirgimais ar vėžinėmis ligomis, kurių metu atsiradę kaulinio audinio pažeidimai patys savaime regeneruoti nebesugeba. Gydant tokias kaulinio audinio pažaidas „auksiniu standartu“ laikomi ir dažniausiai naudojami autologiniai, alogeniniai bei ksenogeniniai kaulinio audinio transplantatai. Tačiau šie natūralūs kaulinio audinio pakaitalai vis dar turi nemažai minusų: papildomoma chirurginė intervencija į organizmą, galimos donorinės srities

patologijos, ribotas donorinio audinio kiekis, galimas imuninis paciento organizmo atsakas, ligų ir patogenų perdavimas iš donoro recipientui ir pan. Todėl pasitelkdami naujausius audinių inžinerijos pasiekimus mokslininkai siekia sukurti biologiškai suderinamus, osteokonduktyvius bei osteo- ir angio- induktyvius dirbtinius kamieninių ląstelių (SC) bei karkasų darinius (konstruktus), kurie užtikrintų efektyvią pažeisto kaulinio audinio regeneraciją. Norima, kad tokių konstrukčių gamyba būtų kuo labiau personalizuota, nereikalaujanti didelių piniginių ir laiko sąnaudų.

Kaulinio audinio konstruktus, atitinkančius minėtus kriterijus, galima pagaminti derinant kamienines ląsteles su kompozitiniais polimerais (tokias kaip polilaktinė rūgštis (PLA) ir kt.) bei biokeraminėmis (hidroksiapatito (HA), biostiklo (BG) ir kt.) medžiagomis ir pasitelkiant vieną perspektyviausių technologijų – lydyto pluošto (FFF) 3D spausdinimą. Toks 3D spausdinimas tampa vis pigesnis ir pritaikomesnis audinių inžinerijoje, todėl labai aktualus tampa šiai technikai tinkamų medžiagų parinkimas, tokių medžiagų biologinės savybės bei 3D spausdinimo būdu pagamintų paviršių įtaka ląstelių likimui.

Osteokonduktyvaus, osteo- ir angio- induktyvaus dirbtinio kaulo gamybai neužtenka tik tinkamos medžiagos bei optimalaus karkaso gaminimo būdo pasirinkimo. Siekiant, kad kuriamas konstruktas lengviau integruotųsi į paciento organizmą, jį sudarantis karkasas turėtų būti papildomai praturtinamas biologinėmis molekulėmis bei prieš implantaciją apauginamas autologinėmis paciento kamieninėmis ląstelėmis.

Vienas iš perspektyviausių variantų karkaso paviršiaus dekoravimui yra jo padengimas autologinių ląstelių suformuotu tarpląstelinio užpildu (ECM). Toks ECM tinklas karkasą praturtina įvairiomis signalinėmis bei struktūrinių baltymų molekulėmis, todėl jo paviršius tampa patrauklesnis ląstelių prisitvirtinimui, migracijai ar net diferenciacijai. Karkasų dengimas ląstelių kilmės ECM yra sparčiai populiarėjanti tyrimų sritis, tačiau iki šiol tokio ECM vaidmuo kaulinio audinio regeneracijoje yra ištirtas tik naudojant kelias ląstelių bei karkasinių medžiagų rūšis, todėl šiuo klausimu trūksta patikimos informacijos, nėra rekomendacijų ir praktiniam jo panaudojimui.

Personalizuoto kaulinio audinio konstrukto kūrimui bei ląstelių-karkasų sąveikos tyrimams plačiausiai yra naudojamos mezenchiminės kamieninės ląstelės (MSC). Tokios yra dantų pulpos kamieninės ląstelės (DPSC), pasižyminčios multipotenciškumu, geromis adhezinėmis bei proliferacinėmis savybėmis ir gebančios lengvai diferencijuoti osteogene kryptimi, todėl jos yra puikus autologinių mezenchiminių ląstelių šaltinis

ties kaulo regeneracijos tyrimuose, tiek ir jų praktiniam pritaikymui klinikoje.

Šiame darbe buvo analizuojamas įvairių FFF 3D spausdinimo būdu pagamintų PLA karkasų modifikacijų vaidmuo DPSC likimui. Modeliu pasirinktos žiurkės kilmės DPSC. PLA karkasai modifikuoti keičiant jų paviršiaus topografiją, cheminę sudėtį bei padengimą baltymais, siekiant išsiaiškinti kiekvienos substrato modifikacijos įtaką ląstelių funkcijoms ir savybėms, pagrindinį dėmesį skiriant ląstelių osteogenezės procesų valdymui.

Darbo tikslas

Nustatyti skirtingų substrato modifikacijų įtaką kamieninių ląstelių likimui siekiant sukonstruoti funkcionalų dirbtinį kaulinį audinį.

Uždaviniai:

1. Ištirti paviršiaus makrotopografijos ($>100\ \mu\text{m}$) vaidmenį dantų pulpos kamieninių ląstelių (DPSC) likimui.
2. Įvertinti substrato cheminės sudėties įtaką DPSC gyvybiniam procesams.
3. Atlikti medžiagos cheminės sudėties vaidmens ląstelių osteogenezei analizę.
4. Nustatyti substrato biodekoravimo poveikį DPSC judrumui, prisitvirtinimui bei dauginimuisi.
5. Įvertinti paviršiaus dekoravimo įtaką ląstelių diferenciacijai osteogenine kryptimi.
6. *In vitro* sąlygomis modeliuoti ir įvertinti ląstelių-karkaso konstrukto siunčiamą signalą recipientiniams audiniams.

Darbo mokslinis aktualumas ir naujumas:

Iki šiol buvo žinoma, kad tik nano- ir mikrotopografijos gali reguliuoti ląstelės lemtį. Šiame darbe pademonstruota, kad ir paviršiaus makrotopografijos (lyginant su ląstelės dydžiu; $>100\ \mu\text{m}$) visiškai pakanka, jog substratas inicijuotų spontaninius osteogenezės procesus ląstelėse. Tai patvirtino, kad FFF 3D spausdinimas gali būti sėkmingai taikomas pigiai, našiai ir personalizuotai konstruktu, skirtu kaulinio audinio regeneracijai, gamybai.

Darbe pirmą kartą palygintos iš PLA+HA ir PLA+BG kompozitų FFF 3D spausdinimo būdu pagamintų karkasų fizinės bei osteoindukcinės savybės.

In vitro sąlygomis nustatyta, kad PLA+BG kompozitas turėjo tinkamus fizinius parametrus ir pasižymėjo efektyvesniu osteogeninę diferenciaciją skatinančiu veikimu, todėl yra tinkamiausias dirbtinio kaulinio audinio konstravimui. Šios žinios yra naudingos kaulinio audinio karkasų gamybos optimizacijai.

Įvertinta daug žadanti biologinė polimerinių karkasų dekoravimo technologija – paviršiaus padengimas ląstelių kilmės ECM. Čia ji pirmą kartą pritaikyta naudojant lengvai gaunamas pirmines DPSC bei FFF 3D spausdinimo metodu pagamintą PLA karkasą (PLA+ECM). Nustatyta, kad DPSC suformuotas ECM pastebimai pagerina karkaso osteoinduktyvumą *in vitro*.

Darbo metu *in vitro* sąlygomis buvo pademonstruotas iš karkasų bei ląstelių pagamintų konstrukčių siunčiamas signalas kaimyninėms recipientinio audinio ląstelėms ir angiogenezei. Toks tyrimas pirmą kartą atliktas siekiant palyginti konstruktus, pagamintus iš pirminių DPSC bei PLA+HA, PLA+BG, PLA+ECM karkasų. Nustatyta, kad geriausias regeneracines savybes demonstruoja DPSC-PLA+BG bei DPSC-PLA+ECM konstruktai. Todėl manome, kad tarpusavyje apjungus DPSC ląsteles, kompozitinį PLA+BG porėtą makrostruktūros karkasą bei DPSC susintetintą ECM tinklą galima tikėtis sukurti efektyvų dirbtinį kaulinio audinio konstrukta, pasižymintį efektyviomis regeneracinėmis savybėmis *in vivo*.

Šis mokslinis darbas svariai prisideda prie audinių inžinerijos progreso kuriant dirbtinį kaulinį audinį, kuris taptų proveržiu šiuolaikinėje medicinoje.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

Ląstelės gyvame organizme gyvena nuolat kintančioje, daugialypėje mikroaplinkoje, kurią sudaro tarpląstelinis užpildas (ECM), kaimyninės ląstelės bei įvairūs augimo veiksniai ir citokinai. Organizmo audiniuose ECM yra tarsi pagrindas, karkasas, prie kurio ląstelės tvirtinasi ir aplink kurį ir yra formuojamas audinys. Reaguodamos į ECM kietumą, cheminę sudėtį bei specifinę jo paviršiaus geometriją, audinį formuojančios ląstelės jaučia, kuria kryptimi joms reikia diferencijuoti, ar reikia daugintis, o gal kaip tik reikia pasukti žūties keliu (Li ir kt., 2018). Taigi, tokia ląstelių ir substrato sąveika nulemia pagrindines jų funkcijas – proliferaciją, diferenciaciją, migraciją bei šiuos procesus valdančių signalinių molekulių sintezę (Cretel ir kt., 2008).

Žinant, kad substratas, su kuriuo sąveikauja ląstelė, daro tokią didelę įtaką jos likimui, pasaulyje kuriami įvairūs paviršiai, kurie savo mechaninėmis, cheminėmis bei fizinėmis savybėmis stimuliuoja norimą ląstelės atsaką (Urrutia ir kt., 2017). Vienas iš audinių inžinierijos uždavinių - sukurti tokius karkasus, kurie savo sandara ir sudėtimi kuo labiau imituotų konstruojamo audinio ECM. Taip tikimasi pasiekti efektyviausią SC proliferaciją, migraciją bei užtikrinti jų diferenciaciją kuriamo audinio linkme (Krishna ir kt., 2016).

Ne išimtis yra ir kaulinis audinys. Siekiant sukurti dirbtinį šio audinio pakaitalą, reikia ne tik puikiai suprasti kaulinio audinio struktūrą bei jo regeneracinius mechanizmus, tačiau, taip pat svarbu iki galo išanalizuoti ir ištirti dirbtinio kaulinio audinio konstravimui tinkamų kamieninių ląstelių bei karkasų sąveikas (Phadke ir kt., 2013). Tik išanalizavus ir atrinkus geriausiu biosuderinamumu, osteokunduktyvumu bei osteo- ir angioinduktyvumu pasižyminčius substratus, galima tikėtis pasiekti proveržio dirbtinio kaulinio audinio kūrime (Ko ir Cho, 2013).

1.1 Kaulinis audinys

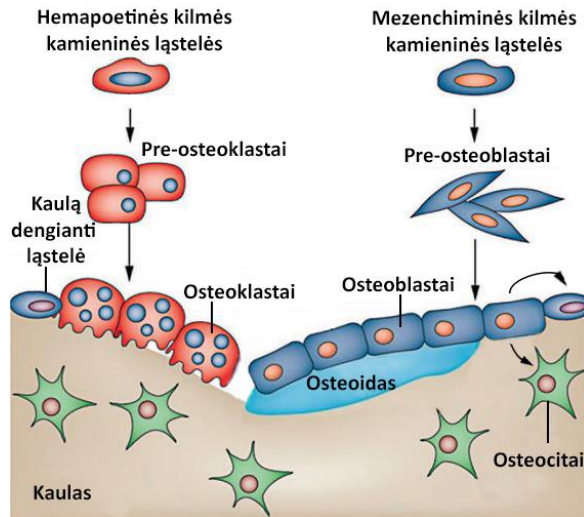
Organizmo vystymosi eigoje kaulai susidaro dviejų skirtingų procesų metu - vykstant mezenchiminiam ir kremzliniam kaulėjimui. Mezenchiminio kaulėjimo metu mezenchimos ląstelės diferencijuoja į kaulinio audinio ląsteles, kurios ima skatinti kauliniam audiniui būdingo tarpląstelinio užpildo (ECM) formavimąsi. Taip susidaro sukaulėję kūneliai, kurie plečiasi, nes juos supančios kaulinio audinio ląstelės gamina vis naujas sukaulėjusias zonas. Mezenchiminis kaulėjimas būdingas kaukolės kaulams (veido plokštiesiems, bei smegeninės skliauto kaulams) (Wang ir kt., 2019).

Kremzlinio kaulėjimo metu mezenchimos ląstelės pirmiausia diferencijuoja į chondrocitus, susiformuoja kremzlinis audinys. Į kremzlę įaugus kraujagyslėms, kremzlinės ląstelės skatina ECM mineralizaciją, taip sudarydamos sukaulėjusias sijeles. Vėliau šios ląstelės žūsta, o kremzlėje buvusios SC diferencijuoja į kaulinio audinio ląsteles, kurios ant sukaulėjusių kremzlės sijelių ima gaminti šio audinio ECM. Taip buvusi kremzlė visiškai sukietėja ir tampa kaulu. Kremzlinis kaulėjimas būdingas likusių griaučių kaulų formavimuisi (Ortega ir kt., 2004).

1.2 Kaulinio audinio ląstelės

Suaugusiame organizme kaulinis audinys nuolat atsinaujina, t.y., geba savarankiškai sugyti po traumų. Tokius kaulinio audinio persitvarkymus kontroliuoja hormoniniai bei fiziologiniai veiksniai (Doblar ir kt., 2004). Persitvarkymas gali vykti tik vidiniuose audinio sluoksniuose (trabekulinio ir kortikalinio audinio porose). Šiuos audinio persitvarkymus vykdo kaulinio audinio ląstelės. Pagal atliekamą funkciją yra išskiriamos 4 kaulinio audinio ląstelių rūšys: osteoblastai, osteocitai, osteoklastai ir kaulą dengiančios ląstelės (1 pav.) (Doblar ir kt., 2004). Osteoblastai – kubo formos ląstelės, išsidėsčiusios išilgai kaulų paviršiaus ir sudarančios 4-6% visų kaulinio audinio ląstelių. Šios ląstelės yra mezenchiminės kilmės, pagrindinė jų funkcija - naujo kaulinio audinio formavimas. Osteoblastai pirmiausia suformuoja organinę kaulinio audinio dalį – osteoidą, kurį vėliau mineralizuoja. Su šiomis ląstelėmis nuolat tarpusavyje sąveikauja ir joms priešingą funkciją vykdo kitos kaulinio audinio ląstelės – osteoklastai. Tai didelės, daugiabranduolės ląstelės, susidarančios kaulų čiulpuose iš hemapoetinių ląstelių-pirmtakių. Šios ląstelės vykdo kaulinio audinio rezorbciją, rezorbcijos srityje sukurdamos specifiską rūgštinę aplinką, kuri ištirpdo kaulinio audinio neorganinę ECM dalį. Vėliau ima veikti specifinės proteazės, lemiančios organinės ECM dalies išardymą (Mohamed, 2008; Manolagas, 2000). Tokia sąveika tarp osteoklastų ir osteoblastų kauliniame audinyje vyksta nuolat, ji padeda užtikrinti pastovią audinio homeostazę. Tačiau, susiformavus naujam kauliniam audiniui, didžioji dalis osteoblastų pasuka apoptozinės žūties keliu. Dalis likusių osteoblastų tampa osteocitais – trečiąja kaulinio audinio ląstelių rūšimi. Osteocitai yra tarsi įkalinami mineralizuotame kaulinio audinio ECM ir yra atsakingi už tolimesnį kaulinio audinio palaikymą ir homeostazę (Mohamed, 2008). Kita osteoblastų dalis tampa paskutiniąja, kaulinį audinį sudarančia ląstelių grupe - dengiamosiomis ląstelėmis. Tai plokščios ir pailgos ląstelės, dengiančios kaulinį audinį iš išorės. Tiksliai šių ląstelių funkcija nėra iki galo nustatyta,

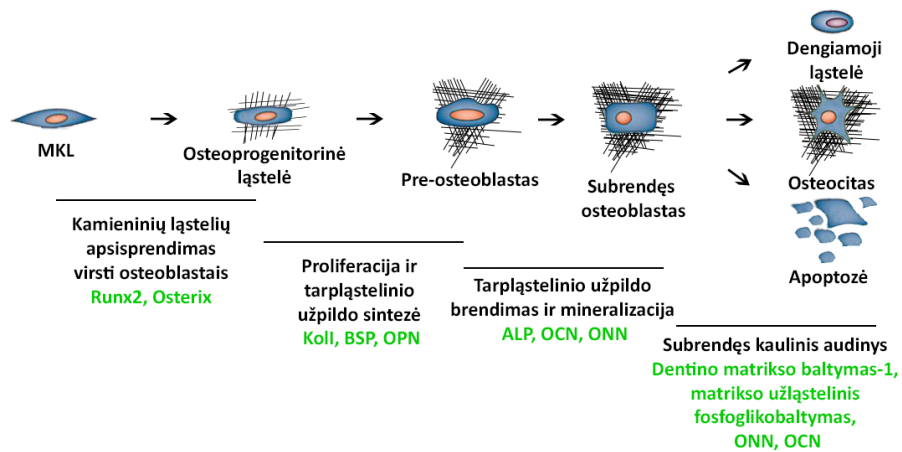
tačiau manoma, jog jos trukdo tiesioginei osteoklastų ir kaulinio audinio sąveikai, t.y. jos dengia kaulinį audinį tose srityse, kuriose tuo momentu neturėtų vykti rezorbcijos ir naujo audinio formavimosi procesai. Naujausiais tyrimais parodyta, jog šios ląstelės taip pat dalyvauja ir osteoklastų diferenciacijos procese, produkuodamos veiksnius (osteoprotegeriną (*osteoprotegerin* (OPG)) ir branduolio faktoriaus kapa-B ligandą (*nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL))), būtinus osteoklastogenezėi (Florencio-Silva ir kt., 2015; Manolagas, 2000).



1.1 pav. Kaulinio audinio ląstelių rūšys (pagal (Lian ir kt., 2012)).

1.3 Osteoblastų formavimasis ir diferenciacija

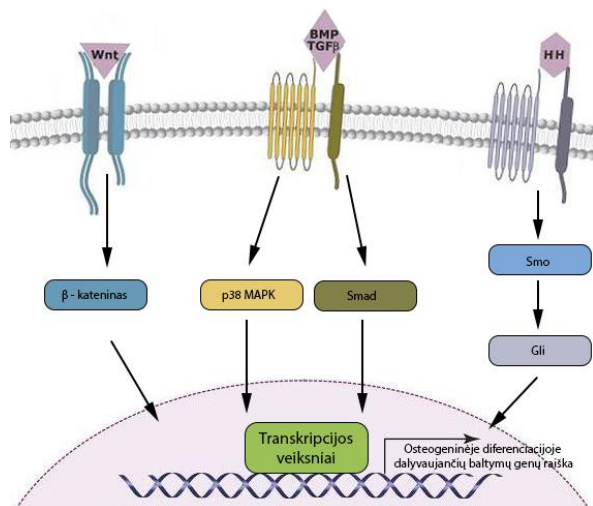
Naujo kaulinio audinio formavimasis vykdo kaulinės ląstelės - osteoblastai. Osteoblastų augimas ir diferenciacija yra reguliuojami įvairių transkripcijos veiksnių, skatinančių raišką baltymų, atsakingų už kaulinio audinio ECM gamybą ir mineralizaciją. Osteoblastai susiformuoja osteoblastogenezės metu iš mezenchiminių kamieninių ląstelių (MSC) (1.2 pav.). Tokią osteoblastų diferenciaciją kontroliuoja daugybė signalinių molekulių – morfogenai, transkripcijos ir augimo veiksniai, citokinai, hormonai. Jie visi prisideda prie sudėtingų osteogeninės diferenciacijos signalinių kelių tinklo valdymo. Visas osteoblastų formavimosi/diferenciacijos procesas gali būti skirstomas į keletą stadijų – kamieninių ląstelių apsisprendimas virsti osteoblastais, pre-osteoblastų proliferacija ir ECM sintezė, ECM brendimas ir mineralizacija, osteoblastų apoptozė ir virtimas osteocitais arba kaulinį audinį dengiančiomis ląstelėmis (Burr ir Allen, 2014).



1.2 pav. Osteoblastų formavimasis ir brendimas.

Kamieninių ląstelių apsisprendimas virsti osteoblastais. Osteoblastų formavimasis prasideda MSC (esančių kaulų čiulpuose, antkaulyje, dantų pulpoje ar panašiuose audiniuose) proliferacija ir apsisprendimu diferencijuotis osteogenine linkme. Iš MSC susidaro osteoprogenitorinės ląstelės. Šis procesas yra griežtai koordinuojamas pagrindinių, už ląstelės osteogenezę atsakingų signalinių kelių - transformuojančio augimo veiksnio β (TGF- β)/ kaulo morfogeninio baltymo (BMP), *Wingless* baltymo/integrinės-1 (WNT) ir *Hedgehog* (HH) (1.3 pav.) (James, 2013).

TGF- β /BMP signalinio kelio baltymai osteogenezę gali reguliuoti sąveikaudami su transmembraniniais serino-treonino kinazių receptoriais (I ir II tipo) ir taip aktyvuodami kanoninį (nuo *Smad* priklausomą) ir ne kanoninį (nuo *Smad* nepriklausomą, p38 mitogenų aktyvinamos baltymų kinazės) TGF- β /BMP signalinius kelius (1.3 pav.) (Chen ir kt., 2016). Tačiau, priklausomai nuo MSC nišoje esančių, pastaruosiuose signaliniuose keliuose dalyvaujančių baltymų ir citokinų koncentracijos, TGF- β /BMP signalinis kelias gali pasižymėti dvejopu vaidmeniu reguliuojant ląstelių osteogenezę, pvz.: maža BMP2 koncentracija skatina ląsteles diferencijuotis riebaline linkme, tuo tarpu didelė šio baltymo koncentracija inicijuoja ląstelių diferenciaciją osteogenine ir chondrogenine kryptimis (zur Niden ir kt., 2005).



1.3 pav. Pagrindiniai ląstelių osteogenezę reguliuojantys signaliniai keliai.

Kitas signalinis kelias, dalyvaujantis ląstelių kaulinės diferenciacijos procese – WNT. Šio signalinio kelio ligandai, prisitvirtindami prie transmembraninių receptorių (angl. *Frizzled receptors*) ir koreceptorių (angl. *Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6 (LRP5/6)*), užkerta kelią β-katenino fosforilinimui ir taip jį stabilizuoja. Toks β-kateninas toliau gali translokuoti į branduolį ir aktyvuoti taikinių genų raišką (1.3 pav). Šis signalinis kelias yra labai svarbus ląstelių diferenciacijai kauline linkme. Tyrimais pademonstruota, kad tam tikrų šio kelio komponentų funkcijos praradimas organizme skatina mažo tankio kaulinio audinio formavimąsi bei įvairias kaulinio audinio ligas (Chen ir kt., 2016). Pavyzdžiui, LRP5 geno funkcijos praradimo mutacija (angl. *loss-of-function mutation*) sukelia pseudogliomos sindromą ir osteoporozę (Little ir kt., 2002). β-katenino stygius stabdo osteoblastų brendimą, taip sukeldamas embriono griaučių defektus (Chen ir Long, 2013).

Trečiasis kelias, dalyvaujantis osteogenezėje, yra HH. Stuburinių organizme HH šeimą sudaro trys grupės: *Sonic HH*, *Indian HH* ir *Desert HH*. Šie baltymai jungiasi prie receptoriaus, taip aktyvuodami transmembraninį baltymą Smo. Aktyvus baltymas Smo HH signalą toliau perduoda transkripcijos veiksniams Gli, kurie skatina HH kelio taikinių genų raišką (1.3 pav.) (Kim ir kt., 2010). *In vitro* tyrimų duomenimis parodyta, kad HH osteoblastogenezę gali indukuoti ir sinergetiškai veikdamas su TGF-β/BMP signaliniu keliu (aktyvuoti Gli transkripcijos

veiksniai toliau skatina BMP raišką) (James, 2013). HH šeimos baltymai yra svarbūs embriono kaulų vystimosi procese bei palaikant poembrioninę kaulinio audinio homostazę (McMahon ir kt., 2003). Nustatyta, jog pradiniuose kaulų lūžių gijimo etapuose ląstelėse padidėja HH signalinio kelio komponentų raiška (*Smo*, *Indian* HH ir kt.) (Ito ir kt., 1999). Tuo pačiu, rasta, jog HH signalinio kelio slopinimas jaunų pelių organizme sukelia jų kaulinio audinio struktūros pakitimus, todėl galvojama, kad sutrikęs HH signalo perdavimas gali lemti osteoporozės formavimąsi bei sutrikusį kaulų lūžių gijimą (Kimura ir kt., 2008).

Mažai žinoma, kada ir kurie MSC signaliniai keliai yra aktyvuojami šioms ląstelėms apsisprendus diferencijuotis osteogenine linkme (Franceschi, 1999). Tačiau yra duomenų, jog MSC diferenciacijai į osteoblastus būtina dviejų transkripcijos veiksnių aktyvacija - su Runt baltymo domenu susijusio transkripcijos veiksnio 2 (*Runx2*) (Ducy ir kt., 1997) ir *Sp7* (*Osterix*) (Nakashima ir kt., 2002). *Runx2* baltymas yra pagrindinis transkripcijos veiksnys, kuris aktyvuojamas anksčiau aptartų signalinių kelių metu. Transkripcijos veiksnys *Runx2* N gale turi Runt domeną, kuris yra svarbus *Runx2* baltymo prisitvirtinimui prie specifinių DNR sekų (PyGPyGGTPy). Tam, kad prisitvirtintų prie DNR, *Runx2* veiksnys turi formuoti heterodimerą su transkripcijos koaktyvatoriumi, pagrindiniu prisitvirtinimo veiksniu β (*Cbfb*). Būtent per Runt domeną *Runx* baltymai ir sąveikauja su *Cbfb* (Bruderer ir kt., 2014).

Preosteoblastų proliferacija ir ECM sintezė. Osteoblastų brendimo stadijos metu osteoprogenitorinės ląstelės virsta preosteoblastais, kurie ima sintetinti kauliniam audiniui būdingus ECM baltymus - I tipo kolageną (*ColI*), kaulo sialobaltymą (*BSP*), osteopontiną (*OPN*) ir kt. (1.2 pav.). Baltymų sintezę reguliuoja pagrindiniai du osteogeninėje diferenciacijoje dalyvaujantys transkripcijos veiksniai – *Runx2* ir *Sp7* (Huang ir kt., 2007). Pirmiausiai aktyvuojama *ColI* bei *BSP* baltymų sintezė, jų raiška ląstelėse aptinkama anksčiausiai. *OPN* baltymas pradamas sintetinti jau vėlesniu preosteoblastų brendimo metu (Ibaraki ir kt., 1992; Owen ir kt., 1990).

ECM brendimas ir mineralizacija. Šios stadijos metu preosteoblastai jau pilnai diferencijuoja iki osteoblastų, subręsta ir yra mineralizuojamas besiformuojančio kaulinio audinio ECM (1.2 pav.). Pagrindinis kaulinio audinio ECM mineralas yra hidroksiapatitas (*HA*) - kalcio ortofosfato hidroksidas $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, kuris formuojasi aplinkoje esančius kalcio jonus jungiant į *HA* kristalus (Boskey ir Robey, 2013). Subrendę osteoblastai pirmiausia suformuoja nemineralizuotą kaulinio audinio ECM – osteoidą. Osteoide yra aptinkama nekolageninių baltymų (osteokalcino

(OCN), osteonektino (ONN) ir kt.), kurių sandarai būdingos rūgštinės aminorūgštys bei posttransliacinės jų modifikacijos (dažniausiai fosforilinimas). Šie baltymai dėka savo sandaros ypatybių geba prisijungti aplinkoje esančius kalcio jonus ir įterpti juos į besiformuojančius HA kristalus (Murshed ir McKee, 2010). Iki šiol tikslus ECM mineralizacijos mechanizmas nėra nustatytas. Manoma, kad tarpusavyje susipynusios kolageno fibrilės stabilizuoja ir sulaiko nekologaninius baltymus, prie kurių yra prisijungę kalcio jonai. Taip inicijuojamas HA kristalų formavimasis (Boskey ir Robey, 2013). Kitas galimas mineralizacijos mechanizmas – matrikso pūslelės (angl. *Matrix vesicles*). Manoma, kad šios pūslelės susiformuoja iš osteoblastų membranos ir yra sudarytos iš osteoblastų membranoje esančių rūgštinių fosfolipidų ir aneksinų. Savo viduje šios pūslelės turi metaloproteinazių fermentų, gebančių išardyti membraną, bei baltymų – fosfohidrolazių (dažniausiai- šarminės fosfatazės (ALP), reguliuojančių fosfatų lygį (Boskey ir Robey, 2013; Murshed ir McKee, 2010). Mineralizacijos mechanizmas, kurį geba aktyvuoti šios pūslelės, vyksta dviem stadijomis: 1) kalcio ir fosfato jonai kaupiasi pūslelės viduje, kur ima formuotis pirmieji kalcio kristalai; 2) toks mineralas toliau didėja ir pro pūslelės membraną išlenda į kaulinio audinio ECM, kur pradeda tarnauti kaip branduolys tolimesniam HA kristalų formavimuisi (Anderson, 1995). Tiesa, tyrimais parodyta, kad ECM mineralizacija gali vykti ir be matrikso pūslelių. Apibendrinant galima teigti, kad greičiausiai mineralizacija ir jos iniciacija gali vykti keliais būdais, kurie vienas su kitu tarpusavyje persipina (Cui ir kt., 2016; Boskey ir Robey, 2013; Murshed ir McKee, 2010).

Osteoblastų apoptozė ir virtimas osteocitais arba kaulinį audinį dengiančiomis ląstelėmis. Paskutinės osteoblastų diferenciacijos stadijos metu didžioji dalis osteoblastų žūva apoptozės būdu. Likusios gyvos ląstelės tampa osteocitais arba kaulinį audinį dengiančiomis ląstelėmis (1.2 pav.). Mineralizuotame ECM įsitvirtinę osteocitai sudaro net 95 % visų ląstelių, aptinkamų žinduolių kauluose. Šioms ląstelėms būdingos ilgos citoplazminės ataugos, padedančios palaikyti ryšį su aplinkinėmis ląstelėmis (Franz-Odendaal ir kt., 2006), bei naujų baltymų ekspresija: dentino matrikso baltymo-1 (angl. *dentin matrix protein-1*), matrikso užląstelinio fosfoglikobaltymo (angl. *matrix extracellular phosphoglycoprotein*) ir sklerostino (Burr ir kt., 2015; Yamada ir kt., 2004; van Bezooijen ir kt., 2004; Toyosawa ir kt., 2001; Kamiya ir Takagi, 2001). Osteocitai geba jausti mechanines jėgas, veikiančias kaulą, ir paversti jas biocheminiais signalais, užtikrinančiais kaulinio audinio homeostazę, t.y., reguliuojančiais balansą tarp kaulo rezorbcijos ir formavimosi (Franz-Odendaal ir kt., 2006). Šios

diferenciacijos stadijos metu ECM gausiai aptinkami ir nekolageniniai baltymai - OCN bei ONN, kurie prisideda prie visiškai mineralizuoto ECM susiformavimo (Ozdemir ir kt., 2016).

1.4 Kaulinio audinio ECM

Kaulinis audinys yra sudarytas iš jam būdingų ląstelių bei specialaus ECM. Visos kaulinį audinį sudarančios ląstelės prisideda formuojant šio audinio ECM, kurį sudaro neorganiniai ir organiniai komponentai (McKee ir kt., 2019).

1.4.1 Neorganinė kaulinio audinio ECM dalis

Neorganinė kaulinio audinio ECM dalis sudaro net ~80 % visos kaulo masės. Šiai ECM daliai yra priskiriamas vanduo ir mineralai. Pagrindinis kaulinio audinio ECM užpildo mineralas, formuojantis kristalus, yra HA (Fujisawa ir Tamura, 2012). Susidarę HA kristalai dažniausiai yra disko formos, jų matmenys varijuoja nuo 20-50 nm ilgio, 15-30 nm pločio ir 2-10 nm storio. Tačiau kristaluose, sudarančiuose kaulinio audinio ECM, yra ir karbonatų jonų, kurie HA kristale pakeičia hidroksilo ir fosfatines grupes, bei kitokių priemaišų: kalcis keičiamas kaliu, magniu, stronciu ir natriu, o hidroksilo grupės gali būti pakeistos chloridu ir fluoridu. Iš visų galimų priemaišų tik fluoridas didina HA kristališkumą, visos kitos mažina HA kristališkumą, todėl kaulinio audinio mineralas dėl jų tampa tirpesnis, o tai labai svarbu palaikant mineralų homeostazę bei kaulinio audinio persitvarkymą (Farbod ir kt., 2014; Fujisawa ir Tamura, 2012).

1.4.2 Organinė kaulinio audinio ECM dalis

Organinę ECM dalį sudaro lipidai, glikoproteinai, proteoglikanai ir cirkuliacijos atnešti baltymai (Ham ir Cormack, 1979).

Glikoproteinai. Tai baltymai, prie kurių kovalentiškai yra prijungtos viena ar kelios oligosacharidų grupės (Robey, 2002). Pagrindinis organinis kaulinio audinio ECM komponentas yra fibrilinis glikoproteinas – kolagenas, jis sudaro net ~90 % visų kaulinio audinio ECM aptinkamų baltymų (Fuchs ir kt., 2019).

1.1 lentelė. Fibriliniai glikoproteinai, aptinkami kaulinio audinio ECM

Baltymas	Struktūra	Funkcijos
I tipo kolagenas (ColI)	Superspiralinis baltymas, kurio kiekviena spirālė sudaryta iš tarpusavyje susisukusių 2 $\alpha 1(I)$ ir 1 $\alpha 2(I)$ grandinių (retais atvejais 3 $\alpha 1(I)$ grandinių).	Labiausiai kaulinio audinio ECM paplitęs baltymas (sudaro net 90 % visos organinės ECM dalies); tarnauja kaip karkasas baltymų, inicijuojančių ir reguliuojančių ECM mineralizaciją, prisitvirtinimui.
V tipo kolagenas (ColV)	Spiralinis baltymas, kurio spirālę gali sudaryti $\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$ ir $\alpha 3(V)$ polipeptidinės grandinės (labiausiai paplitusi izoforma - 1 $\alpha 1(V)$ ir 2 $\alpha 2(V)$).	Kaulinio audinio ECM aptinkamas nedideliais kiekiais; užtikrina plačių I tipo kolageno skaidulų susidarymą.

Kolagenai - fibrilinių glikoproteinų šeimos baltymai yra būdingi tik audinių ECM. Kaulinio audinio ECM aptinkami I ir V tipo kolagenai (1.1 lentelė). I tipo kolageno (ColI) molekulė yra pailga 300 nm ir 1,5 nm skersmens stulpelio formos. Tai yra viena iš ilgiausių žinomų baltymų molekulių. Šio tipo kolageno molekulei, kaip ir kitiems fibriliniams kolagenams, yra būdinga trigubos superspiralės struktūra. Dar viena kolagenų rūšis, nedideliais kiekiais aptinkama kaulinio audinio ECM, yra V tipo kolagenas (ColV). Šios rūšies kolageno molekulės užtikrina plačių ColI tipo skaidulų susidarymą. ColV gali sudaryti $\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$ ir $\alpha 3(V)$ polipeptidinės grandinės. Labiausiai paplitusi ColV izoforma yra sudaryta iš vienos $\alpha 1(V)$ grandinės ir dviejų $\alpha 2(V)$ grandinių. Formuojantis ColV trigubai spiralei, vienoje iš spirālę sudarančių polipeptidinių grandinių ($\alpha 2(V)$) yra paliekamas nenukirptas N galo pro-peptidas. ColI tipo skaidulų formavimosi metu, ColV tipo trimeras yra įtraukiamas į ColI tipo skaidulas ir dėka nenukirpto N galo propeptido ima sąveikauti su ColI tipo superspiralėmis, taip užtikrinant plačių ColI tipo skaidulų susidarymą (Aszódi ir kt., 2006; Wenstrup ir kt., 2004).

Kaulinio audinio ECM aptinkama ir nefibrilinių glikoproteinų. Nemaža dalis tokių kaulinio audinio **glikoproteinų savo polipeptidinėje grandinėje turi RGD (Arg-Gly-Asp) amino rūgščių seką** (1.2 lentelė.). Šią seką atpažįsta ląstelių membranoje įsiterpę integrinai, kurių dėka ląstelės gali prisitvirtinti prie kaulinio audinio ECM (Robey, 2002).

1.2 lentelė. RGD sekas turintys glikoproteinai, aptinkami kaulinio audinio ECM

Baltymas	Struktūra	Funkcijos
Trombospondinai	~450 kDa trimeriniai arba pentameriniai baltymai, savo polipeptidinių grandinių globuliniame C- gale turintys fibrinogeno, properidino, EGF, kolageno, RGD ir <i>von Willebrand</i> homologijas.	Reguliuoja ląstelių adheziją, sąveikauja su daugeliu ECM baltymų.
Fibronektinas	~400 kDa dimerinis baltymas, polipeptidinėje grandinėje turintis RGD pasikartojimus.	Užtikrina ląstelių adheziją
Vitronektinas	Sudarytas iš vienos arba dviejų (tarpusavyje sujungtų disulfidinių ryšių) polipeptidinių grandinių, turtingų cisteinu bei RGD sekomis.	ECM jungiasi į multimerinius kompleksus, su kuriais geba sąveikauti ląstelės, taip užtikrindamas jų adheziją.

Vieni iš tokių nefibrilinių ECM glikoproteinų yra trombospondinų šeimos baltymai, aptinkami daugelio audinių ECM. Šeimą sudaro 5 glikoproteinai: THBS-1, THBS-2, THBS-3, THBS-4, THBS-5. Visi penki glikoproteinai yra randami skirtingų kaulinio audinio brendimo stadijų ECM. Jie čia atlieka ne vieną funkciją: gali sąveikauti su daugeliu kitų ECM baltymų, reguliuoti ląstelių adheziją (ne vien nuo RGD priklausomu būdu) ir kt. Tai rodo, jog greičiausiai šie glikoproteinai turi papildomas specifines sekas, kurias gali atpažinti ląstelių paviršiaus receptoriai – integrinai (Carlson ir kt., 2008; Bilezikian ir kt., 2008).

Fibronektinas yra kitas glikoproteinas, savo polipeptidinėje grandinėje turintis RGD sekas ir aptinkamas kaulo ECM. Jis būdingas visų jungiamųjų audinių ECM. Dėl alternatyvaus splaisingo egzistuoja labai daug šio baltymo izoformų, tačiau tikslios izoformos, būdingos tik kauliniam audiniui, nėra nustatytos. Šis glikoproteinas yra dimerinis baltymas, sudarytas iš dviejų fibronektino monomerų. Fibronektino dimerai yra tirpūs, todėl ECM užpilde jie jungiasi tarpusavyje, sudarydami fibronektino tinklus. Pagrindinė šio ECM komponento funkcija yra užtikrinti ląstelių adheziją. Įdomu tai, kad kauliniame audinyje aptinkamos ląstelės prie fibronektino tvirtinasi nuo RGD nepriklausomu būdu - per paviršiaus receptorius $\alpha\beta 1$ integrinus, kurie atpažįsta specifines fibronektino sekas. Nustatyta, jog ląstelėms sąveikaujant su fibronektinu per šiuos receptorius, jose gali būti aktyvuojami net ir

osteogeninės diferenciacijos signaliniai keliai (Pankov ir Yamada, 2002; Robey, 2002).

Trečiasis kaulinio audinio ECM aptinkamas, polipeptidinėje grandinėje RGD sekas turintis glikoproteinas yra vitronektinas. Šis glikoproteinas yra būdingas daugelio audinių ECM. Žinoma, kad ECM vitronektinas jungiasi į multimerinius kompleksus, su kuriais geba sąveikauti ląstelės. Nustatyta, kad kaulinį audinį formuojančios ląstelės su vitronektino multimeriniais kompleksais sąveikauja per specifinius $\alpha V\beta 3$ receptorius. Pagrindinė šio glikoproteino funkcija - užtikrinti ląstelių adheziją prie ECM (Bilezikian ir kt., 2008; Preissner ir Seiffert, 1998).

1.3 lentelė. SIBLINGs glikoproteinai, aptinkami kaulinio audinio ECM

Baltymas	Struktūra	Funkcijos
Osteopontinas (OPN)	~44-75 kDa baltymas, polipeptidinėje grandinėje turintis daug rūgštinių amino rūgščių, bei RGD sekų. Manoma, kad baltymas neturi antrinės struktūros, todėl polipeptidinės grandinės forma priklauso nuo to prie ko baltymas pritvirtina.	Reguliuoja ECM mineralizacija, užtikrina ląstelių adheziją, migraciją, proliferaciją.
Kaulo sialobaltymas (BSP)	~46-75 kDa baltymas, neturintis antrinės struktūros, stipriai rūgštinis, turintis RGD sekų pasikartojimus ir sritį prie kurios jungiasi su Coll.	Kalcio jonų surušimas ir ECM mineralizacijos iniciacija.

SIBLINGs (angl. *Small Integrin-Binding Ligands with N-linked Glycosylation*) - tai dar viena grupė glikoproteinų, būdingų tik kaulinio audinio ECM (1.3 lentelė). Šiai grupei priklausantys baltymai savo struktūroje be RGD sekų dar turi ir ganėtinai daug sialo rūgšties. Šiai grupei priskiriami šie baltymai: OPN, BSP, dentino užpildo baltymas 1 (angl. *dentin matrix protein-1*), dentino sialobaltymas (angl. *dentin sialo-protein*), dentino fosfobaltymas (angl. *dentin phosphoprotein*), užpildo užląstelinis glikoproteinas (angl. *matrix extracellular glycoprotein*) ir enamelinas (Bilezikian ir kt., 2008; Robey, 2002).

Geriausiai iš šių glikoproteinų yra ištyrinėti pirmieji du – OPN ir BSP. Nors tiksliai OPN baltymo struktūra iki šiol nėra nustatyta, žinoma ganėtinai daug šio glikoproteino funkcijų, turinčių įtakos ląstelių adhezijai, migracijai, proliferacijai. Tačiau pagrindinė OPN funkcija kauliniame audinyje - reguliuoti ECM mineralizaciją. Manoma, kad šis baltymas joniniais ryšiais

tvirtinasi prie kalcio jonų ir reguliuoja HA kristalų augimą, neleisdamas jiems susiformuoti per dideliems (Hunter, 2013).

Kitas giliau ištyrinėtas SIBLINGs grupės baltymas yra BSP. Jis kaulinio audinio ECM sudaro net 12 % visų nekolageninių baltymų. Kaip ir OPN, šis glikoproteinas yra stipriai rūgštinis, todėl prie jo gali prisijungti daug kalcio jonų. Nustatyta, kad OPN savo struktūroje turi sritį, padedančią jam prisijungti prie ColI molekulės. Todėl pagrindinė šio glikoproteino funkcija yra kalcio jonų surišimas ir mineralizacijos iniciacija. Manoma, kad būtent BSP inicijuoja kalcio jonų prijungimą prie ColI ir taip inicijuoja HA kristalų formavimąsi (Vincent ir Durrant, 2013).

1.4 lentelė. γ -karboksigliutamo rūgštį turintys glikoproteinai, aptinkami kaulinio audinio ECM

Baltymas	Struktūra	Funkcijos
Matrikso-Gla-baltymas	~15 kDa baltymas, sudarytas tik iš 84 aminorūgščių; kol nesąveikauja su kalcio jonais, jis yra nestruktūrizuotas. Struktūroje turi 9 glutamo liekanas, iš kurių 5 gali būti γ -karboksilinamos.	ECM mineralizacijos slopinimas.
Osteokalcinas (OCN)	~5 kDa baltymas, sudarytas tik iš 49 aminorūgščių; tik sąveikaudamas su kalcio jonais susisuka į globulę, turinčią tris α spirales.	Reguliuoja HA kristalų augimą, prie jų prijungdamas kalcio jonus.

Dar viena grupė glikoproteinų, aptinkamų kaulinio ECM, yra **γ -karboksigliutamo rūgštį turintys baltymai** (1.4 lentelė). Ši netradicinė aminorūgštis polipeptidinėje grandinėje atsiranda glutamo rūgšties posttransliacinio karboksilinimo metu (Bristol ir kt., 1999). Tokia karboksilinta glutamo rūgštis geba prisijungti kalcio jonus, todėl baltymai, savo struktūroje turintys šią rūgštį, kontroliuoja ECM mineralizaciją. Du pagrindiniai kaulinio audinio ECM aptinkami baltymai, savo polipeptidinėje grandinėje turintys μ -karbosigliutamo rūgštį, yra šie: matrikso-gla-baltymas (angl. *Matrix-Gla-protein*) ir OCN (Bilezikian ir kt., 2008). Matrikso-gla-baltymas yra mažas baltymas, sudarytas tik iš 84 aminorūgščių. Manoma, kad, kol baltymas nesąveikauja su kalcio jonais, jis yra nestruktūrizuotas. Teigiama, kad pagrindinė šio glikoproteino funkcija ECM yra mineralizacijos slopinimas. Tačiau tyrimais parodyta, kad šis baltymas gali

sąveikauti su BMP ir tokiu būdu inhibuoti jo aktyvinius kelius, taip reguliuodamas ląstelių diferenciaciją ir proliferaciją (Cancela ir kt., 2014).

Kitas γ -karboksi glutamo rūgštį savo polipeptidinėje grandinėje turintis glikoproteinas yra OCN. Jis gausiai aptinkamas kaulinio audinio ECM. Šis baltymas yra labai mažas, sudarytas tik iš 49 aminorūgščių. Kaip tiksliai OCN veikia kaulinio audinio ECM mineralizaciją, nėra nustatyta, tačiau manoma, jog jis reguliuoja HA kristalų augimą, prie jų prijungdamas vis naujus kalcio jonus (Cancela ir kt., 2014; Hoang ir kt., 2003).

1.5 lentelė. Nefibriliniai glikoproteinai, aptinkami kaulinio audinio ECM

Baltymas	Struktūra	Funkcijos
Šarminė fosfatazė (ALP)	Dimerinis baltymas, sudarytas iš dviejų vienetų ~80 kDa dydžio monomerų.	Reguliuoja ECM mineralizaciją.
Osteonektinas (ONN)	~35-45 kDa baltymas, polipeptidinėje grandinėje turi daug cisteino aminorūgščių bei EF rankos motyvą.	Inicijuoja ECM mineralizaciją.

Kiti du svarbūs **nefibriliniai glikoproteinai**, aptinkami kaulinio audinio ECM, tačiau nepriskiriami nei vienai iš aukščiau aptartų grupių, yra ALP ir osteonektinas (ONN) (1.5 lentelė).

ALP - prie ląstelės paviršiaus prisitvirtinęs baltymas. Ląstelės membranoje esantys fosfatidilinozitolio glikofosfolipidai sudaro kovalentinius ryšius su ALP polipeptidinės grandinės C galu, taip baltymas išlieka prikibęs prie ląstelės. Vėliau šis ryšys yra nutraukiamas ir ALP keliauja į kaulinio audinio ECM, kur reguliuoja ECM mineralizaciją (Rosen, 2013). Žinoma, kad HA kristalų formavimuisi didelę įtaką turi fosfatų ir pirofosfatų santykis, esantis ECM. Tam tikri fermentai ECM esančią ATP geba versti į pirofosfatus, kurie inhibuoja HA kristalų formavimąsi. ECM esantys ALP baltymai geba šiuos pirofosfatus hidrolizuoti iki fosfatų. Tada ima formotis kalcio fosfatai, kurie ECM kaupiasi kaip HA kristalai. Manoma, jog ECM mineralizacijoje ALP aktyviai dalyvauja tada, kai HA kristalų formavimasis vyksta matrikso pūslelėse (Mitton-Fitzgerald ir kt., 2016; Orimo, 2010).

Dar vienas kaulinio audinio ECM formavimuisi svarbus glikoproteinas yra ONN. Tai rūgštusis glikoproteinas, gebantis prisijungti kalcio jonus. Osteogenezės metu šį glikoproteiną sekretuoja osteoblastai, tačiau organizmo vystymosi eigoje jo raiška yra aptinkama ir kituose

jungiamuosiuose audiniuose. ONN yra atsakingas už kaulinio audinio ECM mineralizacijos iniciaciją. Prisijungęs kalcio jonus, jis geba tvirtintis prie kolageno ir taip duoti pradžia HA kristalų formavimuisi (Rosen, 2013; Bilezikian ir kt., 2008).

1.6 lentelė. Proteoglikanai aptinkami kaulinio audinio ECM

Baltymas	Struktūra	Funkcijos
Versikanas	Turi ~360 kDa šerdinį baltymą, bei G1 ir G2 globulinius domenų, kuriuose yra hialurono tvirtinimosi sritys bei į EGF panašios sekos.	„Numato“ vietas, kuriose embriogenezės metu formuosis kaulinis audinys.
Dekorinas Biglikanas Fibromodulinas	Turi ~38-45 kDa dydžio šerdinius baltymus, kuriuose gausu leucino pasikartojimų.	Tvirtinasi prie Coll ir neleidžia susidaryti per plačioms superspiralėms, geba sąveikauti su TGF-β/BMP ir Wnt signalinių kelių komponentais, taip ląstelėse aktyvuodami osteogenezę.

Kita baltymų grupė, įeinanti į kaulinio audinio ECM sudėtį, yra **proteoglikanai** (1.6 lentelė). Tai didelės molekulinės masės ląstelės paviršiaus ar ECM polianijonai, kuriuose prie baltymo molekulės kovalentiniu ryšiu yra prijungti glikozaminoglikanai. Nuo glikoproteinų jie skiriasi tuo, kad didesniąją molekulinės masės dalį sudaro ne baltymai, o angliavandeniai, sudarantys net iki 95 % proteoglikanų masės. Glikozaminoglikanų karboksi- ir sulfogrupės suteikia molekulei didelį neigiamą krūvį, todėl prie jų gali jungtis daug vandens molekulių, o proteoglikanų tirpalai tampa klampūs, elastingi ir atsparūs spaudimui (Yanagishita, 1993).

Didelis proteoglikanas, įeinantis į besiformuojantį kaulinio audinio ECM, yra versikanas. Didžiausi šio proteoglikano kiekiai suaugusiame organizme yra aptinkami minkštuosiuose audiniuose, tačiau pastebėta, kad embriogenezės metu ten, kur pradeda formotis kaulinis audinys, šis proteoglikanas taip pat yra ekspresuojamas. Manoma, kad jis „numato“ vietą, kuri taps kauliniu audiniu. Šiam proteoglikanui būdinga tai, jog jis jungiasi prie hialurono rūgšties, ECM formuodamas didelius agregatus (Nakamura ir kt., 2005; Wight, 2002).

Osteogenezei progresuojant, versikanas yra pakeičiamas kitais trimis proteoglikanais – dekorinu, biglikanu ir fibromodulinu. Šie proteoglikanai yra priskiriami mažiems baltymams, kurių šerdinė dalis turi leucino

pasikartojimus. Visi šie trys proteoglikanai per savo šerdinius baltymus gali tvirtintis prie skirtingų ColI superspiralės vietų ir taip reguliuoti ColI fibrilių formavimąsi. Manoma, kad šie proteoglikanai veikia dvejopai: stabdo ColI fibrilių diametro didėjimą arba dėka jų struktūroje esančio didelio glikozaminogaliaknų kiekio skatina skirtingų ColI fibrilių tarpusavio sąveiką. Visi trys proteoglikanai taip pat geba sąveikauti ir su TGF- β /BMP ir WNT signalinių kelių komponentais, prisideddami prie osteogeninės diferenciacijos aktyvacijos ląstelėse (Nastase ir kt., 2012; Mochida ir kt., 2009; Takeuchi ir kt., 1994).

1.7 lentelė. Cirkuliacijos metu į kaulinio audinio ECM atnešami baltymai

Baltymas	Struktūra	Funkcijos
Albuminas	~69 kDa baltymas, neglikozilintas.	Neleidžia susidaryti per dideliams HA kristalams.
α_2 -HS-glikobaltymas	~64 kDa baltymas, kuriame dvi polipeptidinės grandinės tarpusavyje sujungtos disulfidiniais ryšiais, grandinėse gausu šių aminorūgščių pasikartojimų: alaninas-alaninas ir prolinas-prolinas.	Stabdo per didelį HA kristalų formavimąsi.

Cirkuliacijos atnešti baltymai: Ketvirtadalį kaulinio audinio ECM nekolegeninių baltymų sudaro ne kaulinio audinio ląstelių sintetiniai, bet cirkuliacijos metu iš gretimų audinių atnešami baltymai (Rosen, 2013) (1.7 lentelė). Didžioji šių baltymų dalis yra sintetinama kepenyse ar kraujodaros audiniuose, tai yra įvairūs imunoglobulinai, pernašos baltymai, citokinai, chemokinai bei augimo veiksniai.

Iš cirkuliacijos metu atneštų baltymų didžiausiais kiekiais ECM yra aptinkami kraujo serumo baltymai – albuminas ir α_2 -HS-glikobaltymas. Abu šie baltymai savo struktūroje turi rūgštinių aminorūgščių, kurios, besijungdamos su HA, padeda šiems baltymams tvirtintis prie kaulinio audinio ECM. Manoma, jog abu šie serumo baltymai reguliuoja ECM mineralizaciją, neleisdami susidaryti per dideliams HA kristalams. Tačiau tai nėra vienintelė jų funkcija. Jie taip pat gali skatinti ląstelių endocitozę, veikti kaip augimo veiksniai ar chemoatraktantai, tarnauti osteoprogenitorinių ląstelių pritraukimui (Bilezikian ir kt., 2008).

1.5 Kaulinio audinio regeneracija

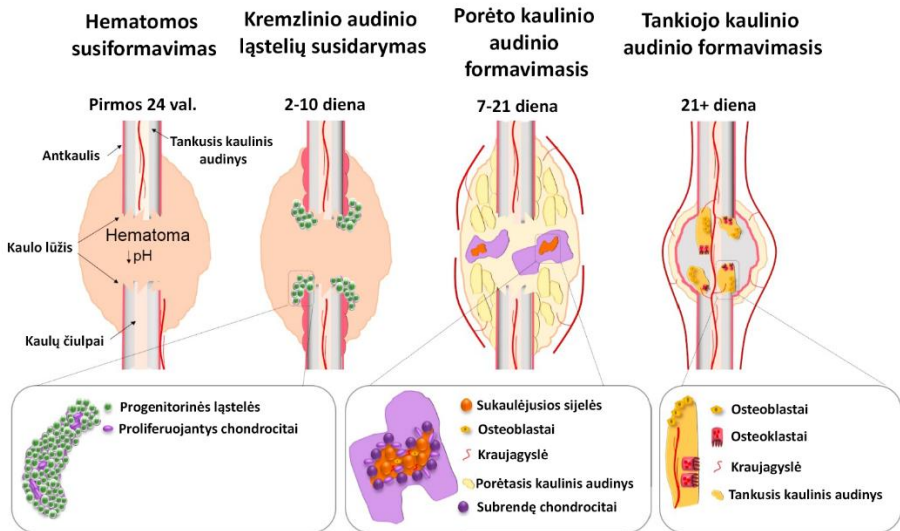
Kaulinis audinys - tai toks audinys, kuris įvairių pažeidimų atveju geba pats savaime regeneruoti nesusidarant randui. Dažniausias kaulinio audinio regeneracijos pavyzdys - kaulų lūžių sugijimas (Dimitriou ir kt., 2011). Tokių kaulinio audinio defektų regeneracija yra griežtai reguliuojamas procesas, susidedantis iš keleto skirtingų stadijų (1.4 pav.): 1) uždegiminė fazė, kraujosruvos susidarymas; 2) progenitorinių ląstelių pritraukimas ir kremzlinio audinio ląstelių susidarymas; 3) kremzlinio audinio salelių mineralizacija ir brendimas; 4) sukaulėjusių salelių persitvarkymas, galutinio kaulinio audinio susidarymas (Ho-Shui-Ling ir kt., 2018; Kheirallah ir Almeshaly, 2016).

