

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
KEMIJSKO INŽENJERSTVO

Maja Perčić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja Maja Perčić

Predala je izraden završni rad dana: 13. srpnja 2015.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Marica Ivanković, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Izv. prof. dr. sc. Jelena Macan, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 16. srpnja 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
KEMIJSKO INŽENJERSTVO

Maja Perčić

Metode bioloških ispitivanja materijala
pogodnih za umjetna tkiva

Završni rad

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Marica Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Marica Ivanković

Izv. prof. dr. sc. Jelena Macan

Prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Zagreb, srpanj 2015.

Sažetak

Strategija inženjerstva tkiva oslanja se na kompleksne interakcije stanica i biomaterijala (nosača) kako bi se ostvarila uspješna regeneracija oštećenog tkiva. U tu svrhu biomaterijali su podvrgnuti ispitivanjima, naročito onima koja se odnose na procjenu biokompatibilnosti, odnosno sposobnosti materijala za obavljanje svoje terapijske funkcije bez izazivanja nepoželjnih (upalnih) reakcija u tijelu pacijenta. *In vitro* testiranje je pokušaj simuliranja *in vivo* okruženja u strogo kontroliranim uvjetima.

U ovom radu, dan je literaturni pregled izdvojenih bioloških metoda koje se upotrebljavaju za ispitivanje pogodnosti primjene materijala u inženjerstvu koštanog tkiva. Kolorimetrijske metode najčešće su korištene metode za brze testove citotoksičnosti materijala. Testovi kojima se utvrđuje umnažanje (proliferacija) i razvoj (diferencijacija) stanica temelje se na kvantitativnom određivanju specifičnih proteina (osteogenih markera), imunološkim fluorescentnim metodama bojanja te na histološkom snimanju biomaterijala.

Summary

Bone tissue engineering strategy relies on the complex interactions between cells and biomaterials (scaffolds) to achieve a successful regeneration of the bone tissue. For this purpose, biomaterials undergo testing, especially those for the assessment of material's biocompatibility, i.e. the ability of biomaterial to perform its desired therapeutically function, without eliciting any undesirable response. *In vitro* testing is an attempt to simulate the *in vivo* situation in a strictly controlled environment.

In this work, several biological methods that are used for materials assessment as candidate in tissue engineering have been described. Colorimetric methods are mostly used for quick cytotoxicity assays of materials. Tests that determine the cell proliferation and differentiation are based on quantification of specific proteins (osteogenic markers), immunological fluorescence staining methods, and on histological evaluation of biomaterials.

Sadržaj

1. Uvod	6
2. Opći dio	7
2.1. Kratki osvrt na inženjerstvo tkiva	7
2.2. Kriteriji biomaterijala u inženjerstvu tkiva	9
3. Biološke metode ispitivanja materijala <i>in vitro</i>	11
3.1. Citotoksičnost	12
3.1.1. Metoda procjene životne aktivnosti	12
3.1.2. Test vijabilnosti stanica	14
3.2. Proliferacija i diferencijacija	16
3.2.1. Inženjerstvo koštanog tkiva	16
3.2.2. Kvantitativno određivanje osteogenih markera	18
3.2.3. Imunološke metode	20
3.2.4. Histološko snimanje	22
4. Zaključak	25
5. Popis literature	26

1. Uvod

Inženjerstvo tkiva (eng. *tissue engineering*, TE) relativno je mlado znanstveno područje koje donosi novi interdisciplinarni koncept obuhvaćajući područje stanične biologije, medicine i inženjerstva biomaterijala. Svrha ovog pristupa je proizvodnja funkcionalnih tkiva i organa pomoću uzgoja odgovarajućih stanica na nosaču (eng. *scaffold*). Stanice se izoliraju iz tijela pacijenta i umnožavaju u kulturi pri odgovarajućim uvjetima uzgoja. Kada je postignuta dovoljna stanična masa, stanice se premještaju na umjetni biorazgradivi, biokompatibilan nosač na kojem stanice započinju stvarati funkcionalno tkivo (*in vitro* uzgajanje). Tkiva razvijena *in vitro* osiguravaju terapijske mogućnosti u području medicine presađivanja tkiva kao i u području razvoja „umjetnih“ organa.