Pirmoji, uždegiminė, stadija prasideda iškart po kaulo lūžio. Lūžęs kaulas pažeidžia šalia esančius audinius bei kraujagyslių tinklą, dėl to pažeistoje vietoje susiformuoja hematoma. Praėjus maždaug 24 val. prasideda antroji kaulinio audinio regeneracijos stadija. Jos metu į susidariusią hematoma ima migruoti neutrofilai. Neutrofilai ima sekretuoti monocitų ir makrofagų chemoatraktantus – interleukiną-6 ir chemokino ligandą 2 (Claes ir kt., 2012). Į pažaidos vietą atkeliavę monocitai ir makrofagai (M1 prouždegiminio fenotipo) pašalina nekrozinės ląstelės bei lūžusio kaulo fragmentus. Kita dalis makrofagų (M2 antiuždegiminio fenotipo), atmigravusių į pažaidos vietą, ima sekretuoti įvairius uždegiminius, chemotaksinius ir progenitorinius mediatorius (SDF-1 α (angl. *stromal derived factor-1 α*), TNF- α , interleukiną-1 β , interleukiną-6, chemokino ligandą 2, BMP, fibroblastų augimo veiksnį, WNT šeimos baltymus) tam, kad į pažaidą iš kaulų čiulpų, antkaulio ir kortikalinio kaulo būtų pritraukiamos progenitorinės SC (Schlundt ir kt., 2018). Tai lemia regeneracinio proceso pradžią, kurio dėka maždaug po savaitės pažaidos vietoje uždegiminė reakcija ir hematoma išnyksta, o į pažaidos vietą atmigravusios progenitorinės ląstelės ima telktis į grupes, inicijuojama chondrogeninė diferenciacija. Įdomu, kad chondrogenine linkme diferencijuoja tik progenitorinės ląstelės, atkeliavusios iš antkaulio (Colnot, 2009). Po to prasideda trečioji kaulinio audinio regeneracijos stadija – tarpinio kaulinio audinio formavimasis. Ši stadija yra beveik analogiška embriono vystymosi metu vykstančiam kremzliniam kaulinio audinio formavimuisi (Ortega ir kt., 2004). Šiuo metu vis daugiau progenitorinių SC virsta kremzlinėmis. Manoma, kad vieta, kurioje SC atsiduria atmigravusios į pažaidą, lemia tai, ar jos pirmiausia diferencijuos į kremzlinį audinį, ar pasuks osteogeninės diferenciacijos keliu. Kadangi chondrocitai geba

išgyventi mažai vaskuliarizuotoje aplinkoje, todėl SC, atsidūrusios toli nuo kraujagyslių, pirmiausia ima diferencijuoti chondrogenine linkme (Schindeler ir kt., 2008). Tačiau į pažaidos vietą migruoja ir endotelinės kamieninės ląstelės, kurios aplink diferencijuojančius chondrocitus ima formuoti naujas kraujagysles. Pilnai diferencijavę bei subrendę chondrocitai ir greta jų susiformavę kraujagyslės inicijuoja ECM mineralizaciją, susidaro sukaulėję sijelės. Aplinkui sukaulėjusias sijeles iš likusių prognetorinių ląstelių pirmiausia ima formotis porėtasis kaulinis audinys. Čia prasideda paskutinė kaulinio audinio regeneracijos stadija – tankiojo kaulinio audinio formavimasis. Ankstesnėje stadijoje susidaręs porėtasis audinys toliau yra pertvarkomas osteoklastų-osteoblastų sąveikos metu, kol suformuojamas galutinis, kaulo išorėje esantis tankusis kaulinis audinys (Ho-Shui-Ling ir kt., 2018).

Tačiau yra nemažai atvejų, kai kaulų lūžiai (13 % visų blauzdikaulių lūžių) patys savaime nesugyja. Dar dažniau, įvykus kitokiems kaulinio audinio pažeidimams (genetinės ligos, vėžiniai susirgimai, įvairūs uždegimai ir pan.) susidaro kritinio dydžio kaulinio audinio defektai, kurie patys savaime regeneruoti nebesugeba. Tada yra atliekamos ortopedinės, žandikaulio ar kitos srities transplantacinės operacijos, taip stengiantis pažeistą kaulinį audinį regeneruoti dirbtinai (Dimitriou ir kt., 2011). Gydant tokius kaulinio audinio kritinius defektus „auksiniu standartu“ laikomi ir naudojami biologiniai kaulinio audinio transplantatai (X. Chen ir kt., 2018). Išskiriamos trys pagrindinės transplantatų kategorijos: autologiniai (to paties individo), alogeniniai (kito donoro) ir ksenogeniniai (kitos biologinės rūšies individo) audiniai. Tačiau jie visi turi nemažai minusų (Ho-Shui-Ling ir kt., 2018; Roseti ir kt., 2017). Autologiniai transplantatai, žinoma, yra geriausi, tačiau dėl atsiradusių kaulinio audinio susirgimų ar didelių pažaidų iš paciento neįmanoma paimti reikiamo kiekio audinio, be to, tokio audinio paėmimas reikalauja dar vienos papildomos chirurginės intervencijos į paciento organizmą (Laurencin ir kt., 2006). Tuo tarpu alo- ir ksenotransplantatų didžiausi minusai yra galimas patogenų perdavimas iš donoro recipientui bei paciento imuninis atsakas į audinį, atkeliavusį iš kito organizmo (Roseti ir kt., 2017).

Paminėtos priežastys verčia mokslininkus ieškoti naujų kaulinio audinio atkurimo būdų. Mėginama pasitelkti audinių inžineriją ir tokiu būdu sukurti dabar naudojamų kaulo transplantatų pakaitalus (Ho-Shui-Ling ir kt., 2018).



1.4 pav. Kaulinio audinio regeneracija po kaulo lūžio (pagal (Ho-Shui-Ling ir kt., 2018).

1.6 Audinių inžinerija kaulinio audinio regeneracijai

Kaip jau minėta aukščiau, audinių inžinerijos principais kuriant dirbtinį kaulinį audinį svarbu, jog pagamintas konstruktas būtų biosuderinamas, pasižymėtų osteointegracinėmis ir net osteoindukcinėmis savybėmis (X. Chen ir kt., 2018; T. ir C., 2001). Tačiau osteointegracijos bei osteoindukcijos neįmanoma pasiekti be kraujagyslių tinklo, kurio formavimasis taipogi turėtų inicijuoti dirbtinio audinio fragmentas. Dirbtiniame konstrukte ar po transplantacijos aplink jį, organizme nesusiformavus naujoms kraujagyslėms, ląstelės žūva dėl maisto medžiagų ir deguonies stokos, todėl žūva ir pagamintas dirbtinis audinys. Kol kas vis dar nėra atrastas optimalus ląstelių, karkaso bei signalinių molekulių derinys, kuris dirbtiniame kauliniame audinyje inicijuotų tiek osteo-, tiek ir angiogenezę (J. Chen ir kt., 2018; Krishnan ir kt., 2014).

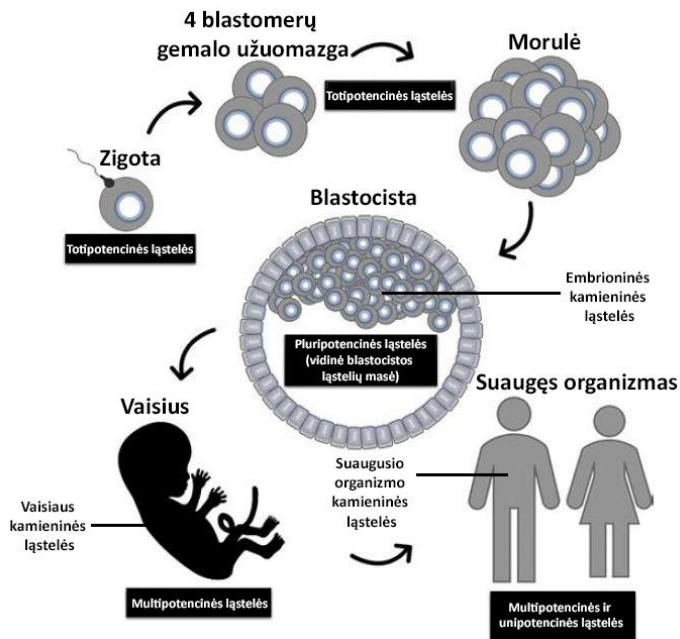
1.6.1 Kamieninės ląstelės kaulo regeneracijoje

Ląstelės, naudojamos dirbtinio audinio konstravimui, yra pirma ir labai svarbi audinių inžinerijos dedamoji. Pagal tai, kokį audinį siekiama sukurti, svarbu išsirinkti tam tinkamiausią ląstelių šaltinį. Pasirinktos ląstelės turi sintetinti ir ekspresuoti augimo veiksnius ir citokinus, skatinančius pažeisto

audinio regeneraciją ir angiogenezę, bei lengvai integruotis į greta esančius audinius. Dirbtinio kaulinio audinio konstravimui gali būti naudojamos pirminės besidiferencijuojančios kaulinio audinio ląstelės arba SC (Polak ir Bishop, 2006).

Pirmosios grupės ląstes galima nesudėtingai išskirti iš paciento kaulinio audinio. Jos užtikrintai formuos būdingą ECM, ekspresuos reikiamus augimo veiksnius ir citokinus bei lengvai integruosis į organizmą. Tačiau dažniausiai dėl esančių ir taip didelių audinio pažeidimų reikiama šių ląstelių kiekį išskirti yra labai sunku. Nors šio tipo ląstelės dirbtinio kaulo inžinerijoje dar naudojamos, tačiau dėl lėto jų dauginimosi mokslininkai dažniausiai renkasi alternatyvias ląstelių rūšis (Howard ir kt., 2008; Polak ir Bishop, 2006).

Kitos grupės ląstelės, pasitelkiamos dirbtinio kaulinio audinio konstravimui – SC. Tai nespecializuotos, puikiai besidauginančios ir gebančios diferencijuoti įvairiomis kryptimis ląstelės. Pagal savo diferenciacijos galimybes SC galima skirstyti į kelias grupes : totipotencines (gali diferencijuoti į bet kurią organizmo ląstelę), pluripotencines (gali diferencijuoti į bet kurį audinį, susidarantį iš endodermos, mezodermos ar ektodermos), multipotencines (gali diferencijuoti į įvairių tipų, tačiau kilusias iš to paties gemalinio lapelio audinių ląsteles) ir unipotencines (gali diferencijuoti tik į to paties audinio ląsteles, kuriame jos yra aptinkamos) (1.5 pav.) (Zakrzewski ir kt., 2019). Pagal tai, iš kur išskiriamos, SC gali būti skirstomos į skirtingus tipus ir potipius. Žinomi trys pagrindiniai SC tipai – embrioninės SC (ESC), suaugusio organizmo SC (SKL) ir indukuotos pluripotencinės SC (iPSC) (Yousefi ir kt., 2016).



1.5 pav. Kamieninių ląstelių plastiškumas ir galimi jų šaltiniai (pagal Łos ir kt., 2019).

ESC - pluripotencinės SC, gebančios diferencijuotis į bet kurio audinio ląsteles. Šios ląstelės išskiriamos iš vidinės blastocistos masės, todėl ESC gavimo metu vaisius žūva. Nors šios ląstelės galėtų labai pagerinti ateities kaulo regeneracinės medicinos pasiekimus, tačiau jų naudojimas gydymui ir moksliniams tyrimams sukelia daug etinių problemų, todėl daugelyje šalių ESC naudojimas yra uždraustas arba griežtai kontroliuojamas (Naderi ir kt., 2011).

iPSC - dar vienas ląstelių tipas, kurį mėginama pritaikyti dirbtinio kaulinio audinio konstravimui. Savo diferenciacijos galimybėmis, morfologija ir augimo ypatybėmis iPSC tapatinamos su ESC. Šios ląstelės gali būti gaunamos iš žmogaus pirmines somatines (pilnai subrendusias ir diferencijavusias) ląsteles įterpus kelių transkripcijos veiksnių genus. Tai leidžia sukurti autologines pluripotencines ląsteles, kurias, išvengiant organizmo imuninio atsako, galima taikyti paciento gydymui. Naudojant šias ląsteles būtų išvengiama ir etinių problemų. Tačiau dėl iPSC geno nestabilumo bei didelės supiktybėjimo rizikos audinių inžinerijoje jos vis dar nėra plačiai naudojamos (Yousefi ir kt., 2016).

SKL - plačiausiai visoje audinių inžinerijoje naudojamos multipotencinės ląstelės. Jos aptinkamos daugelyje audinių: kaulų čiulpuose, kraujyje,

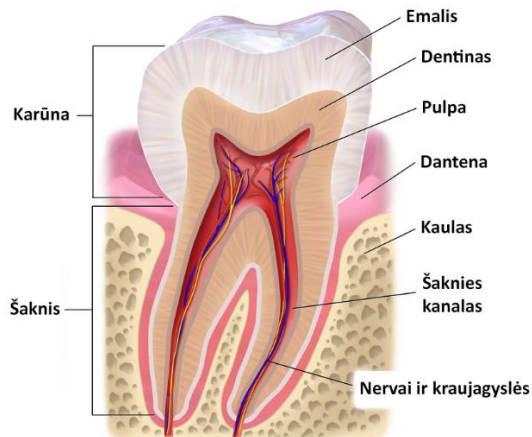
kepenyse, raumenyse, odoje, antkaulyje, dantų pulpoje, riebaliniame audinyje ir pan. Audiniuose SKL telkiasi specialiose nišose, iš kurių, atsiradus audinio pažeidimui, migruoja į pažaidos vietą ir atkuria audinio funkciją. Nors SKL pasižymi mažesniu plastiškumu nei ESC ar iPSC, tačiau tyrimais pademonstruota, jog jos puikiai diferencijuoja į įvairius ląstelių tipus (Naderi ir kt., 2011). Pagal ląstelių kilmę (iš kokio organo ar audinio SKL yra išskiriamos) jas galima skirstyti į keletą tipų – hemapoetines, liaukines, nervines, mezenchimines, endotelines ir pan. (Łos ir kt., 2019).

Dirbtinio kaulinio audinio konstravimui labiausiai tinkamos yra mezenchiminės SC (MSC). Tai į fibroblastus panašios morfologijos, prie pagrindo besitvirtinančios ląstelės, gebančios diferencijuotis osteogenine, chondrogenine, miogenine ir adipogenine kryptimis. Skirtingos rūšies MSC būdingi skirtingi paviršiaus žymenys, tačiau yra ir bendri MSC ląstelių tipai būdingi požymiai, t.y., jos turi būti CD73, CD90, CD105 atžvilgiu teigiamos, tačiau CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 atžvilgiu neigiamos (Dominici ir kt., 2006). Šios ląstelės audinių inžinerijoje yra populiarios ne vien dėl savo plastiškumo. Tyrimais parodyta, kad MSC taip pat pasižymi ir imunomoduliaciniu bei angiogeniniu potencialais. Šios ląstelės sukuria imunoslopinančią aplinką, kuri trukdo pasireikšti dendritinių ir T-ląstelių funkcijoms. MSC taip pat geba sekretuoti angiogenezę skatinančius citokinus, taip atlikdamos ir proangiogeninę funkciją (M. B. Murphy ir kt., 2013). Lengviausiai MSC diferencijuoja ta kryptimi, iš kokio audinio ar organo jos yra išskirtos. Todėl tinkamiausios MSC ląstelių rūšys kaulinio audinio regeneracijai yra kaulų čiulpų, antkaulio ar dantų pulpos kilmės SC (Sacchetti ir kt., 2016; Musina ir kt., 2005).

Plačiai tyrimuose bei gydymui naudojamos kaulų čiulpų kilmės SC (BMSC) dažniausiai yra išskiriamos iš dubens kaulo keteros arba krūtinkaulio kaulų čiulpų. Šios ląstelės geba formuoti adhezinių ląstelių kolonijas, turi fibroblastams būdingą morfologiją ir gali diferencijuoti ne vien tik mezodermos (Birmingham ir kt., 2013; Wakitani ir kt., 1995), bet net ir ektodermos (Bae ir kt., 2011; Woodbury ir kt., 2000) bei endodermos kryptimis (Stock ir kt., 2014; Phadnis ir kt., 2011). Todėl BMSC laikomos pačia universaliausia MSC rūšimi. Didžiausias šių ląstelių minusas yra tai, jog, pacientas turi išverti papildomą intervenciją į organizmą, o jų išskyrimo procedūra yra labai skausminga. Kitas trūkumas - BMSC yra labai mažai, jos sudaro tik 0,01 % visų kaulų čiulpuose aptinkamų ląstelių. Susumavus visus šių ląstelių plusus ir minusus manoma, kad BMSC regeneracijoje reikėtų naudoti tik esant būtinybei (Łos ir kt., 2019; Dai ir kt., 2016).

Kita, vis plačiau dirbtinio kaulinio audinio konstravimui naudojama MSC rūšis - antkaulio kilmės SC (PDSC). Antkaulis - tai plona membrana, dengianti išorinį kaulo paviršių. Antkaulį galima suskirstyti į išorinį (sudaro elastinės skaidulos, mikro kraujagyslės ir fibroblastai) bei vidinį/osteogeninį (čia aptinkamos PDSC) sluoksnius (Ferretti ir Mattioli-Belmonte, 2014). Kaului vystantis ar gijant lūžiams antkaulyje esančios PDSC atlieka svarbų „statybinį“ vaidmenį. Pavyzdžiui, po lūžio šios ląstelės migruoja į pažaidos vietą, ten radę tinkamą „nišą“ diferencijuojasi į osteoblastus ir taip pagreitina kaulo gijimą (Kargozar ir kt., 2019).

Iš antkaulio išskirtos PDSC geba diferencijuoti į adipocitus, osteoblastus bei chondrocitus, jos taip pat ekspresuoja MSC ląstelėms būdingus paviršiaus žymenis (Paz ir kt., 2018). Svarbus PDSC pranašumas prieš kitas MSC rūšis yra tai, jog iš vyresnio amžiaus žmonių išskirtos PDSC demonstruoja panašias regeneracines savybes kaip ir jauno organizmo ląstelės. Ši jų ypatybė siejama su pastebėtu didesniu PDSC telomerų stabilumu *in vitro* (De Bari ir kt., 2006). Tačiau, kaip ir BMSC atveju, taip ir išskiriant autologines PDSC, reikalinga papildoma intervencija į paciento organizmą (Chang ir Knothe Tate, 2012).



1.6 pav. Danties struktūra (pagal (Foundation, 2014)).

Dar viena dirbtinės kaulo regeneracijos inicijavimui naudojama ir sparčiai populiarėjanti MSC rūšis yra dantų pulpos kilmės SC (DPSC). Šios ląstelės yra išskiriamos iš dantų pulpos audinio, esančio vaikų pieniniuose ar suaugusiųjų pastoviuosiuose dantyse (1.6 pav.). Dantų pulpos audinys - tai jungiamasis audinys, esantis mineralizuoto danties vidiniame kanale. Dantų pulpa yra labai svarbi išlaikant danties gyvybines funkcijas, formuojantis

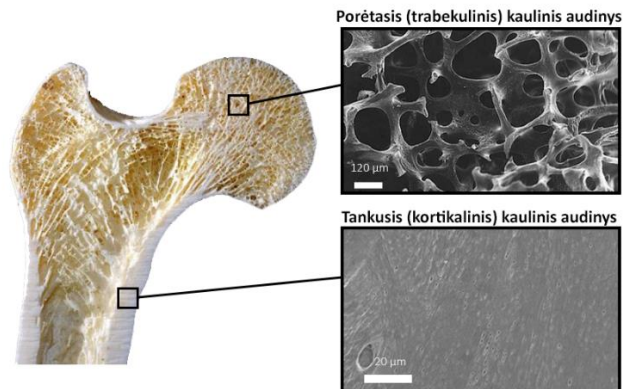
dentinui bei dantų šaknims (Yamada ir kt., 2019). Tačiau krentant vaikų pieniniams dantis ar danties šalinimo atveju iš jame esančio pulpos audinio galima labai nesudėtingai išskirti DPSC (Perez ir kt., 2018; Bertassoli ir kt., 2016). Nustatyta, jog iš danties pulpos išskirtos DPSC geba diferencijuoti ne vien į audinių, kilusių iš mezodermos, ląsteles, tačiau pasižymi ir neurogeniniu bei, svarbiausia, endoteliniu diferenciacijos potencialu (Mullins ir kt., 2019; Luo ir kt., 2018). Be to, DPSC gali būti saugiai šaldomos, išlaikant nepakitusias jų diferenciacijos galimybes (Perez ir kt., 2018; Han ir kt., 2017). Tai gali būti gera alternatyva virkštelės kraujo SC, surenkamoms gimdymo metu. Tyrimais pademonstruota, kad, sudarant tinkamas sąlygas, DPSC kauline linkme geba diferencijuoti netgi spontaniškai (Kanafi ir kt., 2014). Toks ganėtinai lengvas, nereikalaujantis papildomų chirurginių procedūrų DPSC išgavimas, galimybė jas saugoti iki kol jų prireiks pacientui bei lengva šių ląstelių diferenciacija osteogenine ir endoteline kryptimis padaro DPSC labai patraukliu SC šaltiniu įvairiems regeneraciniams tikslams, tarp jų – ir dirbtinio kaulinio audinio konstravimui.

1.6.2 Karkasų vaidmuo kaulinio audinio inžinerijoje

Kita svarbi audinių inžinerijos dedamoji – karkasai. Kuriant dirbtinį kaulinį audinį jie iš dalies atstoja natūraliai audinyje aptinkamą kietąją ECM dalį. Konstruojant audinį labai svarbu parinkti tinkamas medžiagas bei pačio karkaso struktūrą. Dirbtiniais būdais sukurtas karkasas turi savo mechanines, geometrinines ir chemines savybes kuo labiau imituoti kaulinio audinio ECM, nes, implantavus į organizmą, jis turi sukurti palankią aplinką ląstelių prisitvirtinimui, dauginimuisi, migracijai, osteogeninei diferenciacijai ir net inicijuoti naujo kraujagyslių tinklo formavimąsi (Castells-Sala Cristina, Alemany-Ribes Mireia, 2015).

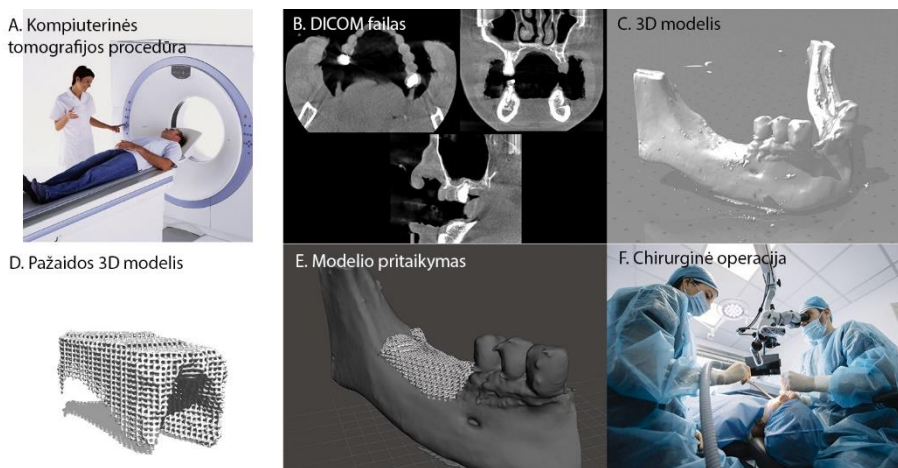
Mechaninės savybės: karkasai, skirti regeneruoti kaulą, turėtų pasižymėti kauliniam audiniui būdingomis mechaninėmis savybėmis. Tiksliai kaulo mechanines savybes apibrėžti labai sunku, nes tame pačiame kaule jų diapazonas gali skirtis, pavyzdžiui, kortikalinių kaulų Jungo modulis (fizikinis dydis, nusakantis medžiagos atsparumą gniuždymui ar tempimui) yra nuo 1 iki 20 GPa; trabekulinių kaulų - 0,1-1 GPa. Nors šios mechaninių savybių ribos yra labai plačios, tačiau kuriant karkasą, kuris bus naudojamas kaulo regeneracijai, būtina į jas atsižvelgti (Mao ir kt., 2018; D. K. Kim ir kt., 2017; Gibson, 1985).

Geometrinės savybės: vertinant natūralų kaulinį audinį makroskopiškai, galima teigti, jog tai yra ne homogeniškas, bet porėtas, anizotropinis audinys. Nors jo porėtumas gali varijuoti nuo 5 iki 95 %, tačiau daugumai kaulų būdingas arba labai mažas, arba labai didelis porėtumas. Atitinkamai yra išskiriami du kaulinio audinio tipai (1.7 pav.). Trabekuliniam audiniui, dar vadinamam porėtąja arba akytąja medžiaga (lot. *substantia spongiosa*), yra būdingas 50-95 % porėtumas. Porų sijąs sudaro mineralizuota kaulinė tarpląstelinė medžiaga, joje yra įsitvirtinę osteocitai. Akytoji medžiaga sudaro ilgųjų kaulų epifizės, didelę dalį trumpųjų kaulų, šis kaulinis audinys aptinkamas slankstelių vidinėje dalyje bei plokščiuosiuose kauluose. Šiame audinyje poros yra susisiekiančios, užpildytos raudonaisiais kaulų čiulpais, gaminančiais raudonąsias kraujo ląsteles (Morgan ir kt., 2008; Doblar ir kt., 2004). Antrasis kaulinio audinio tipas - kortikalinis kaulas arba tankioji medžiaga (lot. *substantia compacta*). Šiam audiniui būdingas tik 5-10% porėtumas, didžiausios poros - tik 50 nm skersmens, jose išsidėsto kraujagyslės (Grüneboom ir kt., 2019). Tankioji medžiaga sudaro ilgųjų kaulų diafizės. Kortikalinis audinys kaulams suteikia kietumo ir stiprumo, kurie reikalingi raumenų jėgai ir svorio apkrovoms atlaikyti (Porter ir kt., 2009; Doblar ir kt., 2004). Abiejų kaulinių audinių pasiskirstymas stuburinių kauluose nėra vienodas: pavyzdžiui, stuburas susideda iš trabekulinio ir kortikalinio audinių santykiu 75:25, tuo tarpu šlaunikaulio galvutėje šis santykis yra 50:50 (Clarke, 2008).



1.7 pav. Kaulinio audinio tipai (pagal (H. Jeong ir kt., 2019; Martin ir kt., 2015; Chappard ir kt., 2011)).

Nustatyta, kad optimali 3D struktūra, tinkanti dirbtinio kaulinio audinio formavimui, yra susisiekiančios poros. Tokia struktūra užtikrina aukštą paviršiaus ploto ir tūrio santykį (Karageorgiou ir Kaplan, 2005). Taip sukuriamas daug vietos ląstelių prisitvirtinimui ir dauginimuisi, o per susisiekiančias poras jos gali būti lengvai aprūpinamos maisto medžiagomis bei pašalinami metabolitai. Tokios susisiekiančios poros yra puikiai tinkamos ir naujo kraujagyslių tinklo formavimuisi. Tiek *in vitro*, tiek *in vivo* tyrimais parodyta, kad geriausiu osteoinduktyvumu pasižymi karkasai, turintys 100-500 μm poras (Sabree ir kt., 2015; Hannink ir Arts, 2011; Karageorgiou ir Kaplan, 2005). Kuriant kaulinio audinio karkasus svarbus matas yra akytojo ir tankiojo audinių santykis. Esant dideliame porėtumui, pastebimai prastėja mechaninės karkasų savybės - jie atlaiko mažesnes spaudimo, lenkimo ir tempimo jėgas (Zhao ir kt., 2018). Bet didelis porėtumas gerina bioaktyvias karkaso savybes - dėl didesnio paviršiaus ploto toks karkasas tampa patrauklesnis ląstelių dauginimuisi, adhezijai bei angiogenezei. Nustatyta, kad optimalus kaulinio audinio karkasų porėtumas yra apie 40-60 % (Murphy ir Atala, 2014).



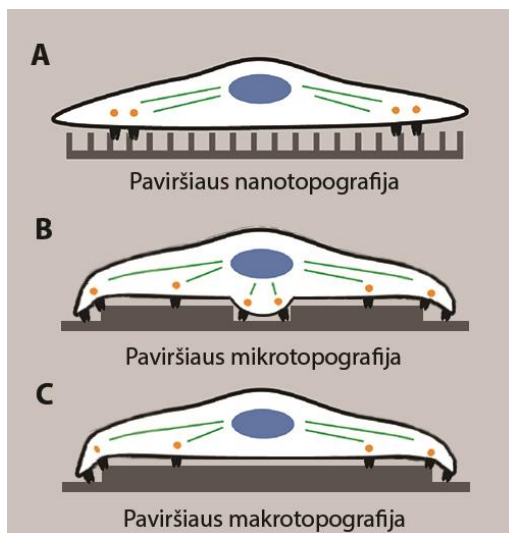
1.8 pav. Individualizuoto dirbtinio kaulinio transplantato gamyba. A – pacientui atliekama pažeistos kaulo vietos kompiuterinė tomografija; B – procedūros metu gauti kaulo pažaidos vaizdai; C – panaudojant kompiuterinės tomografijos vaizdus gaunamas 3D pažaidos modelis; D-E – pagal sumodeliuotą struktūrą maketuojamas tiksliai paciento pažaidą atitinkantis karkasas; F – karkasas spausdinamas 3D spausdintuvu, praturtinamas biologiškai aktyviomis molekulėmis ar autologinėmis paciento ląstelėmis ir chirurginės operacijos metu perkeliamas į organizmą.

Moksliniuose-eksperimentiniuose darbuose yra naudojama daug skirtingų porėtų karkasų gamybos metodų: stereolitografinis (Sabree ir kt., 2015), porogeno išplovimo (angl. *porogen leaching*) (Mao ir kt., 2018; Wang ir kt., 2010), šaldymas-džiovinimas (angl. *freeze-drying*) (Xu ir kt., 2011), formavimas dujomis (angl. *gas forming*) (Chen ir kt., 2012), fazių atskyrimo (angl. *phase separation*) (Conoscenti ir kt., 2017; Zhao ir kt., 2012) ir kt. Tačiau visi šie metodai leidžia sukurti tik nekontroliuojamo porų dydžių ir porėtumo struktūras. Naudojant šiuos karkasų gamybos metodus taip pat negalima užtikrinti, kad gautos poros bus susisiekiančios tarpusavyje, sunku tiksliai kontroliuoti kuriamo karkaso porėtumą (Ji ir kt., 2018). Naudojant šias gamybos technikas pagaminti du identiškus karkasus yra beveik neįmanoma, be to, jų gamyba užtrunka ilgai (Leong ir kt., 2003). Todėl šiuo metu pats populiariausias kauliniam audiniui skirtų porėtų karkasų gamybos būdas yra 3D spausdinimas. Šis gamybos metodas leidžia tiksliau valdyti pačio karkaso architektūrą, nes pagamintas objektas atitinka kompiuterinėmis programomis paruoštus modelius, pagal kuriuos jie ir yra spausdinami. Be to, karkaso modeliavimo ir spausdinimo procesai yra sąlyginai greiti, o tai taupo laiką ir mažina pagaminimo kaštus (Lam ir kt., 2002). Be šių privalumų, 3D spausdinimo technika pasižymi ir kita labai svarbia savybe - leidžia gaminti personalizuotus karkasus, individualiai pritaikytus kiekvienam pacientui, t.y. naudojant kompiuterinę tomografiją gaunami paciento kaulinio audinio pažeidimo vaizdai, pagal kuriuos sumaketuojamas tiksliai pažaidos formą ir tūrį atitinkantis karkasas (1.8 pav.) (Shanjani ir kt., 2011; Klammert ir kt., 2010; Leukers ir kt., 2005).

Karkasų osteokonduktyvumą, osteoinduktyvumą bei angioinduktyvumą gali lemti ne vien porėta jų struktūra. Tyrimais nustatyta, kad dėka receptorių, aktino filamentų ir sutelktinio sąlyčio baltymų kompleksų ląstelės geba jausti paviršiaus reljefą -briaunas ir įdubimus. (1.9 pav.). Ląstelei prisitvirtinus prie paviršiaus ir bent dviejose vietose suformavus stiprias sutelktinių sąlyčių sritis, aktyvuojami citoskeleto persitvarkymai (Ohashi ir kt., 2017). Aktino filamentai yra ištempiami ir išdėstomi paraleliai atsiradusiai jėgai, tai sukelia kofilino atsipalaidavimą ir miozino II prisijungimą, todėl susidariusios streso gijos yra stabilizuojamos (Anselme ir kt., 2010). Tokie citoskeleto persitvarkymai aktyvuoja ląstelės paviršiuje esančius tempimui jautrius receptorių, kurių dėka ji pajunta susidariusias mechanines jėgas. Jei tik aktino filamentas atpalaiduojamas, prie jo vėl prisijungia kofilinas, o tai lemia aktino filamentų suirimą (Ohashi ir kt., 2017; Curtis ir Wilkinson, 1997). Tokie mechaninio streso indukuoti aktino filamentų persitvarkymai ląstelėse aktyvuoja skirtingų už jos proliferaciją,

diferenciaciją ar žūtį atsakingų baltymų bei genų raišką. Pavyzdžiui, nustatyta, kad MSC prisitvirtinus prie kieto paviršiaus ir jose susiformavus aktino-miozino streso gijoms, pasikeičia branduolio lokalizacija bei aktyvuojamas transkripcijos koaktyvatorius su *yes* baltymu sąveikaujantis baltymas (YAP). YAP toliau jungiasi su transkripcijos veiksmu TEAD ir taip aktyvinama su ląstelių proliferacija ir osteogenine diferenciacija susijusių genų raiška (Ohashi ir kt., 2017).

Nustatyta, kad dėl paviršiaus topografijos pasikeitus ląstelės morfologijai, joje įvairių signalinių kelių dėka aktyvuojama augimo veiksmų, tokių kaip kraujagyslių endotelio augimo veiksmas (VEGF, SDF-1 α (angl. *Stromal cell-derived factor 1*), TGF- β 1, VEGFA ir trombocitų kilmės augimo veiksmas BB (PDGF-BB), atsakingų už angiogenezę, raiška (Saberianpour ir kt., 2018). Nors tikslūs signaliniai keliai, keičiantys ląstelių proliferaciją ar diferenciaciją joms sąveikaujant su skirtingos topografijos paviršiais, nėra iki galo iširti, tačiau nevienodas ląstelių atsakas į skirtingo kietumo bei reljefo paviršius yra aiškus ir neginčijamas (Anselme ir kt., 2010). Natūralų kaulinio audinio ECM sudarantys komponentai (HA nanokristalai, kolageno nanoskaidulos ir kt.), tarpusavyje sąveikaudami sukuria ECM paviršiaus mikro- ir nanostruktūrą, ant kurios ir auga kaulinės ląstelės (de Azevedo Gonçalves Mota ir kt., 2016; Venugopal ir kt., 2010; Wegst ir Ashby, 2004). Todėl, dirbtiniais metodais kuriant kauliniam audiniui regeneruoti tinkančius karkasus, mokslininkai dažnai siekia išgauti įvairius mikro- ir nanopaviršiaus nelygumus, kurie užtikrintų efektyvesnę SC osteo- bei angiogenezę (S. Zhang ir kt., 2018; Yao ir kt., 2017; Niu ir kt., 2017). Tačiau, dažniausiai, tokių tikslų porėtų mikro- ir nanolygmenyje struktūrizuotų karkasų sukūrimas reikalauja didelių piniginių ir laiko sąnaudų, o tai labai didina galutinio produkto kainą. Kaip parodė mūsų tyrimai, norint sukurti kuo labiau pacientų gydimui prienamą, bet ir pakankamai efektyvius kaulinio audinio karkasus, nebūtina gaminti tikslūs mikro- ir nanostruktūrų darinius, nes ir už ląstelės skersmenį didesnės struktūros pasižymi osteoindukcinėmis savybėmis (Alksne ir kt., 2019).



1.9 pav. Skirtinų paviršiaus topografijų įtaka ląstelių morfologijai (pagal (Reimer, 2016)).

Cheminės savybės: puikiai žinoma, kad karkaso osteo- bei angioinduktyvumui didelę įtaką turi ir panaudotos medžiagos cheminės savybės (Saberianpour ir kt., 2018; Barradas ir kt., 2011). Kaulinio audinio konstravimui naudojamos įvairios natūralios ir dirbtinės medžiagos (Alizadeh-Osgouei ir kt., 2019; Shanmugam ir Sahadevan, 2018; Jammalamadaka ir kt., 2018; Ozdil ir Aydin, 2014).

Natūralioms medžiagoms priskiriami komponentai, aptinkami kaulinio audinio ECM – albuminas, kolagenas, hialurono rūgštis ir pan. (Shanmugam ir Sahadevan, 2018). Šie junginiai yra biologiškai suderinami, tik retais atvejais sukelia imuninį organizmo atsaką. Be to, jų paviršiuje yra gausių signalinių sekų (tokių kaip RGD), kurias puikiai atpažįsta ląstelių paviršiaus receptoriai. Todėl ląstelės ant karkasų, pagamintų iš natūralių medžiagų, jaučiasi žymiai geriau – aktyviau dauginasi, geriau prie jų tvirtinasi ar net spontaniškai pasuka osteogeninės ir angiogeninės diferenciacijos linkme (Saberianpour ir kt., 2018; Ozdil ir Aydin, 2014). Tačiau natūralių medžiagų panaudojimą apsunkina jų gavimas, valymas bei sunkiau parenkami struktūrizavimo būdai. Dažniausiai tokie junginiai turi pereiti daug valymo ir plovimo procedūrų, nes priemaišos gali sukelti imuninį paciento organizmo atsaką. Taipogi, plovimų ir valymų bei vėliau pačio karkaso gamybos metu natūralios medžiagos gali prarasti savo biologines ypatybes (pvz., gali degraduoti signalinės baltymų sekos, kurias atpažįsta ląstelių receptoriai), dėl to su tokiu būdu pagamintais karkasais nebebus galima pasiekti norimo

ląstelių atsako (Shanmugam ir Sahadevan, 2018; Ozdil ir Aydin, 2014). Dar vienas šių medžiagų trūkumas – greita degradacija organizme. Po implantacijos, organizme, jos greit suskaidomos, todėl karkasas, pagamintas vien tik iš natūralių medžiagų, neužtikrins kaulinio audinio funkcijų palaikymo pažaidos vietoje (Bedian ir kt., 2017; Lee ir kt., 2014).

Kita didelė junginių grupė, naudojama kaulinio audinio karkasų konstravimui, yra dirbtinės arba sintetinės medžiagos. Pastarosios karkasų gamyboje yra patrauklios, nes naudojant jas nesudėtinga kontroliuoti konstruojamo karkaso chemines bei mechanines savybes. Sintetines medžiagas dar smulkiau galima skirstyti į metalus, polimerus ir keramiką (Jammalamadaka ir kt., 2018; Shanmugam ir Sahadevan, 2018).

Kaulinių implantų gamybai dažniausiai naudojami metalai, tokie kaip nerūdijantis plienas, titanas bei titano ir kobalto pagrindu sukurti lydiniai. Šie metalai pasižymi puikiomis mechaninėmis savybėmis, todėl ganėtinai plačiai taikomi medicinoje ir odontologijoje. Jie yra laikomi biologiškai suderinamais, tačiau yra atvejų, kai po implantacijos, greičiausiai dėl sąveikos su fiziologiniais skysčiais, organizme pasireiškė jų sukeltas toksinis efektas (Alizadeh-Osgouei ir kt., 2019). Metalai nėra bioskaidūs, todėl sunkiai integruojasi į audinius. Taipogi, daugelio implantų gamyboje naudojamų metalų tvirtumas yra žymiai didesnis nei natūralaus kaulo, todėl, žiūrint iš biomechaninės pusės, dėl tokio nesutapimo galimi recipientinio kaulo ir dirbtinio implanto visumos mechaninių savybių nevienodumai ir dėl to kylančios kaulo stabilumo problemos. Be to iš šių medžiagų pagamintus karkasus sunku pritaikyti regeneruoti nedidelius kaulo pažeidimus (Niinomi, 2002).

Keramikos grupei dažniausiai yra priskiriamos tokios medžiagos, kaip kalcio fosfato cementai ir įvairios keramikos (HA, trikalcio fosfatas (TCP) ir kt.), bioaktyvūs stiklai (biostiklai (BG)), neorganiniai metalų junginiai (druskos, oksidai) ir pan. (Jammalamadaka ir kt., 2018).

Kalcio fosfatai - junginiai, sudaryti iš kalcio katijonų bei fosfato anijonų. Jie yra pagrindinė neorganinė medžiaga, sudaranti natūralius kaulus (J. Jeong ir kt., 2019). Priklausomai nuo kalcio fosfato rūšies, po implantacijos į organizmą jie ima degraduoti (vieni prasčiau, kiti geriau), todėl į aplinką atsipalaiduoja kalcio ir fosfato jonai. Dėl to kaulo pažaidoje padidėja vietinė kalcio ir fosforo jonų koncentracija. Tokie atsipalaidavę kalcio ir fosforo jonai toliau inicijuoja mineralinio ECM formavimąsi bei su osteogenine (ColI, ALP, OPN, OCN ir kt.) ir angiogenine (VEGF, PDGF ir kt.) diferenciacijomis susijusių baltymų ir augimo veiksnių raišką (Saberianpour ir kt., 2018; Xiao ir kt., 2015; Ben-nissan, 2014; Whited ir kt., 2006).

HA yra vienas iš plačiausiai kaulinio audinio regeneracijos tyrimuose naudojamų kalcio fosfatų. Jo cheminė formulė yra $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Baino ir kt., 2015). Tyrimais parodyta, kad HA pasižymi geru osteosuderinamumu bei osteoinduktyvumu (skatina mineralizuoto ECM formavimąsi, aktyvina su kauline diferenciacija susijusių genų raišką ir pan.). Todėl klinikoje HA milteliai yra naudojami užpildyti kaulinio audinio pažeidimus ar padengti metalinius kaulinio audinio protezus, taip siekiant pagerinti jų integraciją į audinius (Zhang ir kt., 2016; Baino ir kt., 2015). Tačiau karkasai, pagaminti tik iš HA, yra labai trapūs, pasižymi silpnomis mechaninėmis savybėmis bei prasta biodegradacija (B. Huang ir kt., 2018; Kim ir kt., 2006).

Dar vienas kalcio fosfatas, plačiai naudojamas osteogeninės regeneracijos tyrimuose, yra TCP, jo cheminė formulė - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Yra išskiriamos dvi TCP fazės – α ir β . α -TCP yra būdinga monokloninė kristalinė struktūra, o β -TCP – romboedrinė. β -TCP kristalai yra stabilesni, jiems būdinga geresnė biodegradacija. Todėl kaulo regeneracijoje dažniausiai naudojama pastaroji TCP rūšis (Horch ir kt., 2006). β -TCP kristalai yra mažiau stabilūs nei HA, tačiau lyginant su HA, jie pasižymi žymiai geresne degradacija bei tirpumu (J. Jeong ir kt., 2019).

Dar viena plačiai kaulo regeneracijoje tyrinėjama keramika – BG. Tai medžiaga, kurią gali sudaryti skirtingas silicio, kalcio, natrio ir fosforo oksidų santykis. Plačiausiai tyrimuose yra naudojamas 45S5 rūšies BG, kurį sudaro 45 % silicio oksido, 24,5 % kalcio oksido, 24,5 % natrio oksido ir 6 % fosforo oksido (Rahaman ir kt., 2011). Nustatyta, kad BG iškart po implantacijos į organizmą geba prisitvirtinti prie jau esamo kaulinio audinio, inicijuoti jo regeneraciją ir net skatinti naujo kraujagyslių tinklo formavimąsi. Tokios BG savybės pasireiškia dėl palaipsniui organizme vykstančios jo paviršiaus degradacijos. Pirmiausia, iškart po BG karkaso implantacijos, fiziologinėje organizmo aplinkoje ant BG paviršiaus susidaro HA sluoksnis, primenantis biologiškai aktyvius kaulą sudarančius mineralus. Šis susiformavęs HA jungiasi su kaulinio audinio ECM esančiais ColI baltymais, taip šeimininko kaulinis audinys ima sąveikauti su BG karkasu. Vėliau, šiai keramikai palaipsniui degraduojant, ji paskleidžia tirpius silicio, kalcio, natrio ir fosfato jonus, kurie, savo ruožtu, stimuliuoja ląstelių osteogeninę diferenciaciją ir angiogenezę (Qi ir kt., 2018; Baino ir kt., 2015; Jones ir kt., 2010; Cao ir Hench, 1996). Nustatyta, kad BG pasižymi ir geresnėmis mechaninėmis savybėmis nei kitos keramikos. Tačiau vien iš BG pagaminti karkasai vis tiek yra trapūs ir negali užtikrinti mechaninės pažeisto kaulinio audinio funkcijos (Baino ir kt., 2015).

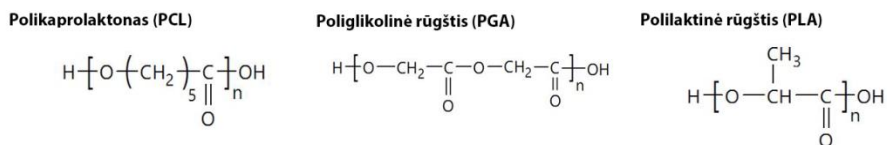
Metalai ir keramikos klinikoje jau yra taikomi kaulinių implantų gamyboje, tačiau šiuolaikinės audinių inžinerijos dėmesys vis labiau krypsta į sintetinius polimerus bei jų pritaikomumą regeneruojant kaulą. Lyginant su natūraliais, sintetiniai polimerai yra žymiai lengviau gaunami, mikrostruktūrizuojami ir pritaikomi didelio masto gamyboje. Kadangi jie yra termiškai ir mechaniškai atsparesni už natūralius, tai, keičiant jų cheminę sudėtį, nesudėtinga išgauti norimas gaminamo karkaso mechanines bei degradacines savybes (Shanmugam ir Sahadevan, 2018; Aiyelabegan ir Sadroddiny, 2017; Ozdil ir Aydin, 2014). Vieni populiariausių sintetinių polimerų, naudojamų kaulinio audinio inžinerijoje, yra linijiniai alifatiniai poliesteriai – poliglikolinė rūgštis (PGA), polikaprolaktonas (PCL) ir polilaktinė rūgštis (PLA) (1.10 pav.). Jie pasižymi geru biosuderinamumu ir optimaliu degradacijos greičiu, iš jų yra nesudėtinga formuoti norimos formos bei geometrijos struktūras (Ghassemi ir kt., 2018).

PGA polimeras pasižymi aukštu kristališkumu, dėl to yra netirpus daugumoje organinių tirpiklių. Šiam polimerui būdinga ganėtinai aukšta lydymosi temperatūra (~225 °C). PGA ištirpinti galima tik itin fluoruotuose tirpikliuose, tokiuose kaip heksafluorizopropanolis. Nors PGA galima pritaikyti daugelyje karkasų gamybos metodų, tačiau šis polimeras yra labai jautrus hidrolizinei degradacijai. Todėl, gaminant karkasus iš šios medžiagos, labai svarbu griežtai kontroliuoti visas gamybos sąlygas, kad pagamintas konstruktas jį implantavus į organizmą nedegraduotų per greitai (Gunatillake ir Adhikari, 2003).

Kitas sintetinis polimeras, plačiai tyrinėjamas kaulinio audinio inžinerijoje, yra PCL. Tai pusiau kristalinis polimeras, turintis ganėtinai žemą lydymosi temperatūrą (~60 °C). PCL yra tirpus daugumoje organinių tirpiklių (chloroforme, metileno chloride, benzene ir kt.) ir gali būti pritaikomas daugelyje karkasų gamybos metodų. Lyginant su PGA ir PLA, šiam polimerui būdinga net tris ir daugiau kartų lėtesnė degradacija. Dažnai manoma, kad PCL labiau tinkamas minkštųjų audinių regeneracijai, nes šis polimeras, panašiai kaip ir raumens audinys – geba atlaikyti dideles tempimo jėgas, tačiau jis yra jautrus spaudimui (Pei ir kt., 2017; Scaffaro ir kt., 2016).

Trečiasis sintetinis polimeras, naudojamas kaulo regeneracijos tyrimuose, yra PLA. Tai, kaip ir PCL, pusiau kristalinis polimeras, kurio lydymosi temperatūra yra ~175 °C. Jis taip pat yra tirpus daugelyje organinių tirpiklių ir lengvai pritaikomas įvairiuose karkasų gamybos methoduose. PLA gali būti išgaunamas net iš atsinaujinančių šaltinių, tokių kaip ryžiai, grūdų krakmolos ar cukranendrės (Xiao ir kt., 2012; Sabir ir kt., 2009). PLA polimeras susideda iš linijinių grandinių, kurių kiekvieną sudaro chiralinės pieno

rūgšties molekulės, turinčios L- ir D- izomerus. Todėl PLA turi du natūraliai aptinkamus optinius izomerus L-PLA ir D-PLA bei dirbtinės sintezės metu gaunamą šių izomerų racementą DL-PLA. PLA struktūroje esanti metilo grupė lemia tai, jog PLA yra hidrofobiškesnis ir lėčiau degraduojantis nei PGA (Sabir ir kt., 2009). Degradacijos metu PLA yra suardomas iki pieno rūgšties monomerų, kurie organizme Krebso ciklo metu suskaidomi iki anglies dioksido (Rezwan ir kt., 2006). Lyginat su PCL, PLA polimerui yra būdingas santykinai aukštas Jungo modulis. Visos šios savybės suteikia PLA didelį pranašumą prieš kitus kaulo inžinerijoje naudojamus polimerus (Scaffaro ir kt., 2016).



1.10 pav. Sintetiniai polimerai naudojami kaulinio audinio inžinerijoje.

Norint pasiekti kuo efektyvesnę kaulinio audinio regeneraciją, dabartiniuose tyrimuose pradėta tarpusavyje maišyti keramikas, metalus ir natūralius bei sintetinius polimerus, siekiant sukurti kompozitus, kurie dar labiau pagerintų karkasų biosuderinamumą, biomechaniką, angio- bei osteoinduktyvumą. Vienoms, grynomis, medžiagoms dažnai trūksta tam tikrų savybių, kurios apriboja jų pritaikymą kaulinio konstrukto kūrimui. Pavyzdžiui, HA ar BG pasižymi puikiais osteointegracinėmis, osteoindukcinėmis ar net angiogeninėmis savybėmis, tačiau karkasas, pagamintas iš gryno HA ar BG, bus labai trapus. Todėl kompozitų kūrimas, tarpusavyje maišant skirtingas medžiagas, leidžia nesunkiai pasiekti norimas kuriamo karkaso charakteristikas (D. Zhang ir kt., 2018; Turnbull ir kt., 2018).

Vieni iš kompozitų, plačiai tyrinėti kaulinio audinio inžinerijoje, yra sudaryti iš sintetinių polimerų bei keramikų. Kompozito pagrindu dažniausiai naudojami tokie polimerai, kaip PCL ar PLA, o papildomai į juos maišomos TCP ar BG keramikos (B. Huang ir kt., 2018; J.-W. Kim ir kt., 2017; Jing ir kt., 2017; Narayanan ir kt., 2016). Su šiais kompozitais atliktų eksperimentų rezultatai demonstruoja, jog jie kryptingai veikia kamieninių ląstelių osteogenezės ir angiogenezės procesus *in vitro* bei kaulo regeneraciją *in vivo*. Tačiau vis dar nėra iki galo aiškus labiausiai osteoinduktyvus, angio- bei osteoinduktyvus sintetinių polimerų bei

keramikų sąstatas. Todėl iki tokių kompozitų taikymo medicinoje vis dar reikia atlikti platesnius jų tyrimus (Gómez-Cerezo ir kt., 2019; Jing ir kt., 2017; J.-W. Kim ir kt., 2017; Zhang ir kt., 2017; Zhang ir kt., 2016; Jiang ir kt., 2012a; Deng ir kt., 2001; Kasuga ir kt., 2000; Marra ir kt., 1999; Lowry ir kt., 1997).

1.6.3 Signalinės molekulės kaulo regeneracijoje

Trečioji audinių inžinerijos dedamoji - signalinės molekulės. Natūraliai audinyje ląstelės tarpusavyje bendrauja dėka įvairių augimo veiksnių, citokinų bei kitų signalinių baltymų. Todėl ir audinių inžinerijoje bandoma šias signalines molekules panaudoti siekiant efektyvesnės pažeisto audinio regeneracijos. Tikimasi, jog tokiomis molekulėmis „dekoruoti“ karkasai ne tik lengviau integruosis į paciento organizmą, bet ir skatins spartesnę pažeisto audinio regeneraciją ar net greitins angiogenezės procesus. Galima išskirti tris pagrindinius tipus bioaktyvių molekulių, kuriomis siekiama patobulinti kaulo regeneracijai skirtus karkasus: 1) augimo veiksniai; 2) ECM aptinkami baltymai; 3) mažos signalinės molekulės. Visos šios molekulės karkaso inicijuojamą osteogenezę gali gerinti dvejopai – tiesiogiai ląstelėse inicijuoti procesus, susijusius su kauline ar angiogenine diferenciacija, arba veikti kaip slopikliai, inhibuojantys kaulo formavimą slopinančius veiksnius (Ho-Shui-Ling ir kt., 2018).

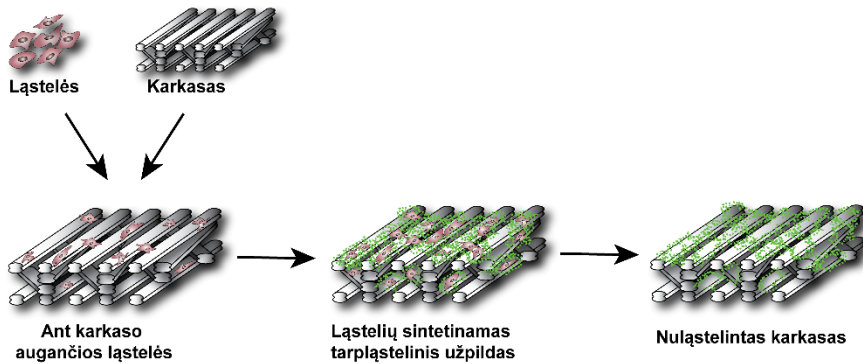
Augimo veiksniai. Yra išskiriami trys pagrindiniai augimo veiksniai, kurie naudojami dekoruojant kaulinio audinio regeneracijai skirtus karkasus – BMP-2, BMP-7 ir PDGF. Šios molekulės tiesiogiai sąveikauja su kaulinio audinio SC receptoriais, kurie aktyvuoja signalinius kelius, atsakingus už osteogeninę diferenciaciją. Konstruktai, savo sudėtyje turintys šiuos tris augimo veiksnius, jau yra taikomi ir klinikoje (Santo ir kt., 2013; Gerstenfeld ir kt., 2003). Iki klinikiniuose tyrimuose karkasų praturtinimui taip pat yra naudojami kai kurie augimo veiksniai, tokie kaip augimo/diferenciacijos veiksnys 5 ar VEGF, o kartais net augimo veiksnių kokteiliai, kuriems sąveikaujant su paviršiniaisiais SC receptoriais taip pat inicijuojama osteogenezė ir/ar angiogenezė (Vukicevic ir kt., 2014; Cui ir kt., 2008; Kaigler ir kt., 2006). Tačiau tyrimais parodyta, kad per didelės augimo veiksnių dozės gali ir neigiamai paveikti naujo kaulinio audinio formavimąsi. Pavyzdžiui, nustatyta, kad į kaulo pažaidos vietą patekus per dideliu BMP-2 kiekiu vyksta osteolizė (kaulinio audinio nykimas) (Zara ir kt., 2011). Todėl labai svarbu tinkamai prie karkasų pritvirtinti ar į jų

struktūrą inkorporuoti augimo veiksniai taip, kad reikiamu momentu nuo jo atsipalaiduotų tik optimalus bioaktyvių molekulių kiekis. Mokslininkai pačiais įvairiausiai sprendimais mėgina siekti šio tikslo (Ho-Shui-Ling ir kt., 2018). Vieni, naudodami skirtingus metodus, apdirba karkasų paviršius, prie kurių augimo veiksniai mėgina prikabinti dėka cheminių ir fizikinių ryšių (tokių kaip šifo bazės, peptidiniai, esteriniai, eteriniai ir kt. ryšiai) (Bouyer ir kt., 2016). Kiti emulsijose mėgina sukurti nanodaleles, su inkorporuotomis bioaktyviomis molekulėmis, kuriomis padengiamas visas karkaso paviršius (B. S. Kim ir kt., 2018). Treti mėgina gaminti augimo veiksnių pilnas mikrosferas, kurias maišo su karkaso pagrindą formuosiančiomis medžiagomis (Wang ir kt., 2017).

Tik nuo mokslininko tikslo, žinių, fantazijos ir išradingumo priklauso, kokį karkasų dekoravimo metodą jis pasirinktų ar sukurs. Tačiau visais metodais siekiama to paties - sukurti tokią sistemą, kuri skatintų tik tinkamoje vietoje ir tinkamu laiku vykstantį augimo veiksnių atsipalaidavimą (Ho-Shui-Ling ir kt., 2018).

ECM baltymai. Kitos bioaktyvios molekulės, naudojamos karkasų dekoravimui, yra kaulinio audinio ECM aptinkami baltymai ar specifinės šių baltymų aminorūgščių sekos. Dažniausiai tokie baltymai ar jų polipeptidinės grandinės dalys yra dirbtinai susintetinami naudojant baltymų sintezatorius. Tokios sukurtos bioaktyvios molekulės, kaip augimo veiksniai, sąveikauja su ląstelių paviršiuje esančiais ir jas atpažįstančiais specifiniais receptoriais, kurie po sąveikos į ląstelę perduoda signalą proliferuoti, migruoti ar prisitvirtinti ir diferencijuoti osteogenine ar angiogenine linkme (Ho-Shui-Ling ir kt., 2018; Cunningham ir kt., 2009; Qian ir Bhatnagar, 1996). Keletas tokių dirbtinai susintetintų polipeptidų pavyzdžių galėtų būti peptidai B2A2-K-NS ir P-15. Peptidas B2A2-K-NS yra BMP receptorių modulatorius, todėl karkasai, savo sudėtyje turintys šio peptido, geba aktyvuoti BMP signalinį kelią, kurio metu aktyvuojama ERK (angl. *Extracellular signal-regulated kinases*), nukreipianti ląstelę osteogeninės diferenciacijos kryptimi (Lin ir kt., 2012; Liu ir kt., 2012). P-15 yra 15 aminorūgščių peptidas, kilęs iš kolageno. Ląstelės prie karkasų, savo sudėtyje turinčių P-15, geba žymiai geriau prisitvirtinti bei diferencijuoti osteogenine linkme (Lindley ir kt., 2010; Gomar ir kt., 2007). Tokie sintetiniai peptidai, kaip ir prieš tai aptarti augimo veiksniai, prie karkasų paviršių gali būti prijungiami naudojant tiesiog fizinę adsorbciją ar kovalentinio imobilizavimo metodą (Curry ir kt., 2016). Tačiau pastaruoju metu vis daugiau dėmesio skiriama naujam ir ganėtinai nesudėtingam karkasų paviršiaus dekoravimo būdai - karkaso padengimui ląstelių kilmės ECM (1.11 pav.). Tokį ECM per keletą dienų *in*

vitro sąlygomis gali susintetinti ląstelių kultūra. Jis yra sudarytas iš įvairių baltymų – fibronektino, perlekano, kolagenų, hialurono rūgšties, proteoglikanų bei augimo veiksnių mišinio. Tokia turtinga ECM sudėtis yra žymiai pranašesnė už pavienius dirbtinai susintetintus ECM baltymų fragmentus (Kutys ir kt., 2013). *In vitro* ir *in vivo* tyrimai, karkasų padengimui naudojant ląstelių kulūros suformuotą ECM, yra aktyviai populiarėjanti sritis. Vis daugėja publikacijų, įrodančių teigiamą tokio ECM poveikį ląstelių osteogenezei (Wu ir kt., 2019; Fu ir kt., 2018; Noh ir kt., 2016). Tačiau skirtingos kilmės ląstelių linijos gali produkuoti skirtingos sudėties ECM, o skirtingi baltymai, esantys jame, gali inicijuoti skirtingą ląstelių atsaką. Ląstelių gaminamo ECM sudėtis gali kisti net ir nuo karkaso topografijos, ant kurio jos auginamos. Todėl, norint sukurti klinikoje taikytiną konstrukta, dekoruotą ląstelių kilmės ECM, šioje srityje vis dar reikia atlikti nemžai tyrimų.



1.11 pav. Karkasų padengimas ląstelių kilmės ECM.

Mažos signalinės molekulės. Paskutinė grupė medžiagų, kurios naudojamos karkasų bioaktyvių savybių pagerinimui, yra mažos signalinės molekulės. Šias molekules pakankamai nesudėtinga gauti cheminės sintezės būdu, kai kurios iš jų gali būti išskiriamos iš augalų ar grybų. Dėl savo mažo dydžio (dažniausiai jos yra mažesnės nei 1000 Da) molekulės nesukelia organizmo imuninio atsako. Be to, jos yra ganėtinais atsparios biologinių sąlygų pokyčiams, todėl jas lengviau inkorporuoti į gaminamus karkasus. Dėl savo mažos struktūros jos lengvai pereina per ląstelių membranos fosfolipidų dvisluoksnį, o patekusios į ląstelės vidų jos gali inicijuoti signalinių kelių, atsakingų už osteogeninę ir angiogeninę diferenciaciją, aktyvavimą (Goonoo ir Bhaw-Luximon, 2019; Wu ir kt., 2017; Zhou ir kt.,

2015; Egusa ir kt., 2010). Didelė mažų signalinių molekulių grupė, plačiai tyrinėjama kaulinio audinio regeneracijos tyrimuose, yra flavonoidai. Šiai grupei priklausantys cheminiai junginiai yra išskiriami iš augalų (vaisių, daržovių, gėlių, augalų stiebų ir pan.). Puikiai žinoma, kad flavonoidai pasižymi antioksidacinėmis, antivirusinėmis ir priešuždegiminėmis savybėmis. Tačiau tyrimais buvo įrodytas ir jų poveikis SC osteogenezei. Žinoma, kad jie MSC geba aktyvuoti BMP ir WNT signalinius kelius bei mitogenų aktyvinamas baltymų kinazes ir taip inicijuoti ląstelių diferenciaciją į osteoblastus (Song ir kt., 2013; Srivastava ir kt., 2013; Zhang ir kt., 2010). Nustatyta, kad osteoinduktyvumu pasižymi tokie flavonoidai kaip kvercetas, silibininas, hesperetinas, nobiletininas, syrengetinas ir kt. (Ying ir kt., 2013; Tominari ir kt., 2012; Hsu ir kt., 2009; Notoya ir kt., 2004; Gao ir Yamaguchi, 1999). O angiogenezę, yra žinoma, gali indukuoti flavonoidai - ikarinas ir kvercetas (Wu ir kt., 2017; Zhou ir kt., 2015). Susumavus visas teigiamas šių mažų signalinių molekulių savybes, manoma, kad jos gali tapti puikia alternatyva dabar plačiai kaulo regeneracijoje naudojamiems augimo veiksniams (Goonoo ir Bhaw-Luximon, 2019).

Norint suformuoti funkcionalų dirbtinį kaulinį audinį, reikia užtikrinti sėkmingą sąveiką tarp trijų pagrindinių audinių inžinerijos sudedamųjų dalių – kamieninių ląstelių, karkaso ir signalinių molekulių (C. M. Murphy ir kt., 2013). Apjungus šias audinių inžinerijos dedamąsias į vieną tikimasi gauti dirbtinio audinio konstrukta, kuris, kaulinio audinio regeneracijos atveju, pasižymėtų puikiu biosuderinamumu, osteointegracija ar net osteo- bei angio- indukcija (X. Chen ir kt., 2018; T. ir C., 2001). Norint tinkamai pasirinkti kiekvieną iš dedamųjų reikia ne tik puikiai išmanyti kaulinio audinio sandarą, bei jo regeneracinius procesus. Tačiau, taip pat svarbu, *in vitro* sąlygomis, iki galo išanalizuoti, dirbtinio kaulinio audinio konstrukto kūrimui tinkamų, kamieninių ląstelių, karkasų bei bioaktyvių molekulių tarpusavio sąveikas. Žinoma jog skirtingas karkasų reljefas, substrato cheminė sudėtis ar paviršiaus praturtinimas įvairiomis bioaktyviomis molekulėmis keičia ląstelių lemtį. Todėl tik nustačius geriausiu biosuderinamumu, osteoinduktyvumu bei osteo- ir angioinduktyvumu pasižyminčius karkasus bei jų paviršiaus modifikacijas, galima tikėtis pasiekti proveržio dirbtinio kaulinio audinio kūrime.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos

2.1.1 Reagentai

GAMINTOJAS	REAGENTO PAVADINIMAS
Sigma-Aldrich Co.	Etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA); dimetilsulfoksidas (DMSO); Deksametazonas; β -glicerofosfatas; L-Askorbo rūgštis 2-fosfatas; γ -linoleinė rūgštis; Kologenazė I; Hialuronidazė; Trinatrio citrato dihidratas; Natrio dodecilsulfatas (SDS); 50 wt. % Glutaraldehydas; TWEEN 20; 1,3 % Pikrinė rūgštis; 99, % Izopropanolis; Polibrenas
Thermo Scientific	50 mM EDTA; DNazė I (#EN0521); RNazė A, 10 mg/ml (#EN0531); <i>Bradford</i> reagentas; <i>Phosphatase Substrate Kit</i> (#37620); <i>Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)</i> (#K0221); acetilinti mažo tankio lipoproteinai (Ac LDL); <i>Lipofectamine 3000 Reagent</i>
Merck Millipore	Natrio hidroksidas (NaOH)
Invitrogen	<i>UltraPure</i> Glicinas; <i>PureLink RNA Mini Kit</i> (12183018A)
Applied Biosystems	<i>High capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i> rinkinys (00506262)
AppliChem GmbH	70 % perchlorinė rūgštis; Triton X-100; Jaučio serumo albuminai (BSA); 96% Acto rūgštis; 37 % Druskos rūgštis (HCl)
Life Technologies	Arklio serumas; TRIzol
EMSURE	Natrio chloridas (NaCl); Chloroformas
Gibco	Fosfatinio buferinio tirpalo (PBS) tabletės
Carl Roth, GmbH	4 % paraformaldehido tirpalas
AnalaR BDH	98 % sieros rūgštis (H ₂ SO ₄)
New England Biolabs, Inc.	Magnetinės dalelės, padengtos ožkos IgG antriniais antikūnais, atpažįstančiais pelės antikūno Fc domeną (#S1431)
Valentis	10 % Amoniakas (NH ₄ OH)
Corning	<i>Matrigel Matrix</i>
R&D Systems	<i>Proteome Profiler Rat Cytokine Array Kit, Panel A</i> rinkinys (ARY008)
Addgene	Lentivirusiniai vektoriai - <i>pLJM1-mCherry</i> ,

	<i>pLJM1-EGFP, pCMV-dR8.9, pCMV-VSV-G</i>
Nanodiagnostika	qPGR pradmenys
Decon Laboratories Limited	Decon-90
Vilniaus degtinė	96 % etanolis (EtOH)

2.1.2 Dažai ir antikūnai

GAMINTOJAS	DAŽO/ANTIŪNO PAVADINIMAS
Sigma-Aldrich Co.	Kristalvioletas; Alizarinas raudonasis S (ARS); <i>Oil Red O</i> ; <i>Direct Red 80</i>
Merck Millipore	Pirminiai pelės antikūnai, atpažįstantys CD45, CD54, CD14, CD90; Rodamino faloidinas; Asilo IgG (H+L) antriniai antikūnai, atpažįstantys triušio antikūno Fc domeną, konjuguoti su Cy3; Pirminiai pelės antikūnai, atpažįstantys vinkuliną; Pirminiai triušio antikūnai, atpažįstantys fibronektiną
Invitrogen	Ožkos IgG antriniai antikūnai, atpažįstantys pelės antikūno Fc domeną, konjuguoti su RPE; Ožkos IgG (H+L) antriniai antikūnai, atpažįstantys pelės antikūno Fc domeną, konjuguoti su Alexa Fluor 488
Abcam, Inc.	Pirminiai pelės antikūnai, atpažįstantys CD31 (ab64543); Pelės IgG2a izotipinė kontrolė (ab18413)
Life Technologies	4',6-diamidino-2-fenilindolo dihidrochloridas (DAPI)
Jackson Immuno Research, Europe Ltd	Žiurkės IgG (H+L) antriniai antikūnai, atpažįstantys pelės antikūno Fc domeną, konjuguoti su Alexa Fluor 594
Cell Signaling Technology	Pirminiai pelės antikūnai, atpažįstantys CD44 (#5640)
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Pirminiai pelės antikūnai, atpažįstantys CD13

2.1.3 Ląstelės, jų auginimo terpės ir komponentai

GAMINTOJAS	TERPĖS/KOMPONENTO PAVADINIMAS
Gibco	Iskovo modifikuota Dulbeco terpė (IMDM); Dulbeco modifikuota Eagle'o terpė (DMEM); fetalinis veršelio serumas (FBS); antibiotikų penicilino ir streptomicino (atitinkamai 100.000 vnt./ml ir 100.000 µg/ml) mišinys
ATCC	HEK293T ląstelių linija

2.1.4 Karkasų gamybai naudotos medžiagos

GAMINTOJAS	MEDŽIAGOS PAVADINIMAS
Ultimaker Original	PLA filamentas
STP chem solutions co., Ltd.	PLA granulės
Riga Technical University	HA milteliai
XL Sci-Tech, Inc.	BG 45S5 granulės

2.1.5 Tirpalai

PAVADINIMAS	SUDĖTIS
DPSC ir PESC auginimo terpė	IMDM, 10 % FBS, 100 VV/ml penicilinas ir 100 µg/ml streptomocinas
HEK293T auginimo terpė	DMEM, 10 % FBS, 100 VV/ml penicilinas ir 100 µg/ml streptomocinas
Transportavimo terpė	IMDM, 300 VV/ml penicilinas ir 300 µg/ml streptomocinas
Osteogeninės diferenciacijos terpė	DMEM, 10 % FBS, 100 VV/ml penicilinas ir 100 µg/ml streptomocinas, 50 nM deksametazonas, 25 µg/ml askorbo rūgštis, 10 mM β-glicerofosfatas
Miogeninės diferenciacijos terpė	IMDM, 2 % arklio serumas, 100 VV/ml penicilinas ir 100 µg/ml streptomocinas
Adipogeninės diferenciacijos terpė	IMDM, 10 % FBS, 100 VV/ml penicilinas ir 100 µg/ml streptomocinas, 200 µM γ-linoleinė rūgštis
DPSC-G atrankos terpė	DMEM, 10 % FBS, 100 VV/ml penicilinas ir 100 µg/ml streptomocinas ir 9 µg/ml puromocinas
PESC-R atrankos terpė	DMEM, 10 % FBS, 100 VV/ml penicilinas

	ir 100 µg/ml streptomycinas ir 5 µg/ml puromycinas
Virškinimo fermentų mišinys	0,5 % kologenazės, 0,3 % hialuronidazės, 0,25 % tripsino ir 0,02 % EDTA mišinys; paruoštas santykiu 2:3:3:3
EDTA/tripsino tirpalas	0,02 M EDTA ir 0,025 % tripsino tirpalas; paruoštas santykiu 4:1
Kristalvioleto dažas	0,1 % kristalvioleto tirpalas, paruoštas 20 % EtOH
Eliucijos tirpalas	0,1 % acto rūgštis, skiesta 50 % EtOH
ARS dažas	2 % ARS, ištirpintas dejonizuotame vandenyje, pH = 4,1–4,3. Reikiamam pH nustatyti naudoti NH ₄ OH ir H ₂ SO ₄
Oil Red O tirpalas	0,5 % Oil Red O tirpalas, paruoštas izopropanolyje
Deksametazono tirpalas	2,5·10 ⁻⁵ M deksametazonas, ištirpintas 96 % EtOH ir DMSO mišinyje; paruoštas santykiu 1:1
Askorbo rūgšties tirpalas	5 mg/ml L-Askorbo rūgšties 2-fosfatas, ištirpintas PBS
β-glicerofosfato tirpalas	1 M β-glicerofosfatas; paruoštas PBS
20x natrio citrato tirpalas (SSC)	3 M NaCl ir 0,3 M trinatrio citrato tirpalas; paruoštas dejonizuotame vandenyje, pH = 7,0, pH privedimui naudotas 10 M NaOH
Lizės tirpalas	0,02 % SDS tirpalas, paruoštas 1x SSC tirpale
Nulauštelinimo tirpalas	0,5 % Triton X-100 ir 20 mM NH ₄ OH; paruoštas PBS
Blokavimo tirpalas	3 % BSA ir 10 % FBS tirpalas; paruoštas PBS
<i>Sirius Red</i> dažas	1 mg/ml <i>Direct Red 80</i> , ištirpintas 1,3 % pikrinėje rūgštyje
Nukleazių tirpalas	0,5 % Triton X-100 ir 20 mM NH ₄ OH, paruoštas PBS

2.2 Metodai

2.2.1 Pirminių ląstelių linijų gavimas ir charakterizavimas

2.2.1.1 Ląstelių išskyrimas, auginimas ir piminės kultūros gryninimas

Tyrimuose naudotos Wistar klonu laboratorinių žiurkių SC. Eksperimentiniam darbui, kuriame naudoti bandomieji gyvūnai, buvo gautas LR Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos Etikos komisijos leidimas Nr. G2-40, 2016-03-18.

DPSC ir endotelinės ląstelės-pirmtakės atitinkamai buvo išskirtos iš žiurkės priekinių dantų pulpos ir plaučių kamieno kraujagyslės endotelio (PESC – plaučių kamieno endotelio ląstelės).

Ląstelių skyrimui iš gyvūno buvo išpreparuoti dantų pulpos ir plaučių kamieno arterijos audiniai, kurie patalpinti į transportavimo terpę, paskui 5 min. dar kartą plauti naujoje transportavimo terpėje. Po plovimo audinių fragmentai perkelti į sterilias stiklainaites ir mechaniškai susmulkinti. Ant susmulkintų audinių buvo užpiltas 1 ml „virškinimo“ fermentų mišinio. Kiekvieno audinio suspensija perkelta į mėgintuvėlius, kuriuose buvo inkubuota 45 min 37 °C temperatūroje, purtant 300 aps./min. greičiu (*Eppendorf Thermomixer comfort*). Po numatyto laiko fermentų veikimas buvo sustabdytas, mišinį iki 10 ml praskiedžiant auginimo terpę. Po to mėginiai centrifuguoti 10 min 975 g greičiu (*CL10 Centrifuge Thermo Scientific*). Susidaręs supernatantas nupiltas, ląstelės ir audinių gabalėliai dar kartą praplauti 10 ml auginimo terpę ir centrifuguoti 10 min 975 g greičiu. Gautas supernatantas nupiltas, ant nuosėdų užpilta nauja auginimo terpė ir ląstelių suspensija kartu su likusiais audinių fragmentais perkelta į auginimo flakonus. Maždaug po savaitės ląstelės suformavo pirminę heterogenišką ląstelių kultūrą.

Toliau šios ląstelių kultūros buvo gryninamos naudojant magnetines daleles. DPSC ir PESC išgryninimui naudotos dalelės, dengtos ožkos antrinais antikūnais, kurie geba jungtis prie pelės pirminių antikūnų, atitinkamai atpažįstančių ląstelės CD44 arba CD31 paviršiaus žymenis, Fc galo.

Prieš gryninimo procedūrą magnetinės dalelės buvo gerai išmaišytos jas purtant 300 aps./min greičiu 24 val. +4 °C temperatūroje. Tada jos 2x praplautos PBS, po to - 1 % BSA (ruoštas PBS) ir sukonzentruotos 50 µl 1 % BSA tirpale (šios procedūros buvo atliktos naudojant prietaisą *King*

Fisher mL). Sukoncentruotos dalelės pagal gamintojo rekomendacijas sumaišytos su CD44 arba CD31 žiurkės ląstelių paviršiaus žymenimis, atpažįstamais pirminius antikūnus, inkubuota 45 min. +4 °C temperatūroje. Po to dalelės 4x plautos 1 % BSA tirpalu ir sukoncentruotos 500 μl 1 % BSA tirpale.

Atliekant gryninimo procedūrą, anksčiau gautų pirminių heterogeninių DPSC ir PESC ląstelių monosluoksniai disperguoti naudojant 0,02 M EDTA. Atkibusios ląstelės buvo surinktos ir centrifuguotos 5 min 975 g greičiu. Supernatantas nupiltas, ląstelės išmaišytos 1 ml auginimo terpės.

Gautos suspensijos maišytos su atitinkamomis magnetinėmis dalelėmis, inkubuota 30 min +4 °C temperatūroje. Tada ląstelės su prie jų prikibusiomis magnetinėmis dalelėmis plautos PBS. Siekiant daleles atskirti nuo išsgrynintų ląstelių, pastarosios su prie jų prikibusiomis magnetinėmis dalelėmis buvo perkeltos į EDTA/tripsino mišinį, kurio pagalba ląstelės atskirtos nuo magnetinių dalelių, plautos auginimo terpe ir iššėtos.

Ląstelės augintos 37 °C temperatūroje, aplinkoje esant 5 % CO₂. Susiformavus monosluokniui, ląstelių kultūra buvo persėjama 1-2 kartus per savaitę, monosluoksnis disperguotas EDTA/tripsino mišiniu. Eksperimentams naudotos ne didesnio kaip 12 pasažo ląstelės.

2.2.1.2 Paviršiaus žymenų nustatymas

DPSC ir PESC buvo charakterizuotos pagal šiuos paviršiaus žymenis: CD13, CD14, CD31, CD44, CD45, CD54, CD90. Foninio fluorescencijos signalo nustatymui ląstelės buvo žymimos pelės izotipinės kontrolės antikūnais.

Tuo tikslu ląstelių monosluoksnis disperguotas EDTA, kiekvieno paviršiaus žymens nustatymui paruošta tiriamųjų ląstelių suspensija, kurios tankis 1·10⁶ ląst./ml. Ląstelių suspensija centrifuguota 5 min +4 °C 400 g greičiu (*HERMLE Labortechnik Gmb*), ląstelės suspenduotos 0,2 % FBS tirpale (ruoštas PBS), dar kartą centrifuguotos 5 min +4 °C, 400 g greičiu ir suspenduotos 1 % BSA tirpale (ruoštas PBS). Į gautus mėginius buvo pridėti pagal gamintojo reikalavimus praskiesti atitinkami pirminiai antikūnai, inkubuota 1 val. +4 °C temperatūroje, tamsoje. Ląstelės dar kartą centrifuguotos 5 min +4 °C 400 g greičiu ir 2x plautos 1 % BSA tirpalu centrifuguojant tokiomis pačiomis sąlygomis. Po paskutinio plovimo ląstelės suspenduotos 1 % BSA tirpale, į kurią buvo pridėti ir atitinkami kiekiai antrinių antikūnų, inkubuota 1 val. +4 °C temperatūroje, tamsoje. Po to ląstelės vėl 2x plautos 1 % BSA tirpalu centrifuguojant 5 min +4 °C 400 g

greičiu. Po paskutinio plovimo ląstelės suspenduotos 1 % BSA tirpale ir analizuotos tėkmės citometru (*BD FACSCanto II*).

2.2.1.3 Multipotenciškumo vertinimas

DPSC multipotenciškumas buvo nustatytas vertinant ląstelių galimybę diferencijuoti osteogenine, adipogenine ir miogenine kryptimis.

Osteogeninė diferenciacija buvo indukuota ant monosluoksniu užpylus pasiruoštą osteogeninės diferenciacijos terpę, kuri buvo keičiama 2 kartus per savaitę. Vertinta po 14 dienų nuo diferenciacijos pradžios ląsteles fiksuojant 4 % paraformaldehido tirpalu ir dažant 2 % ARS tirpalu (pH = 4,1-4,3). Susiformavusios kalcio sankaupos vizualizuotos šviesiniu mikroskopu (*Olympus IX51*).

Adipogeninė diferenciacija indukuota naudojant pasiruoštą adipogeninės diferenciacijos terpę. Vertinta po 4 dienų nuo diferenciacijos pradžios ląsteles fiksuojant 4 % paraformaldehido tirpalu ir dažant 3x skiestu *Oil Red O* tirpalu. Ląstelėse susidariusios lipidinės pūslelės vizualizuotos šviesiniu mikroskopu.

Raumeninė diferenciacija indukuota naudojant pasiruoštą raumeninės diferenciacijos terpę. Vertinta po 7 dienų nuo diferenciacijos pradžios ląsteles dažant 0,1 % kristalvioleto tirpalu. Susiliejusios daugiabrandoelės ląstelės vizualizuotos šviesiniu mikroskopu.

2.2.1.4 Kraujagyslių formavimo testas

PESC savybių vertinimui buvo atliktas kontrolinis kraujagyslių formavimo testas.

Prieš eksperimentą buvo ruošiami *Matrigeliu* (paruoštas gelinis ECM baltymų mišinys, kurį sekretuoja pelės sarkomos ląstelės) dengti ląstelėms skirti auginti paviršiai: skystas *Matrigelis* išpilstytas ant paviršių esant 4 °C temperatūrai. Mėginiai perkelti į 37 °C laipsnių termostatą, kur buvo inkubuoti 30 min (iki sustingimo).

Kol *Matrigelis* stingo, auginimo terpėje be serumo buvo ruošiama $1 \cdot 10^5$ ląst./ml tankio tiriamų ląstelių suspensija. *Matrigeliui* sustingus ląstelės išsėtos ant pasiruoštų paviršių. Po 24 valandų inversiniu šviesiniu mikroskopu vertintas PESC ląstelių suformuotas kraujagyslių tinklas.

2.2.1.5 AcLDL endocitozės testas

PESC savybių vertinimui buvo atliktas acetilintų mažo tankio lipoproteinų (AcLDL) pasisavinimo testas. Kadangi AcLDL pasisavinti geba tik kelių tipų ląstelės – endotelio, mikroglijos bei makrofagai, dėl to tai laikoma puikiu metodu charakterizuoti šių tipų ląsteles.

Pirmiausia buvo paruošta $7 \cdot 10^4$ ląst./cm² tankio suspensija, kuri sėta į mikroplokštelių duobutes, inkubuota 24 val. 37 °C laipsnių temperatūroje, aplinkoje esant 5 % CO₂. Po paros sena augimo terpė pakeista į naują, su joje ištirpintais *Alexa fluor 488* fluorescenciniu dažu žymėtais AcLDL (10-15 µl/ml). Su AcLDL ląstelės inkubuotos 5 val. 37 °C laipsnių temperatūroje, aplinkoje esant 5 % CO₂, tamsoje. Ląstelių gebėjimas pasisavinti AcLDL buvo vertintas fluorescenciniu inversiniu mikroskopu (*Olympus IX51*).

2.2.2 Ląstelių genetinis modifikavimas

2.2.2.1 Lentiviruso dalelių surinkimas

Lentivirusų gamyba buvo vykdyta naudojant HEK293T ląstelių liniją (žmogaus embriono inkstų ląstelių linija su T antigenu). Šių ląstelių transfekcijai naudoti lentivirusiniai vektoriai, kurie koduoja viruso baltymus (*pCMV-VSV-G*), viruso dalelių susirinkimą (*pCMV-dR8.91*) bei tikslinius baltymus (*pLJM1-mCherry* arba *pLJM1-EGFP*).

Paruošta $7 \cdot 10^4$ ląst./cm² HEK293T suspensija buvo išpilstyta į ląstelėms auginti skirtos plokštelės duobutes. Sekančią dieną, ląstelėms padengus 70-80 % paviršiaus ploto, naudojant *Lipofectamine 3000* reagentą pagal gamintojo protokolą atlikta Hek293T transfekcija. Lentivirusinių vektorių mišinys ruoštas masės santykiu 2:1,2:0,8 (*pLJM1-mCherry* arba *pLJM1-EGFP:pCMV-dR8.91: pCMV-VSV-G*). Po 18 val. nuo vektorių pridėjimo sena auginimo terpė buvo pakeista nauja, kurioje buvo 20% FBS. Praėjus 24 val. po terpės pakeitimo, ji kartu su pasigaminusiais virusais nuo Hek293T ląstelių buvo nusiurbta ir perkelta į stiklinį mėgintuvėlį su polibrenu (8 µg/ml). Gautas mišinys prafiltruotas per 0,22 µm filtrą ir laikomas -80 °C temperatūroje iki naudojimo.

2.2.2.2 Lentiviruso transdukcija į ląsteles

Pagaminto lentiviruso transdukcija buvo vykdoma į DPSC ir PESC.

Atskirose plokštelės duobutėse išsėtos DPSC bei PESC - $1 \cdot 10^4$ ląst./cm². Po 24 val. nuo sėjimo pasiruošta lentivirusų suspensija buvo sulašinta į plokštelės šulinėlius (tūrio santykiu 1:2 (lentivirusų suspensija: auginimo terpė)), kuriuose augo tikslinės ląstelės - DPSC arba PESC. Ląstelės su virusais inkubuotos 24 val. Po to terpė pakeista įprastine auginimo terpe ir ląstelės augintos dar 24 val. Po numatyto laiko ant DPSC ir PESC užpilta nauja terpė su atrankos antibiotiku puromicinu, ląstelės augintos 3-5 dienas. Per šį laiką atitinkamose duobutėse susiformavo žaliai (DPSC-G) ir raudonai (PESC-R) fluorescuojančios ląstelės.

2.2.3 Karkasų paruošimas ir charakteristikos

2.2.3.1 Skirtingų mikrostruktūrų karkasų spausdinimas

Skirtingos mikrostruktūros (porėtiems ir vagotiems) PLA karkasams gaminti buvo naudotas skaidrus grynas PLA filamentas, kurio diametras $2,85 \pm 0,10$ mm. Karkasai spausdinti su lydyto pluošto gamybos (FFF) 3D spausdintuvu *Ultimaker Original*. Spausdinimui naudoti parametrai: ekstruderio diametras 0,4 mm, 180–190 °C temperatūra ir 30 mm/s greitis. Karkasų struktūros buvo sukurtos naudojant AutoCAD 2017 programinį paketą, gauti modeliai išsaugoti STL formatu. STL formato modeliai 3D spausdintuvo programinėje įrangoje konvertuoti į g-code formatą.

Pagamintų porėtų karkasų aukštis ir plotis buvo 500 μm ir 300 μm; vagotų - 188 μm ir 250 μm. Atspausdinti PLA lakštai vėliau sukarpyti į 1x1 cm dydžio kvadratus.

Prieš naudojimą karkasai 24 val. buvo plaunami 10 % vandeniniu detergento Decon-90 tirpalu, po to parą laikyti 96 % EtOH ir 1 val. - po UV spinduliais.

2.2.3.2 Kompozitinio filamento paruošimas

Kompozitinių filamentų paruošimui buvo naudotos 100 – 800 μm dydžio PLA granulės ($M_r = 42\,700$ g/mol), 50 μm dydžio HA milteliai ir 38-75 μm dydžio BG 45S5 dalelės.

Kompozitinių medžiagų filamentų gamybai tarpusavyje buvo maišomi PLA ir HA arba PLA ir BG milteliai, atitinkamu masės santykiu 9:1. Gaminant gryną PLA filamentą, buvo naudoti tik PLA milteliai. Prieš naudojimą paruošti milteliai buvo laikomi sandarioje pakuotėje kartu su silikagelio granulėmis, kad iš medžiagos absorbuotųsi drėgmė.

Filamentas buvo gaminamas naudojant ekstruderį *Filabot Original EX2*, *Filabot HQ* su 1,75 mm antgaliu. Ekstruderis iš anksto buvo įkaitinamas iki 145° C, į vidų dedami paruošti milteliai. Filamento išstūmimo iš ekstruderio metu ekstruderio temperatūra buvo palaikoma tarp 140-145 °C. Vienodo diametro ir formos filamento išgavimui ir susukimui buvo naudota savadarbė ritė su reguliuojamu sukimosi greičiu.

Pagaminti PLA+HA (10 %), PLA+BG (10 %) ir gryni PLA filamentai, kurių diametras 1,28 – 1,6 mm.

2.2.3.3 Kompozitinių karkasų gamyba

Kompozitiniai karkasai buvo spausdinami naudojant FFF 3D spausdintuvą *Pharaoh XD 20, Mass Portal*; spausdinimo parametrai: ekstruderio diametras 0,4 mm, 180–190 °C temperatūra ir 30 mm/s greitis.

Karkasų struktūros buvo sukurtos naudojant *AutoCAD 2017* programinį paketą, gauti modeliai išsaugoti STL formatu. STL formato modeliai 3D spausdintuvo programinėje įrangoje konvertuoti į *g-code* formatą. Porėta karkasų mikrostruktūra buvo formuota iš 4 dvisluoksnių gijų sluoksnių, kurios susikirsdamos tarpusavyje sudarydavo 60° kampą. Tarpai tarp gijų - 400 μm, vienos gijos aukštis ~200 μm. Bendras karkaso aukštis 1600 μm. Atspausdinti PLA lakštai sukarpyti į 1x1 cm dydžio kvadratus.

Prieš naudojimą karkasai 24 val. buvo plaunami 10 % vandeniniu detergento Decon-90 tirpalu, po to parą laikyti 96 % EtOH ir 1 val. po UV spinduliais.

2.2.3.4 PLA karkasų padengimas ECM baltymais

PLA karkasų padengimui ląstelių kilmės ECM baltymais ant jų buvo sėjama $3 \cdot 10^4$ ląst./cm² DPSC suspensija. Ląstelės 7 d. augintos terpėje, praturtintoje 100 μg/ml askorbo rūgštimi, pusę terpės tūrio pakeičiant kas 2-3 dienas.

Po 7 dienų karkasai buvo 2x plauti PBS ir pusvalandžiui dedami į -20° C šaldiklį. Išėmus iš šaldiklio užpilta nuląstelinimo tirpalo ir inkubuota 1 val. 37 °C temperatūroje švelniai purtant ~25 aps./min. greičiu (*Biometra WT*

17). Po to mėginiai 2x plauti PBS ir užpylus nukleazių tirpalo inkubuoti 1 val. 37 °C temperatūroje purtant ~25 aps./min. greičiu. Nusiurbus nukleazes, karkasai vėl 2x plauti PBS. Po plovimo užpiltas 0,1 % glutaraldehido tirpalas (ruoštas PBS) ir inkubuota 4–6 val. 4° C temperatūroje. Po inkubacijos karkasai praplauti FB tirpalu, užpiltas 0,1 M glicino tirpalas (ruoštas PBS) ir inkubuota per naktį 4 °C temperatūroje. Kitą dieną mėginiai dar 2x praplauti PBS ir iki naudojimo laikyti PBS šaldytuve esant 4 °C.

2.2.3.5 Karkasų SEM analizė

Karkasų topografijos bei morfologijos analizė buvo atlikta naudojant skenuojantį elektroninį mikroskopą (*Hitachi TM-1000*). Karkasų šoniniai pjūviai atlikti naudojant lazerio šviesos pluošto gamybos technologiją (*laser light filament fabrication technology*), pjauta 10 mm atstumu nuo atspausdinto karkaso krašto. Naudojant programą *ImageJ (ImageJ 1.8.0_112)* gautose nuotraukose buvo išmatuotas mėginių gijų aukštis, plotis bei atstumas tarp gijų.

2.2.3.6 Karkasų hidrofobiškumo nustatymas

Prieš pradėdant eksperimentą karkasai buvo sveriami, po to 24 valandoms merkami į vandenį. Praėjus šiam laikui jie buvo nusausinti filtriniu popieriumi ir vėl sveriami. Apskaičiuotas procentinis karkasų masės padidėjimas: vandens sugertis (%) = $(S_t - S_0) / S_0 \times 100$, kur S_0 – pradinis karkaso svoris; S_t – karkaso svoris po 24 val. inkubacijos vandenyje.

2.2.3.7 Baltymų adsorbcijos ant karkasų vertinimas

Tiriamieji karkasai buvo merkami į FBS, inkubuota 24 val. aplinkoje esant 37 °C ir 5 % CO₂. Po numatyto laiko karkasai buvo 2x plaunami PBS, taip pašalintas perteklinis FBS kiekis. Po praplovimo ant karkasų piltas *Bradfordo* reagentas, jo sugertis matuota plokštelių skaitytuvu *Varioskan Flash (Thermo Scientific)* pasirinkus 595 nm bangos ilgį.

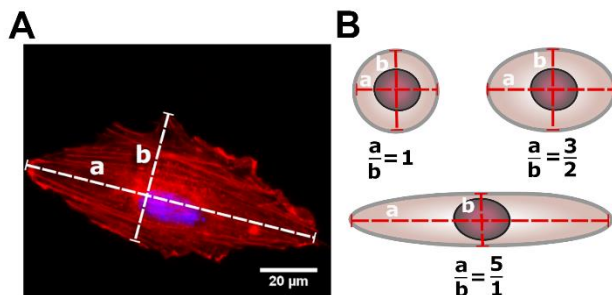
2.2.4 Ląstelių sąveikos su karkasu analizė

2.2.4.1 Ląstelių morfologijos ir adhezijos vizualizavimas

Siekiant įvertinti ląstelių, augintų ant tiriamų karkasų, būseną, buvo atliktas kokybinis ir kiekybinis ląstelių morfologijos ir adhezijos vertinimas, dažant ląstelėse esančius F-aktino filamentus.

Tuo tikslu buvo ruošiama $5 \cdot 10^4$ ląst./cm² DPSC suspensija. Paruoštos ląstelės išsėtos ant tiriamųjų karkasų, inkubuota 30 min., 2 ir 24 val. Po numatytų laikų mėginiai plauti PBS ir fiksuoti 4 % paraformaldehido tirpalu 15 min kambario temperatūroje švelniai purtant 25 aps./min greičiu. Po to jie vėl buvo 3x po 5 min plauti 0,2 % Triton X-100 tirpalu (paruoštas PBS) bei dažyti 5 U/mL rodamino falaidino ir 12,5 μg/ml DAPI dažų mišiniu (paruoštas PBS). Su dažais mėginiai inkubuoti 1 val. kambario temperatūroje, tamsoje, švelniai purtant 25 aps./min greičiu. Po inkubacijos mėginiai dar kartą plauti PBS 3x po 5 min. Ląstelių citoskeletas vizualizuotas fluorescenciniu inversiniu mikroskopu.

Kiekybiniai ląstelių, augintų ant skirtingų paviršių, morfologijos skirtumai vertinti *ImageJ* (*ImageJ 1.8.0_112*) programa skaičiuojant ląstelių ir jų branduolių ilgio bei pločio santykius (2.1 pav.). Kiekybiniai ląstelių adhezijos efektyvumo rezultatai gauti *ImageJ* programa, skaičiuojant adhezijos dinamikoje kintančius ląstelių plotus.



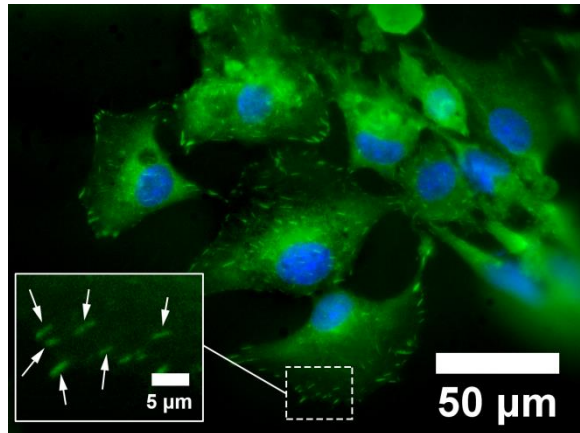
2.1 pav. Ląstelių ilgio ir pločio vertinimo schema. A – ilgio ir pločio matavimo ląstelėje pavyzdys; B – galimi, skirtingos ląstelės formos nulemti, jos ilgio ir pločio santykių pavyzdžiai.

2.2.4.2 Fokalinių adhezijų vertinimas

DPSC, augintų ant tiriamųjų mėginių, adhezijos stiprumas kokybiškai ir kiekybiškai buvo įvertintas imunocitochemijos metodu vizualizuojant ląstelių suformuotas fokales adhezas.

Tuo tikslu DPSC ($5 \cdot 10^4$ ląst./cm²) buvo išsėtos ant karkasų, inkubuota 24 val. Po numatyto laiko mėginiai su ląstelėmis plauti PBS, fiksuoti 4 % paraformaldehido tirpalu (inkubuota 15 min kambario temperatūroje švelniai purtant 25 aps./min greičiu), dar kartą 3x po 5 min plauti 0,2 % Triton X-100 tirpalu (paruoštas PBS) ir 1 val. blokuoti blokavimo tirpale kambario temperatūroje, supant 25 aps./min greičiu. Po šios procedūros mėginiai 1 val. inkubuoti švelniai supant (25 aps./min. greičiu) su pirminiais pelės antikūnais (1:50), atpažįstančiais vinkuliną. Po inkubacijos karkasai su ląstelėmis buvo 3x po 5 min plauti 0,05 % Tween-20 (paruoštas PBS), po to - 1 val. inkubuoti su Alexa Fluor 488 konjuguotų ožkos IgG (H+L) antrinių antikūnų (atpažįstančių pelės antikūno Fc domeną) ir 12,5 μg/ml DAPI mišiniu (paruošta PBS) kambario temperatūroje, tamsoje, švelniai supant (25 aps./min greičiu). Gauti mėginiai vizualizuoti fluorescenciniu inversiniu mikroskopu.

Kiekybiniai ląstelių adhezijos stiprumo skirtumai buvo gauti *ImageJ* (*ImageJ 1.8.0_112*) programos pagalba skaičiuojant ląstelėse susiformavusių fokalinių adhezijų kieki (2.2 pav.).

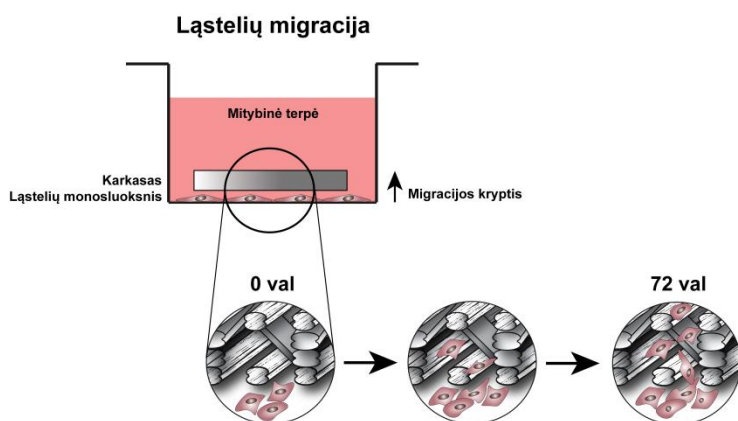


2.2 pav. Ląstelių suformuotų fokalinių adhezijų vertinimas. *ImageJ* programa fluorescenciniu mikroskopu gautose nuotraukose buvo skaičiuojamas fokalinių adhezijų skaičius kiekvienoje ląstelėje. Rodyklės paveiksle žymi fokales adhezas.

2.2.4.3 Migracijos analizė

Kiekybiniam DPSC ir PESC migracijos vertinimui $5 \cdot 10^4$ ląst./cm² suspensija buvo išpilstyta į ląstelėms auginti skirtų plokštelių duobutes (2.3 pav.). Po 24 val. ant susiformavusio monosluoksnio buvo uždedami tiriamieji karkasai, inkubuota 72 val. Po numatyto laiko mėginiai su ant jų užmigrovusiomis ląstelėmis buvo perkelti į švarius šulinėlius, plauti PBS ir dažyti kristalvioletu 30 min. supant juos 25 aps./min. greičiu. Po to mėginiai 3x po 10 min. buvo plaunami PBS. Likęs dažas tirpintas elucijos tirpalu, susidariusio tirpalo sugertis buvo matuota ties 590 nm bangos ilgiu plokštelių skaitytuvu *Varioskan Flash*.

Foninės sugerties vertinimui naudoti karkasai, ant ląstelių monosluoksnio laikyti 3 val. ir paskui apdoroti taip, kaip aprašyta aukščiau. Pasirintas 3 val. laiko intervalas leido įvertinti ant karkaso paviršiaus, jo perkėlimo ant ląstelių monosluoksnio metu, galimai nespecifiškai prisitvirtinusių ląstelių kiekį.



2.3 pav. Vertikalios ląstelių migracijos nuo monosluoksnio aukštyr ant karkasų vertinimo schema.

Siekiant imituoti po konstrukto implantacijos vykiančią DPSC ir PESC sąveiką paciento organizme, buvo atliktas kokybinis PESC migracijos ant DPSC apaugintų karkasų vertinimas. Šiame tyrime buvo naudotos transfekuotos, raudonai fluorescuojančios ląstelės PESC-R ir paprastos, nemodifikuotos DPSC.

Lygiagrečiai, į ląstelėms auginti skirtų plokštelių duobutes buvo išsėjamos PESC-R ($5 \cdot 10^3$ ląst./cm²) bei ant tiriamųjų karkasų sėjamos DPSC

($1 \cdot 10^4$ ląst./cm²). Po 48 val. karkasai su DPSC buvo apverčiami ir perkeliama į plokštelių šulinėlius su PESC-R monosluoksniu. Po perkėlimo praėjus 3 ir 72 val. mėginiai buvo iškelti į naujas duobutes ir 2x plauti PBS. Gauti mėginiai vizualizuoti fluorescenciniu inversiniu mikroskopu (*Olympus IX51*).

2.2.4.4 Ląstelių dauginimosi vertinimas

Proliferacijos vertinimui, ant tiriamųjų karkasų, kurie buvo patalpinti ląstelių auginimo plokštelių duobutėse, buvo išsėtos DPSC ($3 \cdot 10^4$ ląst./cm²). Ląstelės ant mėginių auginamos 24, 48, 72, 96 ir 120 val. Po numatytų laikų mėginiai su ląstelėmis buvo perkelti į švarius šulinėlius ir 2x plauti PBS, po to jie dar kartą perkelti į -20 °C šaldiklį, kur palikti mažiausiai valandai. Praėjus numatytam laikui, ląstelės, esančios ant mėginių, lizuotos lizės tirpalu 30 min purtant 300 aps./min greičiu 37 °C aplinkoje. Gauti lizatai skiesti 2x su SSC tirpalu ir sumaišyti (tūrio santykiu 1:1) su 4 µg/ml DAPI (paruoštas 1x SSC tirpale). Inkubuota 1 val. tamsoje, purtant 300 aps./min greičiu. DAPI-DNR fluorescencija matuota ($\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm) plokštelių skaitytuvu *Varioskan Flash (Thermo Scientific)*.

Ląstelių skaičius ant karkasų buvo nustatytas gautus fluorescencijos intensyvumo rezultatus lyginant su kalibracinės kreivės duomenimis.

Kalibracinė kreivė buvo gauta naudojant tikslų 1 mln DPSC ląstelių kiekį: šis ląstelių kiekis terpėje centrifuguotas 7 min. 975 g greičiu (*Thermo Scientific CL10 centrifuge*), o ląstelės praplautos PBS. Viskas dar kartą tokiomis pačiomis sąlygomis centrifuguota, taip siekiant nuo DPSC pašalinti visas FBS liekanas. Supernatantas pašalintas, ląstelės padėtos į šaldiklį (-20 °C), čia laikytos mažiausiai 1 val. Ištraukus, ant ląstelių buvo užpilta 800 µl lizės tirpalo ir inkubuota 30 min purtant 300 aps./min greičiu 37 °C aplinkoje. Gautas lizatas gerai išmaišytas. Siekiant gauti kiekvieną kalibracinės kreivės tašką liūzatai buvo atitinkamai skiežiami ir išpilstomi į 96 duobučių plokštelės šulinėlius. Lizatas buvo skiedžiamas lizės tirpalu, išlaikant 50 µl bendrą tūrį. Po to lizatai buvo skiedžiami 2x su SSC tirpalu ir toliau atliekamos aukščiau apraštos procedūros (mėginiai dažomi DAPI dažų, matuojama DAPI-DNR fluorescencija).

Karkasų fono vertinimui buvo naudoti ląstelėmis neapauginti mėginiai, su jais atliekant visas aukščiau aprašytas procedūras.

2.2.4.5 Kokultūros analizė

Siekiant įvertinti PESC ir DPSC sąveiką, *in vitro* sąlygomis modeliuojančią galimą angiogenezės procesą dirbtiniame audinyje, ant tiriamų karkasų buvo auginta osteogeninėmis ir angiogeninėmis savybėmis pasižyminčių ląstelių kokultūra. Analizės metu buvo naudojamos dvi transfekuotų ląstelių kultūros: raudonai fluorescuojanti – PESC-R ir žaliai fluorescuojanti – DPSC-G.

Pirmiausia į ląstelėms auginti skirtos plokštelės duobutes buvo sėjamos DPSC-G (750 ląst./cm^2). Po paros augimo terpė buvo pakeista nauja, ląstelės augintos dar 48 val. Po numatyto laiko ant augančių DPSC-G buvo sėjamos PESC-R ($1,5 \cdot 10^4 \text{ ląst./cm}^2$). Nuo PESC-R išsėjimo praėjus 3 ir 96 val. mėginiai buvo 2x plauti PBS ir 25 min. fiksuoti 4 % paraformaldehido tirpalu. Po fiksavimo mėginiai 3x plauti 0,2 % Triton X-100 tirpalu (paruoštas PBS) ir 1 val. tamsoje dažyti 5 $\mu\text{g/ml}$ DAPI tirpalu. Po dažymo mėginiai 3x plauti PBS. PESC ir DPSC sąveikos vizualizuotos fluorescenciniu inversiniu mikroskopu (*Olympus IX51*).

2.2.4.6 Sekretomose esančių citokinų tyrimas

Siekiant nustatyti, kaip tiriamieji karkasai inicijuoja DPSC ekspresuojamų citokinų raišką, buvo atliktas DPSC sekretomose esančių citokinų tyrimas.

Ant tiriamųjų karkasų buvo išsėta $1 \cdot 10^3 \text{ ląst./cm}^2$ DPSC suspensija. Ląstelės kultivuotos 7 dienas. Po to karkasai su ląstelėmis 2x plauti PBS ir perkelti į naujas, ląstelėms auginti skirtų plokštelių duobutes, ant mėginių užpilta augimo terpė be serumo. Po 48 val. terpė buvo surinkta į mėgintuvėlius ir centrifuguota 4 min. 1000 g (*HERMLE, Labortechnik GmbH*) greičiu. Supernatantai perkelti į naujus mėgintuvėlius ir saugoti -20°C iki panaudojimo.

Atšildžius mėginius, naudojant *Rat Cytokine Array Kit*, pagal gamintojo instrukciją buvo atlikta citokinų analizė.

Tyrimas paremtas taškinio (angl. *dotblot*) imunobloto principu. Surinktos sekretomos buvo sumaišytos su biotilintais atpažinimo antikūnais, inkubuota 1 val. kambario temperatūroje. Po inkubacijos ant rinkinyje esančių membranų buvo užpiltas sekretomos-antikūnų mišinys, inkubuota per naktį 4°C . Sekančią dieną membranos buvo plautos, užpiltas su krienų peroksidaze konjuogotas streptavidinas bei chemiliuminescencijos reagentai. Signalas buvo detektuotas transiluminatoriumi (*UVP BioSpectrum, Chemi HR 410*).

Gauti duomenys kiekybiškai įvertinti *ImageJ* (*ImageJ 1.8.0_112*) programos pagalba skaičiuojant nuotraukose matomų skrituliukų vidutinį pikselių šviesumo intensyvumą (angl. *mean pixel density*). Gautos reikšmės normalizuotos pagal teigiamos kontrolės vidutinį šviesumo intensyvumą.

2.2.5 Ląstelių osteogenezės tyrimas

2.2.5.1 Osteogeninės diferenciacijos indukcija

Analizuojant DPSC ir karkasų sąveikas buvo vertinta tiek indukuota, tiek ir spontaniškos osteogeninės diferenciacija.

Indukuotos osteogeninės diferenciacijos atveju atitinkami DPSC kiekiai (2.1 lentelė) buvo sėjami ant tiriamųjų karkasų, po 12 val. paprasta auginimo terpė buvo keičiama osteogeninės diferenciacijos terpe, toliau po pusę jos tūrio keista kas 2-3 dienas. Diferenciacijos efektyvumas analizuotas po 12-kos val. nuo išsėjimo (laikyta 0-line valanda, nes matavimas atliktas dar neužpylus diferencijuojančios terpės, bet ląstelėms patikimai prisitvirtinus prie paviršiaus), po to - po 7, 14 ir 21 dienos, skaičiuojant nuo diferencijuojančios terpės užpylimo momento.