Prilikom izrade umjetnih organa nužno je poznavanje svojstava materijala koji će poslužiti kao biorazgradivi nosač za što bolje prihvaćanje i rast stanica te njihovo udruživanje u funkcionalni biološki sustav. Zbog potrebe za učinkovitom optimizacijom uzgoja stanica, inženjerstvo tkiva zahtjeva sustavan bioinženjerski pristup koji će jamčiti aktivnost i održivost biološkog proizvoda.

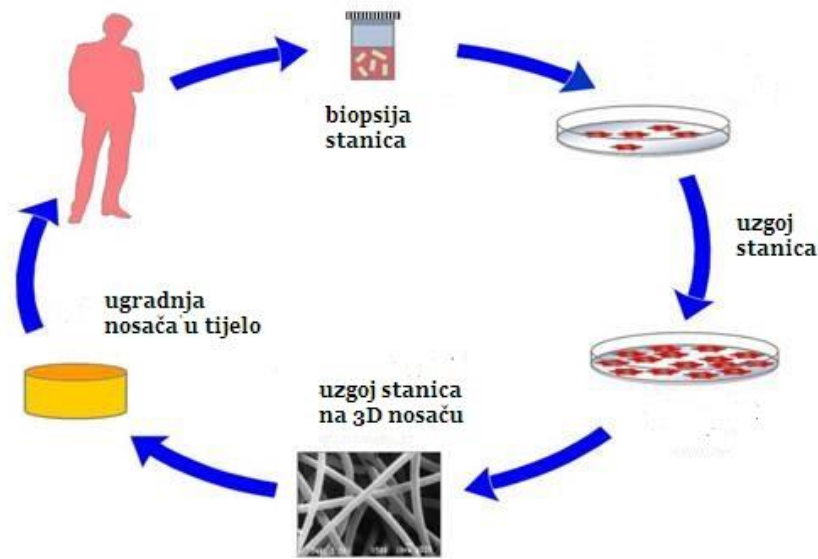
2. Opći dio

2.1. Kratki osvrt na inženjerstvo tkiva

Inženjerstvo tkiva je napredno interdisciplinarno znanstveno polje razvijeno kako bi se zadovoljila potražnja za sigurnim, funkcionalnim i lako dostupnim zamjenama za nepovratno oštećena tkiva [1]. Strategija inženjerstva tkiva temelji se na popravku i regeneraciji tkiva. Stanice se biopsijom uzimaju iz tijela pacijenta, izoliraju i proširuju na dvodimenzijske posude za uzgoj ili se direktno nasađuju na trodimenzijski porozni biorazgradivi nosač (slika 1). Nosač mora biti biokompatibilan s nasađenim stanicama kako bi se omogućilo vezanje stanica, proliferacija (umnažanje), migracija i razvoj u svrhu stvaranja novog tkiva [2]. Prvi materijali koji su se koristili bili su dvodimenzijskog oblika, gdje se prijanjanje stanica odvijalo samo na površini nosača te su bili trajni tj. nisu se biološki razgrađivali tijekom života pacijenta. Nasuprot tome, materijale nove generacije odlikuje trodimenzijska porozna struktura koja potiče povezanost, rast i diferencijaciju (razvoj) stanica unutar materijala, uz postupnu istovremenu biološku razgradnju i regeneraciju funkcionalnog tkiva [1].