Spontaniškos diferenciacijos atveju DPSC taip pat buvo sėjamos ant karkasų (2.1 lentelė), nuo ląstelių išsėjimo praėjus 12 val., auginimo terpė buvo keičiama nauja, įprastine auginimo terpe, po pusę jos tūrio pakeičiant kas 2-3 dienas. Diferenciacijos efektyvumas vertintas po 1, 7 ir 10 dienų, analizuojant specifinius osteogeninės diferenciacijos žymenis – fermento ALP aktyvumą, su osteogenine diferenciacija susijusių baltymų (Runx2, OPN, OCN) genų raišką bei kolageno ir kalcio sandaugų kaupimąsi ECM.

2.1 lentelė. Ląstelių skaičius, naudotas osteogeninės diferenciacijos eksperimentuose

Indukuota diferenciacija		Spontaninė diferenciacija	
Diena	Ląstelių skaičius	Diena	Ląstelių skaičius
0	$5 \cdot 10^4$ ląst./cm ²	1	$5 \cdot 10^4$ ląst./cm ²
7	$1 \cdot 10^3$ ląst./cm ²	7	$1 \cdot 10^3$ ląst./cm ²
14	$1 \cdot 10^3$ ląst./cm ²	10	$1 \cdot 10^3$ ląst./cm ²
21	$1 \cdot 10^3$ ląst./cm ²		

2.2.5.2 ALP aktyvumo vertinimas

DPSC diferenciacijos eigoje ALP aktyvumas ląstelėse buvo vertintas naudojant *Phosphatase Substrate Kit*. Po numatytų diferenciacijos laikų augimo/diferenciacijos terpė buvo nupilta, mėginiai 2x plauti PBS. Ant kiekvieno mėginio buvo užpilta 1 mg/ml PNPP tirpalo (paruošto 1x dietanolamino substratiniame buferyje). Inkubuota 1 val. kambario temperatūroje, purtant 25 aps./min greičiu. Reakcija sustabdyta pridendant 2 M NaOH, susidariusio tirpalo sugertis matuota ties 405 nm plokštelių skaitytuvu *Varioskan Flash*.

Karkasų fono įvertinimui buvo naudoti ląstelėmis neapauginti mėginiai, tačiau su jais buvo atliekamos tokios pat procedūros kaip ir su tiriamosiomis grupėmis.

2.2.5.3 Kolageno kiekio nustatymas

Osteogeninės diferenciacijos metu DPSC sukauptas kolageno kiekis buvo vertintas naudojant *Sirius Red* dažus. Po numatytų diferenciacijos laikų nuo mėginių buvo nupilta augimo/diferenciacijos terpė, karkasai su ląstelėmis 2x plauti FBS, tada užpiltas *Sirius Red* dažas (inkubuota 1 val. kambario temperatūroje švelniai purtant 25 aps./min. greičiu). Po inkubacijos dažas nupiltas, mėginiai plauti 0,01 N HCl tirpalu (paruoštas PBS). Po plovimo karkasai perkelti į mėgintuvėlius ir cetrifuguoti 30 s 100g greičiu (*HERMLE*

Labortechnik GmbH). Dažas buvo tirpinamas 0,1 N NaOH tirpalu (paruoštas PBS), inkubuojant 30 min. kambario temperatūroje purtant 25 aps./min greičiu. Gauto tirpalo sugertis matuota ties 550 nm bangos ilgiu plokštelių skaitytuvu *Varioskan Flash (Thermo Scientific)*

Karkasų fono nustatymui buvo naudoti ląstelėmis neapauginti mėginiai, su jais atliekant lygiai tokias pat procedūras kaip ir su tiriamosiomis grupėmis.

2.2.5.4 Osteogeninėje diferenciacijoje dalyvaujančių baltymų genų raiškos analizė

Su osteogenine diferenciacija siejamų baltymų Runx2, OPN ir OCN genų raiškos pokyčiai DPSC ląstelėse, jas auginant ant skirtingų tiriamųjų paviršių, buvo vertinami qPCR metodu.

Tuo tikslu po numatytų osteogeninės diferenciacijos analizės laikų augimo/diferenciacijos terpė buvo pašalinta, mėginiai plauti PBS ir pagal gamintojo reikalavimus lizuoti su *TRIzol Reagent*. Sėkmingam lizatų gavimui karkasai buvo centrifuguojami (*HERMLE, Labortechnik GmbH*) 5 min 200 g greičiu.

Iš kiekvieno mėginio toliau buvo išskiriama RNR, naudojant *PureLink RNA Mini Kit* (pagal gamintojo reikalavimus). Išskirta RNR buvo transkribuota į cDNR naudojant *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (procedūra atlikta pagal gamintojo rekomendaciją). cDNR sintezei buvo naudojama 391 ng RNR.

qPCR buvo atliktas naudojant *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)*. Reakcijos tūris buvo sumažintas iki 10 µl; naudotas 1 µl pasiruoštos cDNR, o galutinė pradmenų koncentracija reakcijoje buvo 0,2 µM. Pradmenys buvo sukurti naudojant *NCBI/ Primer-BLAST* (2.2 lentelė). qPCR reakcijos buvo vykdomos termocikleryje *Rotor Gene Q (Qiagen)* pagal programą: 95 °C 3 min.; 40 ciklų: 95 °C 30 s, 57 °C 30 s ir 72 °C 30 s; 72 °C 10 min.

Gauti genų raiškos lygiai ląstelėse apskaičiuoti naudojant $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodą. Rezultatai normalizuoti pagal GAPDH geno raišką ir standartizuoti pagal nediferencijuotų ląstelių (augintų monoslouksninėms ląstelėms skirtose plokštelėse) genų raišką pradiniu laiko momentu.

2.2 lentelė. qPGR analizei atlikti naudotų pradmenų sekos.

Genas	Pradmenys
OPN	FW: 5'-CCAGCCAAGGACCAACTACA-3' RV: 5'-TGGCTACAGCATCTGAGTGTTT-3'
OCN	FW: 5'-TGCATTCTGCCTCTCTGACC-3' RV: 5'-CTGGGGCTCCAAGTCCATTG-3'
Runx2	FW: 5'-TGAGATTTGTAGGCCGGAGC-3' RV: 5'-GCTTCTGTCTGTGCCTTCTTG-3'
GAPDH	FW: 5'-AGTGCCAGCCTCGTCTCATA-3' RV: 5'-ATGAAGGGGTCGTTGATGGC-3'

2.2.5.5 TU mineralizacijos vertinimas

Kiekybinis ir kokybinis kalcio sandaupu, kurias ECM suformuoja DPSC, vertinimas atliktas mėginius dažant ARS dažu. Tuo tikslu po numatytų laikų nuo karkasų su ląstelėmis buvo nupilta auginimo terpė, plauta 2x PBS ir fiksuota 4 % paraformaldehido tirpalu švelniai purtant 25 aps./min greičiu 15 min kambario temperatūroje. Po to mėginiai buvo plauti PBS ir pridėtas ARS dažas (pH = 4,1–4,3), inkubuota 20 min kambario temperatūroje švelniai purtant (25 aps./min greičiu). Po inkubacijos ARS dažas buvo pašalintas, mėginiai 3x plauti dejonizuotu vandeniu ir centrifuguoti 30 s 100 g greičiu (*HERMLE Labortechnik GmbH*). Kokybinei analizei raudonai oranžine spalva nusidažę kalcio sandaupos buvo vizualizuotos šviesiniu mikroskopu (*Olympus IX51*).

Kiekybiniam mineralizacijos vertinimui ant mėginių likęs ARS dažas buvo ištirpintas 5 % perchlorinėje rūgštyje. Susidariusio tirpalo sugertis išmatuota plokštelių skaitytuvu *Varioskan Flash (Thermo Scientific)*, ties 490 nm bangos ilgiu.

Karkasų fono nustatymui buvo naudoti ląstelėmis neapauginti mėginiai, su jais atlikus tokias pat procedūras kaip ir su tiriamosiomis grupėmis.

2.2.6 Statistinė duomenų analizė

Statistinė gautų duomenų analizė buvo atlikta naudojant R programų paketą (*RStudio v1.1.442*), išskyrus tėkmės citometrijos duomenis, kurie buvo vertinti naudojant programą *FACSCanto™*, bei qPGR rezultatus, kurie buvo

analizuoti naudojant programą *Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7* ir R programų paketą.

Duomenys pateikti kaip mediana \pm tarpkvartilinis regionas (IQR), vidurkis \pm standartinė paklaida (SE) arba naudojant tankio pasiskirstymo funkciją. Rezultatai gauti atlikus mažiausiai tris nepriklausomus eksperimentus ir kiekviename iš jų naudojant mažiausiai tris mėginius vienoje grupėje.

Gautų duomenų normalumas buvo vertintas naudojant *Shapiro-Wilk* testą ($n \geq 5$). Ne normaliai išsibarsčiusių duomenų atveju skirtumai tarp dviejų grupių nustatyti naudojant *Wilcoxon* testą, o tarp trijų ir daugiau grupių - *Kruskal-Wallis* vieno faktoriaus analizės testą. Statistiškai patikimi skirtumai buvo vertinti naudojant *post hoc Tukey* testą. Normaliai išsibarsčiusių duomenų (ir kai $n < 5$) skirtumai tarp dviejų grupių nustatyti naudojant *Student t* testą, o tarp trijų ir daugiau grupių – vieno faktoriaus *ANOVA* testą. Statistiškai patikimi rezultatų skirtumai buvo vertinti naudojant *Tukey HSD* testą. Laikyta, kad tarp duomenų yra statistiškai patikimas skirtumas, kai $p < 0,05$.

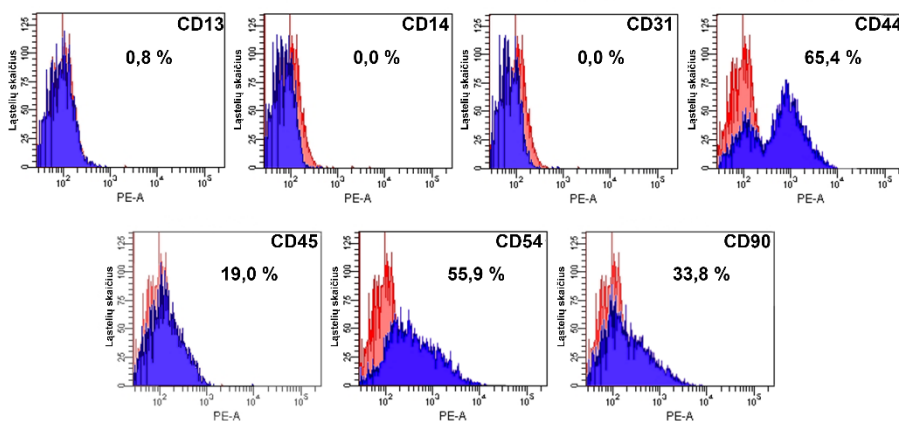
3. REZULTATAI

3.1 Ląstelių charakterizavimas

3.1.1 Dantų pulpos kamieninės ląstelės

Iš žiurkės dantų pulpos audinio išskirtos DPSC buvo išgrynintos panaudojant magnetines daleles, padengtas antikūnu, atpažįstančiu MSC ir DPSC būdingą CD44 paviršiaus žymenį. Gautos ląstelės toliau buvo imunofenotipiškai charakterizuotos tėkmės citometru (3.1 pav.). Nustatyta, kad išgrynintos DPSC yra teigiamos MSC būdingiems paviršiaus žymenims – CD44 (65,4 %), CD54 (55,9 %) ir CD90 (33,8 %) ir neigiamos hemapoetinėms ir epitelinėms ląstelėms būdingiems žymenims – CD14, CD13 ir CD31. Tačiau nedidelis fluorescencijos intensyvumo poslinkis DPSC kultūroje buvo detektuotas ir vienam iš hemapoetinių ląstelių žymenų – CD45 (19 %).

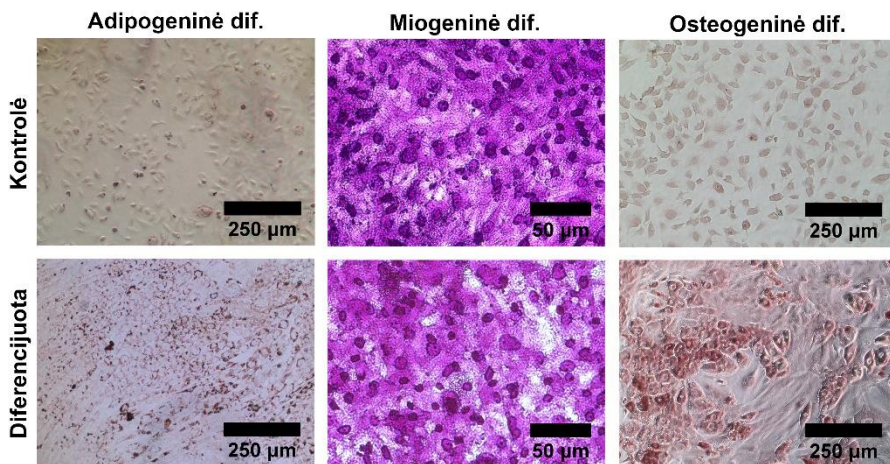
Tai rodo, jog išskirta pirminė DPSC kultūra yra šiek tiek heterogeniška, tačiau didžiąją jos dalį sudaro ląstelės su MSC būdingais paviršiaus žymenimis.



3.1 pav. Imunofenotipinė ląstelių charakterizacija. Tėkmės citometrijos duomenys rodo CD13, CD14, CD31, CD44, CD45, CD54 ir CD90 paviršiaus žymenų raišką DPSC kultūroje.

DPSC multipotenciškumo vertinimui ląstelės diferencijuotos miogenine, adipogenine ir osteogenine kryptimis (3.2 pav.). Gauti rezultatai rodo, jog po atitinkamų diferencijuojančių poveikių atskiruose DPSC kultūros mėginiuose aptiktos raumeniniam audiniui būdingos daugiabranduolės

ląstelės, riebalinio audinio ląstelėse aptinkamos lipidinės pūslelių sankaupos arba kauliniam audiniui būdingos kalcio sankaupos ECM.



3.2 pav. DPSC multipotenciškumo vertinimas. Ląstelių multipotenciškumą rodo: adipogenine linkme diferencijuotose ląstelėse rastos riebalinių pūslelių sankaupos (dažyta Oil Red O); miogenine linkme diferencijuotose ląstelėse nustatytos daugiabranduolės ląstelės (dažyta kristalvioletu); osteogenine linkme diferencijuotose ląstelėse susiformavę kalcio sankaupos (dažyta ARS tirpalu).

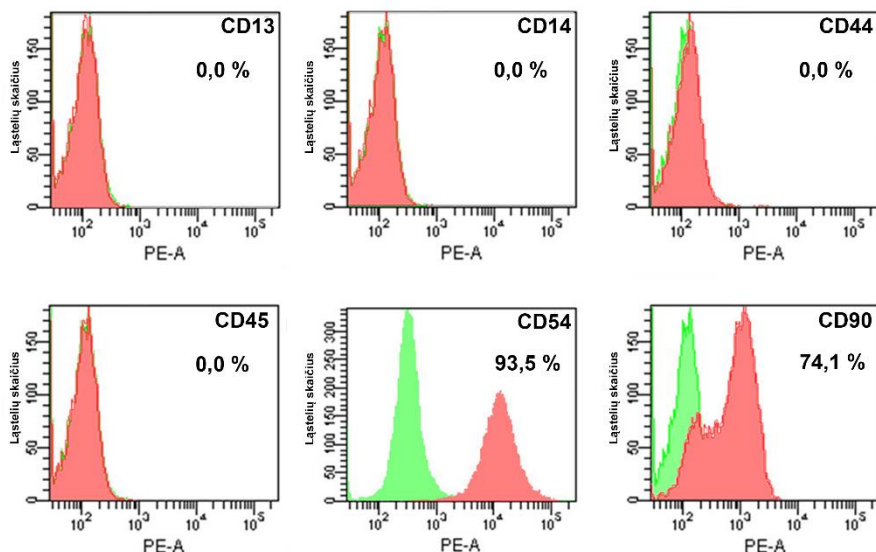
Gauti rezultatai rodo, kad išskirtos ir išgrynintos žiurkės DPSC gali būti priskiriamos kamieninėms multipotencinėms ląstelėms, pasižyminčiomis MSC būdingais paviršiaus žymenimis. Tolimesniuose tyrimuose didžiausias dėmesys skiriamas osteogeniniam jų potencialui.

3.1.2 Endotelinės ląstelės pirmtakės

Iš žiurkės plaučių kamieno kraujagyslės išskirtos PESC buvo išgrynintos naudojant magnetines daleles, padengtas antikūnu, atpažįstančiu endotelinėms ląstelėms būdingą CD31 paviršiaus žymenį.

Gauta pagal CD31 žymenį išgryninta ląstelių kultūra buvo toliau charakterizuota, norint įsitikinti, kad gautas PESC tikrai galima priskirti endotelinių ląstelių tipui. Pirmiausia buvo vertinama CD13, CD14, CD31, CD44, CD45, CD54 ir CD90 žymenų raiška. Tėkmės citometru nustatyta (3.3 pav.) teigiama endotelinėms ląstelėms būdingų CD54 (93,5 %) ir CD90

(74.1 %) žymenų ekspresija ir neigiama hemapoetinėms ląstelėms būdingų CD13, CD14, CD44, CD45 žymenų raiška.



3.3 pav. Imunofenotipinė ląstelių charakterizacija. Tėkmės citometrijos duomenys vaizduoja CD13, CD14, CD44, CD45, CD54 ir CD90 paviršiaus žymenų raiška PESC kultūroje.

Patvirtinimui imunocitochemijos metodu pademonstruota, jog išgrynintos PESC savo paviršiuje tikrai ekspresuoja endotelinių ląstelių žymenį - baltymą - CD31 (3.4 pav. A).

Buvo įvertinta ir dar viena PESC savybė – angiogeninis jų potencialas. Endotelinės ląstelės, auginamos ant *Matrigeliu* dengto paviršiaus, turi gebėti formuoti kraujagyslėms būdingas struktūras (Brown ir kt., 2016). Mūsų darbe, ant tokio paviršiaus atlikus kraujagyslių formavimo eksperimentą, gautas šių ląstelių endotelines savybes patvirtinantis rezultatas – po 24 valandų nuo išsėjimo aukščiau aprašytais metodais charakterizuotos PESC suformavo kraujagyslėms būdingas struktūras (3.4 pav. B).



3.4 pav. PESC charakterizavimas. A – imunocitochemijos metodu vizualizuotas membraninis ląstelių paviršiaus baltymas CD31 (žalia spalva, *Alexa Fluor 488*) bei branduoliai (mėlyna spalva, DAPI); B – po 24 valandų nuo ląstelių išsėjimo ant matrigelio suformuotos kraujagyslės būdingos struktūros; C – ląstelės endocitavusios AcLDL (žymėtas *Alexa Fluor 488*). Nuotrauka invertuota, AcLDL nuotraukoje nudažytas juodai.

Kita endotelinėms ląstelėms būdinga savybė – gebėjimas endocituoti AcLDL. Ši savybė buvo patvirtinta PESC monosluoksnį paveikus terpe su juoje ištirpintais ir fluorescencine žyme žymėtais AcLDL. Po 5 valandų inkubacijos fluorescenciniu mikroskopu gautose nuotraukose matosi AcLDL sankaupos ląstelių viduje (3.4 pav. C). Tai įrodo, kad išskirtos PESC geba endocituoti modifikuotus LDL.

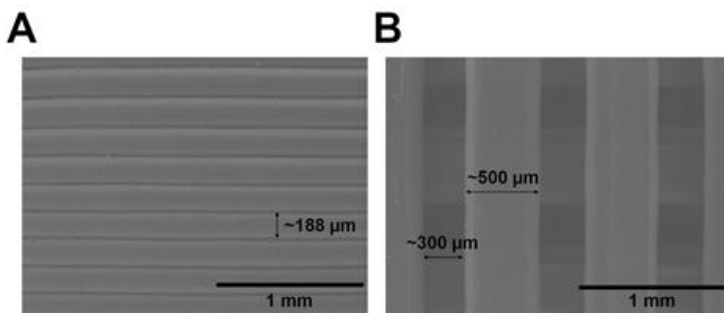
Visų atliktų, šias ląsteles charakterizuojančių, tyrimų rezultatai patvirtino, kad mūsų gautos žiurkės PESC kultūros ląstelės pasižymėjo endotelinėms ląstelėms būdingomis savybėmis, todėl tolimesniuose tyrimuose jos vadinamos endotelinėmis ląstelėmis.

3.2 Substrato topografijos įtaka ląstelių elgsenai

3.2.1 PLA karkasų makrostruktūra

Skirtingos makrostruktūros ($> 100 \mu\text{m}$) PLA karkasai buvo pagaminti FFF 3D spausdintuvu *Ultimaker Original*. Vagotų karkasų paviršius buvo sudarytas iš tarpusavyje susiliečiančių $\sim 188 \mu\text{m}$ PLA gijų, formuojančių vagotą struktūrą (3.5 pav. A). Porėti karkasai buvo sudaryti iš keturių sluoksnių, persiklojančių gijų, kurios formavo porėtą paviršių su $\sim 300 \mu\text{m}$ dydžio susisiekiančiomis poromis (3.5 pav. B). Karkaso porėtumas $\sim 50 \%$, todėl jo paviršiaus plotas apie 5 kartus didesnis už vagoto karkaso.

Kontroliniu paviršiumi eksperimentuose laikytas ląstelių auginimui skirtos plokštelės paviršius (toliau – PP).

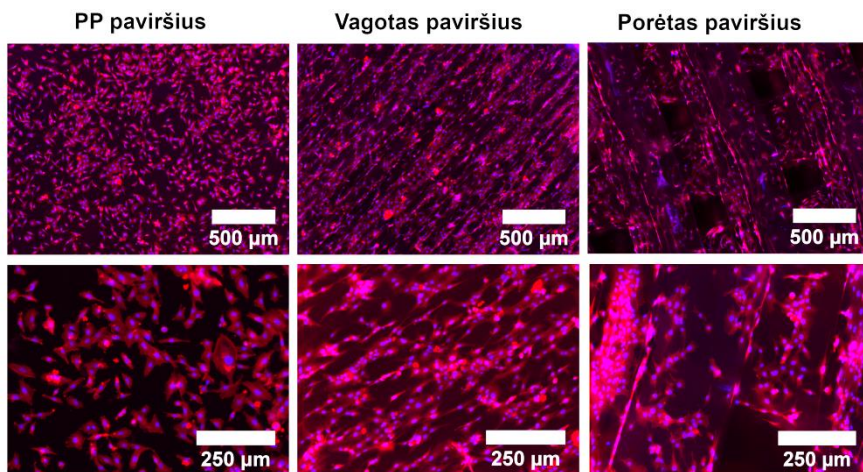


3.5 pav. 3D spausdintuvu pagamintų skirtingos topografijos PLA karkasų vaizdai. A - vagota struktūra; B - porėta struktūra. Nuotraukos gautos skenuojančiu elektronų mikroskopu.

3.2.2 PLA karkasų topografijos įtaka DPSC morfologijai ir proliferacijai

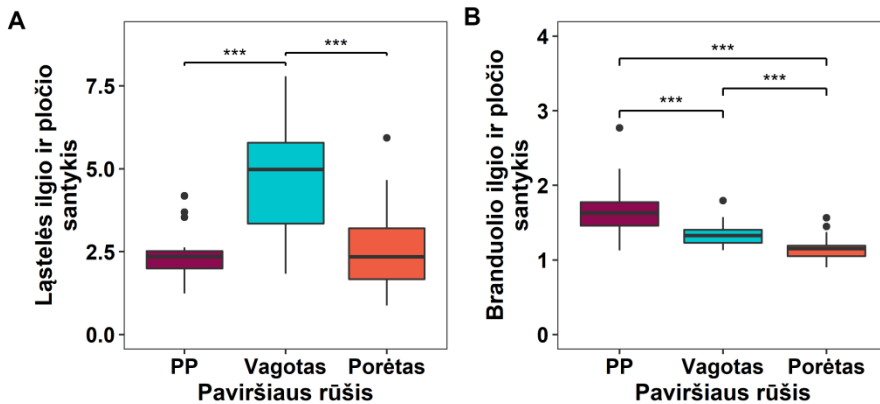
Siekiant nustatyti skirtingo PLA paviršiaus reljefo poveikį ląstelių morfologijai, kuri atspindi tiriamo substrato įtaką ląstelių likimui, DPSC buvo sėjamos ant dviejų tipų tiriamųjų karkasų ir po 24 valandų imunocitochemijos metodu nudažius F-aktino filamentus kokybiškai ir kiekybiškai buvo vertinami ląstelių morfologijos pokyčiai.

Fluorescenciniu mikroskopu gautuose vaizduose (3.6 pav.) matyti, kad ląstelės, augintos tiek ant vagotų, tiek ir ant porėtų karkasų, buvo orientuotos pagal PLA gijas, t.y., DPSC, augusios ant vagotų karkasų, buvo išsidėstę lygiagrečiai PLA gijoms, o ląstelės, augusios ant porėto karkaso, buvo tarsi išsilenkusios ant PLA filamento. Tai rodo, kad DPSC, augusios ant skirtingų PLA makrostruktūrų, patyrė skirtingą tempimą.



3.6 pav. DPSC morfologija, jas auginant ant skirtingos struktūros PLA paviršių. Imunocitochemijos metodu vizualizuotas ląstelių F-aktinas (raudona spalva, dažyta rodamino faloidinu) bei branduoliai (mėlyna spalva, dažyta DAPI). PP – plokštelės paviršius.

Tiriamųjų karkasų topografijos įtaka ląstelių morfologijai buvo patvirtinta vienos ląstelės lygmenyje, kiekybiškai išmatavus visos ląstelės bei jos branduolio ilgio ir pločio santykius (3.7 pav.). Ląstelės, augusios ant vagotų karkasų, buvo žymiai labiau išsitiesusios, išsitempusios ir išilgėjusios, lyginant su DPSC, kurios buvo auginamos ant porėtų karkasų ($p < 0,001$) bei PP ($p < 0,001$) (3.7 pav. A). Branduolio ilgio ir pločio santykio matavimai parodė, kad visos tirtos paviršių struktūros lėmė skirtingos branduolio morfologijos susiformavimą ($p < 0,001$): ant porėtų karkasų augusių DPSC branduoliai buvo apvaliausi, tuo tarpu PP paviršius skatino didžiausią ląstelių branduolių pailgėjimą (3.7 pav. B). Kiekybinis DPSC morfologijos vertinimas patvirtino, kad ląstelės, augdamos ant skirtingų PLA makrostruktūrų, patyrė skirtingą tempimą, kuris gali nulemti ir skirtingą DPSC atsaką į substratą, ant kurio jos augo.

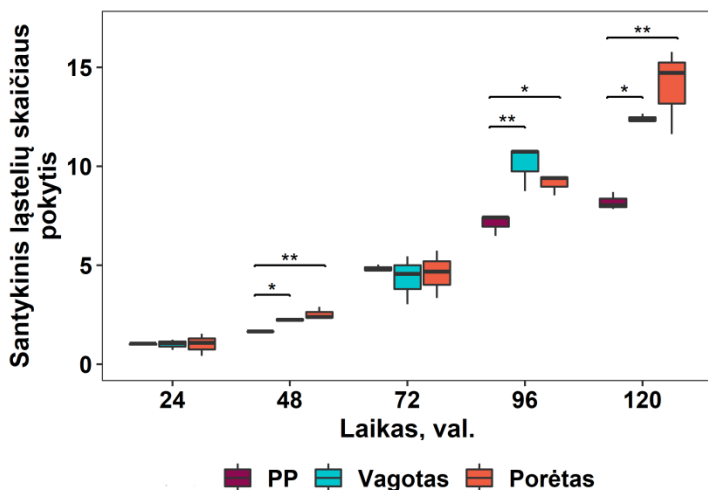


3.7 pav. Ant skirtingų makropaviršių augintų DPSC ir jų branduolių morfologijos pokyčiai. A – ląstelės ilgio ir pločio santykis; B – branduolio ilgio ir pločio santykis. PP – plokštelės paviršius. Rezultatai pateikti kaip mediana \pm IQR. Statistiškai reikšmingi skirtumai pažymėti „***“, kai $p < 0,001$.

Norint įvertinti skirtingų PLA paviršiaus struktūrų įtaką DPSC proliferaciniam aktyvumui, ląstelės buvo augintos ant tiriamųjų karkasų ir po 24, 48, 72, 96 ir 120 valandų nuo išsėjimo matuotas DPSC skaičius, esantis ant kiekvienos rūšies mėginių.

Ląstelių skaičius registruotas DAPI tirpalu dažant ląstelių lizatuose esantį DNR kiekį. DAPI fluorescencijos intensyvumui, priklausančiam nuo ląstelių skaičiaus, yra būdinga tiesinė priklausomybė (S1 pav.) pagal lygtį: $y = 0,0004 x$, x – ląstelių skaičius; y – DAPI fluorescencijos skirtumas (atėmus foną). Rezultatai buvo normalizuoti pagal ląstelių skaičius, gautus ant kiekvienos rūšies paviršiaus po 24 valandų nuo DPSC išsėjimo.

Įvertinus DPSC proliferacinį aktyvumą buvo nustatyta, kad abu tiriamieji PLA karkasai lėmė aktyvesnę ląstelių proliferaciją lyginant su kontroliniu PP paviršiumi (3.8 pav). Gauti rezultatai rodo, kad per 120 valandų ląstelių skaičius ant PP paviršiaus padidėjo maždaug 8 kartus. Tuo tarpu DPSC, augintų ant vagotų karkasų, skaičius išsaugo 12 kartų ($p < 0,05$), o ant porėtų – net 14 kartų ($p < 0,01$). Patikimi ląstelių skaičiaus skirtumai lyginant ląstelių kiekius ant PP paviršiaus ir tiriamųjų PLA karkasų, buvo registruoti jau po 48 valandų nuo ląstelių išsėjimo.



3.8 pav. DPSC , augintų ant skirtingos makrostruktūros PLA karkasų, proliferacinis intensyvumas. Rezultatai normalizuoti pagal ląstelių skaičius, gautus auginant jas ant kiekvienos paviršiaus rūšies nuo DPSC išsėjimo praėjus 24 valandoms; PP – plokštelės paviršius. Rezultatai pateikti kaip mediana ± IQR. Statistiškai reikšmingi skirtumai pažymėti kaip „*“ kai $p < 0,05$ ir „**“, kai $p < 0,01$.

Šie rezultatai rodo, kad struktūrizuotas paviršius nuo antros auginimo paros pradėjo skatinti DPSC ląstelių proliferaciją. Skirtumai ypatingai ryškūs 5-tą auginimo dieną. Vėlesni proliferacijos tyrimai nebeatliekami, nes prasideda kiti ląstelių tarpusavio santykiai, tarp kurių – ir diferenciacijos procesas.

3.2.3 Paviršiaus topografijos vaidmuo ląstelių osteogenezėje

Siekiant išsiaiškinti, kaip PLA paviršiaus struktūra veikia DPSC osteogenezę, po ląstelių išsėjimo ant tiriamųjų mėginių buvo vertintos tiek indukuota, tiek ir spontaniškos osteogeninės šių ląstelių diferenciacijos.

3.2.3.1 Indukuota osteogeninė diferenciacija

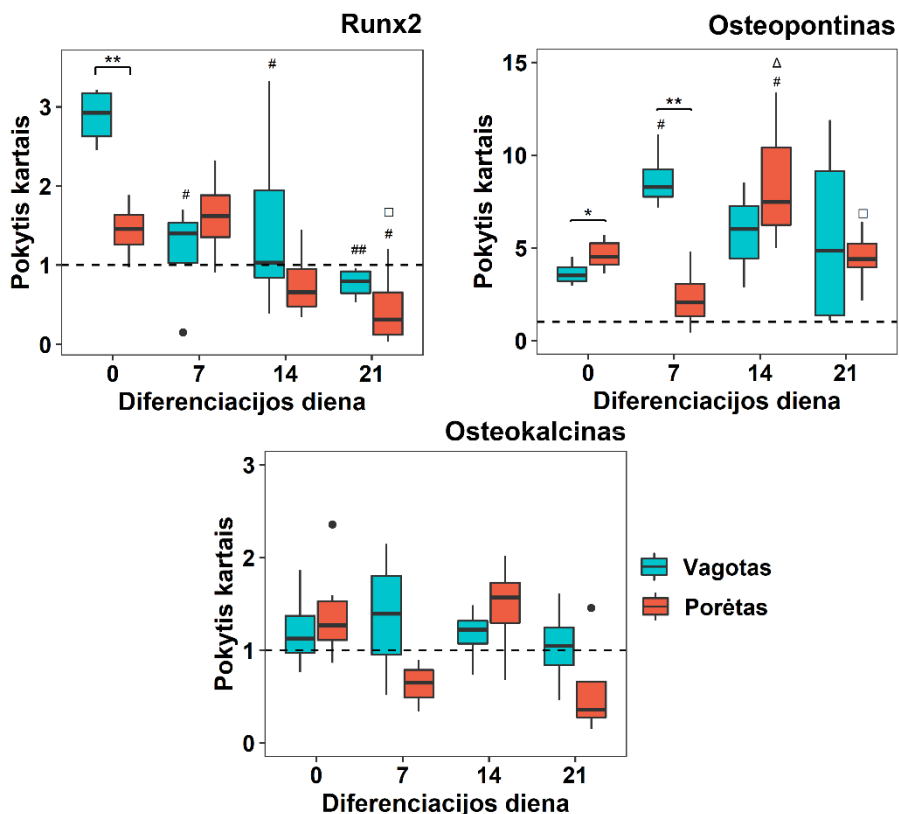
Daugelis SC rūšių osteogeninės diferenciacijos keliu pasuka tik po poveikio specialiais osteogenezės induktoriais. Todėl šiame darbe pirmiausia buvo atlikti indukuotos osteogeninės diferenciacijos eksperimentai. Diferenciacijos indukcijai buvo naudotas vienas labiausiai paplitusių būdų -

SC auginimo terpės praturtintinimas deksametazonu, β -glicerofosfatu ir askorbo rūgštimi.

Indukuota diferenciacija buvo vykdoma ant tiriamųjų mėginių, osteogeninėje diferenciacijos terpėje 21 dieną auginant ląsteles. Po DPSC išsėjimo praėjus 12 valandų įprasta ląstelių auginimo terpė buvo keičiama diferenciacijos terpe. Indukuotos osteogeninės diferenciacijos efektyvumui nustatyti buvo pasirinkta įvertinti specifinius osteogeninės diferenciacijos žymenis – fermento ALP aktyvumą, su osteogenine diferenciacija susijusių genų (koduojančių Runx2, OPN, OCN baltymus) raišką ir ECM mineralizaciją. Siekiant įvertinti diferenciacijos efektyvumo pokyčius laike, mėginiai buvo analizuojami 0-ąją, 7-ąją, 14-ąją ir 21-ąją diferenciacijos dieną.

Osteogeninė diferenciacija tai pakopinis procesas. Jo pradžioje yra stebimas Runx2 bei OPN baltymų kiekio didėjimas ląstelėse. Vėlesnėse šio proceso stadijose ląstelėse didėja ALP aktyvumas, baltymo OCN kiekis bei pradedamas mineralizuoti ECM (Burr ir Allen, 2014). Todėl aptariant osteogeninės diferenciacijos rezultatus buvo stengiamasi išlaikyti šių procesų eiliškumą.

Pradiniame osteogenezės etape stebimi genų, koduojančių Runx2 bei OPN baltymus, raiškos lygio padidėjimai ląstelėse. Todėl qPCR metodu, buvo vertinta šių genų raiška. Rezultatai parodė, kad DPSC indukuotos osteogeninės diferenciacijos metu abu (vagoti ir porėti) PLA karkasai inicijavo genų, koduojančių Runx2 ir OPN baltymus, raiškos padidėjimą (3.9 pav.). Runx2 mRNR raiškos pikas nustatytas diferenciacijos pradžioje, ląstelėms augant ant abiejų tiriamųjų karkasų, tačiau didesnis ši baltymą koduojančio geno raiškos lygis nustatytas DPSC, augintose ant vagotų karkasų ($p < 0,01$). OPN baltymą koduojančio geno raiška ląstelėse, augusiose ant abiejų tirtųjų karkasų, buvo virš bazinio lygio visais diferenciacijos vertinimo laikais. Tačiau, lyginant vagotus ir porėtus karkasus, ankstesnis šio geno raiškos pikas buvo gautas ląstelėse ant vagoto karkaso, tai registruota 7-ąją diferenciacijos dieną ($p < 0,05$). Ant porėtų karkasų OPN mRNR raiškos pikas registruotas 14-ąją diferenciacijos dieną ($p < 0,001$).



3.9 pav. Su osteogenine diferenciacija susijusių genų (koduojančių Runx2, OPN, OCN baltymus) raiškos lygiai DPSC, augintose ant vagotų ir porėtų PLA karkasų, indukuotos osteogeninės diferenciacijos metu. Rezultatai normalizuoti pagal GAPDH geno raišką ir standartizuoti pagal nediferencijuotų ląstelių, augusių ant PP paviršiaus, genų raišką pradinio laiko momentu. Rezultatai pateikti kaip mediana ± IQR. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp skirtingų karkasų grupių pažymėti kaip „**“ kai $p < 0,01$. Tuo tarpu „#“ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistiškai patikimas reikšmes lyginant su 0 diena – „#“ – $p < 0,05$, ir „##“ – $p < 0,01$. „Δ“ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistiškai patikimas reikšmes lyginant su 7 diena – „Δ“ – $p < 0,05$. „□“ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistiškai patikimas reikšmes lyginant su 14 diena – „□“ – $p < 0,05$. „●“ pažymėtos išskirtys.

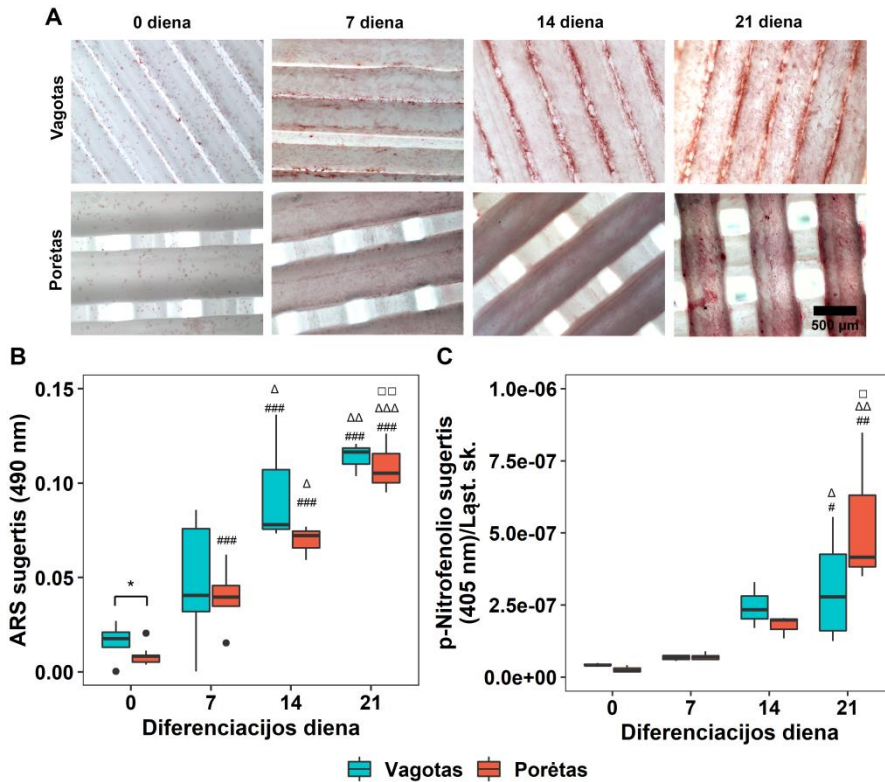
ALP aktyvumo padidėjimas yra sekantis osteogenezės žingsnis ląstelėse. Mūsų darbe, atlikus šio fermento aktyvumo vertinimą nustatyta, kad ląstelėse, augusiose ant abiejų tiriamųjų PLA karkasų, ALP fermentinis aktyvumas nuo 0-ės iki 21-mosios diferenciacijos dienos augo palaipsniui (3.10 pav. C), tačiau statistiškai reikšmingi skirtumai buvo gauti tik po 21-

nos diferenciacijos dienos, lyginant su 0-ne (vagoti – $p<0,05$; porėti – $p<0,01$), 7-ta (vagoti – $p<0,05$; porėti – $p<0,01$) ir 14-ta (porėti – $p<0,05$) dienomis. Statistiškai patikimo ALP aktyvumo skirtumo tarp ląstelių, augusių ant abiejų tiriamųjų karkasų (vagotų ir porėtų), nebuvo nustatyta.

Kaip vėlyvesnis osteogenezės indikatorius buvo vertinamas mineralizuoto ECM formavimasis. ECM mineralizacija analizuota ant karkasų augintas DPSC dažant ARS. Šviesiniu mikroskopu gautose nuotraukose (3.10 pav. A) galima matyti, kad daugiausiai kalcio sankaupų vagotuose karkasuose buvo vagose, kurias suformavo tarpusavyje susilietusios PLA gijos. Lygiai taip pat ir porėtuose karkasuose - daugiausiai kalcio sankaupų matoma ten, kur tarpusavyje susikerta skirtingi PLA filamentai. ECM mineralizacija buvo vertinama ir kiekybiškai, ištirpinus ARS perchlorinėje rūgštyje (3.10 pav. B). Gauti rezultatai rodo, kad jau po 7-nių DPSC diferenciacijos dienų ant abiejų tiriamųjų karkasų galima matyti padidėjusią ECM mineralizaciją, tačiau statistiškai patikimi kalcio sankaupų kiekio skirtumai ant abiejų karkasų grupių buvo fiksuoti po 14-os (vagoti – $p<0,001$; porėti – $p<0,05$) ir 21-os (vagoti – $p<0,001$; porėti – $p<0,01$) diferenciacijos dienų. Taipogi, po 21 diferenciacijos dienos didesnis kalcio sankaupų kiekis buvo nustatytas ECM, kurį sukaupe DPSC, augintos ant porėtų karkasų ($p<0,05$), lyginant su vagotais.

Kaip paskutinis osteogenezės žingsnis, qPGR metodu buvo vertinta OCN baltymą koduojančio geno raiška. Statistiškai patikimų jo raiškos lygio skirtumų ląstelėse nebuvo nustatyta (3.9 pav.).

Akivaizdu, kad indukuotos diferenciacijos metu abi PLA makrostruktūros (vagota ir porėta) vienodai gerai atliko substrato vaidmenį DPSC osteogeninės diferenciacijos procese.



3.10 pav. Indukuotos osteogeninės DPSC diferenciacijos vertinimas. A – kokybinis ECM mineralizacijos vertinimas, kalcio sankaupos dažytos ARS ir vizualizuotos šviesiniu mikroskopu; B – kiekybinis ECM mineralizacijos vertinimas, atliktas matuojant ištirpinto ARS šviesos sugertį; C – fermento ALP aktyvumo tyrimas, atliktas matuojant p-nitrofenolio šviesos sugertį. Duomenys standartizuoti pagal ląstelių skaičių kiekvienu laiku momentu ant atitinkamo karkaso. Rezultatai pateikti kaip mediana \pm IQR. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp skirtingų karkasų grupių pažymėti kaip „*“ kai $p < 0,05$. Tuo tarpu „#“ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistiškai patikimas reikšmes lyginant su 0 diena – „#“ - $p < 0,05$; „##“ - $p < 0,01$; „###“ - $p < 0,001$. „ Δ “ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistiškai patikimas reikšmes lyginant su 7 diena – „ Δ “ - $p < 0,05$; „ $\Delta\Delta$ “ - $p < 0,01$. „ \square “ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistiškai patikimas reikšmes lyginant su 14 diena – „ \square “ - $p < 0,05$. „●“ pažymėtos išskirtys.

3.2.3.2 Spontaninė osteogeninė diferenciacija

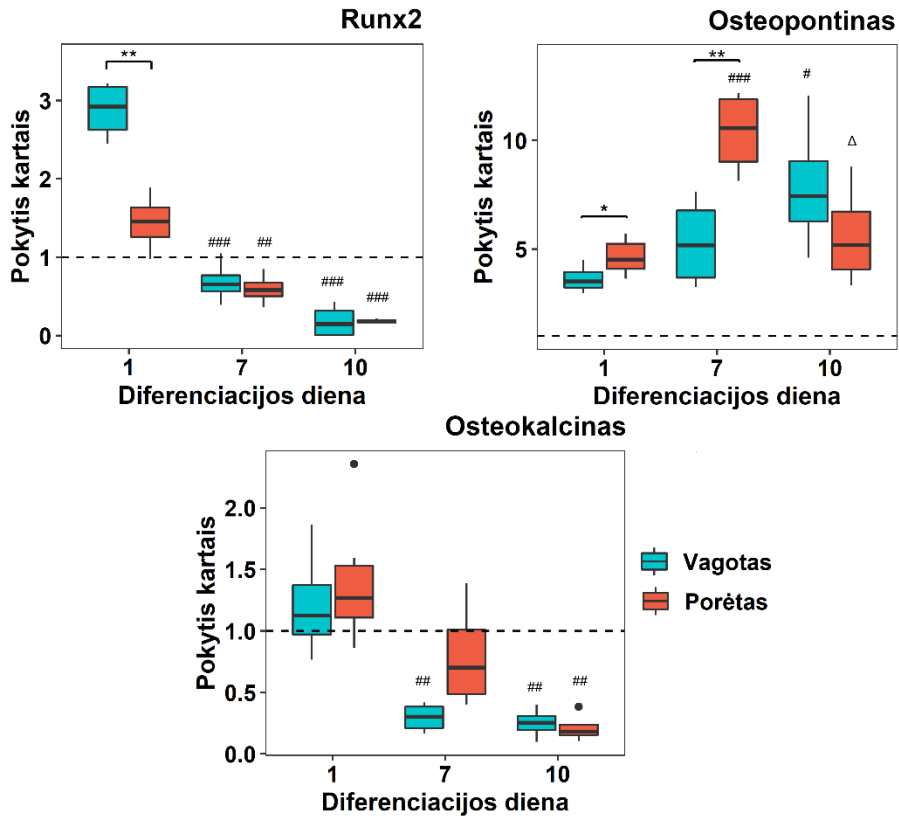
Žinoma, jog paviršiaus mikrostruktūra gali inicijuoti spontaninę osteogeninę SC diferenciaciją (Glatt ir kt., 2017). Šiame darbe tolimesniais eksperimentais buvo vertinama, ar mūsų tiriamos PLA makrostruktūros

(vagota ir porėta, kurių reljefas yra didesnis už ląstelės skersmenį) geba indukuoti spontaniinę DPSC osteogenezę.

Spontaniinė DPSC diferenciacija buvo registruota ląsteles auginant 10 dienų įprastinėje auginimo terpėje (pusę jos keičiant kas 2-3 dienas) ant tiriamųjų PLA karkasų. Spontaniinės osteogeninės diferenciacijos efektyvumas registruotas vertinant tokius pat osteogeninės diferenciacijos žymenis, kaip ir indukuotos diferenciacijos atveju (fermento ALP aktyvumą, su osteogenine diferenciacija susijusių genų (koduojančių Runx2, OPN, OCN baltymus) raišką bei ECM mineralizaciją). Siekiant palyginti skirtingomis sąlygomis augusių ląstelių diferenciacijos dinamiką, mėginiai buvo analizuoti 1-mą, 7-tą ir 10-tą dieną po DPSC išsėjimo. Rezultatai aptariaimi vadovaujantis ta pačia įvykių eiliškumo seka, stengiantis išlaikyti osteogeninės diferenciacijos metu vykstančių procesų tvarką (Burr ir Allen, 2014).

Įvertinus genų, koduojančių Runx2 ir OPN baltymus, raišką ląstelėse buvo pastebėta, kad abu tirtieji paviršiai (vagotas ir porėtas) inicijavo padidėjusią šių genų raišką (3.11 pav.). Kaip ir indukuotos diferenciacijos atveju, transkripcijos veiksnio Runx2 mRNR raiškos pikas ant vagotų ir porėtų karkasų augusiose DPSC nustatytas diferenciacijos registracijos pradžioje. Lyginant ant vagoto ir porėto paviršiaus augusias ląsteles akivaizdu, kad didesnė šio geno raiška nustatyta ląstelėse, kultivuotose ant vagoto paviršiaus ($p < 0,01$). Vėlesnėmis dienomis ląstelėse, augusiose ant abiejų PLA paviršių, buvo registruotas geno, koduojančio Runx2 baltymą, raiškos sumažėjimas (7-tą (vagoti – $p < 0,001$; porėti – $p < 0,01$) ir 10-tą (vagoti – $p < 0,001$; porėti – $p < 0,001$) dieną). Spontaniinės diferenciacijos metu OPN baltymo mRNR raiška palaipsniui didėjo visais fiksuotais diferenciacijos laikais DPSC auginant ant abiejų tiriamų PLA paviršių. Tačiau diferenciacijos registracijos pradžioje (1-mą ir 7-tą dienomis) šio geno raiška buvo didesnė ląstelėse, augusiose ant porėtų karkasų (1-mą dieną – $p < 0,05$; 7-tą dieną – $p < 0,01$).

Analizuojant ALP aktyvumą ląstelėse spontaniinės diferenciacijos metu buvo nustatyta, kad po 10-ties DPSC kultivavimo ant karkasų dienų padidėjęs fermento aktyvumas buvo registruotas tiek ant vagotų, tiek ir ant porėtų karkasų augančiose ląstelėse lyginant su 1-ma (vagoti – $p < 0,001$; porėti – $p < 0,05$) ir 7-ta (vagoti – $p < 0,001$; porėti – $p < 0,05$) dienomis (3.12 pav., C). Taip pat pastebėta, kad po 10-ties diferenciacijos dienų didžiausiu ALP aktyvumu pasižymėjo ląstelės, augintos ant porėtų PLA karkasų ($p < 0,07$).

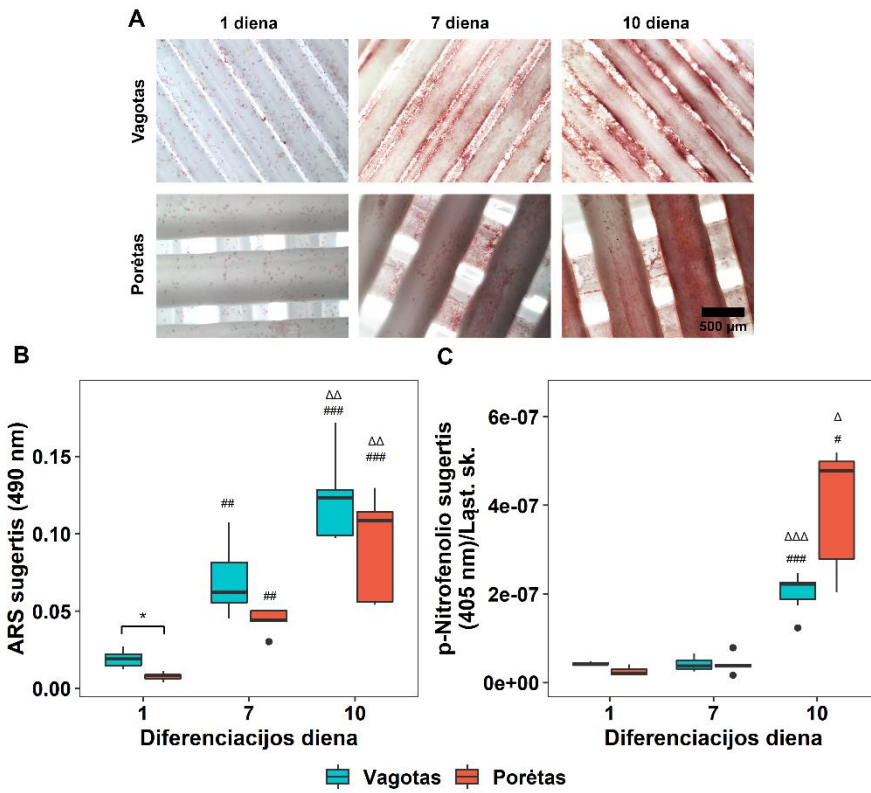


3.11 pav. Su osteogenine diferenciacija susijusių genų (koduojančių Runx2, OPN, OCN baltymus) raiškos lygiai DPSC, augusiose ant vagotų ir porėtų PLA karkasų, spontaninės osteogeninės diferenciacijos metu. Rezultatai normalizuoti pagal GAPDH geno raišką ir standartizuoti pagal nediferencijuotų ląstelių, augusių ant PP paviršiaus, genų raišką pradinio laiko momentu. Rezultatai pateikti kaip mediana \pm IQR. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp skirtingų karkasų grupių pažymėti kaip „*“ kai $p < 0,05$ ir „**“ kai $p < 0,01$. Tuo tarpu „#“ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistiškai patikimas reikšmes lyginant su 1 diena – „#“ - $p < 0,05$, „##“ - $p < 0,01$ ir „###“ - $p < 0,001$. „ Δ “ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistiškai patikimas reikšmes lyginant su 7 diena – „ Δ “ - $p < 0,05$.

Spontantinės diferenciacijos tyrimo metu įvertinus besiformuojantį mineralizuotą ECM buvo pastebėta, kad DPSC, lygiai taip pat kaip ir indukuotos diferenciacijos atveju, buvo linkę susitelkti PLA karkasų vagose bei gijų susikirtimo vietose. Šiose srityse buvo stebėta ir intensyviausia ECM mineralizacija (3.12 pav. A). ECM mineralizaciją įvertinus kiekybiškai, matyti, kad net po 7-nių dienų kalcio sandaugų kiekis, susidaręs už ląstelių, augusių ant abiejų tiriamųjų karkasų, ribų yra didesnis nei pirmą diferenciacijos dieną (vagoti – $p < 0,01$; porėti – $p < 0,05$) (3.12 pav. B). Taip pat pastebėta, kad po 7-nių kultivavimo dienų didesnis kalcio sandaugų kiekis nustatytas ECM užpilde, kurį suformavo DPSC, augusios ant porėtų karkasų ($p < 0,05$), šis skirtumas buvo matomas ir po 10-ties dienų ($p < 0,05$).

Įvertinus geno, koduojančio OCN baltymą, raišką ląstelėse, augusiose tiek ant vagotų, tiek ir ant porėtų PLA karkasų, pastebėta, kad ji palaipsniui mažėjo viso tyrimo metu (3.11 pav.).

Gauti rezultatai patvirtino, kad abi PLA makrostruktūros (vagota ir porėta) geba inicijuoti DPSC spontanine osteogeninę diferenciaciją. Tokios makrostruktūros gali būti naudojamos kaip substratas dirbtinio kaulinio audinio formavimui.



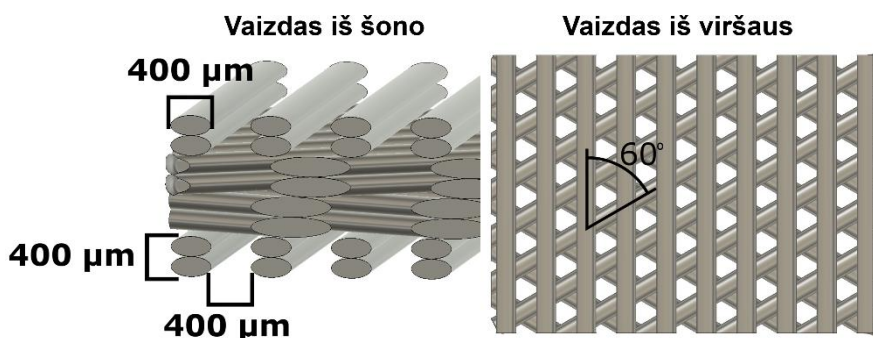
3.12 pav. Spontaninės DPSC osteogeninės diferenciacijos vertinimas. A – kokybinis ECM mineralizacijos vertinimas, ECM susidarę kalcio sandaupos dažytos ARS ir vizualizuotos šviesiniu mikroskopu; B – kiekybinis ECM mineralizacijos vertinimas, atliktas matuojant ištirpinto ARS šviesos sugertį; C – ALP aktyvumo tyrimas, atliktas matuojant p-nitrofenolio šviesos sugertį. Duomenys standartizuoti pagal ląstelių skaičių kiekvienu registravimo laiko momentu ant atitinkamos karkaso grupės. Rezultatai pateikti kaip mediana ± IQR. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp skirtingų karkasų grupių pažymėti kaip „*“ kai $p < 0,05$. Tuo tarpu „#“ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistškai patikimas reikšmes lyginant su 1 diena – „#“ - $p < 0,05$; „##“ - $p < 0,01$; „###“ - $p < 0,001$. „Δ“ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistškai patikimas reikšmes lyginant su 7 diena – „Δ“ - $p < 0,05$; „ΔΔ“ - $p < 0,01$; „ΔΔΔ“ - $p < 0,001$. „●“ pažymėtos išskirtys.

3.3 Karkaso cheminės sudėties įtaka ląstelių likimui

3.3.1 Kompozitinių karkasų fizinės savybės

Skirtingos cheminės sudėties (kompozitiniams) karkasams pagaminti *Filabot Original EX2* ekstrūderiu buvo paruošti filamentai, sudaryti iš PLA ir 10 % HA priemaišų (PLA+HA) bei PLA ir 10 % BG priemaišų (PLA+BG).

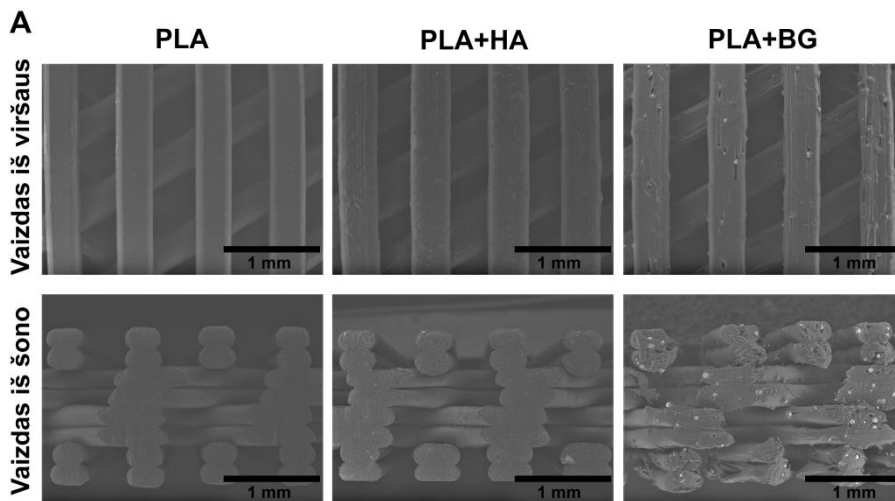
Atsižvelgiant į ląstelių elgsenos ant aukščiau aprašytų skirtingos makrotopografijos paviršių rezultatus, porėtų karkasų modelis buvo patobulintas (3.13 pav.). Sukurtą naują karkaso architektūrą sudarė keturi sluoksniai, kuriuose tarpusavyje susikirsdomos gijos formavo 60° kampą. Kiekvienas sluoksnis buvo sudarytas iš dviejų gijų sluoksnių, kurioms susiliečiant yra suformuojama vaga. Pagal tokią, patobulintą karkaso architektūrą, iš gautų polimero-biokeramikos filamentų FFF 3D spausdintuvu *Pharaoh XD 20* buvo spausdinami porėti karkasai, kurie ir naudoti tolimesniuose tyrimuose. Kontroliniu paviršiumi buvo laikomi iš gryno PLA filamento pagaminti analogiški (naujos architektūros) mėginiai.



3.13 pav. Porėto karkaso, skirto įvertinti cheminės sudėties įtaką ląstelių likimui, modelis. Karkasą sudaro keturi sluoksniai, kurių kiekvieną formuoja dvi tarpusavyje susiliečiančios gijos. Kiekvieno sluoksnio gijos susikirsdomos tarpusavyje suformuoja 60° kampą.

SEM pagalba buvo gautos karkasų nuotraukos (3.14 pav. A), kuriose buvo išmatuoti karkasų porų dydžiai bei gijų aukščiai ir pločiai (3.14 pav. B). Vidutinis PLA karkasų porų dydis buvo $414,43 \pm 23,4 \mu\text{m}$, gijų aukštis $219,4 \pm 8,4 \mu\text{m}$, o plotis - $387,9 \pm 10,8 \mu\text{m}$. Kompozitinio PLA+HA karkaso vidutinis porų dydis buvo $412,3 \pm 10,9 \mu\text{m}$, gijų aukštis - $224 \pm 9,5 \mu\text{m}$, o plotis - $407,6 \pm 17,9 \mu\text{m}$. Kompozitinio PLA+BG karkaso atveju $218 \pm 10,2 \mu\text{m}$ aukščio ir $384,4 \pm 13 \mu\text{m}$ pločio gijos formavo $396,9 \pm 25,5 \mu\text{m}$ dydžio poras. Be to, gautuose SEM vaizduose galima matyti, jog suformuotuose

kompozitiniuose filamentuose HA ir BS dalelės pasiskirstė tolygiai (aiškiau matosi vaizduose iš šono) (3.14 pav. A).



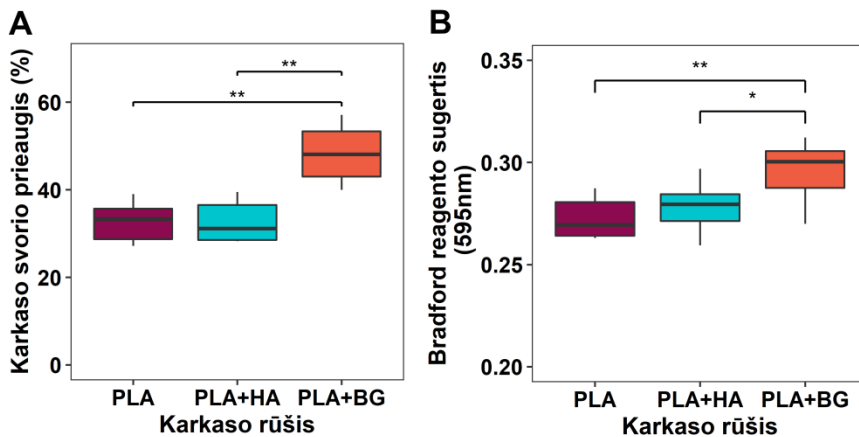
B

	PLA	PLA + HA	PLA + BG
Porų dydis, mm	414.4 ± 23.4	412.3 ± 10.9	396.9 ± 25.5
Gijos aukštis, mm	219.4 ± 8.4	224.0 ± 9.5	218.0 ± 10.2
Gijos plotis, mm	387.9 ± 10.8	407.6 ± 17.9	384.4 ± 13.0

3.14 pav. 3D spausdintuvu pagaminti kompozitiniai karkasai. A - SEM nuotraukos, kuriose matyti karkasų vaizdai iš viršaus ir iš šono; B – kompozitinių karkasų charakteristikos.

Siekiant nustatyti, ar po implantacijos kompozitiniai karkasai lengvai integruosis į organizmą, buvo tiriamos jų vandens absorbcinės bei baltymų adsorbcijos savybės. Vertinant karkasų vandens sugertį, tiriamieji mėginiai buvo sveriami prieš ir po 24 valandų inkubacijos vandenyje, o iš gautų duomenų skaičiuotas procentinis jų svorio prieaugis (3.15 pav. A). Šie rezultatai parodė, kad tiek gryni PLA, tiek ir kompozitiniai PLA+HA karkasai buvo linkę absorbuoti mažiau vandens nei PLA+BG mėginiai ($p < 0,01$).

Vertinant baltymų adsorbciją ant kompozitų, tiriamieji mėginiai 24 valandas buvo inkubuojami FBS. Po inkubacijos mėginiai plauti ir matuotas ant karkasų paviršiaus nusėdusių baltymų kiekis (3.15 pav. B). Matyti, kad PLA+BG karkasai baltymus adsorbavo geriausiai.



3.15 pav. Kompozitinių karkasų fizinės savybės. A – karkasų vandens absorbcija, išreikšta procentiniu svorio priaugiu po 24 valandų inkubacijos vandenyje; B – baltymų adsorbcija ant karkasų paviršiaus, atlikta matuojant Bradford reagento šviesos sugertį. Rezultatai pateikti kaip mediana ± IQR. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp skirtingų karkasų grupių pažymėti, kaip „*“ kaip $p < 0,05$ ir „**“ kai $p < 0,01$.

Rezultatai parodė, kad biokeramikos (HA arba BG) iš esmės nepakeitė 3D būdu spausdinamų karkasų struktūros, tačiau BG dalelės patikimai pagerino karkaso vandens absorbciją bei padarė karkaso paviršių tinkamesnį serume esančių baltymų prisitvirtinimui.

3.3.2 Biokeramikos priedų poveikis ląstelių adhezijai

Monosluoksniu augančių ląstelių prisitvirtinimas prie substrato yra būtinas norint užtikrinti sėkmingą jų proliferaciją bei diferenciaciją (Di Benedetto ir kt., 2015). Siekiant įvertinti, ar skirtingos biokeramikos keičia DPSC adhezijos efektyvumą, ląstelės buvo sėjamos ant tiriamųjų karkasų, o nuo išsėjimo praėjus 0,5, 2 ir 24 valandoms buvo vizualizuoti DPSC F-aktino filamentai (S2 pav.) bei skaičiuotas ląstelės užimamas plotas (3.16 pav. B).

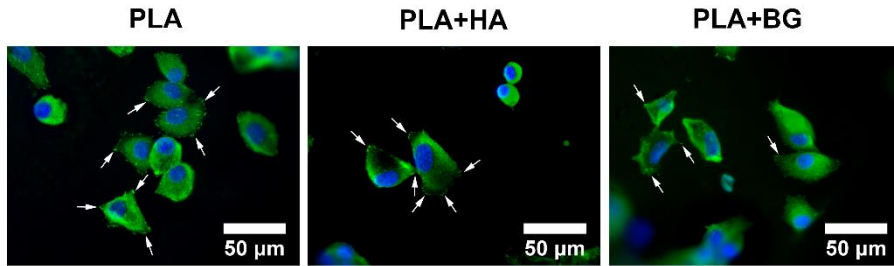
Žinoma, kad šioms ląstelėms tvirtinantis prie paviršiaus keičiasi jų forma. Iškart po išsėjimo, suspensijoje, jos yra apvalios. Vėliau, pradėjus tvirtintis prie substrato, jų forma tampa vis plokštesnė (Khalili ir Ahmad, 2015; Pierres ir kt., 2002). Todėl galima teigti, kad patraukliausi ląstelės adhezijai yra tie paviršiai, ant kurių ji greičiausiai užima didžiausią plotą, t.y., greičiausiai tampa plokščia.

Mūsų rezultatai parodė, kad po pirmojo pusvalandžio ląstelės greičiau tvirtinosi prie kompozitinių mėginių - atitinkamai didesni DPSC užimami plotai, lyginant su grynos PLA karkasais, buvo registruoti ant PLA+HA ($p<0,01$) ir PLA+BG ($p<0,05$) substratų. Vėlesnis ląstelių ploto vertinimas (po 24 valandų) parodė, kad lyginant su pirmuoju pusvalandžiu, ant visų tirtų paviršių ląstelių užimti plotai padidėjo, tačiau paaiškėjo, kad kompozitinis PLA+BG paviršius ląstelių adheziją užtikrino prasčiausiai (lyginant su PLA ($p<0,01$) ir PLA+HA ($p<0,001$) karkasais).

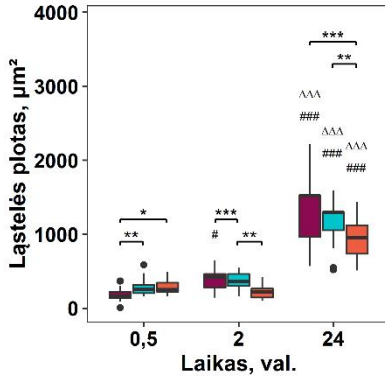
Norint įsitikinti, ar tikrai kompozitinis PLA+BG karkasas yra mažiausiai patrauklus DPSC adhezijai, po 24 valandų, nuo ląstelių išsėjimo ant tiriamųjų paviršių, buvo vizualizuotos ir kiekybiškai įvertintos jų susiformuotos fokalinės adhezijos (sutelktinio sąlyčio taškai) (3.16 pav. A ir C). Suformuotų fokolinių adhezijų kiekis ląstelėje gali būti siejamas su jos prisitvirtinimo prie substrato stiprumu (McGrail ir kt., 2015). Kuo ląstelė ant substrato suformuoja daugiau fokolinių adhezijų, tuo ji stipriau prie jo prisitvirtina, o toks paviršius, atitinkamai, yra laikomas tinkamesniu ir patrauklesniu jos išlikimui.

Tyrimai patvirtino, kad mažiausiai fokolinių adhezijų suformavo DPSC, augusios ant PLA+BG karkasų, todėl, lyginant su PLA ($p<0,05$) ir PLA+HA ($p<0,05$) paviršiais, PLA+BG kompozitas buvo nepatraukliausias šių ląstelių prisitvirtinimui. Abu DPSC adhezijos vertinimo tyrimai patvirtino, kad prasčiausiai ląstelių adheziją užtikrino kompozitiniai PLA+BG karkasai.

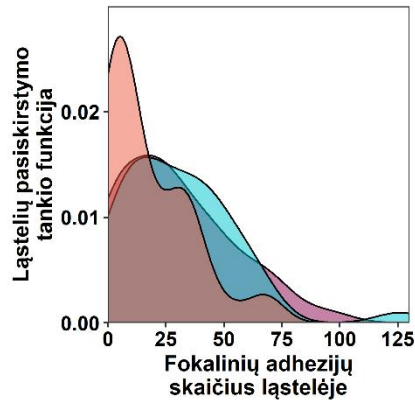
A



B



C

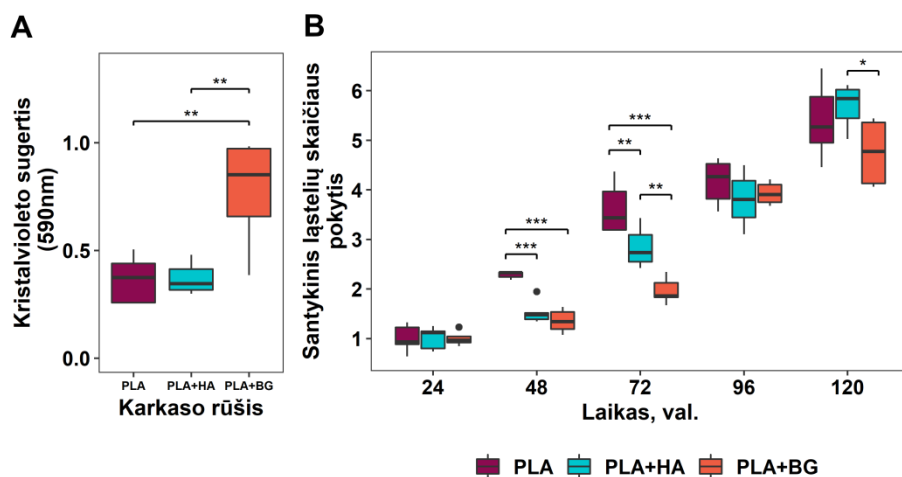


■ PLA ■ PLA+HA ■ PLA+BG

3.16 pav. DPSC adhezija ant kompozitinių karkasų. A – imunocitochemijos metodu vizualizuotos ląstelių suformuotos fokalines adhezijos (žalia spalva, dažyta Alexa Fluor 488) bei branduoliai (mėlyna spalva, dažyta DAPI). Rodyklės nuotraukose žymi fokalines adhezijas; B – ląstelės ploto matavimai po 0,5, 2 ir 24 valandų auginimo ant tiriamųjų mėginių. Rezultatai pateikti kaip mediana ± IQR; C – kiekybinis fokalinių adhezijų vertinimas po 24 val. nuo DPSC išsėjimo. Rezultatai pateikti ląstelių pasiskirstymo tankio funkcijos histograma. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp skirtingų karkasų grupių pažymėti kaip „*“ kai $p < 0,05$, „**“ kai $p < 0,01$ ir „***“ kai $p < 0,001$. Tuo tarpu „#“ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistiškai patikimas reikšmes lyginant su 0,5 val. – „#“ – $p < 0,05$, „##“ ir „###“ – $p < 0,001$. „Δ” rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistiškai patikimas reikšmes lyginant su 2 val. – „ΔΔΔ” – $p < 0,001$. „●“ pažymėtos išskirtys.

3.3.3 Kompozitinių PLA karkasų įtaka DPSC migracijai ir proliferacijai

Vertinant kaip skirtingi kompozitiniai karkasai inicijuoja ląstelių judėjimą jų linkme buvo atliekamas vertikali DPSC migracijos testas. Tuo tikslu tiriamieji mėginiai 72 valandas buvo inkubuojami ant DPSC monosluoksnio. Po numatyto laiko registruotas ant karkasų užmigrusių ląstelių skaičius (3.17 pav. A). Iš gautų rezultatų galima matyti, kad patraukliausi DPSC buvo PLA+BG mėginiai. Ant šios rūšies karkasų, lyginant su grynais PLA ($p < 0,01$) ir kompozitniais PLA+HA ($p < 0,01$), „užlipo“ daugiausiai ląstelių.



3.17 pav. DPSC migracija ir proliferacija ant kompozitinių karkasų. A – vertikali DPSC migracija ant tiriamųjų mėginių, atlikta matuojant kristalvioleto sugertį; B – ląstelių, augintų ant skirtingos cheminės sudėties karkasų, proliferacijos rezultatai, normalizuoti pagal ląstelių kiekius, gautus ant kiekvienos rūšies paviršiaus po 24 val. nuo išsėjimo. Duomenys pateikti kaip mediana \pm IQR. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp skirtingų karkasų grupių pažymėti kaip „*“ kai $p < 0,05$, „**“ kai $p < 0,01$ ir „***“ kai $p < 0,001$. „●“ pažymėtos išskirtys.

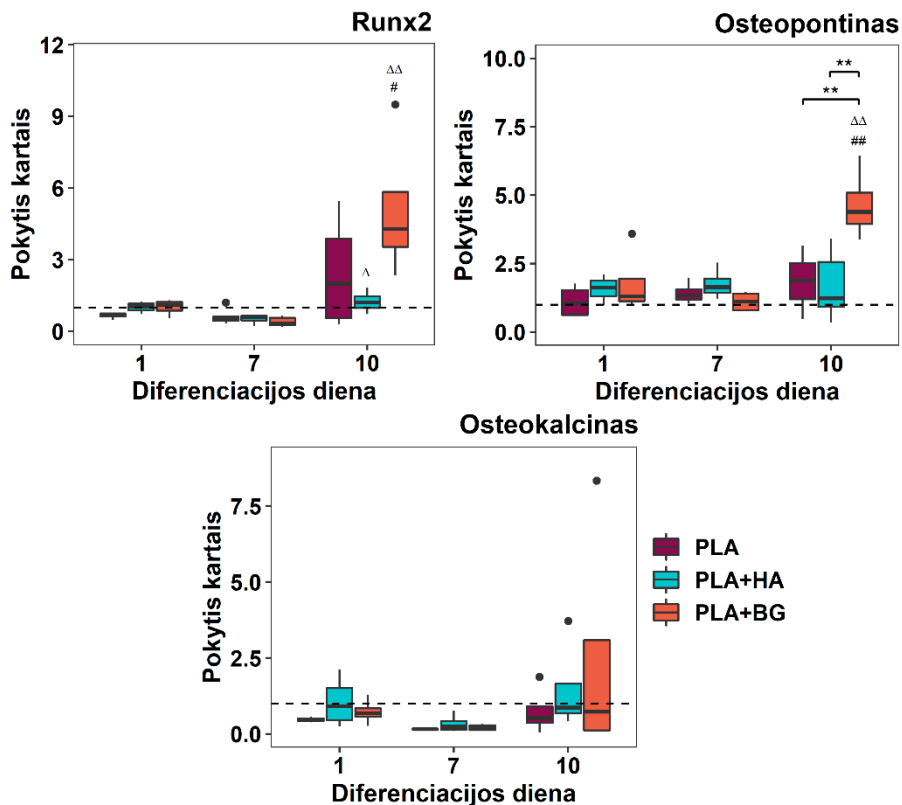
Vertinant biokeramikos priedų kompozituose poveikį DPSC proliferacijai, ląstelės buvo augintos ant tiriamųjų kompozitinių struktūrų. Po numatytų laiko momentų (24, 48, 72, 96 ir 120 valandų) DAPI dažant DNR buvo registruotas užaugusių ląstelių skaičius. DPSC kiekis buvo nustatomas pagal kalibracinę kreivę (S1 pav.). Rezultatai parodė, kad tiriamos biokeramikų priemonės nėra toksiškos ląstelėms, proliferacija vyksta (3.17 pav. B), tačiau, beveik visais analizuotais laiko momentais efektyviausiai DPSC dauginosi ant grynų PLA karkasų, lyginat su kompozitniais

PLA+HA ir PLA+BS mėginiais. Lėčiausiai dauginosi DPSC, augintos ant PLA+BG substrato.

Po DPSC migracijos ir proliferacijos tyrimo gauti prieštaringi rezultatai - ląstelių migracijai patraukliausias buvo kompozitinis PLA+BG paviršius, tačiau ant jo auginant ląsteles, fiksuota prasčiausia DPSC proliferacija. Beje, šis kompozitas pasižymėjo ir prasčiausiomis adhezinėmis sąvybėmis. Tokie rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad BG priemaišos, kurios SEM nuotraukose matomos kaip maži „spygliukai“ (3.14 pav. A), gali padėti ląstelėms „užlipti“ ant šių paviršių. Tačiau lieka neaišku, kodėl vėliau šis kompozitinis paviršius yra nebepatrauklus DPSC prisitvirtinimui ir dauginimuisi.

3.3.4 Kompozitų poveikis osteogeninei ląstelių diferenciacijai

Ankstesnių eksperimentų rezultatai, gauti vertinant skirtingą paviršių topografiją, parodė, jog makroreljefą turintys PLA mėginiai geba inicijuoti spontanišią DPSC osteogeninę diferenciaciją. Todėl, siekiant nustatyti karkasų cheminės sudėties įtaką DPSC osteogenezei, buvo pasirinkta dar kartą atlikti spontanišios osteogeninės diferenciacijos eksperimentus. Tuo tikslu nuo ląstelių išsėjimo praėjus 1, 7 ir 10 dienų buvo vertinamas ALP aktyvumas, nustatoma su osteogenine diferenciacija susijusių baltymų genų raiška bei analizuojamas būdingo kauliniam audiniui ECM susiformavimas. Rezultatų dėstymas paremtas osteogeninės diferenciacijos metu vykstančių procesų eiliškumu (Burr ir Allen, 2014). Todėl pirmiausia vertinti su osteogenine diferenciacija siejamų genų, koduojančių Runx2 ir OPN baltymus, raiška bei ALP aktyvumas, vėliau kauliniam audiniui būdingo ECM suformavimas (kalcio sanaujų bei kolageno kaupimasis ECM) ir galiausiai geno, koduojančio OCN baltymą, raiškos lygis ląstelėse.



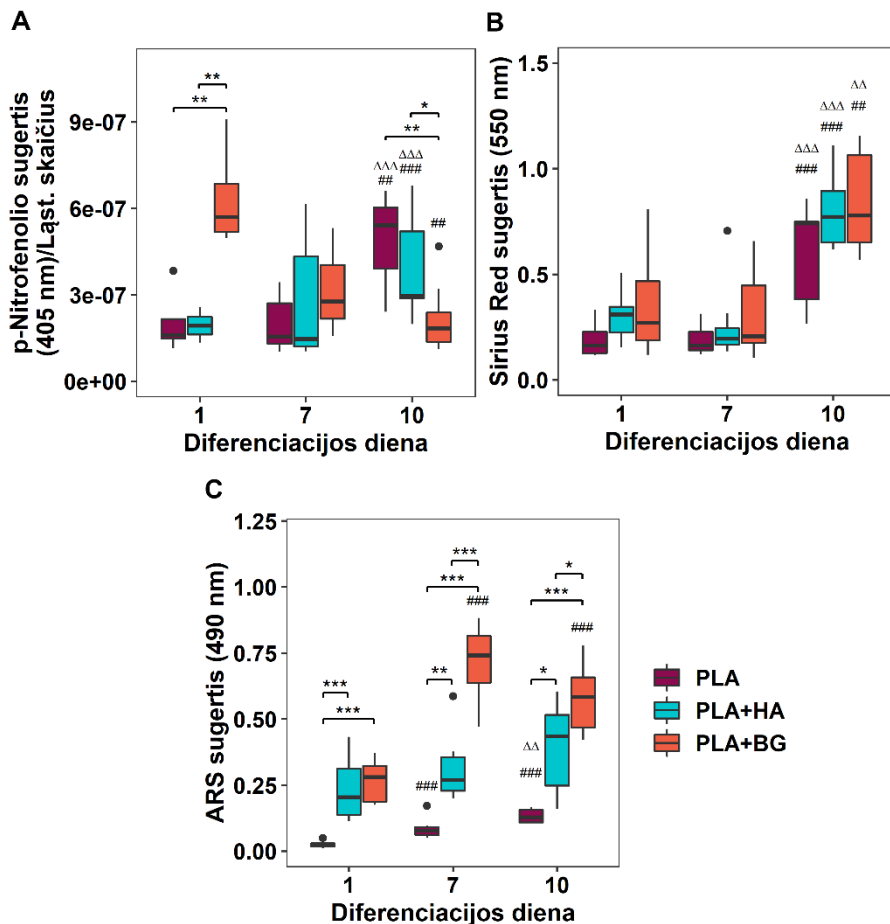
3.18 pav. Su osteogenine diferenciacija susijusių genų (koduojančių Runx2, OPN, OCN baltymus) raiškos lygiai DPSC, augintose ant skirtingų kompozitinių karkasų. Rezultatai normalizuoti pagal GAPDH geno raišką ir standartizuoti pagal nediferencijuotų ląstelių, augintų ant PP paviršiaus, genų raišką pradiniu laiko momentu. Rezultatai pateikti kaip mediana \pm IQR. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp skirtingų karkasų grupių pažymėti kaip „**“, kai $p < 0,01$. Tuo tarpu „#“ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistškai patikimas reikšmes lyginant su 1 diena – „#“ – $p < 0,05$ ir „##“ - $p < 0,01$. „ Δ “ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistškai patikimas reikšmes lyginant su 7 diena – „ $\Delta\Delta$ “ - $p < 0,01$.

Vertinant pirmuosius ląstelės osteogenezės žymenis pastebėta, kad spontaninės diferenciacijos metu visi tirtieji karkasai inicijavo genų, koduojančių Runx2 ir OPN baltymus, raiškos padidėjimą ląstelėse (3.18 pav.). Visi paviršiai 10-ąją DPSC diferenciacijos dieną inicijavo didžiausią baltymo Runx2 mRNR raišką, tačiau ląstelėse, augintose ant grynos PLA ($p < 0,27$) bei PLA+HA ($p < 0,09$) karkasų, šio geno raiška buvo mažesnė nei DPSC, augintose ant PLA+BG kompozito. Vertinant geno, koduojančio OPN baltymą, raišką matoma panaši tendencija kaip ir Runx2 atveju - 1-ąją

ir 7-ąją ląstelių auginimo ant karkasų dieną šio geno raiškos lygis DPSC kultūrose nekito. Padidėjęs šio geno raiškos lygis registruotas tik 10-ąją diferenciacijos dieną, ląstelėms augant ant PLA+BG ($p < 0,01$) karkasų. Nors genų, koduojančių abu baltymus, raiškos padidėjimas yra siejamas su osteogenezės pradžia, tačiau mūsų tyrimo metu jų raiškos lygio didėjimas fiksuotas tik 10-ąją diferenciacijos dieną. Ląstelėse aktyvuojami įvairūs signaliniai keliai tarpusavyje gali persidengti ir persipinti, priklausomai nuo to, kaip jie yra aktyvuojami. Kartais biologinių procesų aktyvacijai pakanka ir nedidelių signalinių baltymų kiekio ląstelėse. Manome, kad ir šiuo atveju, pradiniais laiko momentais, bazinio genų, koduojančių Runx2 ir OPN baltymus, raiškos lygio pakako tam, kad DPSC būtų inicijuota osteogeninė diferenciacija.

ALP aktyvumo matavimai parodė, kad jau 1-ąją dieną po išsėjimo ląstelėse, augintose ant kompozitinių PLA+BG karkasų, buvo fiksuotas ryškus šio fermento aktyvumo padidėjimas, lyginant su ląstelėmis, augintomis ant grynos PLA ($p < 0,01$) bei PLA+HA ($p < 0,01$) substratų (3.19 pav. A). Vėlesnėmis dienomis ALP aktyvumas ant PLA+BG paviršiaus augintose ląstelėse palaipsniui mažėjo, tuo tarpu DPSC, kultivuotose ant PLA ir PLA+HA karkasų, šio fermento aktyvumas piką pasiekė tik 10-ąją dieną.

Analizuojant kauliniam audiniui būdingo ECM susiformavimą buvo vertinami diferenciacijos metu DPSC susintetinti kolageno ir kalcio sandaugų kiekiai. Matyti, kad visi tirti paviršiai inicijuoja kolageno kaupimąsi DPSC formuojamame ECM, tačiau kolageno kiekio skirtumai tarp skirtingų karkasų grupių nebuvo nustatyti (3.19 pav. B). Įvertinus ECM mineralizaciją akivaizdu, jog jau po 1-osios diferenciacijos dienos daugiau kalcio sandaugų susidarė aplink ląsteles, augusias ant kompozitinių PLA+HA ($p < 0,001$) ir PLA+BG ($p < 0,001$) karkasų, lyginant su grynos PLA mėginiais (3.19 pav. C). Vėlesnėmis diferenciacijos dienomis (7-ąją ir 10-ąją) intensyviausia ECM mineralizacija registruota DPSC augant ant PLA+BG mėginių.



3.19 pav. Osteogeninės diferenciacijos vertinimas DPSC auginant ant skirtingų kompozitinių karkasų. A –ALP aktyvumo tyrimas, atliktas matuojant p-nitrofenolio šviesos sugertį. Duomenys standartizuoti pagal ląstelių skaičių kiekvienu vertinimo laiku ant atitinkamos grupės karkasų; B – kiekybinis kolageno kaupimosi ECM vertinimas, atliktas kolageno sankaupas dažant *Sirius Red* ir matuojant ištirpinto dažo šviesos sugertį; C – kiekybinis ECM mineralizacijos vertinimas, atliktas matuojant ištirpinto ARS šviesos sugertį. Rezultatai pateikti kaip mediana ± IQR. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp skirtingų karkasų grupių pažymėti kaip „*“, kai $p < 0,05$; „**“ kai $p < 0,01$ ir „***“ kai $p < 0,001$. Tuo tarpu „#“ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistiškai patikimas reikšmes lyginant su 1-ma diena – „###“ - $p < 0,01$; „####“ - $p < 0,001$. „Δ“ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistiškai patikimas reikšmes lyginant su 7-ta diena – „ΔΔ“ - $p < 0,01$, „ΔΔΔ“ - $p < 0,001$. „●“ pažymėtos išskirtys.

Paskutinis osteogeninės diferenciacijos žymuo, baltymo OCN mRNA raiška, visomis DPSC diferenciacijos dienomis, ląstelėms augant ant visų tirtųjų karkasų, nepadidėjo (3.18 pav.). Tačiau lyginant su PLA ($p < 0,61$) ir PLA+HA ($p < 0,84$) karkasų grupėmis, 10-ąją ląstelių auginimo dieną buvo registruotas nežymus šio geno raiškos lygio padidėjimas DPSC, augintose ant PLA+BG mėginių.

Gauti rezultatai rodo, kad visi trys karkasai (PLA, PLA+HA ir PLA+BG) inicijavo spontaninę DPSC diferenciaciją, tačiau stipriausia osteogenezės indukcija pasižymėjo kompozitinis PLA+BG substratas.

3.4 Paviršiaus dekoravimo įtaka ląstelių likimui

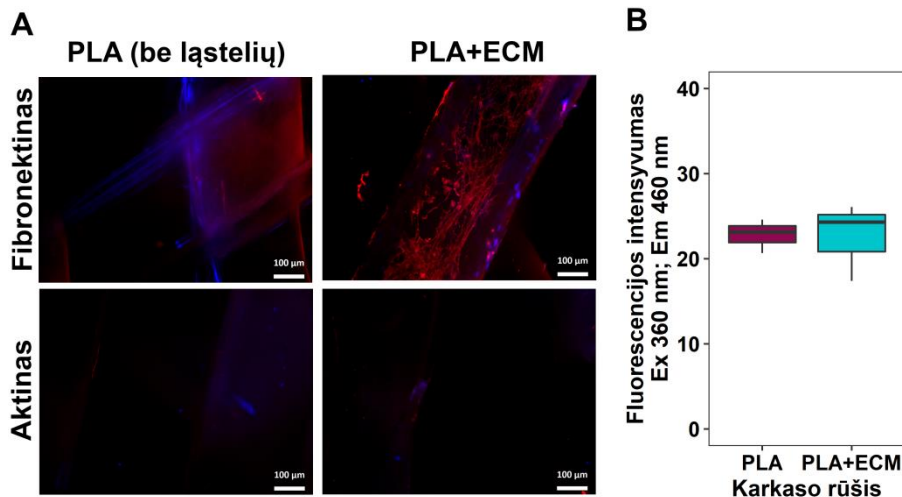
3.4.1 Ląstelių kilmės ECM baltymais padengtų karkasų fizinės savybės

Siekiant įvertinti, ar paviršiaus padengimas ECM baltymais keis substrato įtaką ląstelės likimui, buvo kuriami DPSC suformuotu ECM dengti PLA karkasai.

Šie karkasai ruošti DPSC auginant ant grynos PLA mėginių askorbo rūgštimi praturtintoje terpėje. Naudojant tokią terpę buvo siekiama, kad ECM susikauptų didesnis kolageno kiekis (Kutys ir kt., 2013). Nuo DPSC išsėjimo praėjus 7 dienoms, ląstelės buvo pašalintos nuo 3D struktūros (atlikta „nuląstelinimo“ procedūra, angl. *decellularization*). Tokiu būdu ant PLA karkasų buvo siekiama palikti tik DPSC susintetintus ECM baltymus (fibronektiną, kolageną ir kt.). „Nuląstelinimo“ efektyvumas buvo vertinamas kokybiškai - vizualizuojant ant PLA karkaso likusius baltymus (dažant fibronektiną ir aktiną) bei DNR (dažant DAPI dažais), ir kiekybiškai –matuojant po nuląstelinimo likusius ląstelių DNR pėdsakus (3.20 pav.). Nuląstelinimo efektyvumo vertinimo metu kontroliniu paviršiumi buvo laikomas paprastas PLA karkasas, ant kurio ląstelės nebuvo augintos.

Gautose nuotraukose (3.20 pav. A) galima matyti, kad naudota ląstelių pašalinimo metodika yra efektyvi. Procedūros metu buvo išlaikytas nepažeistas DPSC suformuotas ECM, tai rodo ant karkasų išlikęs fibronektino tinklas, bet pašalinti visi ląstelių citoskeleto baltymai ir DNR - po procedūros ant karkasų neliko nei aktino tinklo, nei DNR likučių. Šiuos rezultatus patvirtino ir kiekybinis DNR kiekio matavimas mėginiuose (3.20 pav. B). Matyti, kad nuląstelinamų karkasų grupėje (PLA+ECM) DNR kiekis ant šių substratų yra praktiškai toks pat kaip ir ant kontrolinio paviršiaus. Taip paruošti mėginiai buvo laikomi ląstelių kilmės ECM baltymais dengtais karkasais (PLA+ECM) ir toliau naudoti analizuojant

tokio natūralaus dekoravimo poveikį DPSC likimui, lyginant jį su nedekoruoto PLA paviršiaus įtaka šioms ląstelėms.

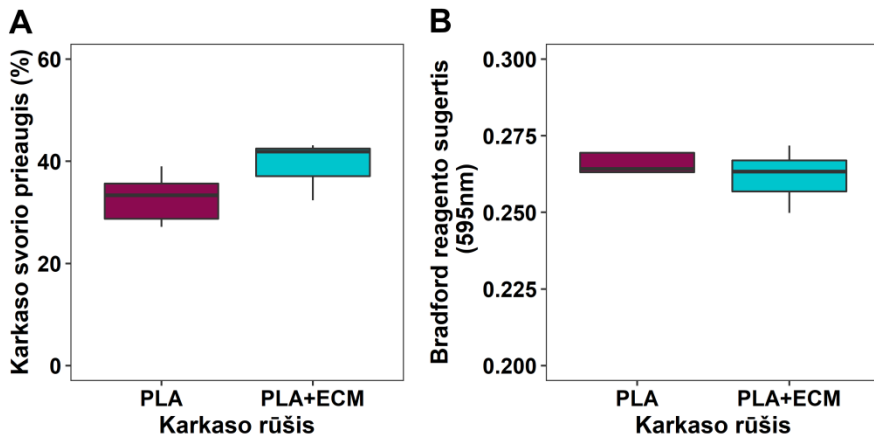


3.20 pav. PLA karkaso "nuląstelinimo" efektyvumas. A – vizualizuoti fibronektino ir aktino filamentai (raudona spalva, dažyta Alexa Fluor 594) bei DNR likučiai (mėlyna, dažyta DAPI); B – po "nuląstelinimo" procedūros kiekybiškai išmatuota DAPI fluorescencija. Rezultatai pateikti kaip mediana \pm IQR. PLA - kontrolinis paviršius, ant kurio ląstelės nebuvo augintos. PLA+ECM – "nuląstelintas" karkasas.

Vertinant ECM reikšmę karkaso integracijos į organizmą kontekste, buvo tiriamos PLA+ECM mėginių vandens absorbcinės bei baltymų adsorbcinės savybės. Analizuojant vandens absorbciją, karkasai buvo 24 val. inkubuoti vandenyje, jų svoris buvo registruotas prieš ir po panardinimo. Iš gautų duomenų skaičiuotas procentinis mėginių svorio prieaugis (3.21 pav. A). Rezultatai parodė, kad PLA+ECM mėginiai buvo linkę geriau absorbuoti vandenį nei karkasai, pagaminti iš grynos PLA. Tačiau statistiškai patikimas skirtumas tarp abiejų karkasų grupių nustatytas nebuvo.

Vertinant baltymų adsorbciją ant tiriamųjų mėginių, jie 24 val. buvo inkubuojami FBS. Po numatyto laiko mėginiai plauti, matuotas ant karkasų paviršiaus nusėdusių baltymų kiekis (3.21 pav. B). Rezultatai rodo, kad abi tirtos karkasų grupės gebėjo užtikrinti vienodą baltymų adsorbciją, skirtumas tarp jų nustatytas nebuvo.

Taigi, gauti rezultatai parodė, kad paviršiaus padengimas ECM kilmės baltymais nekeičia karkaso fizinių savybių.

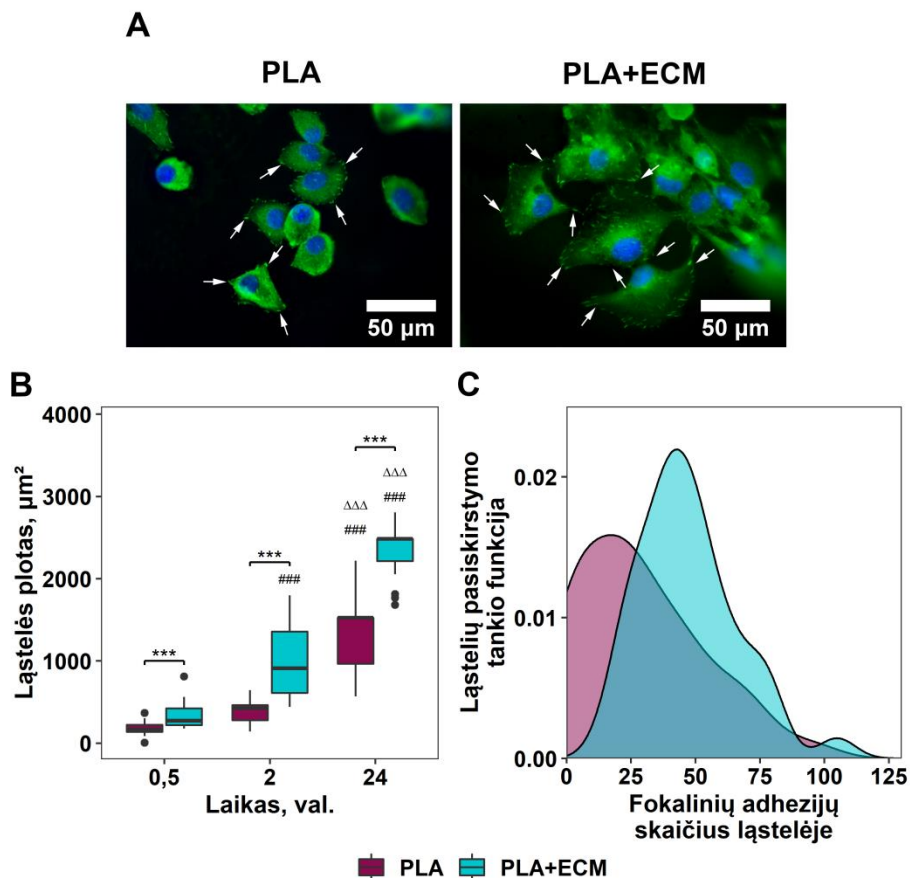


3.21 pav. ECM baltymais dekoruotų karkasų fizinės savybės. A – karkasų vandens absorbcijos vertinimas, išreikštas procentiniu svorio prieaugiu po 24 valandų inkubacijos vandenyje; B – baltymų adsorbcija ant karkasų paviršiaus, matuota Bradford reagento šviesos sugertis. Rezultatai pateikti kaip mediana \pm IQR.

3.4.2 ECM baltymų įtaka ląstelių adhezijai

Biodekoravimo ECM baltymais įtaka DPSC adhezijos efektyvumui tirta ląsteles auginant ant PLA ir PLA+ECM paviršių ir po 0,5, 2 ir 24 val vizualizuojant F-aktino filamentus (S3 pav.). Fluorescencinio mikroskopo pagalba gautose nuotraukose kiekvienu laiko momentu buvo skaičiuoti ląstelių užimami plotai (3.22 pav. B). Jau po pirmojo pusvalandžio, kaip ir kitais tirtais laiko momentais, ląstelės geriau tvirtinosi prie ECM baltymais padengtų karkasų, tai rodo atitinkamai didesni DPSC užimami plotai lyginant su ląstelėmis, auginomomis ant grynos PLA substratų ($p < 0,001$).

Norint nustatyti ar paviršiaus padengimas ECM baltymais užtikrina ir stipresnę DPSC adheziją, po 24 valandų nuo jų išsėjimo kokybiškai ir kiekybiškai vertintos ląstelių suformuotos fokalinės adhezijos (3.22 pav. A ir C). Gauti rezultatai rodo, kad lyginant su grynos PLA mėginiais, PLA+ECM ($p < 0,001$) paviršius lėmė didesnę fokolinių adhezijų skaičių ląstelėse, t.y. ECM baltymais padengti karkasai buvo patrauklesni DPSC prisitvirtinimui.

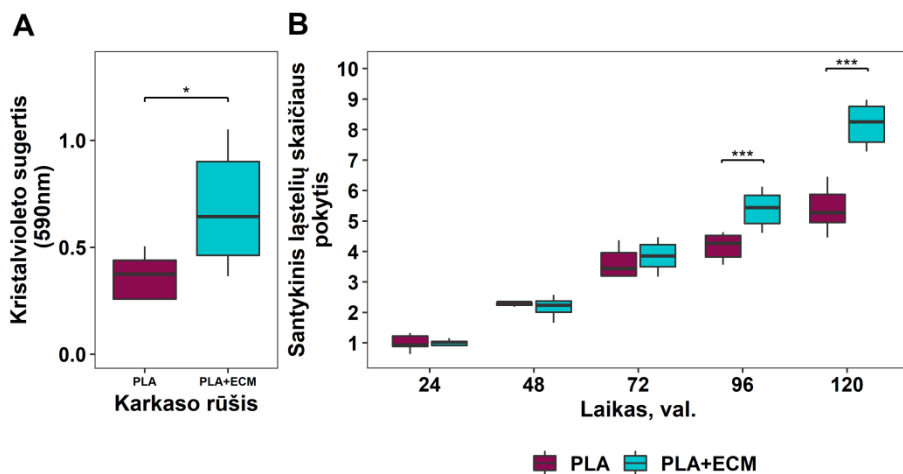


3.22 pav. DPSC adhezija ant ECM baltymais padengtų karkasų. A – imunocitochemijos metodu vizualizuotos ląstelių suformuotos focalinės adhezijos (žalia spalva, dažyta Alexa Fluor 488) bei branduoliai (mėlyna spalva, dažyta DAPI). Rodyklės nuotraukose žymi focalines adhezijas; B – ląstelės ploto matavimai po 0,5, 2 ir 24 valandų auginimo ant tiriamųjų mėginių. Rezultatai pateikti kaip mediana ± IQR; C – kiekybinis focalinių adhezijų vertinimas nuo DPSC išsėjimo praėjus 24 valandoms. Rezultatai pateikti ląstelių pasiskirstymo tankio funkcijos histograma. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp skirtingų karkasų grupių pažymėti kaip „***“ kai $p < 0,001$. Tuo tarpu „#“ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistiškai patikimas reikšmes lyginant su 0,5 valandomis – „###“ - $p < 0,001$. „Δ“ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistiškai patikimas reikšmes lyginant su 2 valandomis – „ΔΔΔ“ - $p < 0,001$. „●“ pažymėtos išskirtys.

Abu DPSC adhezijos vertinimo tyrimai patvirtino, kad ląstelių kilmės ECM baltymai žymiai pagerino DPSC prisitvirtinimą prie substrato.

3.4.3 Biodekoravimo ECM baltymais poveikis ląstelių migracijai ir proliferacijai

Norint nustatyti, ar ECM baltymai skatina ir inicijuoja ląstelių judėjimą, buvo atliekamas DPSC migracijos testas, kurio metu tiriamieji mėginiai 72 val. inkubuoti ant DPSC monoslauksnio. Po numatyto laiko buvo vertintas ant karkasų „užmigravusių“ ląstelių skaičius (3.23 pav. A). Rezultatai rodo, kad DPSC aktyviau judėjo ant ECM baltymais dengtų paviršių, lyginant su grynos PLA karkasais, t.y., ant PLA+ECM grupės mėginių ląstelių „užlipo“ daugiau ($p < 0,05$).



3.23 pav. Ląstelių migracija ir proliferacija ant ECM baltymais dekoruotų PLA karkasų. A – DPSC migracija ant tiriamųjų mėginių, ląstelių skaičius vertintas matuojant kristalvioleto šviesos sugertį; B – ląstelių proliferacija ant skirtingų karkasų, rezultatai normalizuoti pagal ląstelių kiekį, registruotą ant kiekvienos paviršiaus rūšies 24-tą DPSC auginimo valandą. Duomenys pateikti kaip mediana \pm IQR. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp skirtingų karkasų grupių pažymėti kaip „*“ kai $p < 0,05$ ir „***“ kai $p < 0,001$.

Siekiant išanalizuoti paviršiaus padengimo ECM baltymais įtaką DPSC proliferacijai, naudotas ląstelių DNR dažymo DAPI metodas, o ląstelių skaičiaus vertinimui pasitelkta kalibracinė kreivė S1 pav. Vertinimas atliktas po 24, 48, 72, 96 ir 120 val. ląstelių auginimo ant tiriamųjų mėginių. Rezultatai parodė (3.23 pav. B), kad po ląstelių išsėjimo praėjus 24, 48 ir 72 valandoms registruotas DPSC skaičius ant abiejų tirtų paviršių buvo beveik vienodas, t.y. ląstelės proliferavo vienodai gerai tiek ant PLA, tiek ir ant PLA+ECM karkasų. Tačiau įvertinus DPSC kiekį po 96 ir 120 valandų

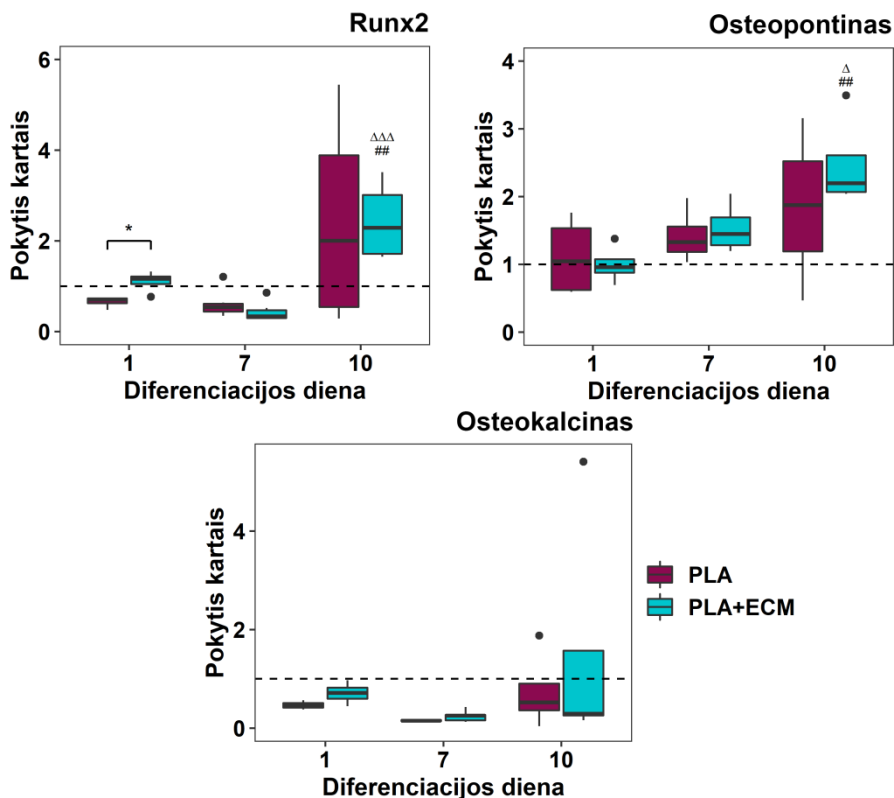
pastebėta, kad šiais laiko momentais rezultatai išsiskyrė, matyti, kad ląstelės efektyviau dauginosi ant ECM baltymais dengtų mėginių ($p < 0,001$).

Abu DPSC migracijos ir proliferacijos testai patvirtino, kad ECM baltymai skatino migraciją, o po ilgesnio inkubacinio periodo – ir šių ląstelių proliferaciją.

3.4.4 ECM baltymais dengtų PLA karkasų įtaka osteogeninei ląstelių diferenciacijai

Osteogenezės intensyvumo vertinimui ląstelės buvo augintos ant PLA ir PLA+ECM karkasų, o nuo sėjimo praėjus 1, 7, ir 10-čiai dienų buvo vertintas ALP aktyvumas, nustatyta su osteogenine diferenciacija susijusių genų (koduojančių Runx2, OPN ir OCN baltymus) raiška bei atlikta būdinga kauliniam audiniui ECM susiformavimo analizė.

Įvertinus ankstyvųjų osteogenezės žymenų, genų, koduojančių Runx2 ir OPN baltymus, raišką, buvo pastebėta, kad diferenciacijos metu tiek PLA, tiek ir PLA+ECM karkasai inicijavo šių abiejų genų raiškos padidėjimus ląstelėse (3.24 pav.). DPSC augant ant abiejų tirtų paviršių didžiausia Runx2 mRNR raiška fiksuota 10-ąją dieną, tačiau statistškai patikimas šio geno raiškos lygio skirtumas tarp abiejų grupių karkasų nustatytas jau 1-ąją dieną, t.y., 24 val po sėjimo ($p < 0,05$). Vertinant geno, koduojančio OPN baltymą, raišką pastebėta, kad abiem atvejais ji ilgą laiką svyravo apie bazinį lygį, o padidėjimas registruotas tik 10-ąją diferenciacijos dieną, ląstelėms augant ant PLA+ECM karkasų. Statistiškai patikimi OPN mRNR raiškos skirtumai tarp PLA ir PLA+ECM grupių nebuvo nustatyti.