Znanstveno TE područje oslanja se na upotrebu trodimenzijskih biorazgradivih poroznih nosača koji pružaju pogodno okruženje za regeneraciju tkiva i organa. Nosač koji služi kao predložak za stvaranje tkiva najčešće je nasađen stanicama i faktorima rasta (proteinima) te podvrgnut biofizikalnim podražajima u biološkim reaktorima [3]. Služi kao privremena potpora stanicama izoliranih iz prirodnog tkiva koje se potom uzgajaju i izrastaju u novo tkivo prije ugrađivanja u pacijenta [4]. Nosač se u tijelu pacijenta zamjenjuje prirodno nataloženom izvanstaničnom matricom (engl. *extracellular matrix*, ECM) koju talože stanice tijekom svog razvoja, odnosno diferencijacije. Izvanstanična matrica je prirodni idealni biološki materijal za stvaranje tkiva te je u dinamičkoj ravnoteži s okolnim mikrookolišem [5].

Princip inženjerstva tkiva



ž

Slika 1. Princip inženjerstva tkiva. Stanice izvađene biopsijom se izoliraju iz biomase, uzgajaju na nosaču, koji se ispituje *in vitro* te ugrađuje u tijelo pacijenta [6].

Nosači mogu biti građeni od raznih biomaterijala i proizvedeni raznim tehnikama [3]. Nosači nastoje djelomično oponašati prirodnu izvanstaničnu matricu. Stoga je utvrđivanje odgovarajućih karakteristika biomaterijala za smještaj stanica ključan korak pri stvaranju umjetnog tkiva. Biomaterijal se definira kao sintetski ili prirodni materijal koji se upotrebljava kao zamjena za dijelove živog sustava tako da funkcionira u bliskom kontaktu sa živim tkivom. Njegova prisutnost u biološkoj okolini ne uzrokuje oštećenja [7].

Svi materijali koji su namijenjeni za ugradnju u ljudski organizam, kao što su umjetni organi, proteze ili medicinski uređaji, podvrgnuti su reakciji tkiva na strano tijelo [8]. Tri su individualne grupe biomaterijala koje se najčešće koriste u području inženjerstva tkiva: keramika (bioaktivna ili bioinertna), sintetski i prirodni polimeri. Svaka grupa biomaterijala ima specifične prednosti i nedostatke, stoga se sve više koriste kompozitni nosači sastavljeni od kombinacije različitih materijala [3].

2.2. Kriteriji biomaterijala u inženjerstvu tkiva

Neovisno o vrsti tkiva, prilikom dizajniranja biomaterijala za umjetna tkiva, važno je da materijal zadovoljava ključne kriterije kao što su biokompatibilnost, biorazgradivost, poroznost (struktura) i čvrstoća materijala [3].

I. Biokompatibilnost

Prvi kriterij koji potencijalni materijal za umjetna tkiva mora zadovoljiti je biokompatibilnost. Biokompatibilnost je mjera kompatibilnosti materijala s biološkim sustavom. Svrha provođenja testova biokompatibilnosti je uvid u ponašanje materijala, tj. ima li materijal potencijalno opasne učinke u ljudskom tijelu. Stanice moraju prijanjati na materijal, normalno funkcionirati, migrirati po površini i kroz nosač te se umnožavati na materijalu. Nakon ugradnje u ljudsko tijelo, nosač ne smije izazvati imunološku reakciju kako bi se spriječilo bilo kakav upalni proces koji bi mogao smanjiti ozdravljenje ili prouzročiti odbacivanje materijala od strane tijela [3].

II. Biorazgradivost

Jedan od ciljeva inženjerstva tkiva je omogućiti stanicama pacijenta da zamijene ugrađeni nosač tijekom određenog perioda. Nosači nisu namijenjeni kao trajni umetci već privremeno ostaju u tijelu pacijenta. Stoga bi takav materijal trebao biti u potpunosti biorazgradiv. Nusprodukti biološke razgradnje ne smiju biti toksični i moraju izaći iz tijela bez interakcija s drugim organima. Stoga bi se takav materijal trebao razgrađivati kontroliranom brzinom razgradnje koja odgovara brzini stvaranja novog tkiva [3].