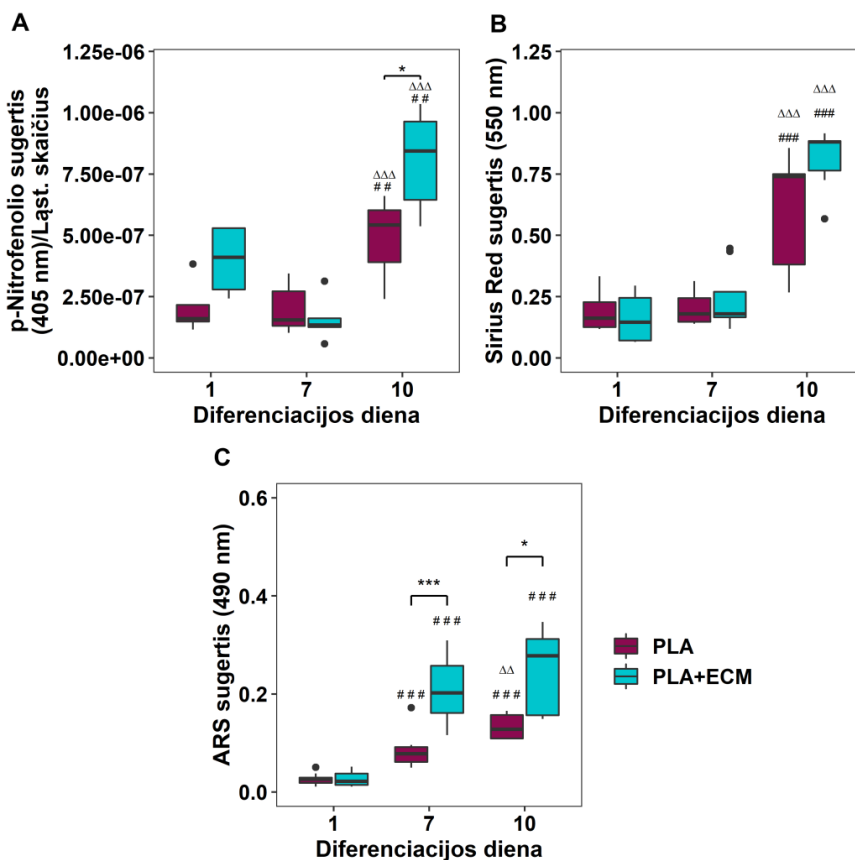
3.24 pav. Su osteogenine diferenciacija susijusių genų (koduojančių Runx2, OPN, OCN baltymus) raiškos lygiai DPSC, auginuose ant ECM baltymais dengtų karkasų. Rezultatai normalizuoti pagal GAPDH geno raišką ir standartizuoti pagal nediferencijuotų ląstelių, auginių ant PP paviršiaus, genų raišką pradiniu laiko momentu. Rezultatai pateikti kaip mediana ± IQR. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp skirtingų karkasų grupių pažymėti kaip „*“, kai $p < 0,05$. Tuo tarpu „#“ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistiškai patikimas reikšmes lyginant su 1-ia diena – „###“ - $p < 0,01$. „Δ“ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistiškai patikimas reikšmes lyginant su 7 diena – „Δ“ - $p < 0,05$ ir „ΔΔΔ“ - $p < 0,001$. „●“ pažymėtos išskirtys.

ALP aktyvumo rezultatai rodo (3.25 pav. A), kad pirmosiomis diferenciacijos dienomis ląstelėse, auginuose ant PLA ir PLA+ECM karkasų, ALP fermento aktyvumo skirtumų nebuvo. Abiejose tiriamosiose grupėse fermento aktyvumas piką pasiekė tik 10-ąją dieną, didesnis jis buvo DPSC, auginuose ant ECM baltymais padengtų (PLA+ECM) karkasų ($p < 0,05$) lyginant su ląstelėmis, auginomis ant grynos PLA mėginių.

Norint nustatyti, ar PLA+ECM karkasai inicijuoja efektyvesnę DPSC vykdomą kauliniam audiniui būdingo ECM formavimąsi, buvo vertinami ant tiriamųjų paviršių susidarę kolageno ir kalcio sandaupų kiekiai. Remiantis gautais rezultatais galima teigti, kad abu paviršiai inicijavo kolageno kaupimąsi ECM, tačiau kolageno kiekio skirtumai tarp PLA ir PLA+ECM karkasų grupių nebuvo nustatyti (3.25 pav. B). Panaši tendencija stebėta ir vertinant ECM mineralizaciją - abi mėginių grupės skatino DPSC formuoti kalcio sandaupas ECM (3.25 pav. C), tačiau jau po 7-osios diferenciacijos dienos galima matyti, kad DPSC daugiau kalcio sandaupų suformavo augdamos ant PLA+ECM ($p < 0,001$) karkasų, lyginant su grynos PLA paviršiais. Šis skirtumas išliko ir po 10-ties dienų ($p < 0,05$).

Analizuojant vėlyvąją osteogenezę, geno, koduojančio OCN baltymą, raiškos padidėjimas, tiek ląstelėms augant ant PLA, tiek ir ant PLA+ECM karkasų, nebuvo fiksuotas (3.24 pav.).

Mūsų rezultatai rodo, kad abu mėginiai (PLA ir PLA+ECM) inicijavo spontanišią osteogeninę DPSC diferenciaciją, tačiau stipresne indukcija pasižymėjo DPSC kilmės ECM baltymais padengtas PLA substratas.



3.25 pav. Osteogeninės diferenciacijos vertinimas DPSC auginant ant ECM baltymais dengtų karkasų. A –ALP aktyvumo tyrimas, atliktas matuojant p-nitrofenolio šviesos sugertį; duomenys standartizuoti pagal ląstelių skaičių kiekvienu laiku momentu ant atitinkamos grupės karkaso; B – kiekybinis kolageno kaupimosi ECM vertinimas, atliktas kolageno sankaupas dažant Sirius Red ir matuojant ištirpinto dažo šviesos sugertį; C – kiekybinis ECM mineralizacijos vertinimas, atliktas matuojant ištirpinto ARS šviesos sugertį. Rezultatai pateikti kaip mediana ± IQR. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp skirtingų karkasų grupių pažymėti kaip „*“ kai $p < 0,05$ ir „***“, kai $p < 0,001$. Tuo tarpu „#“ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistiškai patikimas reikšmes lyginant su 1-ma diena – „##“ - $p < 0,01$; „###“ - $p < 0,001$. „Δ“ rodo toje pačioje karkasų grupėje esančias statistiškai patikimas reikšmes lyginant su 7-ta diena – „ΔΔ“ - $p < 0,01$, „ΔΔΔ“ - $p < 0,001$. „●“ pažymėtos išskirtys.

3.5 Tikėtinas organizmo atsakas į skirtingus dirbtinio kaulinio audinio konstruktus

Norint regeneruoti pažeistą audinį dažnai yra kuriami SC-karkaso konstruktai. Tikimasi, kad toks karkaso ir SC apjungimas užtikrins dar efektyvesnę pažaidos regeneraciją (Diomedea ir kt., 2016; El-Backly ir kt., 2008). Todėl šiame darbe, *in vitro* sąlygomis, buvo siekiama išsiaiškinti galimą paciento organizmo atsaką į skirtingus dirbtinio kaulinio audinio konstruktus: DPSC-PLA, DPSC-PLA+HA, DPSC-PLA+BG ir DPSC-PLA+ECM.

3.5.1 Konstrukto (DPSC-karkasas) siunčiamas signalas organizmui

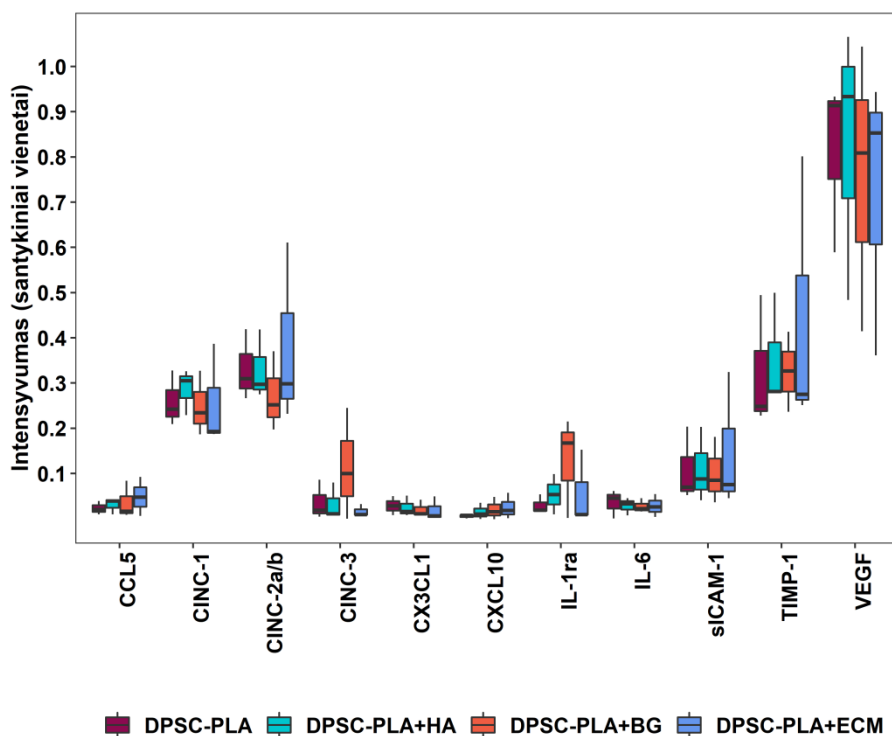
Norint nustatyti, ar karkasų cheminė sudėtis bei paviršiaus dekoravimas ECM baltymais inicijuoja skirtingus ląstelių siunčiamus signalus, buvo išanalizuota DPSC, augintų ant tiriamųjų substratų (PLA, PLA+HA, PLA+BG ir PLA+ECM), sintetinamų citokinų, chemokinių bei augimo veiksnių raiška.

Citokinų, chemokinių bei augimo veiksnių analizę buvo nuspręsta atlikti po 7-ių DPSC augimo ant karkasų dienų. Septynių dienų intervalas pasirinktas ne atsitiktinai. Iš anksčiau mūsų gautų spontaninės osteogeninės diferenciacijos rezultatų matyti, kad būtent po 7-ių šio proceso dienų DPSC osteogenezė jau aktyvuota, todėl toks konstruktas, jį perkėlus į organizmą, kontaktuos su greta esančiomis ląstelėmis ir taip pažaidos vietoje inicijuos naujo kaulinio audinio formavimąsi. Kyla klausimas, kokius signalus aplinkinėms ląstelėms toks konstruktas siųs?

Taškinio imunobloto principu sekretomose, surinktose nuo visų keturių mėginių (DPSC-PLA, DPSC-PLA+HA, DPSC-PLA+BG bei DPSC-PLA+ECM), buvo ieškota 29 molekulių (S4 pav), iš jų 11 buvo detektuota. Aptikti šie citokinai, chemokinai bei augimo veiksniai: citokinų-indukuojamų neutrofilų chemoatraktantų šeimos baltymai (CINC) (CINC-1, CINC-2 α/β , CINC-3), chemokino (C-X-C motyvo) ligandas 1 (CXCL1), interleukinas 1ra (IL-1ra), interleukinas 6 (IL-6), tirpi tarpląstelinė adhezijos molekulė 1 (sICAM-1), C-X-C motyvo chemokinas 1 (CXCL10), chemokino (C-C motyvo) ligandas 5 (CCL5), TIMP metalopeptidazės slopiklis 1 (TIMP-1) ir VEGF (3.26 pav.). Patikimi šių molekulių kiekio skirtumai, priklausantys nuo skirtingos karkaso cheminės sudėties ar paviršiaus „dekoravimo“ ECM baltymais, nebuvo nustatyti. Tačiau buvo pastebėta, kad DPSC, augusios ant visų keturių karkasų (PLA, PLA+HA,

PLA+BG arba PLA+ECM) aktyviausiai sintetino augimo veiksnį VEGF. Lyginant su kitomis molekulėmis, identifikuotas VEGF kiekis sekretomose buvo didžiausias (3.26 pav.). Tai gera žinia dirbtinio audinio konstravimo kontekste, kadangi šis veiksnys yra siejamas su angiogenezės indukcija (McCull ir kt., 2004), todėl galima teigti, kad visi tirti konstruktai po jų implantacijos į organizmą naujai besiformuojančiame kauliniame audinyje inicijuos kraujagyslių tinklo formavimąsi.

Kitos sekretomose aptiktos signalinės molekulės pasižymi osteogeniniu aktyvumu bei skatina osteoklastų migraciją, todėl greičiausiai, po konstrukto perkėlimo į organizmą, jos bus signalu, inicijuojančiu regeneracinius kaulinio audinio procesus.



3.26 pav. Citokinai, chemokinai bei augimo veiksniai, aptikti DPSC-PLA, DPSC-PLA+HA, DPSC-PLA+BG arba DPSC-PLA+ECM konstrukčių sekretomose. Signalinių molekulių analizė atlikta taškinio imunobloto principu. Duomenys normalizuoti pagal teigiamos kontrolės vidutinį švytėjimo intensyvumą. Rezultatai pateikti kaip mediana ± IQR.

3.5.2 Konstrukto (DPSC-karkasas) įtaka angiogenezės indukcijai

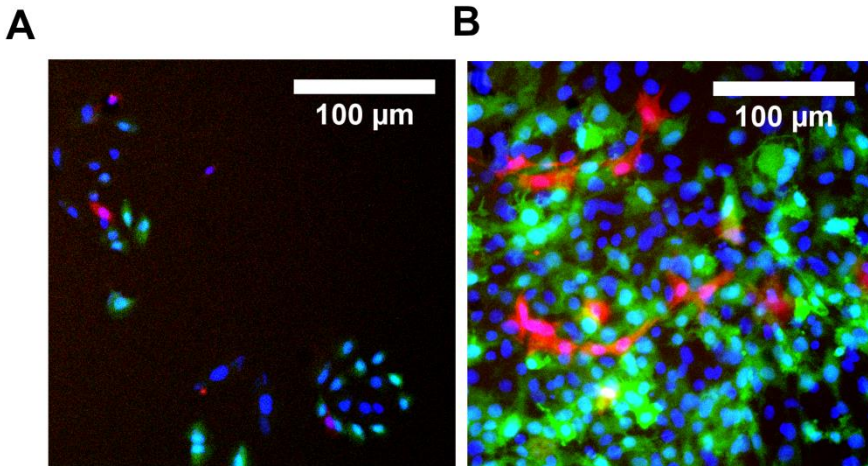
Sukonstruotas dirbtinio audinio fragmentas neužtikrins sėkmingos pažeisto audinio regeneracijos jeigu jame ir aplink jį nesiformuos naujas kraujagyslių tinklas. Dėl šios priežasties norima, kad kuriami konstruktai, pasižymėtų ne tik puikiu biosuderinamumu bei SC stimuliacija diferencijuotis tikslinio audinio linkme, bet taip pat inicijuotų ir angiogenezės procesą (J. Chen ir kt., 2018; Krishnan ir kt., 2014).

Darbe buvo analizuotos skirtingų dirbtinio kaulinio audinio konstrukto (DPSC-PLA, DPSC-PLA+HA, DPSC-PLA+BG arba DPSC-PLA+ECM) angioindukcinės savybės. Angiogenezės analizei buvo sukurtos ir naudotos dvi transfekuotų ląstelių kultūros: raudonai fluorescuojanti – PESC-R bei žaliai fluorescuojanti – DPSC-G.

Tiriami konstruktai buvo formuojami iš skirtingų rūšių karkasų bei DPSC. Tikimasi, jog po implantacijos į organizmą, link sukurto konstrukto, migruos endotelinės kamieninės ląstelės, kurioms sąveikaujant su osteogentine linkme besidiferencijuojančiomis DPSC, bus pradedamas formuoti kraujagyslių tinklas.

Iš pradžių buvo įvertinta, kaip 2D aplinkoje tarpusavyje sąveikauja DPSC ir PESC kultūrų ląstelės. Siekiant *in vitro* sąlygomis imituoti realią situaciją organizme, pirmiausia buvo sėjamos DPSC-G ląstelės. Po 3-jų parų ant jų papildomai buvo išsėtos PESC-R. Nuo pastarųjų ląstelių išsėjimo praėjus 3 ir 96 val. DPSC-G ir PESC-R kokultūros buvo vizualizuotos. Gautose nuotraukose (3.27 pav.) matyti, kad po 3 val. nuo išsėjimo, PESC-R ląstelės yra pavienės, tačiau prisitvirtinusios prie plokštelės paviršiaus. Po 96 val. nuo PESC-R išsėjimo, matyti, kad endotelinės ląstelės išsidėsto ne atsiktinai, o ima formuoti pailgas, į kraujagysles panašias struktūras. Tai rodo, kad konstrukto kūrimui pasirinkta ląstelių rūšis (DPSC) sėkmingai sąveikauja su endotelinėmis ląstelėmis (PESC), leisdamas joms formuoti kraujagyslių tinklą.

Siekiant, kad į pažeistą kaulo vietą migruotų endotelinės ląstelės, svarbu, kad kuriamas konstruktas inicijuotų šį procesą. Mūsų atveju norint tai patikrinti *in vitro* sąlygomis, analizuota tiek karkasų be ląstelių (PLA, PLA+HA, PLA+BG, PLA+ECM), tiek ir jų derinių su DPSC (konstrukto) įtaka angiogenezėi. Tuo tikslu ant tiriamų substratų buvo auginta dviejų tipų – DPSC ir PESC - kokultūra ir analizuoti joje vykstantys procesai.

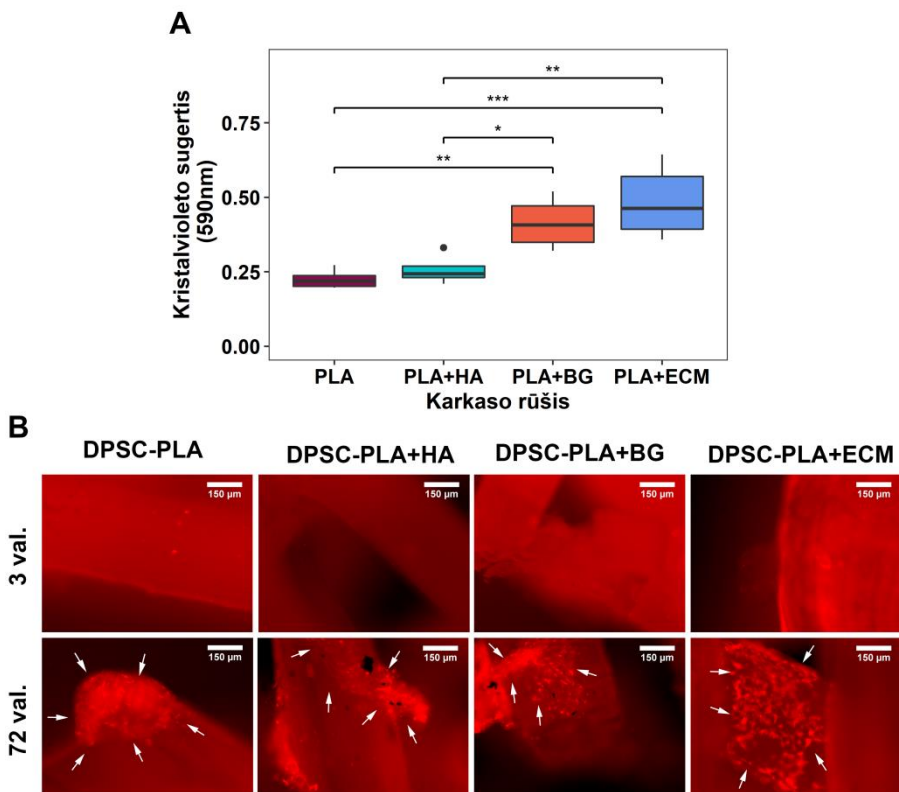


3.27 pav. DPSC ir PESC kokultūra 2D aplinkoje. A – ląstelių sąveika po 3 val. augimo kokultūroje; B – DPSC ir PESC sąveika po 96 val. augimo kokultūroje. Žalia spalva, lentivirusiniu vektoriumi *pLJM1-EGFP* transfekuotos DPSC (DPSC-G); raudona spalva, lentivirusiniu vektoriumi *pLJM1-mCherry* transfekuotos PESC (PESC-R); mėlyna spalva, ląstelių branduoliai dažyti DAPI.

Vertinant PESC migraciją ant tiriamų karkasų buvo atliktas kiekybinis, vertikalios migracijos testas. Jo metu tiriamieji mėginiai 72 valandas buvo inkubuoti ant PESC monosluoksnio. Po numatyto laiko registruotas ant karkasų užmigravusių ląstelių skaičius (3.28 A pav.). Iš gautų rezultatų matyti, kad patraukliausi PESC buvo PLA+BG ir PLA+ECM mėginiai. Ant šių karkasų rūšių, lyginant su grynais PLA (PLA:PLA+BG - $p < 0,01$, bei PLA:PLA+ECM - $p < 0,001$) ir kompozitiniiais PLA+HA (PLA:PLA+BG - $p < 0,05$, bei PLA:PLA+ECM - $p < 0,01$), „užlipo“ daugiausiai ląstelių.

PESC migracija ant konstrukčių (DPSC-PLA, DPSC-PLA+HA, DPSC-PLA+BG bei DPSC-PLA+ECM) buvo vertinta kokybiškai. Tuo tikslu jie 3 ir 72 valandas laikyti ant PESC-R monosluoksnio. Po numatyto laiko, ant mėginių „užlipusios“ PESC-R vizualizuotos fluorescenciniu mikroskopu. Gautose nuotraukose (3.28 B pav.) galima matyti, kad per pirmas 3 valandas ląstelės užmigruoti nespėjo nei ant vienos rūšies konstrukto. Tačiau po 72 val. ant visų mėginių buvo registruotos „užlipusios“ PESC-R. Nuotraukose net galima įžiūrėti PESC formuojamas į kraujagysles panašias struktūras.

Šie rezultatai rodo, kad PESC migravo ant visų tirtų karkasų ir konstrukčių, tačiau geriausiai angiogenezės procesą inicijavo PLA+BG bei PLA+ECM mėginiai. Pastebėta, kad endotelinės ląstelės sąveikavo su DPSC, sąveikos metu formuodamos į kraujagysles panašias struktūras.



3.28 pav. PESC migracijos ant karkasų ir konstrukčių vertinimas. A – kiekybinis PESC migracijos ant PLA, PLA+HA, PLA+BG ir PLA+ECM karkasų vertinimas, atliktas matuojant kristalvioleto sugertį. Rezultatai pateikti kaip mediana \pm IQR. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp skirtingų karkasų grupių pažymėti kaip „*“, kai $p < 0,05$, „**“, kai $p < 0,01$ ir „***“, kai $p < 0,001$; B – kokybinis PESC migracijos ant konstrukčių (DPSC-karkasas) vertinimas. Raudona spalva, lentivirusiniu vektoriumi *pLJM1-mCherry* transfekuotos PESC (PESC-R).

Mūsų atlikti darbai leidžia teigti, kad, sprendžiant iš tirtų ląstelių sąveikų su substratu bei PESC ir DPSC tarpusavio sąveikų, naudota polimerinė medžiaga ir jos struktūrizavimas FFF 3D spausdintuvu yra tinkami dirbtinio kaulinio audinio formavimui. Tokio polimero praturtinimas cheminiais priedais ar biodekoravimas gali padėti valdyti ląstelių diferenciaciją, bei reguliuoti sukurto konstrukto (ląstelės-karkasas) integracijos į organizmą efektyvumą.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Audinių inžinerija - tarpdisciplininė mokslo šaka, jungianti tiksliuosius ir gyvybės mokslus. Pagrindinis jos tikslas - sukonstruoti dirbtinius gyvų audinių pakaitalus, kurie galėtų atkurti, sutvirtinti ar pagerinti pažeisto audinio funkcijas (Castells-Sala Cristina, Alemany-Ribes Mireia, 2015; Howard ir kt., 2008). Funkcionalus audinys gaunamas tada, kai užtikrinama kokybiška sąveika tarp trijų pagrindinių audinių inžinerijos dedamųjų – ląstelių, karkaso ir bioaktyvių molekulių. Tik tinkamai suderinus šiuos komponentus bus gautas konstruktas, kuris gebės inicijuoti efektyvią pažeisto audinio regeneraciją (C. M. Murphy ir kt., 2013). Yra žinoma, kad substratas, su kuriuo sąveikauja ląstelė, daro didelę įtaką jos likimui, todėl gaminant audinių konstruktus siekiama, kad karkasai savo struktūra ir sudėtimi užtikrintų optimalią SC proliferaciją, migraciją bei inicijuotų jų diferenciaciją norima kryptimi (Urrutia ir kt., 2017); (Krishna ir kt., 2016). Šis darbas nagrinėja ląstelių ir karkaso sąveikas, o gauti rezultatai turėtų pasitarnauti dirbtinio kaulinio audinio kūrimui ir tobulinimui.

Darbe buvo tirta suaugusio organizmo SC, išskirtų iš dantų pulpos, sąveika su paviršinėmis struktūromis, analizuoti šių ląstelių savybių pokyčiai, priklausantys nuo substrato paviršiaus reljefo, cheminės sudėties bei paviršiaus biodekoravimo. Be to, *in vitro* sąlygomis buvo siekiama modeliuoti galimą recipientinio organizmo atsaką į sukurtus konstruktus - potencialius dirbtinio audinio implantus.

Tyrimo modeliu buvo pasirinktos iš *Wistar* klonu laboratorinės žiurkės priekinių dantų pulpos išskirtos DPSC, priskiriamos MSC tipui. Žvelgiant iš žmogaus pozicijų, dantų pulpos ląstelės yra gana lengvai prieinamos ir gali būti nesudėtingai gaunamos šalinant dantis. Be to, kaip mūsų ir kitų autorių darbai parodė, jos geba lengvai diferencijuoti adipogenine, miogenine ir osteogenine kryptimis, todėl savo plastiškumu nenusileidžia plačiai audinių inžinerijos tyrimuose naudojamoms BMSC, kurių gavimo procedūra yra labai skausminga pacientams. Atsižvelgiant į DPSC charakteristikas bei sąlyginai lengvą, nereikalaujančią papildomos intervencijos į paciento organizmą išskyrimo procedūrą, manome, jog šios ląstelės gali būti sėkmingai naudojamos dirbtinio kaulinio audinio kūrimui (Mori ir kt., 2011; Pierdomenico ir kt., 2005)(Tamaki ir kt., 2013). Yra žinoma, kad priklausomai nuo to, iš kokio šaltinio MSC yra išskirtos, jos būna linkusios spontaniškai diferencijuoti to audinio linkme (Naruse ir kt., 2004). Todėl, auginant DPSC ant joms patrauklaus substrato, buvo galima tikėtis pasiekti šių ląstelių spontaniinę osteogeninę diferenciaciją (Du ir kt., 2019).

Paviršiaus topografijos vaidmuo ląstelės likime. Yra žinoma, kad mikro- ir nanostruktūrizuotas paviršius gali nulemti ląstelių diferenciaciją (Saberianpour ir kt., 2018; Ohashi ir kt., 2017; Anselme ir kt., 2010). Nustatyta, kad toks reljefas veikia ląstelių citoskeleto persitvarkymus, fokolinių adhezijų formavimąsi bei signalinių kelių aktyvaciją, o kartu su šiais vyksmais keičiasi ir ląstelės morfologija (S. Zhang ir kt., 2018; Zhu ir kt., 2018; Yao ir kt., 2017; Niu ir kt., 2017; Abagnale ir kt., 2015; Kim ir kt., 2013; Watari ir kt., 2012; Kim ir kt., 2011; Chaubey ir kt., 2008; Hamilton ir kt., 2008; Deligianni ir kt., 2001). Tačiau tokių mikro- ir nanostruktūrizuotų paviršių gamyba yra brangi, reikalaujanti didelių finansinių ir laiko sąnaudų. Šios gamybos problemos gali būti sprendžiamos naudojant 3D spausdinimą. 3D spausdinimas leidžia nebrangiai ir greitai pagaminti kontroliuojamo reljefo, susisiekiančio porėtumo bei tiksliai paciento kaulinį defektą atitinkančius karkasus. Nepaisant šių privalumų, 3D spausdinimo būdu, naudojant FFF technologiją, galima pasiekti tik makrotopografijos (>100 μm) struktūras (Shanjani ir kt., 2011; Klammert ir kt., 2010; Leukers ir kt., 2005; Lam ir kt., 2002), o tokio grubumo substrato vaidmuo kamieninių ląstelių likimui dar nėra pakankamai ištirtas. Todėl šiame darbe vienas iš uždavinių kaip tik ir buvo įvertinti makrostruktūrizuoto (gijų ir vagų skersmuo >100 μm) paviršiaus įtaką kamieninių ląstelių elgsenai bei osteogeninei diferenciacijai.

Šiuo tikslu buvo suprojektuoti ir 3D spausdintuvu atspausdinti dviejų tipų grynos PLA karkasai, turintys skirtingą paviršiaus makroreljefą. Pirmojo tipo mėginiai buvo porėti. Juose 500 μm PLA gijos formavo 300 μm dydžio poras, kurios, susijungdamos tarpusavyje, sudarė 50 % porėtumą. Tokį pasirinkimą lėmė žinios, jog 100-500 μm dydžio poros labiausiai primena natūralią kaulo ECM struktūrą bei geriausiai skatina angiogenezės procesus, todėl yra tinkamiausios kaulinio audinio regeneracijai *in vivo*. Visgi optimaliausia karkaso, skirto kaulinio audinio konstravimui, architektūra yra laikoma 300-400 μm dydžio susisiekiančios poros, sudarančios 50 % porėtumą. Tokioje karkaso struktūroje sėkmingai geba formotis naujas kraujagyslių tinklas, bet dėl per didelio porų dydžio ar porėtumo nenukenčia ir karkaso mechaninės savybės (Wall ir Board, 2014; Hannink ir Arts, 2011; Karageorgiou ir Kaplan, 2005). Antrosios rūšies mėginiai buvo vagoti. Juose 188 μm susiliečiančios PLA gijos formavo plokščią iš makrovagų sudarytą paviršių. Mūsų duomenys rodo, kad abiejų tipų paviršiaus makrotopografija, kaip ir plačiai tyrinėjami mikro- ar nanonelygumai, geba paveikti DPSC morfologiją. Vagoti paviršiai nulėmė labiau išsitempusią ir išsilgėjusią ląstelių formą, tuo tarpu DPSC, augusios ant porėtų karkasų, buvo

plokštesnės, tarsi išsilenkusios ant PLA filamento gijų. Todėl tikėtina, kad mūsų sukurti, makrostruktūrizuoti substratai, inicijuodami DPSC morfologijos pokyčius, turėjo poveikį šių ląstelių likimui.

Kamieninių ląstelių gebėjimas augti prisitvirtinus ant naujai kuriamo karkaso yra svarbus kriterijus, vertinantis galimą konstrukto pritaikomumą audinių inžinerijoje (Baksh ir kt., 2004). Proliferacijai įtaką gali daryti ne tik įvairios aplinkos sąlygos, bet ir dėl paviršiaus topografijos pakitusi ląstelės morfologija (Janvikul ir kt., 2013; Loh ir Choong, 2013). Iki šiol didesni kaip 100 μm paviršiaus makronelygumai ląstelių gyvybiniams procesams buvo mažai tirti (Gregor ir kt., 2017). Bet kaip tik tokios struktūros yra sukuriamos 3D spausdinimo būdu, todėl svarbu suprasti, ar jos turi įtakos ant jų auginamų ląstelių likimui. Šiame darbe buvo nagrinėta makrovagų ir makroporų įtaka DPSC proliferacijai ir, nors skirtumai tarp vagoto ir porėto reljefo poveikio ląstelėms nebuvo nustatyti, bet buvo patvirtinta, jog DPSC, augintos ant abiejų tiriamųjų karkasų, dauginosi žymiai sparčiau, lyginant su kontroliniu PP paviršiumi. Šie ląstelių skaičiaus augimo skirtumai tikėtini dėl paviršių erdviųjų struktūrų (2,5-3D). Tokios struktūros, lyginant su 2D substratu, turi žymiai didesnę paviršiaus plotą, su kuriuo turi galimybę sąveikauti ląstelės, o tai ir gali nulemti efektyvesnę jų dauginimąsi (Zhu ir kt., 2015; Bhat ir Kumar, 2012; Saşmazel ir kt., 2008). Be akivaizdžiai didesnio tirtų karkasų paviršiaus ploto, reikėtų atsižvelgti ir į kitus aspektus, kurie galėjo lemti geresnę DPSC, augusių ant šių mėginių, proliferaciją. Pavyzdžiui, paviršiaus šurkštumas ar topografija. Dėka integrino receptorių ląstelės geba jausti įvairius paviršiaus nelygumus, kurie skatina jas keisti savo morfologiją, o informaciją apie šiuos stimulus signaliniais keliais perduoti į branduolį (Ohashi ir kt., 2017; Abagnale ir kt., 2015). Mūsų tyrimo metu ląstelėse, augintose ant makrovagotų bei makroporėtų paviršių, buvo stebimas skirtingas citoskeleto išsidėstymas, kuris lėmė ir skirtingą DPSC išsitempimą, susispaudimą ar išsilenkimą. Literatūros duomenimis, pasikeitusios citoskeleto tempimo jėgos aktyvuoja YAP signalinį kelią, kuris yra labai svarbus ląstelių migracijos, proliferacijos ir išgyvenamumo procesų reguliavimui (Mascharak ir kt., 2017).

Ląsteles supanti aplinka veikia ir jų diferenciaciją (Lien ir kt., 2009). Nustatyta, kad porėti karkasai, kuriuos sudaro mikro- arba nanostruktūrizuotos gijos, skatina MSC osteogenezę (Niu ir kt., 2017; Kuboki ir kt., 2001) Tačiau, vėlgi, nėra duomenų, įrodančių, kad ir makrostruktūros geba atlikti tą patį. Yra priimta, kad ankstyvaisiais osteogeninės diferenciacijos žymenimis yra laikomi genu, koduojančių OPN bei Runx2 baltymus, raiškos padidėjimas ląstelėse. Šie žymenys rodo MSC

apsisprendimą pasukti osteogeninės diferenciacijos keliu. Tuo tarpu ALP aktyvumas, kauliniam audiniui specifinio ECM formavimas ir geno, koduojančio OCN baltymą, raiškos padidėjimas yra traktuojami kaip vėlyvieji ląstelių osteogenezės požymiai (Q. Chen ir kt., 2018; Xu ir kt., 2015; Mihaila ir kt., 2014; Roberts ir kt., 2011; Huang ir kt., 2007; Lian ir kt., 1993). Mūsų rezultatai rodo, jog abu makrostruktūrizuoti PLA paviršiai ankstyvosiomis DPSC diferenciacijos dienomis inicijavo transkripcijos veiksnio Runx2 mRNR raiškos lygio padidėjimą ląstelėse. Tuo tarpu, geno, koduojančio OPN baltymą, raiška, ALP aktyvumas bei ECM mineralizacija palaipsniui didėjo visais tirtais DPSC indukuotos ir spontaninės diferenciacijos laikais. Įdomu tai, kad ARS dažų nudažius ECM esančias kalcio sankaupas pastebėta, jog ECM mineralizacija buvo labiau išreikšta PLA gijų susilietimo ir susikirtimo vietose, kur ląstelės buvo labiau susispaudusios. Geno, koduojančio OCN baltymą, raiškos padidėjimas nebuvo nustatytas nei indukuotos, nei spontaninės osteogeninės diferenciacijos metu DPSC auginant tiek ant vagotų, tiek ir ant porėtų karkasų. Tikėtina, kad mūsų eksperimentų metu šioms ląstelėms nepakako laiko, kad jos pasiektų vėlyvąją diferenciacijos stadiją, kai ląstelės visiškai diferencijuoja į osteoblastus. Kaip tik tada ir turėtų būti stebimas OCN mRNR raiškos padidėjimas (Huang ir kt., 2007). Nepakitęs geno, koduojančio OCN baltymą, raiškos lygis rodo, kad indukuotos (po 21 dienos) ir spontaninės (po 10 dienų) osteogeninės diferenciacijos metu DPSC jau ima brandinti mineralizuotą ECM, tačiau tai vis dar nėra pilnai subrendę osteoblastai.

Mūsų rezultatai rodo, kad abi tirtos paviršiaus makrostruktūros turėjo beveik vienodą, osteoindukcinį poveikį DPSC. Manome, kad tokius rezultatus lėmė ląstelių reakcija į gana panašių matmenų gijas ir poras, todėl ir atsakas į tirtas makrostruktūras pasireiškė panašiu citoskeleto persitvarkymu. Taigi, šiuo atveju, vagos ar poros didelės įtakos diferenciacijai neturėjo. Poros, tikėtina, turi didesnę prasmę kalbant apie karkasą, kaip funkcionalų audinį, į kurį įsiterpia naujai besiformuojančios kraujagyslės.

Indukuotos ir spontaninės diferenciacijos palyginimo rezultatai parodė, kad net be papildomų osteogenezės induktorių DPSC auginant ant makrostruktūrizuotų paviršių buvo fiksuotas ALP aktyvumo, su osteogenine diferenciacija susijusių baltymų (Runx2 ir OPN) genų raiškos bei ECM mineralizacijos didėjimas. Todėl galima teigti, jog spontaninės osteogeninės DPSC diferenciacijos indukavimui nereikia daug laiko ir pinigų

reikalaujančių mikro- ir nanopaviršių struktūrizacijos, tam visiškai užtenka ir makroreljefinio (sudaryto iš struktūrų, didesnių nei 100 μm) paviršiaus.

Karkaso cheminės sudėties įtaka ląstelės likimui. Substrato cheminės sudėties įtakos ląstelių likimui tyrimui buvo naudojami kompozitiniai karkasai, pagaminti iš PLA+HA ir PLA+BG. Kadangi šio darbo rezultatus buvo siekiama pritaikyti dirbtinio kaulinio audinio kūrimui, todėl šie kompozitai buvo pasirinkti neatsitiktinai, o išsamiai įvertinus literatūroje pateikiamą informaciją. Šiuolaikinės audinių inžinerijos specialistai siekia, kad pažeistų audinių regeneracijai kuriami karkasai kuo labiau imituotų natūralų audinio ECM, o jų gamyba būtų pigi, naši ir personalizuota. Norima, jog galutinis produktas būtų kuo labiau prieinamas pacientui. Todėl viena perspektyviausių kaulinio audinio karkaso gamybos technologijų yra 3D spausdinimas, o labiausiai tam tinkanti medžiaga – kompozitas, imituojantis kaulo ECM (Qi ir kt., 2018; B. Huang ir kt., 2018; Burgio ir kt., 2018; Kuss ir kt., 2018; J.-W. Kim ir kt., 2017; Zhang ir kt., 2016). 3D spausdinimui tinkantys kompozitai dažniausiai yra kuriami HA ir BG biokeramikas maišant su plačiai spausdinimui naudojamais PLA ar PCL polimerais. Biokeramikų pridėjimas į polimerą pagerina jo biosuderinamumą, osteokonduktyvumą bei osteo- ar netgi angioinduktyvumą (Motealleh ir kt., 2017; Zhang ir kt., 2016). Tačiau iki šiol vis dar nėra atlikti tyrimai, lyginantys 3D spausdinimo būdu pagamintų kompozitinių PLA+HA ir PLA+BG karkasų osteokonduktyviasias bei osteo- ir angioinduktyviasias savybes. Norėdami tai įvertinti, atlikome *in vitro* tyrimus, kurių metu lyginome 3D spausdintų PLA+HA (PLA su 10 % (w/w) HA) ir PLA+BG (PLA su 10 % (w/w) BG) mėginių įtaką DPSC likimui.

Atsižvelgiant į paviršiaus topografijos rezultatus, kurie rodė, jog abi tirtos makrostruktūros turėjo panašią įtaką DPSC osteogenezei, sukūrėme patobulintos makrostruktūros susisiekiiančio porėtumo karkaso modelį, kuris ir buvo naudotas tiriamų kompozitinių karkasų gamybai. Siekiant išsaugoti teigiamas vagų ir porų osteoindukcines savybes, kiekvienas karkaso sluoksnis buvo formuojamas iš dvisluoksnių gijų, taip paliekant vagotą topografiją. Pati karkaso architektūra buvo sudaryta iš 4 tokių dvisluoksnių gijų sluoksnių, kurie susikirsdami sudarė 60° kampą, o kartu ir 400 μm dydžio poras. Taip suformuotos poros daro karkasą atsparesnį mechaninių jėgų poveikiui (Ji ir kt., 2018).

Kita būtina dirbtiniam audiniui būdinga savybė – hidrofiliškumas. Į organizmą implantuotas konstruktas nuolat sąveikaus su kūno skysčiais, kuriuose gausu mitybinių medžiagų. Šias medžiagas konstruktas turi pasisavinti, nes tik tokiu būdu jis išliks gyvybingas ir integruosis į organizmą

(Ma ir kt., 2007). Įvertinus mūsų pagamintų kompozitinių karkasų, savo sudėtyje turinčių hidrofilinių biokeramikos dalelių, vandens absorbciją matome, kad BG vandens sugėrimą pagerino 15,5 % lyginant su grynos PLA ir kompozitiniiais PLA+HA karkasais. Pastebėjome, jog hidrofilinės BG granulės buvo labiau išsikišusios iš PLA filamentu nei HA dalelės, dėl to ant kompozitinio PLA+BG karkaso galėjo susiformuoti didesnis hidrofilinio paviršiaus plotas, kuris galėjo lemti geresnes PLA+BG vandens absorbcines savybes.

Skirtinga medžiagų cheminė sudėtis nulemia ir ląstelės prisitvirtinimą prie jos paviršiaus (Murphy ir kt., 2014). Ląstelės-substrato arba ląstelės-ląstelės sąveika yra būtina ląstelių išgyvenimui bei funkcionalaus audinio homostazės palaikymui naujai formuojamame audinyje (Ohashi ir kt., 2017; Kutys ir kt., 2013). Viena iš svarbiausių pradinių kuriamo dirbtinio audinio karkaso sąlygų – patrauklumas ląstelių prisitvirtinimui. Tačiau prie sintetinio polimero paviršiaus ląstelės tiesiogiai tvirtinasi sunkiai. Jų paviršinės molekulės, tokios kaip integrinai, lengviau sąveikauja su užląstelinų baltymų aminorūgščių sekomis, negu su polimero paviršiumi. Todėl svarbu, kad organizmo skysčiuose esantys baltymai, tokie kaip albuminas, α 2-HS-glikobaltymas ir pan., galėtų lengvai adsorbuotis ir kauptis ant karkaso paviršiaus (Aiyelabegan ir Sadroddiny, 2017; Allen ir kt., 2006). Mūsų atveju ant visų tirtų mėginių paviršių (PLA, PLA+HA bei PLA+BG) baltymai pakankamai gerai adsorbavosi, tačiau geriausius rezultatus šioje srityje demonstravo kompozitiniai PLA+BG karkasai.

Vertinant ląstelių adheziją nustatėme, kad DPSC tvirtinosi prie visų tiriamųjų mėginių - tai rodo plokščia ląstelių forma, registruota nuo išsėjimo praėjus 24 valandoms. Šiuo laiku visais atvejais ląstelių morfologija buvo pastebimai pakitusi lyginant su ląstelėmis po 0,5 ir 2 valandų. Įdomu tai, jog palyginus DPSC, augintų ant skirtingų grupių karkasų, adhezijos stiprumą nustatyta, kad prasčiausiai DPSC tvirtinosi ant kompozitinių PLA+BG mėginių. Šiuo atveju per 24 valandas buvo rasti mažiausi DPSC paviršiaus ploto pakitimai bei fiksuotas mažiausias fokalinių adhezijų skaičius ląstelėse. Kaip minėta, ląstelės su sintetiniu paviršiumi sąveikauja lengviau, kai ant jo iš organizmo skysčių ar ląstelių auginimo terpės yra nusėdusių baltymų. Sąveiką tarp tokių baltymų ir PLA+HA ar PLA+BG paviršių pirmiausia lemia koordinaciniai kovalentiniai bei elektrostatiniai ryšiai. Pavyzdžiui, elektrostatinės sąveikos atsiranda tarp neigiamai įkrautų jonų (esančių BG) ar fosforo grupių (esančių HA) bei protonizuotų baltymų amino grupių (–NH:), todėl HA ir BG esantis didelis neigiamai įkrautų jonų ir fosforo grupių kiekis inicijuoja stiprią baltymų absorbciją (Srinivasan ir kt., 2012; Lobel ir

Hench, 1996; Gorbunoff ir Timasheff, 1984). Matyt dėl to, karkasai, savo sudėtyje turintys BG granuliu, galėjo lemti geresnę ar bent tokią pat DPSC adheziją kaip ir PLA+HA paviršius. Tačiau mūsų atveju per pirmąsias 24 valandas nuo ląstelių išsėjimo BG dalelės nepadėjo DPSC prisitvirtinimui.

Substrato cheminė sudėtis gali būti kaip chemoatraktantas ląstelių migracijai, ji gali inicijuoti ir proliferaciją (Tamburaci ir Tihminlioglu, 2018; Anselme, 2000). Tokios paviršiaus savybės yra labai svarbios audinių inžinerijoje, nes organizme link konstrukto turi atmigruoti aplink pažaidą esančios SC. Atsidūrusios šiame židinyje, ląstelės turėtų proliferuoti, diferencijuotis bei sintetinti audiniui būdingą ECM. Taip palaipsniui dirbtinis konstruktas būtų pakeičiamas funkcionuojančiu, naujai suformuotu audiniu (Su ir kt., 2018). Mūsų darbe, analizuojant DPSC migraciją pastebėta, kad ląstelės aktyviau judėjo ant kompozitinių PLA+BG karkasų, lyginant su PLA ir PLA+HA mėginiais. Tokius rezultatus galėjo lemti iš 45S5 BG dalelių ištirpę jonai, kurie, yra žinoma, stimuliuoja ląstelių judrumą (Li ir kt., 2016; Yu ir kt., 2016). Spartesnė DPSC migracija ant PLA+BG karkasų galėtų paaiškinti ir prastesnę šių ląstelių adheziją ant pastarųjų mėginių. Žinoma, jog vykstant efektyviai ląstelių adhezijai, jos prie paviršiaus pristvirtina vidutinio stiprumo jėga (DiMilla ir kt., 1991). Ląstelei prilipus per silpnai, neužtikrinamas pakankamas sukibimas su substratu, todėl migracija vyksta lėtai. Jeigu ląstelė prisitvirtina per daug stipriai, jai tampa sunku judėti (Huttenlocher ir kt., 1995). Kadangi DPSC ant PLA+BG karkasų migravo geriausiai, todėl ir jų prisitvirtinimas prie šio paviršiaus neturėjo būti toks stiprus.

Proliferacijos tyrimai parodė, kad palyginus su ląstelėmis, augintomis ant kompozitinių PLA+HA ir PLA+BG mėginių, geriausiai DPSC dauginosi ant grynos PLA paviršių. Toks lėtesnis DPSC augimas ant kompozitų gali būti siejama su ląstelių osteogenezės pradžia. Žinoma, kad SC, apsisprendusios pasukti diferenciacijos keliu, išeina iš ląstelės ciklo, jų viduje inicijuojami diferenciacijos procesai, o dėl to sulėtėja dauginimasis (Rutkovskiy ir kt., 2016; Li ir Kirschner, 2014; Cooper, 2000; Janners ir Searls, 1970).

Šiuos teiginius patvirtino ir mūsų DPSC osteogenezės tyrimas, kurio metu buvo siekiama palyginti biokeramikų priedų (HA ar BG) osteoindukcinį aktyvumą. Analizuojant ankstyvąją ant tiriamųjų karkasų augančių DPSC osteogenezę buvo vertinamas jose esantis genų, koduojančių Runx2 ir OPN baltymus, raiškos lygis (Xu ir kt., 2015; Huang ir kt., 2007). Nustatyta, kad ląstelėse, augintose ant abiejų tirtų kompozitų, Runx2 mRNR kiekiai buvo panašūs. Tačiau geno, koduojančio OPN baltymą, raiškos tyrimas parodė, kad didžiausią jo mRNR kiekio didėjimą inicijavo

kompozitiniai PLA+BG karkasai. Tokią pat tendenciją demonstravo ir vėlesnėse DPSC osteogeninės diferenciacijos stadijose dalyvaujančio fermento ALP aktyvumo matavimai. PLA+BG kompozitas ląstelėse inicijavo anksčiausią ir didžiausią šio fermento aktyvumo padidėjimą, lyginant su grynos PLA ir PLA+HA mėginiais.

Nagrinėjant vėlyvąją DPSC osteogenezę, specifiniais dažais buvo dažomi ir kiekybiškai vertinami DPSC ECM besikaupiantys kalcis bei kolagenas (Rutkovskiy ir kt., 2016; Langenbach ir Handschel, 2013). Rezultatai parodė, kad, lyginant su grynos PLA ir PLA+HA karkasais, efektyviausią tiriamų ląstelių ECM mineralizaciją inicijavo PLA+BG mėginiai. Tuo tarpu kolageno kaupimąsi ECM skatino visi tirti karkasai, skirtumų tarp atskirų grupių neregistruota. Kaip paskutinis osteogeninės diferenciacijos rodmuo buvo vertinamas geno, koduojančio OCN baltymą, raiškos lygis ląstelėse. OCN baltymas yra aptinkamas kaulinio audinio ECM ir yra laikomas subrendusių osteoblastų žymeniu (Lee ir kt., 2015). Mūsų tyrimo metu, geno, koduojančio šį baltymą, raiškos padidėjimas ląstelėse, augintose ant visų tiriamųjų grupių kompozitų, nebuvo registruotas. Manome, kad kaip ir vertinant skirtingą paviršiaus topografiją, taip ir tiriant cheminės sudėties įtaką osteogenezės procese, ląstelėms nepakako laiko, kad jos pasiektų vėlyvąją diferenciacijos stadiją, kai šis baltymas aptinkamas, o ląstelės pilnai diferencijuoja į osteoblastus.

Osteoinduktyvumas yra svarbi kuriamo dirbtinio kaulinio audinio konstrukto savybė. Vienas iš pagrindinių audinių inžinerijos tikslų yra sukurti tokį šio audinio karkasą, kuris vien tik savo paviršiaus geometrija bei chemine sudėtimi inicijuotų spontaniinę SC diferenciaciją osteogenine linkme (Gómez-Cerezo ir kt., 2019; Jaidev ir Chatterjee, 2019; Alizadeh-Osgouei ir kt., 2019; Jiang ir kt., 2012b). Apibendrinus visus mūsų gautus osteogeninės diferenciacijos rezultatus galima teigti, kad abu kompozitai (PLA+HA bei PLA+BG) inicijavo spontaniinę ląstelių osteogenezę, tačiau PLA+BG karkasai pasižymėjo stipresniu osteoinduktyvumu. Tikėtina, kad tokius rezultatus galėjo nulemti BG dalelių cheminė sudėtis, nes yra žinoma, kad iš skysčiuose tirpstančio BG atsipalaiduoja kalcio, fosforo ir silicio jonai, kurie stimuliuoja SC metabolinį aktyvumą, proliferaciją ir osteogenezę (Qi ir kt., 2018; Valerio ir kt., 2004; Xynos ir kt., 2001; Silver ir kt., 2001). Matyt, kad ir mūsų atveju šie cheminiai komponentai turėjo lemiamos įtakos tirtų ląstelių likimui.

Substrato padengimo ECM baltymais įtaka ląstelės likimui. Žinoma, kad paviršiaus, ant kurio auga ląstelė, padengimas baltymais moduliuoja jos likimą (Li ir kt., 2019; Salvay ir kt., 2008), todėl kuriant karkasus, skirtus

dirbtinių audinių konstravimui, jie yra papildomai dekoruojami įvairiais baltymais (kolagenu, elsatinu ir pan.) bei signalinėmis molekulėmis (melatoninu, RGD sekomis ir pan.) (Miao ir kt., 2019; Soriente ir kt., 2018; Vila ir kt., 2016).

Šiame darbe buvo išbandytas gana naujas karkasų dekoravimo būdas – paviršiaus padengimas ląstelių suformuotu, natūralios kilmės ECM. Toks ECM yra žymiai sudėtingesnės struktūros nei vienos rūšies baltymai ar signalinės molekulės, todėl geba užtikrinti efektyvesnę pažeisto audinio regeneraciją (Kim ir kt., 2019; B. Kim ir kt., 2018). Karkasų dengimas ląstelių suformuotu ECM yra sparčiai populiarėjanti tyrimų sritis. Kuriant dirbtinio kaulinio audinio konstruktus, tokiu ECM yra dengiami įvairūs polimerų (PCL, PLGA), kompozitų (PCL+PLGA+TCP ir pan.) ar grynų biokeramikų (HA, bifazinio kalcio fosfato ir pan.) karkasai, pagaminti FFF 3D spausdinimo, elektrospiningo ar pan. gamybos metodais (Burgio ir kt., 2018; B. Kim ir kt., 2018; Noh ir kt., 2016; Kumar ir kt., 2016; Pati ir kt., 2015; Liao ir Guo ir Grande-Allen ir ir kt., 2010; Liao ir Guo ir Nelson ir ir kt., 2010). 3D spausdinimas yra laikomas viena perspektyviausių dirbtinio kaulinio audinio konstrukto gamybos technologija, o tam labiausiai tinkanti medžiaga - PLA polimero ir biokeramikos kompozitas (Kuss ir kt., 2018; Burgio ir kt., 2018; B. Huang ir kt., 2018; Scaffaro ir kt., 2016). Todėl iš tokio kompozito 3D spausdinimo būdu pagaminus karkasą bei jį dekoravus ląstelių kilmės ECM būtų galima tikėtis gauti išties geromis osteoregeneracinėmis savybėmis pasižyminčius, sąlyginai nebrangiai pagaminamus karkasus. Daugiausia literatūroje randama darbų, kuriuose analizuotas pirminių BMSC arba osteoblastų pastovių linijų ląstelių suformuoto ECM įtaka ląstelių likimui (B. Kim ir kt., 2018; Burgio ir kt., 2018; Liao ir Guo ir Grande-Allen ir ir kt., 2010; Liao ir Guo ir Nelson ir ir kt., 2010). Kadangi, kaip žinia, BMSC išskyrimo procedūra yra sudėtinga ir skausminga pacientui, todėl į klinikinius tyrimus stengiamasi pereiti naudojant kitokias sauaugusio organizmo SC rūšis, pavyzdžiui, DPSC, kurios gaunamos sąlyginai paprastu ir neskausmingu būdu. Norint kaulo regeneracijai taikyti DPSC suformuotu ECM padengtus konstruktus, svarbu išsiaiškinti tokio ECM poveikį ląstelės likimui. Tuo tikslu, šiame darbe ant 3D spausdintuvu pagamintų porėtų PLA karkasų 7-nias dienas buvo auginamos DPSC. Po numatyto laiko ląstelės buvo pašalintos, o ant naujai gautos ECM padengtos PLA karkasų grupės, kurie toliau vadinami PLA+ECM, iš naujo buvo sėjamos DPSC ir analizuojamas jų likimas.

Norint kuriamą karkasą padaryti osteokonduktyviu bei osteo- ir angioinduktyviu, jis turi būti patrauklus ląstelių prisitvirtinimui,

dauginimuisi ir migracijai. Atitinkamai, toks konstruktas turėtų kuo labiau imituoti natūralaus audinio fizines ir mechanines savybes (Aiyelabegan ir Sadroddiny, 2017; Ohashi ir kt., 2017; Ma ir kt., 2007). Žinoma, kad karkaso padengimas ECM pagerina tokias jo mechanines savybes, kaip lankstumas ir elastingumas. Karkaso Jungo modulis didėja, kai ant paviršiaus susiformuoja tankus ECM tinklas, kuris ir didina karkaso lankstumą (Burgio ir kt., 2018). Duomenų apie ECM įtaką karkasų fizinėms savybėms (vandens absorbcijai ir baltymų adsorbcijai) nėra, nors jos, kaip minėta, yra labai svarbios sėkmingai dirbtinio konstrukto integracijai į organizmą (Aiyelabegan ir Sadroddiny, 2017; Ma ir kt., 2007; Allen ir kt., 2006). Todėl šiame darbe analizavome, ar PLA karkasų padengimas ląstelių kilmės ECM keičia PLA vandens sugertį bei baltymų adsorbciją. Nustatėme, kad PLA padengimas ECM neturėjo įtakos nei karkaso vandens absorbcijai, nei kraujo serumo baltymų prisitvirtinimui ant jo paviršiaus. Abi tirtos mėginių grupės (PLA ir PLA+ECM) demonstravo vienodai geras fizines savybes, kurių pakako tiek sėkmingam ląstelių prisitvirtinimui, tiek ir jų proliferacijai.