III. Mehanička svojstva

U idealnom slučaju, nosač bi trebao imati mehanička svojstva u skladu s anatomskim položajem u koji se treba ugraditi i dovoljno čvrste strukture za kiruško rukovanje tijekom same ugradnje. Pored zahtjeva ugradnje, nosač bi trebao zadržavati stabilnost i tijekom biološke razgradnje. Izrada nosača s adekvatnim mehaničkim svojstvima predstavlja veliki izazov za inženjerstvo kostiju i hrskavice [3].

IV. Struktura

Struktura nosača je od iznimne važnosti. Nosači moraju imati visoko poroznu strukturu s dobrom međusobnom povezanošću pora radi osiguranja prohodnosti stanica, hranjivih tvari i metaboličkog otpada. Porozna struktura treba omogućiti difuziju otpadnih tvari iz nosača i migraciju stanica kroz cijeli volumen nosača. Postoje različiti kritični rasponi veličina pora ovisno o vrsti stanica i tkiva za koje se nosač proizvodi [3].

Rast novog tkiva ovisi o neposrednom okruženju kojem je nosač podvrgnut. Čimbenici koji mogu utjecati na rast su temperatura, sastav biološkog medija za uzgajanje i mehaničko okruženje. Najjednostavniji bioreaktori za uzgajanje su laboratorijske zdjelice (Petrijeva zdjelica) i tikvice. Oni pružaju sterilno okruženje za ispitivanje i jednostavnu primjenu. Međutim, daju samo statičko dvodimenzijsko okruženje i zahtijevaju individualno rukovanje pri zamjeni medija, nasađivanju stanica itd. [9]

U cilju da se dobije jasna biološka informacija o stanicama koje su u doticaju s materijalom, isključivo se koriste *in vitro* metode ispitivanja. *In vitro* ispitivanja pružaju informacije o citotoksičnosti (utjecaju materijala na stanice), staničnoj proliferaciji i diferencijaciji. *In vitro* ispitivanja lakše su standardizirana i kvantitativnija za razliku od *in vivo* [5]. Biološko ispitivanje materijala za procjenu biokompatibilnosti, smatra se središnjom temom koja se odnosi na klinički uspjeh primjene materijala u inženjerstvu tkiva. U biološkoj procjeni materijala kao zamijene za koštana oštećenja koriste *in vitro* uzgajanja sa stanicama preosteoblasta (stanicama koje izgrađuju izvanstaničnu matricu koštanog tkiva) [10].

In vitro testiranja koriste se kao prvi stupanj ispitivanja toksičnosti i stanične biokompatibilnosti kako bi se izbjeglo korištenje životinja u testiranju neprikladnih materijala. Međutim, ispitivanja ne pokazuju biološki odgovor tkiva na materijale, stoga su ograničena na odgovor određenih staničnih vrsta [7].

3. Biološke metode ispitivanja materijala *in vitro*

Karakterizacija materijala i analiza njegovih komponenata provode se prije biološkog testiranja [11]. Izolacija primarnih stanica, njihov uzgoj i umnožavanje u laboratoriju preduvjet je za proizvodnju tkiva *in vitro*. Prije ugradnje medicinskog nadomjestka u živi organizam, mora se provesti niz *in vitro* testova kako bi se ustanovila biokompatibilnost materijala te time osiguralo učinkovito liječenje pacijenta ugradnjom *in vivo*. Testovima biokompatibilnosti *in vitro* dobivaju se podaci o toksičnom učinku na stanice. Na taj se način eliminiraju materijali koji s tog aspekta nisu zadovoljili, što je ujedno i smanjenje rizika za pacijenta tj. povećanje biološke sigurnosti. Ispitivanja biokompatibilnosti materijala *in vitro* odvijaju se na nekoliko razina:

- ❖ Citotoksičnost, pri čemu se ispituje životna aktivnost stanica (vijabilnost stanica) u doticaju s materijalom;
- ❖ Analiza rasta stanica kojom se ispituje prijanjanje stanica i njihovo umnožavanje na poroznom nosaču;
- ❖ Funkcionalnost kojom se istražuje utjecaj materijala na normalne stanične funkcije [12].