Vis dėlto, palyginus adheziją, proliferaciją ir migraciją DPSC auginant ant grynos PLA ir ECM dengtų PLA+ECM karkasų - skirtumai buvo gauti. DPSC, augusios ant PLA+ECM mėginių, greičiau ir stipriau prie jų prisitvirtino bei žymiai aktyviau ant jų dauginosi ir judėjo. Šiuos adhezijos, proliferacijos ir migracijos skirtumus tarp tiriamųjų grupių greičiausiai nulėmė ant PLA+ECM paviršių likę DPSC sukaupti ECM baltymai (Noh ir kt., 2016; Pati ir kt., 2015; Cheng ir kt., 2014; Chen, 2010). Natūraliai audiniuose aptinkamas ECM yra sudarytas iš tankaus įvairių baltymų (kolagenų, fibronektino, vitronektino ir pan.) ir proteoglikanų (versikanas, dekorinas, biglikanas ir pan.) tinklo, kuris ir užtikrina aplinką, tinkamą audinio ląstelių gyvenimui ir dauginimuisi (B. Kim ir kt., 2018) (Thibault ir kt., 2011). Todėl ant nuląstelintų paviršių auginamos MSC per jų membranose esančius integrinų receptorius ima sąveikauti su ECM baltymuose ir proteoglikanuose esančiomis amino rūgščių signalinėmis sekomis. Atitinkamai į šių sąveikų vietas ląstelėse bus pritraukiami adhezijos ir citoskeleto formavimo procesuose dalyvaujantys baltymai, tokie kaip vinkulinas, aktinas (Kumar ir kt., 2016; Humphries ir kt., 2007). Šie baltymai toliau aktyvuoja signalinius kelius, inicijuojančius MSC išgyvenimą, proliferaciją ar diferenciaciją (Holle ir kt., 2016; Kumar ir kt., 2016; Provenzano ir Keely, 2011).

Mums buvo svarbu nustatyti ir tai, ar 3D spausdintų PLA karkasų padengimas DPSC kilmės ECM gerina mėginių osteoindukcines savybes. Tuo tikslu ląsteles auginant ant PLA bei PLA+ECM karkasų buvo

analizuojami skirtingų MSC osteogenezės stadijų žymenys. Išanalizavus ankstyvai osteogenezei būdingų genų, koduojančių Runx2 ir OPN baltymus, raišką nustatyta, jog abi tirtos mėginių grupės (PLA bei PLA+ECM) ląstelėse inicijavo vienodą šių baltymų mRNR sintezės intensyvumą. Įvertinus vėlesnei SC osteogenezei būdingą ALP aktyvinimą pastebėta, kad padengimas ECM skatina ankstesnę ir intensyvesnę šio fermento aktyvaciją DPSC. Analizuojant vėlyvąją ląstelių osteogenezę buvo vertinamas ląstelių formuojamame ECM besikaupiantis kalcio bei kolageno kiekis. Gauti rezultatai parodė, kad karkasų padengimas ląstelių kilmės ECM inicijavo pastebimai efektyvesnę DPSC ECM mineralizaciją, lyginat su grynos PLA grupe. Tačiau DPSC susintetinto kolageno kiekio skirtumų tarp šių grupių mėginių nebuvo nustatyta. Tiek PLA, tiek ir PLA+ECM karkasai inicijavo šio baltymo kaupimąsi naujai besiformuojančiame ECM. Kaip galutinis osteogeninės diferenciacijos rodiklis buvo vertinamas subrendusiuose osteoblastuose aptinkamas padidėjęs geno, koduojančio OCN baltymą, raiškos lygis (Lee ir kt., 2015). Tačiau ir šį kartą šito baltymo mRNR raiškos lygio padidėjimas DPSC, augintose ant abiejų grupių karkasų, nebuvo registruotas. Tikėtina, jog kaip ir ankstesnių tyrimų metu, DPSC nepakako laiko tam, kad pasiektų paskutinąją diferenciacijos stadiją, kai ląstelės visiškai diferencijuoja į osteoblastus.

Apibendrinus osteogeninės diferenciacijos rezultatus galima teigti, kad lyginant su grynos PLA mėginiais, PLA padengimas ECM neinicijavo didesnės su osteogenine diferenciacija siejamų genų, koduojančių Runx2 ir OPN baltymus, raiškos, tačiau, tokio šių baltymų mRNR raiškos lygio pakako tam, kad DPSC, augintose ant PLA+ECM karkasų, būtų fiksuotas aukštesnis ALP aktyvumo lygis bei spartesnė naujojo ECM mineralizacija, lyginant su grynos PLA mėginiais. Toks greitesnis mineralizuoto užpildo fomavimasis galėjo pasireikšti dėl ant PLA+ECM paviršiaus likusių kalcio sankaupų, prie kurių žymiai lengviau geba prisijungti nauji kalcio jonai (Liao ir Guo ir Nelson ir ir kt., 2010). Taipogi, formuojantis mineralizuotam ECM, svarbų vaidmenį vaidina fosfatazė ALP. Ji ECM esančius pirofosfatus hidrolizuoja iki fosfatų, tik tada gali susiformuoti kalcio fosfatai, kurie ECM ir kaupiasi kaip HA kristalai (Mitton-Fitzgerald ir kt., 2016; Rosen, 2013; Orimo, 2010). Kadangi DPSC augant ant PLA+ECM karkasų buvo stebima aktyvesnė naujojo ECM mineralizacija, tai ląstelėse buvo fiksuotas ir didesnis ALP aktyvumas.

Galimas organizmo atsakas į skirtingus konstruktus. Pažeistus audinius, kurie savaime regeneruoti nebegali, dažnai bandoma gydyti kuriant SC-karkaso konstruktus (toliau konstruktą bus vadinamas karkasas su SC).

Toks *in vitro* pagalba sukurtas SC ir karkaso darinys dar nėra pilnai funkcionuojantis dirbtinis audinys, tačiau parodyta, kad jis gali užtikrinti efektyvią, pažeistos audinio vietos regeneraciją (Diomedea ir kt., 2016; El-Backly ir kt., 2008). Tyrimų metu pasitaiko, kad net detaliam išanalizavus konstrukta sudarančio karkaso ir kamieninių ląstelių sąveikas *in vitro*, po perkėlimo į organizmą jis vis tiek sukelia uždegiminę reakciją (Lock ir kt., 2019). Todėl šiame darbe, *in vitro* sąlygomis buvo siekiama iširti galimą recipiento organizmo atsaką į skirtingus (DPSC-PLA, DPSC-PLA+HA, DPSC-PLA+BG ir DPSC-PLA+ECM) mūsų sukurtus dirbtinio kaulinio audinio konstruktus.

Siekiant įvertinti, kokius signalinius kelius organizme gali aktyvinti implantuoti konstruktai, buvo analizuojami jų produkuojami citokinai, chemokinai bei augimo veiksniai. Vertinta 29 signalinių molekulių raiška, iš jų 11 buvo aptikta visose analizuotose sekretomose: CINC-1, CINC-2 α/β , CINC-3, CXCL1, IL-1ra, IL-6, sICAM-1, CXCL10, CCL5, TIMP-1 ir VEGF. Didžioji dalis detektuotų citokinių, chemokinių bei augimo veiksnių yra siejami su uždegiminių procesų aktyvavimu (pvz.: IL-6, CINC šeimos baltymai ir kt.) arba stabdymu (pvz.: interleukinas 10, interleukinas 13 ir kt.) (Su ir kt., 2012; Cavallion, 2001). Tačiau dalis jų, priklausomai nuo to, kokios ląstelės juos sintetina, gali inicijuoti ir su imuniniu atsaku nesusijusius procesus. Pavyzdžiui, žinoma, jog uždegiminiu aktyvumu pasižymintis citokinas IL-6 bei CINC šeimos baltymai MSC geba aktyvuoti osteogeninės diferenciacijos signalinius kelius (Yang ir kt., 2018; Xie ir kt., 2018; R. L. Huang ir kt., 2018; Chung ir kt., 2006). Lygiai taip pat, imuninius procesus moduluojantys chemokinai gali prisidėti prie kaulinio audinio regeneracijos procesų. Vieni jų (CXCL10, CCL5 ar CX3CL1), kaip ir citokinių atveju, inicijuoja signalinių kelių, atsakingų už ląstelių osteogeninę diferenciaciją, aktyvavimą (Liu ir kt., 2014; Xiao ir kt., 2009; Lisignoli ir kt., 2003), o kiti (sICAM, CX3CL1 ir TIMP-1) yra tarsi chemoatraktantai osteoklastams, kurių atliekama kaulinio audinio ECM rezorbcija yra būtina sėkmingai kaulo regeneracijai (Egea ir kt., 2012; Koizumi ir kt., 2009; Fernandes ir kt., 2008).

Todėl galima teigti, kad *in vitro* sąlygomis patvirtinome, kad visi tirti konstruktai organizme turėtų inicijuoti kaulinio audinio regeneraciją bei neturėtų sukelti imuninės reakcijos ir uždegimo.

Atliekant konstrukto sekretomose esančių citokinių, chemokinių bei augimo veiksnių analizę pastebėta, kad DPSC, augusios ant visų keturių karkasų (PLA, PLA+HA, PLA+BG arba PLA+ECM) aktyviausiai sintetino augimo veiksnį VEGF. Lyginant su kitomis signalinėmis molekulėmis,

identifikuotas VEGF kiekis sekretomose buvo didžiausias. Organizme šis veiksnys yra siejamas su angiogenezės indukcija (McColl ir kt., 2004), jis yra laikomas endotelinių SC chemoatraktantu, kuris traukia ląsteles judėti link jo (Pellet-Many, 2015). Tai reiškia, jog darbo metu buvo sukurti konstruktai, pasižymintys angioindukcinėmis savybėmis. Šią hipotezę patvirtino ir endotelinių ląstelių migracijos tyrimai. Kiekybiškai įvertinus PESC migraciją ant tirtų karkasų (PLA, PLA+HA, PLA+BG ir PLA+ECM) nustatyta, jog sparčiausiai šios ląstelės migravo ant PLA+BG bei PLA+ECM grupių mėginių. Tikėtina, kad PLA+BG atveju geresnę PESC migraciją taip pat inicijavo iš 45S5 BG dalelių, esančių kompozite, ištirpę ir į augimo terpę atsipalaidavę jonai, kurie, kaip žinoma, teigiamai stimuliuoja tiek ląstelių migraciją, tiek ir angiogenezę. PLA+ECM mėginių atveju PESC judėjimą, greičiausiai paskatino DPSC kilmės ECM tinklas, kuriuo buvo padengtas šių karkasų paviršius. ECM esantys baltymai geba inicijuoti ląstelių migraciją bei angiogenezę (Noh ir kt., 2016; Pati ir kt., 2015; Moore ir kt., 2015; Cheng ir kt., 2014; Chen, 2010). Tačiau, atlikus kokybinį PESC migracijos ant DPSC-PLA, DPSC-PLA+HA, DPSC-PLA+BG ir DPSC-PLA+ECM konstrukto vertinimą pastebėta, kad endotelinių ląstelių migracijai buvo patrauklūs visi tirti mėginiai. Manome, kad skirtumas tarp konstrukto grupių nebuvo nustatytas dėl kokybinio migracijos vertinimo specifikos. Šiuo metodu analizuojant ląstelių judėjimą gali išryškėti tik labai žymūs ir akyvaizdūs skirtumai. Tačiau yra parodyta, kad po konstrukto implantacijos į organizmą, angiogenezės procesai jame yra skatinami tiek konstrukto sudarančio karkaso angioindukcinių savybių, tiek ir konstrukto formuojančių ląstelių (Liu ir kt., 2011). Todėl organizme efektyviausiai kraujagyslių tinklo formavimąsi turėtų inicijuoti DPSC-PLA+BG bei DPSC-PLA+ECM konstruktai.

Substrato makrotopografijos (>100 μm) įtakos DPSC likimui analizė parodė, jog spontaninės DPSC osteogenezės užtikrinimui nereikia itin tikslių ir sudėtingai išgaunamų paviršių nano- ir mikromodifikacijų. DPSC diferenciacijos osteogenine linkme inicijavimui pakanka 3D spausdintuvu, FFF metodu gaminti susisiekiiančio porėtumo karkasus, kurių kiekvienas sluoksnis būtų formuojamas iš dvisluoksnių gijų. Įvertinus paviršiaus cheminės sudėties įtaką ląstelių elgsenai pastebėta, jog efektyviausiai SC osteogenezę indukuoja PLA ir BG kompozitas. Parodyta, kad ir PLA paviršiaus padengimas DPSC kilmės ECM tinklu žymiai pagerino paviršiaus osteoindukcines savybes. *In vitro* sąlygomis išanalizavus iš karkasų (PLA, PLA+HA, PLA+BG ir PLA+ECM) bei DPSC pagamintų konstrukto

gebėjimą inicijuoti angiogenezę nustatyta, kad labiausiai šio proceso indukcijai organizme būtų tinkami DPSC-PLA+BG bei DPSC-PLA+ECM konstruktai. Todėl tikėtina, kad tarpusavyje apjungus DPSC ląsteles, kompozitinį PLA+BG porėtos makrostruktūros karkasą bei DPSC susintetintą ECM tinklą galima tikėtis pasiekti sėkmingos kaulinio audinio regeneracijos *in vivo*.

Šio darbo rezultatai prisideda prie sėkmingo dirbtinio kaulinio audinio sukūrimo, kuris padarytų didžiulį proveržį šiuolaikinėje medicinoje.

IŠVADOS

1. Parodyta, kad paviršiaus makrotopografija ($>100\ \mu\text{m}$) keičia žiurkės dantų pulpos kamieninių ląstelių (DPSC) morfologiją; dėl formos pokyčio atsiradę citoskeleto įtempimai inicijuoja šių ląstelių proliferaciją bei spontaniinę osteogeninę diferenciaciją.

2. Nustatyta, kad kompozitas, sudarytas iš polilaktinės rūgšties ir 10 % 45S5 biostiklo (PLA+BG), yra patrauklesnis DPSC migracijai, lyginant su PLA ir 10 % hidroksiapatito (PLA+HA) paviršiumi, bet ląstelių prisitvirtinimui bei dauginimuisi labiau tinka PLA+HA substratas.

3. Rezultatai rodo, kad abi tirtos kompozitinių karkasų rūšys inicijuoja osteogenezės procesus ląstelėse, tačiau anksčiausiai ir stipriausiai šarminės fosfatazės fermentinį aktyvumą, tarpląstelinio užpildo mineralizaciją bei su osteogenine diferenciacija siejamų genų, koduojančių Runx2 ir OPN baltymus, raišką skatina PLA+BG kompozitai.

4. Parodyta, kad PLA karkasų paviršiaus padengimas tarpląstelinio užpildo (ECM) baltymais pagerina DPSC prisitvirtinimą, šis substratas yra patrauklesnis ląstelių migracijai ir proliferacijai lyginant su nedengtu polimeru.

5. Nustatyta, kad ląstelių suformuotas ECM baltymų tinklas padidina polimerinio karkaso osteoinduktyvumą; ląstelėms augant ant tokio substrato jose stipriau aktyvuojama šarminė fosfatazė bei stebima efektyvesnė ECM mineralizacija.

6. Visų tirtų konstrukčių (DPSC-PLA, DPSC-PLA+HA, DPSC-PLA+BG bei DPSC-PLA+ECM) produkuojamose sekretomose buvo aptikti tik citokinai, chemokinai bei augimo veiksniai (CINC-1, CINC-2 α/β , CINC-3, CXCL1, IL-1ra, IL-6, sICAM-1, CXCL10, CCL5, TIMP-1 ir VEGF), skatinantys osteoregeneracinį procesą, uždegimą skatinančių signalinių molekulių nebuvo nustatyta. Įvertinus konstrukčių inicijuojamą angiogenezę pastebėta, kad ši procesą stipriausiai indukavo DPSC-PLA+BG bei DPSC-PLA+ECM mėginiai. Gauti rezultatai leidžia teigti, kad DPSC-PLA+BG bei DPSC-PLA+ECM konstruktai yra tinkamiausi kaulo regeneracijai organizme.

MOKSLINIAI PASIEKIMAI

Publikacijos disertacijos tema:

- **Alksnė M**, Šimoliūnas E, Kalvaitytė M, Skliutas E, Rinkūnaitė I, Gendvilienė I, Baltriukienė D, Rutkūnas V, Bukelskienė V. The effect of larger than cell diameter polylactic acid surface patterns on osteogenic differentiation of rat dental pulp stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2019;107(1):174-186. doi:10.1002/jbm.a.36547.
- **Alksnė M**, Kalvaitytė M, Šimoliūnas E, Rinkūnaitė I, Gendvilienė I, Locs J, Rutkūnas V, Bukelskiene V. *In vitro* comparison of 3D printed polylactic acid/hydroxyapatite and polylactic acid/bioglass composite scaffolds: Insights into materials for bone regeneration. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2020. doi: 10.1016/j.jmbbm.2020.103641.

Kitos publikacijos:

- **Peciukaiyte-Alksne M**, Šarlauskas J, Miseviciene L, Maroziene A, Cenas N, Krikštopaitis K, Staniulyte Z, Anusevicius Ž. Flavoenzyme-mediated reduction reactions and antitumor activity of nitrogen-containing tetracyclic ortho-quinone compounds and their nitrated derivatives. *EXCLI J*. 2017;16:663-678. doi: 10.17179/excli2017-273.
- Jarasiene-Burinskaja R, **Alksne M**, Bartuskiene V, Voisniene V, Burinskij J, Cenas N, Bukelskiene V. Study of the cytotoxic effects of 2,5-diaziridinyl-3,6-dimethyl-1,4-benzoquinone (MeDZQ) in mouse hepatoma cells. *EXCLI J*. 2017;16:151-159. doi: 10.17179/excli2016-783.
- Valiulienė G, Treigytė G, Savickienė ., Matuzevičius D, **Alksnė M**, Jarašienė-Burinskaja R, Bukelskienė V, Navakauskas D, Navakauskienė R. Histone modifications patterns in tissues and tumours from acute promyelocytic leukemia xenograft model in response to combined epigenetic therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;79:62-70. doi: 10.1016/j.biopha.2016.01.044.
- Šarlauskas J, **Pečiukaiytė-Alksnė M**, Misevičienė L, Marozienė A, Polmickaitė E, Staniulytė Z, Čėnas N, Anusevičius Ž. Naphtho[1',2':4,5]imidazo[1,2-a]pyridine-5,6-diones: Synthesis, enzymatic reduction and cytotoxic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2016;26(2):512-517. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.

- Šarlauskas J, Nemeikaitė-Čėnienė A, Nivinskas H, Miliukienė V, Jarašienė R, **Pečiukaiytė M**, Baltriukienė D, Bukelskienė V, Krištopaitis K, Čėnas N. Redox reactions and cytotoxicity mechanisms of anticancer aziridinyl-subsbtituted-1,4-benzoquinones: a minireview. *Chemija*. 2015;26(3):208-17.

Žodiniai pranešimai konferencijose:

- **Alksnė M**, Kalvaitytė M, Šimoliūnas E, Gendviliene I, Rutkūnas V, Bukelskiene V. Kaulinio audinio konstravimas panaudojant 3D karkasą ir nepilnos diferenciacijos ląsteles. „Thermo Fisher Scientific“ mokslo diena 2019; 2019 Spalio 9; Lietuva, Vilnius.
- **Alksnė M**, Kalvaitytė M, Šimoliūnas E, Bukelskienė V. Dirbtinio kaulinio audinio karkaso, sukonstruoto 3D spausdinimo būdu, savybių tyrimas *in vitro*. 9-oji jaunųjų mokslininkų konferencija „Fizinių ir technologijos mokslų tarpdalykiniai tyrimai“; 2019 Kovo 12; Lietuvos Mokslų Akademija, Vilnius, Lietuva.
- **Alksnė M**, Kalvaitytė M, Šimoliūnas E, Bukelskienė V. Dirbtinio kaulinio audinio karkaso, sukonstruoto 3D spausdinimo būdu, savybių tyrimas *in vitro*. INFOBALT stipendijų konkursas; 2019 Kovo 18; INVL technologies, Vilnius, Lietuva.
- **Alksnė M**, Kalvaitytė M, Šimoliūnas E, Bukelskienė V, Baltriukiene D. Macro-structured polylactic acid scaffolds for osteogenic differentiation. CellFit Workshop – Cells Communicate! 2019 Kovo 14; Belgradas, Serbija.
- **Alksnė M**. Micro-structured polylactic acid scaffolds for osteogenic regeneration. III International Conference of Lithuanian Association of Stem Cells Researchers; 2017 Spalio 27; Lietuva, Vilnius.

Stendiniai pranešimai konferencijose:

- Šimoliūnas E, **Alksnė M**, Kalvaitytė M, Bukelskienė V, Baltriukienė D. PLA composites and pure PLA decorated with cell-derived extracellular matrix impact on the fate of dental pulp stem cells osteogenic differentiation. CellFit Workshop – Cells Communicate! 2019 Kovo 14; Belgradas, Serbija.
- Kalvaitytė M, **Alksnė M**, Šimoliūnas E, Bukelkiene V. The Impact of Scaffold Microstructure on Dental Pulp Stem Cells Osteogenic Differentiation. The COINS' 18. 2018 Vasario 28-Kovo 2; Lietuva, Vilnius.
- Kalvaitytė M, **Alksnė M**, Šimoliūnas E, Bukelkiene V. The impact of PLA scaffold micro-structurization on rat's dental pulp stem cells

osteogenic differentiation *in vitro*. The COINS`17. 2017 Vasario 28-Kovo 2; Lietuva, Vilnius.

- **Alksnė M**, Šimoliūnas E, Kalvaitytė M, Skliutas E, Barasa P, Baltriukienė D, Bukelskienė V. The influence of ordered 3D printed PLA scaffold microstructurization on rat dental pulp stem cells. 2017 TERMIS-EU Conference; 2017 Birželio 26-30; Šveicarija, Davosas.
- **Alksnė M**, Gendvilienė I, Šimoliūnas E, Barasa P, Kalvaitytė M, Skliutas E, Malinauskas M, Baltriukienė D, Bukelskienė V, Rutkūnas V. The effect of ordered 3D printed PLA scaffold microstructurization on DPSC osteogenic differentiation *in vitro* and new bone formation *in vivo*. 20th Anniversary Conference Laboratory Animals in Research. 2016 Lapkričio 24-25; Lietuva, Vilnius.
- Barasa P, **Pečiukaitytė M**, Balčiūnas E, Šimoliūnas E, Baltriukienė D, Bukelskienė V. Influence of surface topography on the vital processes of myogenic cells *in vitro*. XIV International Conference of Lithuanian Biochemical Society. 2016 Birželio 28-30; Lietuva, Druskininkai.

Apdovanojimai:

- L'ORÉAL Baltic 'For Women in Science' apdovanojimas, 2019.
- Asociacijos „INFOBALT“ vardinė stipendija, 2019.
- „BAFF Professional Internship Program“ stipendija, 2016.

FINANSINĖ PARAMA

Disertacijoje pristatomi tyrimai finansuoti:

- Lietuvos mokslo tarybos, pagal projektą MIP – 046/2015;
- L'ORÉAL Baltic “For Women in Science” programos, kurią remia Lietuvos nacionalinė UNESCO komisija ir Lietuvos mokslų akademija;
- Asociacijos „INFOBALT“.

Kita finansinė parama:

- COST programa „CellFit“ (COST Action CA16119) finansavo dalyvavimą konferencijoje „CellFit Workshop – Cells Communicate!“.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovei dr. Virginijai Bukelskienei už suteiktą galimybę dirbti ir atlikti tyrimus Biologinių modelių skyriuje, taip pat už patarimus, pastabas, pagalbą, rūpestį ir kantrybę viso vadovavimo metu bei rašant šį darbą.

Už pagalbą, palaikymą, patarimus ir idėjas dėkoju kolegoms Miglei Kalvaitytei, Povilui Barasai, Egidijui Šimoliūnui, Ievai Rinkūnaitei, dr. Daivai Baltriukienei, prof. dr. Vygandui Rutkūnui ir Ievai Gendvilienei.

Esu dėkinga kolegoms iš Proteomokos skyriaus: Silvijai Urnikytei bei Nadeždai Dreiže už HEK293T ląstelių liniją, lentivirusinius vektorius bei patarimus ląstelių transfekavimo klausimais.

Nuoširdžiai dėkoju Ląstelės biologijos skyriui už galimybę pasinaudoti fluorescentiniu mikroskopu.

Taip pat norėčiau padėkoti Rygos Bendrosios chemijos inžinerijos institutui už HA miltelius bei kolegoms iš Vilniaus universiteto Fizikos fakulteto Lazerinių tyrimų centro ir įmonei „3D Cretaive“ už karkasų atspausdinimą.

Dėkoju visiems Biochemijos instituto „ląstelininkams“ už geros nuotaikos palaikymą darbo vietoje.

Galiausiai noriu padėkoti visai savo šeimai!

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abagnale G, Steger M, Nguyen VH, Hersch N, Sechi A, Joussem S, Denecke B, Merkel R, Hoffmann B, Dreser A, Schnakenberg U, Gillner A, Wagner W. Surface topography enhances differentiation of mesenchymal stem cells towards osteogenic and adipogenic lineages. *Biomaterials*. 2015;61:316–26. doi: <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2015.05.030>.
2. Aiyelabegan HT, Sadroddiny E. Fundamentals of protein and cell interactions in biomaterials. *Biomed Pharmacother*. 2017;88:956–70. PMID:28178627. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.136>.
3. Alizadeh-Osgouei M, Li Y, Wen C. A comprehensive review of biodegradable synthetic polymer-ceramic composites and their manufacture for biomedical applications. *Bioact Mater*. 2019;4:22–36. PMID:30533554. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2018.11.003>.
4. Alksne M, Simoliunas E, Kalvaityte M, Skliutas E, Rinkunaite I, Gendviliene I, Baltrikiene D, Rutkunas V, Bukelskiene V. The effect of larger than cell diameter polylactic acid surface patterns on osteogenic differentiation of rat dental pulp stem cells. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2019;107. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36547>.
5. Allen LT, Tosetto M, Miller IS, O'Connor DP, Penney SC, Lynch I, Keenan AK, Pennington SR, Dawson KA, Gallagher WM. Surface-induced changes in protein adsorption and implications for cellular phenotypic responses to surface interaction. *Biomaterials*. 2006;27:3096–108. PMID:16460797. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.019>.
6. Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Relat Res*. 1995;266–80. PMID:7634645.
7. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 2000;21:667–81. PMID:10711964.
8. Anselme K, Ploux L, Ponche A. Cell/Material Interfaces: Influence of Surface Chemistry and Surface Topography on Cell Adhesion. *J Adhes Sci Technol*. 2010;24:831–52. doi: <https://doi.org/10.1163/016942409X12598231568186>.
9. Aszódi A, Legate KR, Nakchbandi I, Fässler R. What Mouse Mutants Teach Us About Extracellular Matrix Function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22:591–621. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104258>.
10. de Azevedo Gonçalves Mota RC, da Silva EO, de Lima FF, de Menezes LR, Thiele ACS, Mota RC de AG, Silva EO da, Lima FF de, Menezes LR de, Thiele ACS. 3D Printed Scaffolds as a New Perspective for Bone Tissue Regeneration: Literature Review. *Mater Sci Appl*. 2016;07:430–52. doi: <https://doi.org/10.4236/msa.2016.78039>.
11. Bae KS, Park JB, Kim HS, Kim DS, Park DJ, Kang SJ. Neuron-Like

- Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Yonsei Med J.* 2011;52:401. doi: <https://doi.org/10.3349/ymj.2011.52.3.401>.
12. Baino F, Novajra G, Vitale-Brovarone C. Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015;3:202. PMID:26734605. doi: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00202>.
 13. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 2004;8:301–16. PMID:15491506. .
 14. De Bari C, Dell’Accio F, Vanlauwe J, Eyckmans J, Khan IM, Archer CW, Jones EA, McGonagle D, Mitsiadis TA, Pitzalis C, Luyten FP. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:1209–21. doi: <https://doi.org/10.1002/art.21753>.
 15. Barradas AMC, Yuan H, van Blitterswijk CA, Habibovic P. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *Eur Cell Mater.* 2011;21:407–29; discussion 429. PMID:21604242. .
 16. Bedian L, Villalba-Rodríguez AM, Hernández-Vargas G, Parra-Saldivar R, Iqbal HMN. Bio-based materials with novel characteristics for tissue engineering applications – A review. *Int J Biol Macromol.* 2017;98:837–46. doi: <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.02.048>.
 17. Ben-nissan B. Advances in Calcium Phosphate Biomaterials. vol. 2. 2014. doi: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-53980-0>.
 18. Di Benedetto A, Brunetti G, Posa F, Ballini A, Grassi FR, Colaianni G, Colucci S, Rossi E, Cavalcanti-Adam EA, Lo Muzio L, Grano M, Mori G. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from dental bud: Role of integrins and cadherins. *Stem Cell Res.* 2015;15:618–28. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.09.011>.
 19. Bertassoli BM, Costa ES, Sousa CA, Albergaria JDS, Maltos KLM, Goes AM, Matins TM da M, Silva GAB, Jorge EC, Bertassoli BM, Costa ES, Sousa CA, Albergaria JDS, Maltos KLM, Goes AM, Matins TM da M, Silva GAB, Jorge EC. Rat dental pulp stem cells: isolation and phenotypic characterization method aiming bone tissue bioengineering. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2016;59. doi: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150613>.
 20. van Bezooijen RL, Roelen BAJ, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SE, ten Dijke P, Löwik CWGM. Sclerostin Is an Osteocyte-expressed Negative Regulator of Bone Formation, But Not a Classical BMP Antagonist. *J Exp Med.* 2004;199:805–14. PMID:15024046. doi: <https://doi.org/10.1084/jem.20031454>.
 21. Bhat S, Kumar A. Cell proliferation on three-dimensional chitosan–agarose–gelatin cryogel scaffolds for tissue engineering applications. *J*

- Biosci Bioeng.* 2012;114:663–70. PMID:22884715. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.07.005>.
22. Bilezikian JP, Raisz LG (Lawrence G, Martin TJ. Principles of bone biology. Elsevier; 2008.
 23. Birmingham E, Niebur GL, McHugh PE, al. et. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur Cells Mater.* 2013;23:13–27.
 24. Boskey AL, Robey PG. The Regulatory Role of Matrix Proteins in Mineralization of Bone. *Osteoporosis.* 2013:235–55. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415853-5.00011-X>.
 25. Bouyer M, Guillot R, Lavaud J, Plettinx C, Olivier C, Curry V, Boutonnat J, Coll JL, Peyrin F, Josserand V, Bettega G, Picart C. Surface delivery of tunable doses of BMP-2 from an adaptable polymeric scaffold induces volumetric bone regeneration. *Biomaterials.* 2016;104:168–81. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.001>.
 26. Bristol J, Ratcliffe J, Roth D, Jacobs M, Furie B, Furie B, Sanchez-Vega B, Solera J. Biosynthesis of prothrombin: intracellular localization of the vitamin K-dependent carboxylase and the sites of gamma-carboxylation. *Blood.* 1999;88:2585–93. PMID:8839851. .
 27. Brown RM, Meah CJ, Heath VL, Styles IB, Bicknell R. Tube-Forming Assays, Humana Press, New York, NY; 2016, p. 149–57. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3628-1_9.
 28. Bruderer M, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater.* 2014;28:269–86. PMID:25340806. .
 29. Burgio F, Rimmer N, Piele U, Buschmann J, Beaufils-Hugot M. Characterization and in ovo vascularization of a 3D-printed hydroxyapatite scaffold with different extracellular matrix coatings under perfusion culture. *Biol Open.* 2018;7:bio034488. PMID:30341104. doi: <https://doi.org/10.1242/bio.034488>.
 30. Burr DB, Allen MR. Basic and Applied Bone Biology. Elsevier; 2014. doi: <https://doi.org/10.1016/C2011-0-05817-9>.
 31. Burr DB, Bellido T, White KE. Bone structure and function. *Rheumatology.* 2015:42–55. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-09138-1.00006-1>.
 32. Cancela ML, Laizé V, Conceição N. Matrix Gla protein and osteocalcin: From gene duplication to neofunctionalization. *Arch Biochem Biophys.* 2014;561:56–63. doi: <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2014.07.020>.
 33. Cao W, Hench LL. Bioactive materials. *Ceram Int.* 1996;22:493–507. doi: [https://doi.org/10.1016/0272-8842\(95\)00126-3](https://doi.org/10.1016/0272-8842(95)00126-3).
 34. Carlson CB, Lawler J, Mosher DF. Structures of thrombospondins. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65:672–86. PMID:18193164. doi: <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7484-1>.

35. Castells-Sala Cristina, Alemany-Ribes Mireia et al. Current Applications of Tissue Engineering in Biomedicine. *J Biochips Tissue Chips*. 2015;s2:1–14. doi: <https://doi.org/10.4172/2153-0777.S2-004>.
36. Cavaillon JM. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol (Noisy-Le-Grand)*. 2001;47:695–702. PMID:11502077. .
37. Chang H, Knothe Tate ML. Concise review: the periosteum: tapping into a reservoir of clinically useful progenitor cells. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1:480–91. PMID:23197852. doi: <https://doi.org/10.5966/sctm.2011-0056>.
38. Chappard D, Baslé MF, Legrand E, Audran M. New laboratory tools in the assessment of bone quality. *Osteoporos Int*. 2011;22:2225–40. doi: <https://doi.org/10.1007/s00198-011-1573-6>.
39. Chaubey A, Ross KJ, Leadbetter RM, Burg KJL. Surface Patterning: Tool to Modulate Stem Cell Differentiation in an Adipose System. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2008;84:70–8. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30846>.
40. Chen J, Long F. β -catenin promotes bone formation and suppresses bone resorption in postnatal growing mice. *J Bone Miner Res*. 2013;28:1160–9. PMID:23188722. doi: <https://doi.org/10.1002/jbmr.1834>.
41. Chen J, Deng L, Porter C, Alexander G, Patel D, Vines J, Zhang X, Chasteen-Boyd D, Sung H-J, Li Y-P, Javed A, Gilbert S, Cheon K, Jun H-W. Angiogenic and Osteogenic Synergy of Human Mesenchymal Stem Cells and Human Umbilical Vein Endothelial Cells Cocultured on a Nanomatrix. *Sci Rep*. 2018a;8:15749. PMID:30356078. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34033-2>.
42. Chen Q, Shou P, Zheng C, Jiang M, Cao G, Yang Q, Cao J, Xie N, Velletri T, Zhang X, Xu C, Zhang L, Yang H, Hou J, Wang Y, Shi Y. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death Differ*. 2016;23:1128–39. doi: <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.168>.
43. Chen Q, Cao L, Wang J-L, Zhao H, Lin H, Fan Z-Y, Dong J. Improved cell adhesion and osteogenesis using a PLTGA (poly l -lactide, 1,3-trimethylene carbonate, and glycolide) terpolymer by gelatin-assisted hydroxyapatite immobilization for bone regeneration. *J Mater Chem B*. 2018b;6:301–11. doi: <https://doi.org/10.1039/C7TB02293J>.
44. Chen W, Zhou H, Tang M, Weir MD, Bao C, Xu HHK. Gas-foaming calcium phosphate cement scaffold encapsulating human umbilical cord stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2012;18:816–27. PMID:22011243. doi: <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0267>.
45. Chen XD. Extracellular matrix provides an optimal niche for the maintenance and propagation of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev*. 2010;90:45–54. doi: <https://doi.org/10.1002/bdrc.20171>.
46. Chen X, Fan H, Deng X, Wu L, Yi T, Gu L, Zhou C, Fan Y, Zhang X. Scaffold Structural Microenvironmental Cues to Guide Tissue

- Regeneration in Bone Tissue Applications. *Nanomaterials*. 2018c;8:960. PMID:30469378. doi: <https://doi.org/10.3390/nano8110960>.
47. Cheng CW, Solorio LD, Alsberg E. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering. *Biotechnol Adv*. 2014;32:462–84. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.012>.
 48. Chung R, Cool JC, Scherer MA, Foster BK, Xian CJ. Roles of neutrophil-mediated inflammatory response in the bony repair of injured growth plate cartilage in young rats. *J Leukoc Biol*. 2006;80:1272–80. doi: <https://doi.org/10.1189/jlb.0606365>.
 49. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8:133–43. doi: <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.1>.
 50. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3 Suppl 3:S131-9. PMID:18988698. doi: <https://doi.org/10.2215/CJN.04151206>.
 51. Colnot C. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *J Bone Miner Res*. 2009;24:274–82. doi: <https://doi.org/10.1359/jbmr.081003>.
 52. Conoscenti G, Carrubba V La, Brucato V. A Versatile Technique to Produce Porous Polymeric Scaffolds: The Thermally Induced Phase Separation (TIPS) Method. 2017. doi: <https://doi.org/10.21767/2572-4657.100012>.
 53. Cooper GM. Cell Proliferation in Development and Differentiation. 2000.
 54. Cretel E, Pierres A, Benoliel A-M, Bongrand P. How Cells Feel Their Environment: A Focus on Early Dynamic Events. *Cell Mol Bioeng*. 2008;1:5–14. doi: <https://doi.org/10.1007/s12195-008-0009-7>.
 55. Cui L, Houston DA, Farquharson C, MacRae VE. Characterisation of matrix vesicles in skeletal and soft tissue mineralisation. *Bone*. 2016;87:147–58. doi: <https://doi.org/10.1016/J.BONE.2016.04.007>.
 56. Cui M, Wan Y, Anderson DG, Shen FH, Leo BM, Laurencin CT, Balian G, Li X. Mouse growth and differentiation factor-5 protein and DNA therapy potentiates intervertebral disc cell aggregation and chondrogenic gene expression. *Spine J*. 2008;8:287–95. doi: <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2007.05.012>.
 57. Cunningham BW, Atkinson BL, Hu N, Kikkawa J, Jenis L, Bryant J, Zamora PO, McAfee PC. Ceramic granules enhanced with B2A peptide for lumbar interbody spine fusion: An experimental study using an instrumented model in sheep: Laboratory investigation. *J Neurosurg Spine*. 2009;10:300–7. doi: <https://doi.org/10.3171/2009.1.SPINE08565>.
 58. Curry AS, Pensa NW, Barlow AM, Bellis SL. Taking cues from the extracellular matrix to design bone-mimetic regenerative scaffolds. *Matrix Biol*. 2016;52–54:397–412. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.02.011>.

59. Curtis A, Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials*. 1997;18:1573–83. PMID:9613804. doi: [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(97\)00144-0](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(97)00144-0).
60. Dai R, Wang Z, Samanipour R, Koo KI, Kim K. Adipose-Derived Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Stem Cells Int*. 2016;2016. doi: <https://doi.org/10.1155/2016/6737345>.
61. Deligianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG, Missirlis YF. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*. 2001;22:87–96. PMID:11085388. .
62. Deng X, Hao J, Wang C. Preparation and mechanical properties of nanocomposites of poly(D,L-lactide) with Ca-deficient hydroxyapatite nanocrystals. *Biomaterials*. 2001;22:2867–73. PMID:11561892. .
63. DiMilla PA, Barbee K, Lauffenburger DA. Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed. *Biophys J*. 1991;60:15–37. doi: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82027-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82027-6).
64. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis P V. Bone regeneration: Current concepts and future directions. *BMC Med*. 2011;9. doi: <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-66>.
65. Diomedede F, Zini N, Gatta V, Fulle S, Merciaro I, D'Aurora M, La Rovere RM, Traini T, Pizzicannella J, Ballerini P, Caputi S, Piattelli A, Trubiani O. Human periodontal ligament stem cells cultured onto cortico-cancellous scaffold drive bone regenerative process. *Eur Cell Mater*. 2016;32:181–201. PMID:27633707. doi: <https://doi.org/10.22203/ecm.v032a12>.
66. Dobljar M, Garc JM, Omez MJG. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Eng Fract Mech*. 2004;71:1809–40. doi: <https://doi.org/10.1016/j.engfracmech.2003.08.003>.
67. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F., Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315–7. PMID:16923606. doi: <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
68. Du Y, Montoya C, Orrego S, Wei X, Ling J, Lelkes PI, Yang M. Topographic cues of a novel bilayered scaffold modulate dental pulp stem cells differentiation by regulating YAP signalling through cytoskeleton adjustments. *Cell Prolif*. 2019. doi: <https://doi.org/10.1111/cpr.12676>.
69. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell*. 1997;89:747–54. doi: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80257-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80257-3).
70. Egea V, Zahler S, Rieth N, Neth P, Popp T, Kehe K, Jochum M, Ries C. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) regulates mesenchymal stem cells through let-7f microRNA and Wnt/ β -catenin

- signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1115083109>.
71. Egusa H, Saeki M, Doi M, Fukuyasu S, Matsumoto T, Kamisaki Y, Yatani H. A Small-molecule Approach to Bone Regenerative Medicine in Dentistry. *J Oral Biosci*. 2010;52:107–18. doi: [https://doi.org/10.1016/S1349-0079\(10\)80039-8](https://doi.org/10.1016/S1349-0079(10)80039-8).
 72. El-Backly RM, Massoud AG, Azza ;, El-Badry M, Sherif RA, Marei MK. Regeneration of dentine/pulp-like tissue using a dental pulp stem cell/poly(lactic-co-glycolic) acid scaffold construct in New Zealand white rabbits. 2008. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1747-4477.2008.00139.x>.
 73. Farbod K, Nejadnik MR, Jansen JA, Leeuwenburgh SCG. Interactions Between Inorganic and Organic Phases in Bone Tissue as a Source of Inspiration for Design of Novel Nanocomposites. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014;20:173–88. doi: <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2013.0221>.
 74. Fernandes JC, Shi Q, Benderdour M, Lajeunesse D, Lavigne P. An active role for soluble and membrane intercellular adhesion molecule-1 in osteoclast activity in vitro. *J Bone Miner Metab*. 2008;26:543–50. doi: <https://doi.org/10.1007/s00774-008-0866-0>.
 75. Ferretti C, Mattioli-Belmonte M. Periosteum derived stem cells for regenerative medicine proposals: Boosting current knowledge. *World J Stem Cells*. 2014;6:266–77. PMID:25126377. doi: <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i3.266>.
 76. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:421746. PMID:26247020. doi: <https://doi.org/10.1155/2015/421746>.
 77. Foundation W. Medical gallery of Blausen Medical 2014. *WikiJournal Med*. 2014;1:10. doi: <https://doi.org/10.15347/wjm/2014.010>.
 78. Franceschi RT. The developmental control of osteoblast-specific gene expression: role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10:40–57. PMID:10759426. .
 79. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*. 2006;235:176–90. doi: <https://doi.org/10.1002/dvdy.20603>.
 80. Fu Y, Liu L, Cheng R, Cui W. ECM decorated electrospun nanofiber for improving bone tissue regeneration. *Polymers (Basel)*. 2018;10. doi: <https://doi.org/10.3390/polym10030272>.
 81. Fuchs RK, Thompson WR, Warden SJ. Bone biology. Bone Repair Biomater., Elsevier; 2019, p. 15–52. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102451-5.00002-0>.
 82. Fujisawa R, Tamura M. Acidic bone matrix proteins and their roles in calcification. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012;17:1891–903. PMID:22201843. .

83. Gao YH, Yamaguchi M. Suppressive Effect of Genistein on Rat Bone Osteoclasts: Apoptosis Is Induced through Ca²⁺ Signaling. *Biol Pharm Bull.* 1999;22:805–9. doi: <https://doi.org/10.1248/bpb.22.805>.
84. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem.* 2003;88:873–84. doi: <https://doi.org/10.1002/jcb.10435>.
85. Ghassemi T, Shahroodi A, Ebrahimzadeh MH, Mousavian A, Movaffagh J, Moradi A. Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. *Arch Bone Jt Surg.* 2018;6:90–9. PMID:29600260. .
86. Gibson LJ. The mechanical behaviour of cancellous bone. *J Biomech.* 1985;18:317–28. doi: [https://doi.org/10.1016/0021-9290\(85\)90287-8](https://doi.org/10.1016/0021-9290(85)90287-8).
87. Glatt V, Evans CH, Tetsworth K. A concert between biology and biomechanics: The influence of the mechanical environment on bone healing. *Front Physiol.* 2017;7. doi: <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00678>.
88. Gomar F, Orozco R, Villar JL, Arrizabalaga F. P-15 small peptide bone graft substitute in the treatment of non-unions and delayed union. A pilot clinical trial. *Int Orthop.* 2007;31:93–9. doi: <https://doi.org/10.1007/s00264-006-0087-x>.
89. Gómez-Cerezo N, Casarrubios L, Saiz-Pardo M, Ortega L, de Pablo D, Díaz-Güemes I, Fernández-Tomé B, Enciso S, Sánchez-Margallo FM, Portolés MT, Arcos D, Vallet-Regí M. Mesoporous bioactive glass/ ϵ -polycaprolactone scaffolds promote bone regeneration in osteoporotic sheep. *Acta Biomater.* 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2019.04.019>.
90. Goonoo N, Bhaw-Luximon A. Mimicking growth factors: role of small molecule scaffold additives in promoting tissue regeneration and repair. *RSC Adv.* 2019;9:18124–46. doi: <https://doi.org/10.1039/C9RA02765C>.
91. Gorbunoff MJ, Timasheff SN. The interaction of proteins with hydroxyapatite: III. Mechanism. *Anal Biochem.* 1984;136:440–5. doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90241-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90241-0).
92. Gregor A, Filová E, Novák M, Kronek J, Chlup H, Buzgo M, Blahnová V, Lukášová V, Bartoš M, Nečas A, Hošek J. Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. *J Biol Eng.* 2017;11:31. PMID:29046717. doi: <https://doi.org/10.1186/s13036-017-0074-3>.
93. Grüneboom A, Hawwari I, Weidner D, Culemann S, Müller S, Henneberg S, Brenzel A, Merz S, Bornemann L, Zec K, Wuelling M, Kling L, Hasenberg M, Voortmann S, Lang S, Baum W, Ohs A, Kruff O, Quick HH, Jäger M, Landgraeber S, Dudda M, Danuser R, Stein J V., Rohde M, Gelse K, Garbe AI, Adamczyk A, Westendorf AM, Hoffmann D, Christiansen S, Engel DR, Vortkamp A, Krönke G, Herrmann M, Kamradt T, Schett G, Hasenberg A, Gunzer M. A network of transcortical capillaries as mainstay for blood circulation in long bones. *Nat*

- Metab.* 2019;1:236–50. doi: <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0016-5>.
94. Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. 2003;5:1–16. PMID:14562275. doi: <https://doi.org/vol005a01> [pii].
 95. Ham AW, Cormack DH. *Histology*. Lippincott; 1979.
 96. Hamilton D, Ghrebi S, Kim H, Chehroudi B, Brunette D. Surface Topography and Cell Behavior. *Encycl. Biomater. Biomed. Eng. Second Ed. - Four Vol. Set*, CRC Press; 2008, p. 2551–61. doi: <https://doi.org/10.1201/b18990-246>.
 97. Han Y-J, Kang Y-H, Shivakumar SB, Bharti D, Son Y-B, Choi Y-H, Park W-U, Byun J-H, Rho G-J, Park B-W. Stem Cells from Cryopreserved Human Dental Pulp Tissues Sequentially Differentiate into Definitive Endoderm and Hepatocyte-Like Cells in vitro. *Int J Med Sci.* 2017;14:1418–29. PMID:29200956. doi: <https://doi.org/10.7150/ijms.22152>.
 98. Hannink G, Arts JJC. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration? *Injury.* 2011;42:S22–5. PMID:21714966. doi: <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.008>.
 99. Ho-Shui-Ling A, Bolander J, Rustom LE, Johnson AW, Luyten FP, Picart C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials.* 2018;180:143–62. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.017>.
 100. Hoang QQ, Sicheri F, Howard AJ, Yang DSC. Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature.* 2003;425:977–80. doi: <https://doi.org/10.1038/nature02079>.
 101. Holle AW, McIntyre AJ, Kehe J, Wijesekara P, Young JL, Vincent LG, Engler AJ. High content image analysis of focal adhesion-dependent mechanosensitive stem cell differentiation. *Integr Biol (United Kingdom).* 2016;8:1049–58. doi: <https://doi.org/10.1039/c6ib00076b>.
 102. Horch H-H, Sader R, Pautke C, Neff A, Deppe H, Kolk A. Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006;35:708–13. PMID:16690249. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2006.03.017>.
 103. Howard D, Buttery LD, Shakesheff KM, Roberts SJ. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J Anat.* 2008;213:66–72. PMID:18422523. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x>.
 104. Hsu Y-L, Liang H-L, Hung C-H, Kuo P-L. Syringetin, a flavonoid derivative in grape and wine, induces human osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein-2/extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *Mol Nutr Food Res.* 2009;53:1452–61. doi: <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800483>.