Ispitivanje biokompatibilnosti provodi se pri temperaturi ljudskog tijela (37 °C) te u atmosferi zraka s 0,05 atm CO₂. *In vitro* testiranja su važna zbog mogućnosti kontrole eksperimentalnih uvjeta i smanjuju potrebe testiranja na pokusnim životinjama [13]. Kod ispitivanja biokompatibilnosti materijala nužna je usporedba dobivenih rezultata s pozitivnom

i negativnom kontrolom. Pozitivna kontrolna materijala daje ponovljivi citotoksični odgovor, dok negativna kontrola ne posjeduje štetan utjecaj na stanice [12].

3.1. Citotoksičnost

Citotoksičnost je mogućnost neke tvari da inducira staničnu smrt. Detaljne studije ovisnosti koncentracije i vremena o toksičnom učinku, zajedno s promatranjem učinaka na stanični ciklus, mogu pružiti vrijedne informacije o mehanizmima i vrstama toksičnosti [14]. Stanice su više osjetljivije na toksičnost u *in vitro* okruženju nego *in vivo*, tj. u ljudskom organizmu. Stoga, ako je materijal toksičan *in vitro*, najvjerojatnije će rezultirati djelomičnom toksičnošću u *in vivo* okruženju [15].

Tretiranje stanica s citotoksičnim spojem može dovesti do različitih staničnih stanja:

- ❖ Nekroze – gubitak cjelovitosti membrane koji vodi prema bržem staničnom odumiranju;
- ❖ Citostatičkog učinka – prestanak staničnog rasta i dijeljenja čime se smanjuje stanična vijabilnost,
- ❖ Apoptoze – aktiviranje genetski programirane stanične smrti.

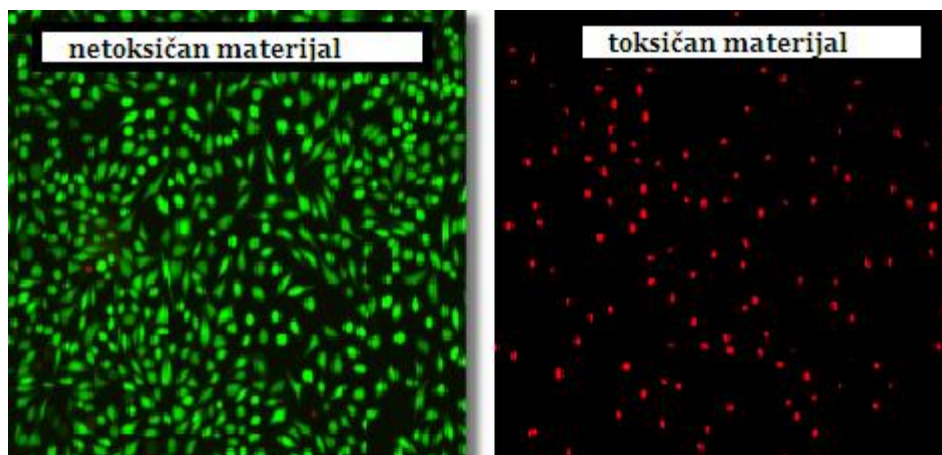
Citotoksičnost biomaterijala može se mjeriti preko životne aktivnosti stanica na dva načina:

- ❖ Izravno testiranje pri kojem se broje žive stanice (mikroskopskim metodama);
- ❖ Neizravno testiranje pri kojem se procjenjuje broj stanica pomoću mjerenja metaboličke aktivnosti, propusnosti membrane itd. (spektrofotometrijskim metodama) [16].