105. Huang B, Caetano G, Vyas C, Blaker JJ, Diver C, Bártolo P. Polymer-Ceramic Composite Scaffolds: The Effect of Hydroxyapatite and β -tri-Calcium Phosphate. *Mater (Basel, Switzerland)*. 2018a;11. PMID:29342890. doi: <https://doi.org/10.3390/ma11010129>.
106. Huang RL, Sun Y, Ho CK, Liu K, Tang QQ, Xie Y, Li Q. IL-6 potentiates BMP-2-induced osteogenesis and adipogenesis via two different BMPR1A-mediated pathways article. *Cell Death Dis*. 2018b;9. doi: <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0126-0>.
107. Huang W, Yang S, Shao J, Li Y-P. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci*. 2007;12:3068–92. PMID:17485283. .
108. Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, Ballestrem C. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol*. 2007;179:1043–57. doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.200703036>.
109. Hunter GK. Role of Osteopontin in Modulation of Hydroxyapatite Formation. *Calcif Tissue Int*. 2013;93:348–54. PMID:23334303. doi: <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9698-6>.
110. Huttenlocher A, Sandborg RR, Horwitz AF. Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. 1995;7:697–706. doi: [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80112-X](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80112-X).
111. Ibaraki K, Termine JD, Whitson SW, Young MF. Bone matrix mRNA expression in differentiating fetal bovine osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 1992;7:743–54. doi: <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650070704>.
112. Ito H, Akiyama H, Shigeno C, Iyama K, Matsuoka H, Nakamura T. Hedgehog Signaling Molecules in Bone Marrow Cells at the Initial Stage of Fracture Repair. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;262:443–51. doi: <https://doi.org/10.1006/BBRC.1999.1197>.
113. Jaidev LR, Chatterjee K. Surface functionalization of 3D printed polymer scaffolds to augment stem cell response. *Mater Des*. 2019;161:44–54. doi: <https://doi.org/10.1016/J.MATDES.2018.11.018>.
114. James AW. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Artic ID*. 2013;2013:17. doi: <https://doi.org/10.1155/2013/684736>.
115. Jammalamadaka U, Tappa K, Jammalamadaka U, Tappa K. Recent Advances in Biomaterials for 3D Printing and Tissue Engineering. *J Funct Biomater*. 2018;9:22. doi: <https://doi.org/10.3390/jfb9010022>.
116. Janners MY, Searls RL. Changes in rate of cellular proliferation during the differentiation of cartilage and muscle in the mesenchyme of the embryonic chick wing. *Dev Biol*. 1970;23:136–65. doi: [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(70\)80011-2](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(70)80011-2).
117. Janvikul W, Uppanan P, Thavornnyutikarn B, Kosorn W, Kaewkong P. Effects of Surface Topography, Hydrophilicity and Chemistry of Surface-treated PCL Scaffolds on Chondrocyte Infiltration and ECM Production. *Procedia Eng*. 2013;59:158–65. doi:

- <https://doi.org/10.1016/J.PROENG.2013.05.106>.
118. Jeong H, Asai J, Ushida T, Furukawa KS. Assessment of the Inner Surface Microstructure of Decellularized Cortical Bone by a Scanning Electron Microscope. *Bioengineering*. 2019a;6:86. doi: <https://doi.org/10.3390/bioengineering6030086>.
 119. Jeong J, Kim JH, Shim JH, Hwang NS, Heo CY. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomater Res*. 2019b;23. doi: <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0149-3>.
 120. Ji K, Wang Y, Wei Q, Zhang K, Jiang A, Rao Y, Cai X. Application of 3D printing technology in bone tissue engineering. *Bio-Design Manuf*. 2018;1:203–10. doi: <https://doi.org/10.1007/s42242-018-0021-2>.
 121. Jiang W, Shi J, Li W, Sun K. Morphology, wettability, and mechanical properties of polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds with interconnected pore structures fabricated by a mini-deposition system. *Polym Eng Sci*. 2012a;52:2396–402. doi: <https://doi.org/10.1002/pen.23193>.
 122. Jiang W, Shi J, Li W, Sun K. Three dimensional melt-deposition of polycaprolactone/bio-derived hydroxyapatite composite into scaffold for bone repair. 2012b. doi: <https://doi.org/10.1080/09205063.2012.698894>.
 123. Jing X, Mi H-Y, Turng L-S. Comparison between PCL/hydroxyapatite (HA) and PCL/halloysite nanotube (HNT) composite scaffolds prepared by co-extrusion and gas foaming. *Mater Sci Eng C*. 2017;72:53–61. doi: <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2016.11.049>.
 124. Jones JR, Lin S, Yue S, Lee PD, Hanna J V, Smith ME, Newport RJ. Bioactive glass scaffolds for bone regeneration and their hierarchical characterisation. *Proc Inst Mech Eng H*. 2010;224:1373–87. doi: <https://doi.org/10.1243/09544119JEIM836>.
 125. Kaigler D, Wang Z, Horger K, Mooney DJ, Krebsbach PH. VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects. *J Bone Miner Res*. 2006;21:735–44. PMID:16734388. doi: <https://doi.org/10.1359/jbmr.060120>.
 126. Kamiya N, Takagi M. Differential Expression of Dentin Matrix Protein 1, Type I Collagen And Osteocalcin Genes in Rat Developing Mandibular Bone. *Histochem J*. 2001;33:545–52. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1014955925339>.
 127. Kanafi MM, Ramesh A, Gupta PK, Bhonde RR. Dental pulp stem cells immobilized in alginate microspheres for applications in bone tissue engineering. *Int Endod J*. 2014;47:687–97. PMID:24127887. doi: <https://doi.org/10.1111/iej.12205>.
 128. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005;26:5474–91. PMID:15860204. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>.
 129. Kargozar S, Mozafari M, Hamzehlou S, Brouki Milan P, Kim H-W, Baino F. Bone Tissue Engineering Using Human Cells: A Comprehensive Review on Recent Trends, Current Prospects, and

- Recommendations. *Appl Sci*. 2019;9:174. doi: <https://doi.org/10.3390/app9010174>.
130. Kasuga T, Ota Y, Nogami M, Abe Y. Preparation and mechanical properties of polylactic acid composites containing hydroxyapatite fibers. *Biomaterials*. 2000;22:19–23. doi: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00091-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00091-0).
 131. Khalili AA, Ahmad MR. A Review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. *Int J Mol Sci*. 2015;16:18149–84. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms160818149>.
 132. Kheirallah M, Almehaly H. Present Strategies for Critical Bone Defects Regeneration. *Oral Heal Case Reports*. 2016;02. doi: <https://doi.org/10.4172/2471-8726.1000127>.
 133. Kim BS, Yang SS, Kim CS. Incorporation of BMP-2 nanoparticles on the surface of a 3D-printed hydroxyapatite scaffold using an ϵ -polycaprolactone polymer emulsion coating method for bone tissue engineering. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2018a;170:421–9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.043>.
 134. Kim B, Ventura R, Lee B-T. Functionalization of porous BCP scaffold by generating cell-derived extracellular matrix from rat bone marrow stem cells culture for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018b;12:e1256–67. doi: <https://doi.org/10.1002/term.2529>.
 135. Kim DK, Kim JI, Hwang TI, Sim BR, Khang G. Bioengineered Osteoinductive *Broussonetia kazinoki* /Silk Fibroin Composite Scaffolds for Bone Tissue Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017a;9:1384–94. doi: <https://doi.org/10.1021/acsami.6b14351>.
 136. Kim J, Kim HN, Lim K-T, Kim Y, Pandey S, Garg P, Choung Y-H, Choung P-H, Suh K-Y, Chung JH. Synergistic effects of nanotopography and co-culture with endothelial cells on osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2013;34:7257–68. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.029>.
 137. Kim J-W, Shin K-H, Koh Y-H, Hah MJ, Moon J, Kim H-E. Production of Poly(ϵ -Caprolactone)/Hydroxyapatite Composite Scaffolds with a Tailored Macro/Micro-Porous Structure, High Mechanical Properties, and Excellent Bioactivity. *Mater (Basel, Switzerland)*. 2017b;10. PMID:28937605. doi: <https://doi.org/10.3390/ma10101123>.
 138. Kim MS, Kim AY, Jang KJ, Kim JH, Kim JB, Suh KY. Effect of nanogroove geometry on adipogenic differentiation. *Nanotechnology*. 2011;22:494017. PMID:22101869. doi: <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/49/494017>.
 139. Kim S-S, Sun Park M, Jeon O, Yong Choi C, Kim B-S. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27:1399–409. doi: <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2005.08.016>.
 140. Kim W-K, Meliton V, Bourquard N, Hahn TJ, Parhami F. Hedgehog signaling and osteogenic differentiation in multipotent bone marrow

- stromal cells are inhibited by oxidative stress. *J Cell Biochem.* 2010;111:1199–209. doi: <https://doi.org/10.1002/jcb.22846>.
141. Kim YS, Majid M, Melchiorri AJ, Mikos AG. Applications of decellularized extracellular matrix in bone and cartilage tissue engineering. *Bioeng Transl Med.* 2019;4:83–95. doi: <https://doi.org/10.1002/btm2.10110>.
 142. Kimura H, Ng JMY, Curran T. Transient Inhibition of the Hedgehog Pathway in Young Mice Causes Permanent Defects in Bone Structure. *Cancer Cell.* 2008;13:249–60. PMID:18328428. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.01.027>.
 143. Klammert U, Gbureck U, Vorndran E, Rödiger J, Meyer-Marcotty P, Kübler AC. 3D powder printed calcium phosphate implants for reconstruction of cranial and maxillofacial defects. *J Cranio-Maxillofacial Surg.* 2010;38:565–70. doi: <https://doi.org/10.1016/J.JCMS.2010.01.009>.
 144. Ko E, Cho SW. Biomimetic polymer scaffolds to promote stem cell-mediated osteogenesis. *Int J Stem Cells.* 2013;6:87–91. doi: <https://doi.org/10.15283/ijsc.2013.6.2.87>.
 145. Koizumi K, Saitoh Y, Minami T, Takeno N, Tsuneyama K, Miyahara T, Nakayama T, Sakurai H, Takano Y, Nishimura M, Imai T, Yoshie O, Saiki I. Role of CX3CL1/Fractalkine in Osteoclast Differentiation and Bone Resorption. *J Immunol.* 2009;183:7825–31. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803627>.
 146. Krishna L, Dhamodaran K, Jayadev C, Chatterjee K, Shetty R, Khora SS, Das D. Nanostructured scaffold as a determinant of stem cell fate. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7. doi: <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0440-y>.
 147. Krishnan L, Willett NJ, Gulberg RE. Vascularization Strategies for Bone Regeneration. *Ann Biomed Eng.* 2014;42:432–44. PMID:24468975. doi: <https://doi.org/10.1007/s10439-014-0969-9>.
 148. Kuboki Y, Jin Q, Takita H. Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A Suppl 1:S105-15. PMID:11314788. .
 149. Kumar A, Nune KC, Misra RDK. Biological functionality of extracellular matrix-ornamented three-dimensional printed hydroxyapatite scaffolds. *J Biomed Mater Res Part A.* 2016;104:1343–51. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35664>.
 150. Kuss MA, Wu S, Wang Y, Untrauer JB, Li W, Lim JY, Duan B. Prevascularization of 3D printed bone scaffolds by bioactive hydrogels and cell co-culture. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2018;106:1788–98. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33994>.
 151. Kutys ML, Doyle AD, Yamada KM. Regulation of cell adhesion and migration by cell-derived matrices. *Exp Cell Res.* 2013;319:2434–9. PMID:23751565. doi: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.05.030>.
 152. Lam CX., Mo X., Teoh S., Hutmacher D. Scaffold development using

- 3D printing with a starch-based polymer. *Mater Sci Eng C*. 2002;20:49–56. doi: [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(02\)00012-7](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(02)00012-7).
153. Langenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4:117. doi: <https://doi.org/10.1186/scrt328>.
154. Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices*. 2006;3:49–57. doi: <https://doi.org/10.1586/17434440.3.1.49>.
155. Lee EJ, Kasper FK, Mikos AG. Biomaterials for tissue engineering. *Ann Biomed Eng*. 2014;42:323–37. PMID:23820768. doi: <https://doi.org/10.1007/s10439-013-0859-6>.
156. Lee J, Abdeen AA, Kilian KA. Rewiring mesenchymal stem cell lineage specification by switching the biophysical microenvironment. *Sci Rep*. 2015;4:5188. doi: <https://doi.org/10.1038/srep05188>.
157. Leong KF, Cheah CM, Chua CK. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials*. 2003;24:2363–78. doi: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00030-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00030-9).
158. Leukers B, Güllkan H, Irsen SH, Milz S, Tille C, Schieker M, Seitz H. Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing. *J Mater Sci Mater Med*. 2005;16:1121–4. doi: <https://doi.org/10.1007/s10856-005-4716-5>.
159. Li H, He J, Yu H, Green CR, Chang J. Bioglass promotes wound healing by affecting gap junction connexin 43 mediated endothelial cell behavior. *Biomaterials*. 2016;84:64–75. doi: <https://doi.org/10.1016/j.BIOMATERIALS.2016.01.033>.
160. Li R, McCarthy A, Zhang YS, Xie J. Decorating 3D Printed Scaffolds with Electrospun Nanofiber Segments for Tissue Engineering. *Adv Biosyst*. 2019;3:1900137. doi: <https://doi.org/10.1002/adbi.201900137>.
161. Li VC, Kirschner MW. Molecular ties between the cell cycle and differentiation in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:9503–8. PMID:24979803. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1408638111>.
162. Li W, Yan Z, Ren J, Qu X. Manipulating cell fate: dynamic control of cell behaviors on functional platforms. *Chem Soc Rev*. 2018;47:8639–84. doi: <https://doi.org/10.1039/c8cs00053k>.
163. Lian JB, McKee MD, Todd AM, Gerstenfeld LC. Induction of bone-related proteins, osteocalcin and osteopontin, and their matrix ultrastructural localization with development of chondrocyte hypertrophy in vitro. *J Cell Biochem*. 1993;52:206–19. doi: <https://doi.org/10.1002/jcb.240520212>.
164. Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, Stein JL, Hassan MQ, Gaur T, Zhang Y. MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8:212–27. PMID:22290358. doi:

- <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.234>.
165. Liao J, Guo X, Grande-Allen KJ, Kasper FK, Mikos AG. Bioactive polymer/extracellular matrix scaffolds fabricated with a flow perfusion bioreactor for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2010a;31:8911–20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.110>.
166. Liao J, Guo X, Nelson D, Kasper FK, Mikos AG. Modulation of osteogenic properties of biodegradable polymer/extracellular matrix scaffolds generated with a flow perfusion bioreactor. *Acta Biomater*. 2010b;6:2386–93. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.01.011>.
167. Lien S-M, Ko L-Y, Huang T-J. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomater*. 2009;5:670–9. PMID:18951858. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.020>.
168. Lin X, Shanmugasundaram S, Liu Y, Derrien A, Nurminskaya M, Zamora PO. B2A peptide induces chondrogenic differentiation in vitro and enhances cartilage repair in rats. *J Orthop Res*. 2012;30:1221–8. doi: <https://doi.org/10.1002/jor.22078>.
169. Lindley EM, Guerra FA, Krauser JT, Matos SM, Burger EL, Patel V V. Small peptide (P-15) bone substitute efficacy in a rabbit cancellous bone model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;94:463–8. PMID:20578227. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31676>.
170. Lisignoli G, Toneguzzi S, Piacentini A, Cattini L, Lenti A, Tschon M, Cristino S, Grassi F, Facchini A. Human osteoblasts express functional CXC chemokine receptors 3 and 5: Activation by their ligands, CXCL10 and CXCL13, significantly induces alkaline phosphatase and β -N-acetylhexosaminidase release. *J Cell Physiol*. 2003;194:71–9. doi: <https://doi.org/10.1002/jcp.10188>.
171. Little RD, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao S-C, Eustace B, Lappe MM, Spitzer L, Zweier S, Braunschweiger K, Benchekroun Y, Hu X, Adair R, Chee L, FitzGerald MG, Tulig C, Caruso A, Tzellas N, Bawa A, Franklin B, McGuire S, Nogue X, Gong G, Allen KM, Anisowicz A, Morales AJ, Lomedico PT, Recker SM, Van Eerdewegh P, Recker RR, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Johnson ML. A Mutation in the LDL Receptor–Related Protein 5 Gene Results in the Autosomal Dominant High–Bone–Mass Trait. *Am J Hum Genet*. 2002;70:11–9. PMID:11741193. doi: <https://doi.org/10.1086/338450>.
172. Liu S, Zhang H, Zhang X, Lu W, Huang X, Xie H, Zhou J, Wang W, Zhang Y, Liu Y, Deng Z, Jin Y. Synergistic angiogenesis promoting effects of extracellular matrix scaffolds and adipose-derived stem cells during wound repair. *Tissue Eng Part A*. 2011;17:725–39. PMID:20929282. doi: <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2010.0331>.
173. Liu Y, Lin X, Takahashi K, Zamora PO. B2A, a receptor modulator, increases the growth of pluripotent and preosteoblast cells through bone

- morphogenetic protein receptors. *Growth Factors*. 2012;30:410–7. doi: <https://doi.org/10.3109/08977194.2012.745520>.
174. Liu YC, Kao YT, Huang WK, Lin KY, Wu SC, Hsu SC, Schuyler SC, Li LY, Lu FL, Lu J. CCL5/RANTES is important for inducing osteogenesis of human mesenchymal stem cells and is regulated by dexamethasone. *Biosci Trends*. 2014;8:138–43. doi: <https://doi.org/10.5582/bst.2014.01047>.
175. Lobel KD, Hench LL. In-vitro protein interactions with a bioactive glass. *J Sol-Gel Sci Technol*. 1996;7:69–76. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00401885>.
176. Lock A, Cornish J, Musson DS. The role of in vitro immune response assessment for biomaterials. *J Funct Biomater*. 2019;10. doi: <https://doi.org/10.3390/jfb10030031>.
177. Loh QL, Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng Part B Rev*. 2013;19:485–502. PMID:23672709. doi: <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2012.0437>.
178. Łos MJ, Skubis A, Ghavami S. Stem Cells. *Stem Cells Biomater. Regen. Med.*, Elsevier; 2019, p. 5–16. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812258-7.00002-2>.
179. Lowry KJ, Hamson KR, Bear L, Peng YB, Calaluce R, Evans ML, Anglen JO, Allen WC. Polycaprolactone/glass bioabsorbable implant in a rabbit humerus fracture model. *J Biomed Mater Res*. 1997;36:536–41. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19970915\)36:4<536::AID-JBM12>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19970915)36:4<536::AID-JBM12>3.0.CO;2-8).
180. Luo L, He Y, Wang X, Key B, Lee BH, Li H, Ye Q. Potential Roles of Dental Pulp Stem Cells in Neural Regeneration and Repair. *Stem Cells Int*. 2018;2018:1731289. PMID:29853908. doi: <https://doi.org/10.1155/2018/1731289>.
181. Ma Z, Mao Z, Gao C. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007;60:137–57. PMID:17683921. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.06.019>.
182. Manolagas SC. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000;21:115–37. doi: <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0395>.
183. Mao D, Li Q, Li D, Chen Y, Chen X, Xu X. Fabrication of 3D porous poly(lactic acid)-based composite scaffolds with tunable biodegradation for bone tissue engineering. *Mater Des*. 2018;142:1–10. doi: <https://doi.org/10.1016/J.MATDES.2018.01.016>.
184. Marra KG, Szem JW, Kumta PN, DiMilla PA, Weiss LE. In vitro analysis of biodegradable polymer blend/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res*. 1999;47:324–35. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19991205\)47:3<324::AID-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19991205)47:3<324::AID-)

- JBM6>3.0.CO;2-Y.
185. Martin RB, Burr DB, Sharkey NA, Fyhrie DP. Skeletal Tissue Mechanics. New York, NY: Springer New York; 2015. doi: <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3002-9>.
 186. Mascharak S, Benitez PL, Proctor AC, Madl CM, Hu KH, Dewi RE, Butte MJ, Heilshorn SC. YAP-dependent Mechanotransduction is Required for Proliferation and Migration on Native-like Substrate Topography HHS Public Access. *Biomaterials*. 2017;115:155–66. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.11.019>.
 187. McColl BK, Stacker SA, Achen MG. Molecular regulation of the VEGF family - Inducers of angiogenesis and lymphangiogenesis. *APMIS*. 2004;112:463–80. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2004.apm11207-0807.x>.
 188. McGrail DJ, Khambhati NN, Qi MX, Patel KS, Ravikumar N, Brandenburg CP, Dawson MR. Alterations in ovarian cancer cell adhesion drive taxol resistance by increasing microtubule dynamics in a FAK-dependent manner. *Sci Rep*. 2015;5. doi: <https://doi.org/10.1038/srep09529>.
 189. McKee TJ, Perlman G, Morris M, Komarova S V. Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2019;9:10542. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46896-0>.
 190. McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol*. 2003;53:1–114. PMID:12509125. .
 191. Miao Y, Chen Y, Liu X, Diao J, Zhao N, Shi X, Wang Y. Melatonin decorated 3D-printed beta-tricalcium phosphate scaffolds promoting bone regeneration in a rat calvarial defect model. *J Mater Chem B*. 2019;7:3250–9. doi: <https://doi.org/10.1039/c8tb03361g>.
 192. Mihaila SM, Gaharwar AK, Reis RL, Khademhosseini A, Marques AP, Gomes ME. The osteogenic differentiation of SSEA-4 sub-population of human adipose derived stem cells using silicate nanoplatelets. *Biomaterials*. 2014;35:9087–99. PMID:25123923. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.052>.
 193. Mitton-Fitzgerald E, Gohr CM, Bettendorf B, Rosenthal AK. The Role of ANK in Calcium Pyrophosphate Deposition Disease. *Curr Rheumatol Rep*. 2016;18:25. PMID:27032788. doi: <https://doi.org/10.1007/s11926-016-0574-z>.
 194. Mochida Y, Parisuthiman D, Pornprasertsuk-Damrongsri S, Atsawasuwan P, Sricholpech M, Boskey AL, Yamauchi M. Decorin modulates collagen matrix assembly and mineralization. *Matrix Biol*. 2009;28:44. PMID:19049867. doi: <https://doi.org/10.1016/J.MATBIO.2008.11.003>.
 195. Mohamed AM. An overview of bone cells and their regulating factors of differentiation. *Malays J Med Sci*. 2008;15:4–12. PMID:22589609. .

196. Moore MC, Pandolfi V, Mcfetridge PS. Novel human-derived extracellular matrix induces in vitro and in vivo vascularization and inhibits fibrosis. 2015. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.022>.
197. Morgan EF, Barnes GL, Thomas EA. Chapter 1: the Bone Organ System: Form and Function. *Osteoporosis*. 2008;3–25. doi: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012470862-4/50002-7>.
198. Mori G, Brunetti G, Oranger A, Carbone C, Ballini A, Muzio L Lo, Colucci S, Mori C, Grassi FR, Grano M. Dental pulp stem cells: osteogenic differentiation and gene expression. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1237:47–52. PMID:22082364. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06234.x>.
199. Motealleh A, Eqtesadi S, Civantos A, Pajares A, Miranda P. Robocast 45S5 bioglass scaffolds: in vitro behavior. *J Mater Sci*. 2017;52:9179–91. doi: <https://doi.org/10.1007/s10853-017-0775-5>.
200. Mullins E, Forgues C, Kingsley K, Mullins E, Forgues C, Kingsley K. Effects of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) on Dental Pulp Stem Cells (DPSC). *Curr Res Med 2019, Vol 9, Page 1*. 2019;9:1–8. doi: <https://doi.org/10.3844/AMJSP.2019.1.8>.
201. Murphy CM, O'Brien FJ, Little DG, Schindeler A. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *Eur Cell Mater*. 2013a;26:120–32. PMID:24052425. .
202. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: Environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med*. 2013b;45. doi: <https://doi.org/10.1038/emm.2013.94>.
203. Murphy S V, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol*. 2014;32:773–85. doi: <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>.
204. Murphy WL, McDevitt TC, Engler AJ. Materials as stem cell regulators. *Nat Mater*. 2014;13:547–57. PMID:24845994. doi: <https://doi.org/10.1038/nmat3937>.
205. Murshed M, McKee MD. Molecular determinants of extracellular matrix mineralization in bone and blood vessels. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010;19:359–65. PMID:20489614. doi: <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e3283393a2b>.
206. Musina RA, Bekchanova ES, Sukhikh GT. Comparison of Mesenchymal Stem Cells Obtained from Different Human Tissues. *Bull Exp Biol Med*. 2005;139:504–9. doi: <https://doi.org/10.1007/s10517-005-0331-1>.
207. Naderi H, Matin MM, Bahrami AR. Review paper: Critical issues in tissue engineering: Biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. *J Biomater Appl*. 2011;26:383–417. doi: <https://doi.org/10.1177/0885328211408946>.
208. Nakamura M, Sone S, Takahashi I, Mizoguchi I, Echigo S, Sasano Y. Expression of Versican and ADAMTS1, 4, and 5 During Bone Development in the Rat Mandible and Hind Limb. *J Histochem*

- Cytochem.* 2005;53:1553–62. PMID:15983115. doi: <https://doi.org/10.1369/jhc.5A6669.2005>.
209. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell.* 2002;108:17–29. doi: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00622-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00622-5).
210. Narayanan G, Vernekar VN, Kuyinu EL, Laurencin CT. Poly (lactic acid)-based biomaterials for orthopaedic regenerative engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;107:247–76. PMID:27125191. doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.015>.
211. Naruse K, Urabe K, Mukaida T, Ueno T, Migishima F, Oikawa A, Mikuni-Takagaki Y, Itoman M. Spontaneous differentiation of mesenchymal stem cells obtained from fetal rat circulation. *Bone.* 2004;35:850–8. PMID:15454092. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2004.05.006>.
212. Nastase M V, Young MF, Schaefer L. Biglycan: a multivalent proteoglycan providing structure and signals. *J Histochem Cytochem.* 2012;60:963–75. PMID:22821552. doi: <https://doi.org/10.1369/0022155412456380>.
213. zur Nieden NI, Kempka G, Rancourt DE, Ahr H-J. Induction of chondro-, osteo- and adipogenesis in embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2: effect of cofactors on differentiating lineages. *BMC Dev Biol.* 2005;5:1. PMID:15673475. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-213X-5-1>.
214. Niinomi M. Recent metallic materials for biomedical applications. *Metall Mater Trans A.* 2002;33:477–86. doi: <https://doi.org/10.1007/s11661-002-0109-2>.
215. Niu H, Lin D, Tang W, Ma Y, Duan B, Yuan Y, Liu C. Surface Topography Regulates Osteogenic Differentiation of MSCs via Crosstalk between FAK/MAPK and ILK/ β -Catenin Pathways in a Hierarchically Porous Environment. *ACS Biomater Sci Eng.* 2017;3:3161–75. doi: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00315>.
216. Noh YK, Du P, Kim IG, Ko J, Kim SW, Park K. Polymer mesh scaffold combined with cell-derived ECM for osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Biomater Res.* 2016;20. doi: <https://doi.org/10.1186/s40824-016-0055-5>.
217. Notoya M, Tsukamoto Y, Nishimura H, Woo J-T, Nagai K, Lee I-S, Hagiwara H. Quercetin, a flavonoid, inhibits the proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblasts in vitro. *Eur J Pharmacol.* 2004;485:89–96. doi: <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2003.11.058>.
218. Ohashi K, Fujiwara S, Mizuno K. Roles of the cytoskeleton, cell adhesion and rho signalling in mechanosensing and mechanotransduction. *J Biochem.* 2017;161:mvw082. PMID:28082721.

- doi: <https://doi.org/10.1093/jb/mvw082>.
219. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch.* 2010;77:4–12. PMID:20154452. .
220. Ortega N, Behonick DJ, Werb Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol.* 2004;14:86–93. doi: <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2003.12.003>.
221. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol.* 1990;143:420–30. doi: <https://doi.org/10.1002/jcp.1041430304>.
222. Ozdemir B, Kurtis B, Tuter G, Senguven B, Yildirim B. Osteocalcin and osteonectin expression after double application of platelet-rich plasma in rabbits. *J Istanbul Univ Fac Dent.* 2016;50:1–9. PMID:28955559. doi: <https://doi.org/10.17096/jiufd.40536>.
223. Ozdil D, Aydin HM. Polymers for medical and tissue engineering applications. *J Chem Technol Biotechnol.* 2014;89:1793–810. doi: <https://doi.org/10.1002/jctb.4505>.
224. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* 2002;115:3861–3. PMID:12244123. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.00059>.
225. Pati F, Song TH, Rijal G, Jang J, Kim SW, Cho DW. Ornamenting 3D printed scaffolds with cell-laid extracellular matrix for bone tissue regeneration. *Biomaterials.* 2015;37:230–41. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.012>.
226. Paz AG, Maghaireh H, Mangano FG. Stem Cells in Dentistry: Types of Intra- and Extraoral Tissue-Derived Stem Cells and Clinical Applications. *Stem Cells Int.* 2018;2018:4313610. PMID:30057624. doi: <https://doi.org/10.1155/2018/4313610>.
227. Pei B, Wang W, Fan Y, Wang X, Watari F, Li X. Fiber-reinforced scaffolds in soft tissue engineering. *Regen Biomater.* 2017;4:257–68. PMID:28798872. doi: <https://doi.org/10.1093/rb/rbx021>.
228. Pellet-Many C. Chemotactic migration of endothelial cells towards VEGF-A165. *Methods Mol Biol.* 2015;1332:151–7. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2917-7_11.
229. Perez JR, Kouroupis D, Li DJ, Best TM, Kaplan L, Correa D. Tissue Engineering and Cell-Based Therapies for Fractures and Bone Defects. *Front Bioeng Biotechnol.* 2018;6:105. PMID:30109228. doi: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00105>.
230. Phadke A, Hwang Y, Hee Kim S, Hyun Kim S, Yamaguchi T, Masuda K, Varghese S. Effect of scaffold microarchitecture on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Eur Cells Mater.*

- 2013;25:114–29. doi: <https://doi.org/10.22203/ecm.v025a08>.
231. Phadnis SM, Joglekar M V., Dalvi MP, Muthyala S, Nair PD, Ghaskadbi SM, Bhonde RR, Hardikar AA. Human bone marrow-derived mesenchymal cells differentiate and mature into endocrine pancreatic lineage in vivo. *Cytotherapy*. 2011;13:279–93. doi: <https://doi.org/10.3109/14653249.2010.523108>.
232. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, Becchetti E, Marchionni C, Alviano F, Fossati V, Staffolani N, Franchina M, Grossi A, Bagnara GP. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*. 2005;80:836–42. PMID:16210973. .
233. Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P. Cell fitting to adhesive surfaces: A prerequisite to firm attachment and subsequent events. *Eur Cells Mater*. 2002;3:31–45. PMID:14562252. doi: <https://doi.org/10.22203/ecm.v003a04>.
234. Polak JM, Bishop AE. Stem cells and tissue engineering: Past, present, and future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1068, Blackwell Publishing Inc.; 2006, p. 352–66. doi: <https://doi.org/10.1196/annals.1346.001>.
235. Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog*. 2009;25:1539–60. doi: <https://doi.org/10.1002/btpr.246>.
236. Preissner KT, Seiffert D. Role of Vitronectin and Its Receptors in Haemostasis and Vascular Remodeling. *Thromb Res*. 1998;89:1–21. doi: [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(97\)00298-3](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(97)00298-3).
237. Provenzano PP, Keely PJ. Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase signaling. *J Cell Sci*. 2011;124:1195–205. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.067009>.
238. Qi X, Wang H, Zhang Y, Pang L, Xiao W, Jia W, Zhao S, Wang D, Huang W, Wang Q. Mesoporous bioactive glass-coated 3D printed borosilicate bioactive glass scaffolds for improving repair of bone defects. *Int J Biol Sci*. 2018;14:471–84. doi: <https://doi.org/10.7150/ijbs.23872>.
239. Qian JJ, Bhatnagar RS. Enhanced cell attachment to anorganic bone mineral in the presence of a synthetic peptide related to collagen. *J Biomed Mater Res*. 1996;31:545–54. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199608\)31:4<545::AID-JBM15>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199608)31:4<545::AID-JBM15>3.0.CO;2-F).
240. Rahaman MN, Day DE, Sonny Bal B, Fu Q, Jung SB, Bonewald LF, Tomsia AP. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomater*. 2011;7:2355–73. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.016>.
241. Reimer A. Analysis of human stem cell interactions at the single cell resolution. *Drug Target Rev*. 2016;3:43–6.
242. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and

- bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27:3413–31. doi: <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.01.039>.
243. Roberts SJ, Chen Y, Moesen M, Schrooten J, Luyten FP. Enhancement of osteogenic gene expression for the differentiation of human periosteal derived cells. *Stem Cell Res*. 2011;7:137–44. PMID:21763621. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2011.04.003>.
244. Robey P. Bone Matrix Proteoglycans and Glycoproteins. *Princ. Bone Biol.*, Elsevier; 2002, p. 225–37. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-012098652-1/50116-5>.
245. Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, Grigolo B. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C*. 2017;78:1246–62. PMID:28575964. doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>.
246. Rutkovskiy A, Stensløkken K-O, Vaage JJ. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Med Sci Monit Basic Res*. 2016;22:95–106. PMID:27667570. doi: <https://doi.org/10.12659/MSMBR.901142>.
247. Saberianpour S, Heidarzadeh M, Geranmayeh MH, Hosseinkhani H, Rahbarghazi R, Nouri M. Tissue engineering strategies for the induction of angiogenesis using biomaterials. *J Biol Eng*. 2018;12:36. PMID:30603044. doi: <https://doi.org/10.1186/s13036-018-0133-4>.
248. Sabir MI, Xu X, Li L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *J Mater Sci*. 2009;44:5713–24. doi: <https://doi.org/10.1007/s10853-009-3770-7>.
249. Sabree I, Gough JE, Derby B. Mechanical properties of porous ceramic scaffolds: Influence of internal dimensions. *Ceram Int*. 2015;41:8425–32. doi: <https://doi.org/10.1016/J.CERAMINT.2015.03.044>.
250. Sacchetti B, Funari A, Remoli C, Giannicola G, Kogler G, Liedtke S, Cossu G, Serafini M, Sampaolesi M, Tagliafico E, Tenedini E, Saggio I, Robey PG, Riminucci M, Bianco P. No Identical “Mesenchymal Stem Cells” at Different Times and Sites: Human Committed Progenitors of Distinct Origin and Differentiation Potential Are Incorporated as Adventitial Cells in Microvessels. *Stem Cell Reports*. 2016;6:897–913. doi: <https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2016.05.011>.
251. Salvay DM, Rives CB, Zhang X, Chen F, Kaufman DB, Lowe WL, Shea LD. Extracellular matrix protein-coated scaffolds promote the reversal of diabetes after extrahepatic islet transplantation. *Transplantation*. 2008;85:1456–64. doi: <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31816fc0ea>.
252. Santo VE, Gomes ME, Mano JF, Reis RL. Controlled release strategies for bone, cartilage, and osteochondral engineering-part i: Recapitulation of native tissue healing and variables for the design of delivery systems. *Tissue Eng - Part B Rev*. 2013;19:308–26. doi: <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0138>.
253. Saşmazel HT, Gümüşderelioğlu M, Gürpınar A, Onur MA. Comparison

- of cellular proliferation on dense and porous PCL scaffolds. *Biomed Mater Eng*. 2008;18:119–28. PMID:18725692. .
254. Scaffaro R, Lopresti F, Botta L, Rigogliuso S, Gherzi G. Integration of PCL and PLA in a monolithic porous scaffold for interface tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016;63:303–13. doi: <https://doi.org/10.1016/J.JMBBM.2016.06.021>.
 255. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol*. 2008;19:459–66. doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.07.004>.
 256. Schlundt C, El Khassawna T, Serra A, Dienelt A, Wendler S, Schell H, van Rooijen N, Radbruch A, Lucius R, Hartmann S, Duda GN, Schmidt-Bleek K. Macrophages in bone fracture healing: Their essential role in endochondral ossification. *Bone*. 2018;106:78–89. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.10.019>.
 257. Shanjani Y, Hu Y, Pilliar RM, Toyserkani E. Mechanical characteristics of solid-freeform-fabricated porous calcium polyphosphate structures with oriented stacked layers. *Acta Biomater*. 2011;7:1788–96. doi: <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2010.12.017>.
 258. Shanmugam K, Sahadevan R. Bioceramics—An introductory overview. *Fundam. Biomater. Ceram.*, Elsevier; 2018, p. 1–46. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102203-0.00001-9>.
 259. Silver IA, Deas J, Ercińska M. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. *Biomaterials*. 2001;22:175–85. PMID:11101161. .
 260. Song L, Zhao J, Zhang X, Li H, Zhou Y. Icariin induces osteoblast proliferation, differentiation and mineralization through estrogen receptor-mediated ERK and JNK signal activation. *Eur J Pharmacol*. 2013;714:15–22. doi: <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2013.05.039>.
 261. Soriente A, Fasolino I, Raucci MG, Demitri C, Madaghiele M, Giuri A, Sannino A, Ambrosio L. Effect of inorganic and organic bioactive signals decoration on the biological performance of chitosan scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2018;29. doi: <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6072-2>.
 262. Srinivasan S, Jayasree R, Chennazhi KP, Nair SV, Jayakumar R. Biocompatible alginate/nano bioactive glass ceramic composite scaffolds for periodontal tissue regeneration. *Carbohydr Polym*. 2012;87:274–83. doi: <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2011.07.058>.
 263. Srivastava S, Bankar R, Roy P. Assessment of the role of flavonoids for inducing osteoblast differentiation in isolated mouse bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Phytomedicine*. 2013;20:683–90. doi: <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2013.03.001>.
 264. Stock P, Brückner S, Winkler S, Dollinger M, Christ B. Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Hepatocytes Improve the Mouse Liver after Acute Acetaminophen Intoxication by Preventing

- Progress of Injury. *Int J Mol Sci.* 2014;15:7004–28. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms15047004>.
265. Su DL, Lu ZM, Shen MN, Li X, Sun LY. Roles of pro- and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of SLE. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012. doi: <https://doi.org/10.1155/2012/347141>.
266. Su P, Tian Y, Yang C, Ma X, Wang X, Pei J, Qian A. Mesenchymal Stem Cell Migration during Bone Formation and Bone Diseases Therapy. *Int J Mol Sci.* 2018;19:2343. PMID:30096908. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms19082343>.
267. T. A, C. J. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001;10:S96–101. PMID:11716023. doi: <https://doi.org/10.1007/s005860100282>.
268. Takeuchi Y, Kodama Y, Matsumoto T. Bone matrix decorin binds transforming growth factor-beta and enhances its bioactivity. *J Biol Chem.* 1994;269:32634–8. PMID:7798269. .
269. Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H, Sato S. In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology.* 2013;101:121–32. PMID:22772774. doi: <https://doi.org/10.1007/s10266-012-0075-0>.
270. Tamburaci S, Tihminlioglu F. Biosilica incorporated 3D porous scaffolds for bone tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C.* 2018;91:274–91. doi: <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2018.05.040>.
271. Thibault RA, Mikos AG, Kasper FK. Protein and mineral composition of osteogenic extracellular matrix constructs generated with a flow perfusion bioreactor. *Biomacromolecules.* 2011;12:4204–12. doi: <https://doi.org/10.1021/bm200975a>.
272. Tominari T, Hirata M, Matsumoto C, Inada M, Miyaura C. Polymethoxy Flavonoids, Nobiletin and Tangeretin, Prevent Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Bone Loss in an Experimental Model for Periodontitis. *J Pharmacol Sci.* 2012;119:390–4. doi: <https://doi.org/10.1254/jphs.11188SC>.
273. Toyosawa S, Shintani S, Fujiwara T, Ooshima T, Sato A, Ijuhin N, Komori T. Dentin Matrix Protein 1 Is Predominantly Expressed in Chicken and Rat Osteocytes But Not in Osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2001;16:2017–26. PMID:11697797. doi: <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.11.2017>.
274. Turnbull G, Clarke J, Picard F, Riches P, Jia L, Han F, Li B, Shu W. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioact Mater.* 2018;3:278–314. doi: <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2017.10.001>.
275. Urrutia CO, Dominguez-García MV, Flores-Estrada J, Laguna-Camacho A, Castillo-Cadena J, Flores-Merino M V. Mechanical Stimulation of Cells Through Scaffold Design for Tissue Engineering. *Scaffolds Tissue Eng. - Mater. Technol. Clin. Appl., InTech;* 2017. doi: <https://doi.org/10.5772/intechopen.69925>.

276. Valerio P, Pereira MM, Goes AM, Leite MF. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*. 2004;25:2941–8. doi: <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2003.09.086>.
277. Venugopal J, Prabhakaran MP, Zhang Y, Low S, Choon AT, Ramakrishna S. Biomimetic hydroxyapatite-containing composite nanofibrous substrates for bone tissue engineering. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci*. 2010;368:2065–81. doi: <https://doi.org/10.1098/rsta.2010.0012>.
278. Vila M, García A, Girotti A, Alonso M, Rodríguez-Cabello JC, González-Vázquez A, Planell JA, Engel E, Buján J, García-Honduvilla N, Vallet-Regí M. 3D silicon doped hydroxyapatite scaffolds decorated with Elastin-like Recombinamers for bone regenerative medicine. *Acta Biomater*. 2016;45:349–56. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.09.016>.
279. Vincent K, Durrant MC. A structural and functional model for human bone sialoprotein. *J Mol Graph Model*. 2013;39:108–17. PMID:23261880. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2012.10.007>.
280. Vukicevic S, Oppermann H, Verbanac D, Jankolija M, Popek I, Curak J, Brkljacic J, Pauk M, Erjavec I, Francetic I, Dumic-Cule I, Jelic M, Durdevic D, Vlahovic T, Novak R, Kufner V, Bordukalo Niksic T, Kozlovic M, Banic Tomisic Z, Bubic-Spoljar J, Bastalic I, Vikić-Topic S, Peric M, Pecina M, Grgurevic L. The clinical use of bone morphogenetic proteins revisited: A novel biocompatible carrier device OSTEOGROW for bone healing. *Int Orthop*. 2014;38:635–47. doi: <https://doi.org/10.1007/s00264-013-2201-1>.
281. Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*. 1995;18:1417–26. doi: <https://doi.org/10.1002/mus.880181212>.
282. Wall A, Board T. The Compressive Behavior of Bone as a Two-Phase Porous Structure. *Class. Pap. Orthop.*, London: Springer London; 2014, p. 457–60. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4471-5451-8_116.
283. Wang L, Huang J, Moore DC, Song Y, Ehrlich MG, Yang W. SHP2 regulates intramembranous ossification by modifying the TGF β and BMP2 signaling pathway. *Bone*. 2019;120:327–35. doi: <https://doi.org/10.1016/J.BONE.2018.11.014>.
284. Wang Q, Zhang Y, Li B, Chen L. Controlled dual delivery of low doses of BMP-2 and VEGF in a silk fibroin-nanohydroxyapatite scaffold for vascularized bone regeneration. *J Mater Chem B*. 2017;5:6963–72. doi: <https://doi.org/10.1039/c7tb00949f>.
285. Wang Y, Dai J, Zhang Q, Xiao Y, Lang M. Improved mechanical properties of hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) scaffolds by surface modification of hydroxyapatite. *Appl Surf Sci*. 2010;256:6107–12. doi: <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2010.03.127>.
286. Watari S, Hayashi K, Wood JA, Russell P, Nealey PF, Murphy CJ,

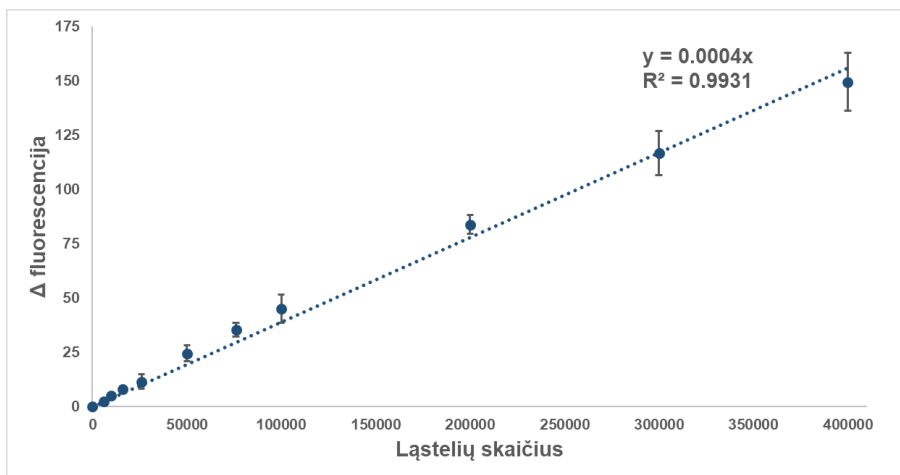
- Genetos DC. Modulation of osteogenic differentiation in hMSCs cells by submicron topographically-patterned ridges and grooves. *Biomaterials*. 2012;33:128–36. PMID:21982295. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.09.058>.
287. Wegst UGK, Ashby MF. The mechanical efficiency of natural materials. *Philos Mag*. 2004;84:2167–86. doi: <https://doi.org/10.1080/14786430410001680935>.
288. Wenstrup RJ, Florer JB, Brunskill EW, Bell SM, Chervoneva I, Birk DE. Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. *J Biol Chem*. 2004;279:53331–7. PMID:15383546. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M409622200>.
289. Whited BM, Skrtic D, Love BJ, Goldstein AS. Osteoblast response to zirconia-hybridized pyrophosphate-stabilized amorphous calcium phosphate. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2006;76:596–604. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30573>.
290. Wight TN. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14:617–23. doi: [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00375-7](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00375-7).
291. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000;61:364–70. doi: [https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20000815\)61:4<364::AID-JNR2>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20000815)61:4<364::AID-JNR2>3.0.CO;2-C).
292. Wu Y-HA, Chiu Y-C, Lin Y-H, Ho C-C, Shie M-Y, Chen Y-W. 3D-Printed Bioactive Calcium Silicate/Poly-ε-Caprolactone Bioscaffolds Modified with Biomimetic Extracellular Matrices for Bone Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2019;20. PMID:30795573. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms20040942>.
293. Wu Y, Cao L, Xia L, Wu Q, Wang J, Wang X, Xu L, Zhou Y, Xu Y, Jiang X. Evaluation of Osteogenesis and Angiogenesis of Icaritin in Local Controlled Release and Systemic Delivery for Calvarial Defect in Ovariectomized Rats. *Sci Rep*. 2017;7:5077. PMID:28698566. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05392-z>.
294. Xiao J, Dong H, Wu Y, Tian W, Liu L. Gene expression profiling of Cx3cl1 in bone marrow mesenchymal stem cells by osteogenic induction. *Omi A J Integr Biol*. 2009;13:337–43. doi: <https://doi.org/10.1089/omi.2009.0018>.
295. Xiao L, Wang B, Yang G, Gauthier M. Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications. *Biomed. Sci. Eng. Technol., InTech*; 2012. doi: <https://doi.org/10.5772/23927>.
296. Xiao X, Wang W, Liu D, Zhang H, Gao P, Geng L, Yuan Y, Lu J, Wang Z. The promotion of angiogenesis induced by three-dimensional porous beta-tricalcium phosphate scaffold with different interconnection sizes via activation of PI3K/Akt pathways. *Sci Rep*. 2015;5:9409. PMID:25797242. doi: <https://doi.org/10.1038/srep09409>.
297. Xie Z, Tang S, Ye G, Wang P, Li J, Liu W, Li M, Wang S, Wu X, Cen

- S, Zheng G, Ma M, Wu Y, Shen H. Interleukin-6/interleukin-6 receptor complex promotes osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9:13. doi: <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0766-0>.
298. Xu C, Su P, Chen X, Meng Y, Yu W, Xiang AP, Wang Y. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic Bioglass-Collagen-Phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2011;32:1051–8. doi: <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.09.068>.
299. Xu J, Li Z, Hou Y, Fang W. Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *Am J Transl Res.* 2015;7:2527–35. PMID:26885254. .
300. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res.* 2001;55:151–7. PMID:11255166. .
301. Yamada T, Matsukawa N, Matsumoto M, Morimoto S, Ogihara T, Ochi T, Yoshikawa H, Nampei A, Hashimoto J, Hayashida K, Tsuboi H, Shi K, Tsuji I, Miyashita H. Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is highly expressed in osteocytes in human bone. *J Bone Miner Metab.* 2004;22:176–84. PMID:15108058. doi: <https://doi.org/10.1007/s00774-003-0468-9>.
302. Yamada Y, Nakamura-Yamada S, Kusano K, Baba S. Clinical Potential and Current Progress of Dental Pulp Stem Cells for Various Systemic Diseases in Regenerative Medicine: A Concise Review. *Int J Mol Sci.* 2019;20:1132. PMID:30845639. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms20051132>.
303. Yanagishita M. Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Pathol Int.* 1993;43:283–93. PMID:8346704. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.1993.tb02569.x>.
304. Yang A, Lu Y, Xing J, Li Z, Yin X, Dou C, Dong S, Luo F, Xie Z, Hou T, Xu J. IL-8 Enhances Therapeutic Effects of BMSCs on Bone Regeneration via CXCR2-Mediated PI3k/Akt Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2018;48:361–70. doi: <https://doi.org/10.1159/000491742>.
305. Yao Q, Cosme JGL, Xu T, Miszuk JM, Picciani PHS, Fong H, Sun H. Three dimensional electrospun PCL/PLA blend nanofibrous scaffolds with significantly improved stem cells osteogenic differentiation and cranial bone formation. *Biomaterials.* 2017;115:115–27. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.11.018>.
306. Ying X, Sun L, Chen X, Xu H, Guo X, Chen H, Hong J, Cheng S, Peng L. Silibinin promotes osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells via bone morphogenetic protein signaling. *Eur J Pharmacol.* 2013;721:225–30. doi: <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2013.09.031>.

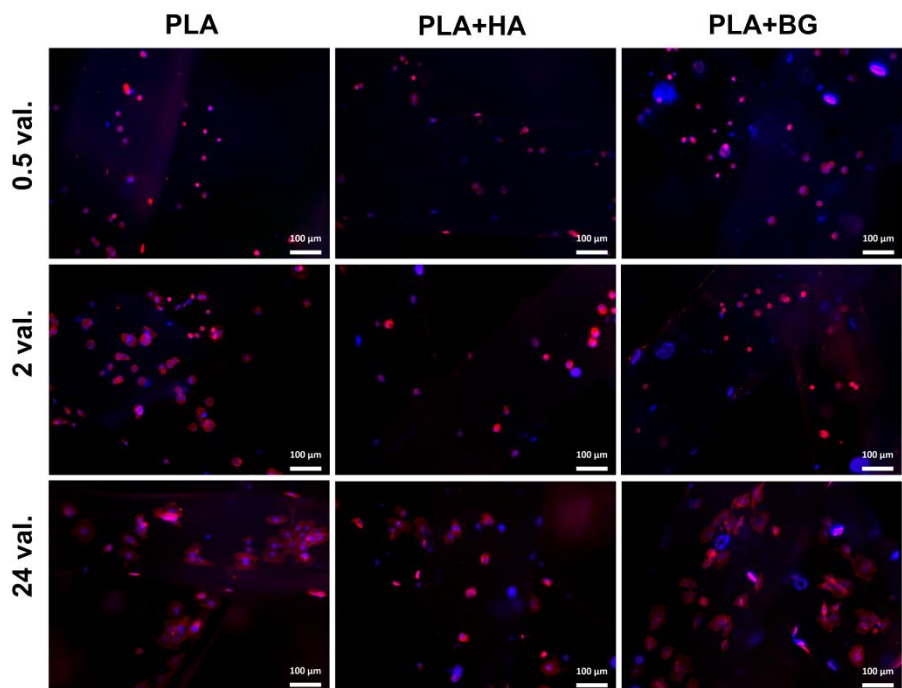
307. Yousefi AM, James PF, Akbarzadeh R, Subramanian A, Flavin C, Oudadesse H. Prospect of stem cells in bone tissue engineering: A review. *Stem Cells Int.* 2016;2016. doi: <https://doi.org/10.1155/2016/6180487>.
308. Yu H, Peng J, Xu Y, Chang J, Li H. Bioglass Activated Skin Tissue Engineering Constructs for Wound Healing. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8:703–15. doi: <https://doi.org/10.1021/acsami.5b09853>.
309. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10. doi: <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>.
310. Zara JN, Siu RK, Zhang X, Shen J, Ngo R, Lee M, Li W, Chiang M, Chung J, Kwak J, Wu BM, Ting K, Soo C. High doses of bone morphogenetic protein 2 induce structurally abnormal bone and inflammation in vivo. *Tissue Eng - Part A.* 2011;17:1389–99. doi: <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0555>.
311. Zhang D, Wu X, Chen J, Lin K. The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration. *Bioact Mater.* 2018a;3:129–38. doi: <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2017.08.004>.
312. Zhang H, Mao X, Du Z, Jiang W, Han X, Zhao D, Han D, Li Q. Three dimensional printed macroporous polylactic acid/hydroxyapatite composite scaffolds for promoting bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. *Sci Technol Adv Mater.* 2016;17:136. PMID:27877865. doi: <https://doi.org/10.1080/14686996.2016.1145532>.
313. Zhang H, Mao X, Zhao D, Jiang W, Du Z, Li Q, Jiang C, Han D. Three dimensional printed polylactic acid-hydroxyapatite composite scaffolds for prefabricating vascularized tissue engineered bone: An in vivo bioreactor model. *Sci Rep.* 2017;7:15255. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14923-7>.
314. Zhang J, Li G, Chan C, Meng C, Lin MC, Chen Y, He M, Leung P, Kung H. Flavonoids of Herba Epimedii regulate osteogenesis of human mesenchymal stem cells through BMP and Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;314:70–4. doi: <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2009.08.012>.
315. Zhang S, Ma B, Liu F, Duan J, Wang S, Qiu J, Li D, Sang Y, Liu C, Liu D, Liu H. Polylactic Acid Nanopillar Array-Driven Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells Determined by Pillar Diameter. *Nano Lett.* 2018b;18:2243–53. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b04747>.
316. Zhao H, Li L, Ding S, Liu C, Ai J. Effect of porous structure and pore size on mechanical strength of 3D-printed comby scaffolds. *Mater Lett.* 2018;223:21–4. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.03.205>.
317. Zhao J, Han W, Chen H, Tu M, Huan S, Miao G, Zeng R, Wu H, Cha Z, Zhou C. Fabrication and in vivo osteogenesis of biomimetic poly(propylene carbonate) scaffold with nanofibrous chitosan network in macropores for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.*

- 2012;23:517–25. doi: <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4468-3>.
318. Zhou Y, Wu Y, Jiang X, Zhang X, Xia L, Lin K, Xu Y. The Effect of Quercetin on the Osteogenic Differentiation and Angiogenic Factor Expression of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One*. 2015;10:e0129605. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129605>.
319. Zhu C, Rodda AE, Truong VX, Shi Y, Zhou K, Haynes JM, Wang B, Cook WD, Forsythe JS. Increased Cardiomyocyte Alignment and Intracellular Calcium Transients Using Micropatterned and Drug-Releasing Poly(Glycerol Sebacate) Elastomers. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018:acsbiomaterials.8b00084. doi: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00084>.
320. Zhu Y, Zhu R, Ma J, Weng Z, Wang Y, Shi X, Li Y, Yan X, Dong Z, Xu J, Tang C, Jin L. *In vitro* cell proliferation evaluation of porous nano-zirconia scaffolds with different porosity for bone tissue engineering. *Biomed Mater*. 2015;10:055009. doi: <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/5/055009>.
321. Rosen CJ, editor. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Ames, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013. doi: <https://doi.org/10.1002/9781118453926>.

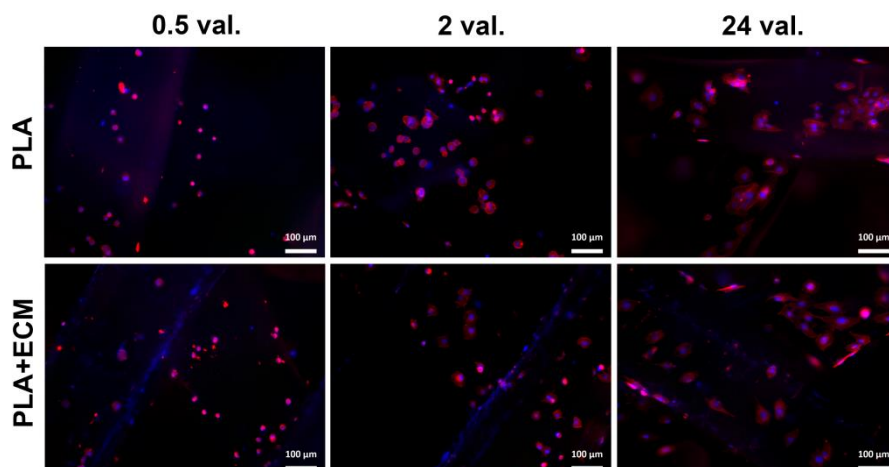
PRIEDAI



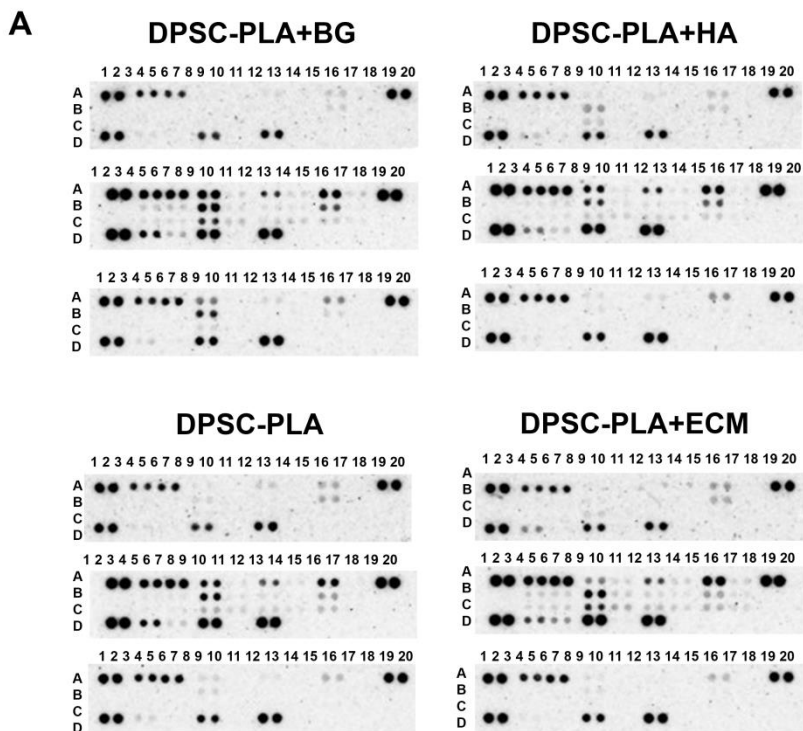
S1 pav. DAPI priklausomybė nuo ląstelių skaičiaus. Grafike atidėtos vidutinės kalibracinių kreivių reikšmės (n=3). Paklaidos pateiktos \pm SD.



S2 pav. DPSC morfologija ant kompozitinių karkasų. Po 0,5, 2 ir 24 valandų nuo ląstelių išsėjimo imunocitochemijos metodu vizualizuotas ląstelių F-aktinas (raudona spalva, rodamino faloidinas) bei branduoliai (mėlyna spalva, DAPI).



S3 pav. DPSC morfologija ant ląstelių kilmės ECM dengtų PLA karkasų. Po 0,5, 2 ir 24 valandų nuo ląstelių išsėjimo imunocitochemijos metodu vizualizuotas ląstelių F-aktinas (raudona spalva, rodamino faloidinas) bei branduoliai (mėlyna spalva, DAPI).



B

Citokinių, chemokinių ir augimo veiksnių išsidėstymas membranoje																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A	Atskaitos taškai		CINC-1	CINC-2α/β	CINC-3	CNTF					CX3CL1		GM-CSF		sICAM-1		IFN-γ		Atskaitos taškai	
B			IL-1α	IL-1β	IL-1ra	IL-2					IL-3		IL-4		IL-6		IL-10			
C			IL-13	IL-17	CXCL10	LIX					L-Selektinas		MIG		MIP-1α		MIP-3α			
D	Atskaitos taškai		CCL5	CXCL7	TIMP-1	TNF-α					VEGF						K			

S4 pav. Konstruktų sekretomose esančių citokinių, chemokinių bei augimo veiksnių analizė. A – kokybinai signalinių molekulių vaizdai, gauti taškinio imunobloto principu; B – tirtų molekulių bei kontrolinių taškų koordinatės.

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt,
www.leidykla.vu.lt
Tiražas 15 egz.