3.1.1. Metoda procjene životne aktivnosti

„Live/dead“ jedna je od najčešće primjenjenih metoda ispitivanja citotoksičnosti i kvantifikacije sposobnosti stanica da prežive u doticaju s materijalom na kojem su uzgajane. Metoda omogućuje fluorescentno određivanje živih i mrtvih stanica metodom bojanja. Rezultati bojanja analiziraju se pomoću fluorescentnog mikroskopa. Stanice koje su preživjele

uzgajanje na biomaterijalu obojat će se zelenom bojom, dok stanice s oštećenom membranom i mrtve stanice prikazat će se crvenom bojom (slika 2). Najprikladnije boje za fluorescentno određivanje životne aktivnosti stanica su acetometoksi kalcein (kalcein AM) i etidijev homodimer (EthD-1). Polianionska boja, kalcein AM, dobro se zadržava u živim stanicama te se na mikroskopskoj analizi uočava kao zeleno obojenje. EthD-1 ulazi u stanice s oštećenom membranom te nakon vezanja s nukleinskim kiselinama proizvodi crvenu boju koja upućuje na staničnu smrt [17].



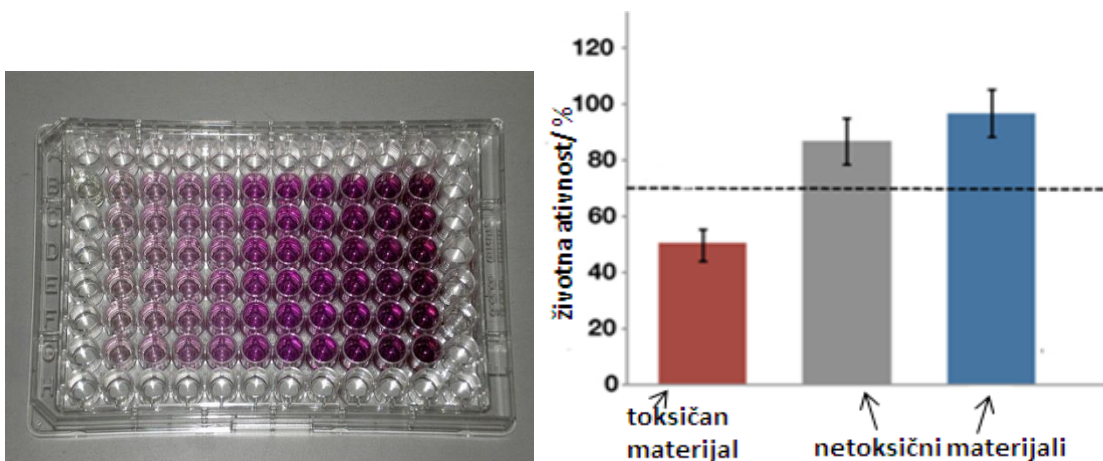
Slika 2. Fluorescentne mikrografije procjene citotoksičnosti materijala „live/dead“ metodom. Zdrave stanice pokazuju zelenu fluorescenciju, dok se mrtve stanice s oštećenom membranom prikazuju u crvenoj boji [18].

Za razliku od većine standardnih ispitivanja citotoksičnosti, „live/dead“ test omogućuje istovremeno određivanje dvaju ključnih aspekata zdravlja stanica: propusnosti i enzimske funkcije [18]. Koristeći kombinaciju kalcein AM i EthD-1 boja postiže se brza procjena životne aktivnosti u populaciji stanica primjenom standardne fluorescentne mikroskopije [12].

3.1.2. Test vijabilnosti stanica

Neovisno o vrsti stanica i načinu ispitivanja, potrebno je kvantitativno određivanje broja preživjelih stanica. Postoje različite metode koje se mogu koristiti za procjenu broja živih eukariotskih (životinjskih) stanica [19].

MTT test citotoksičnosti *in vitro* je pogodna metoda za procjenu održivosti stanice u doticaju s biomaterijalom. Glavne karakteristike ove metode su njena jednostavnost, točnost i brza detekcija toksičnosti te je koristan alat u procjeni rizika na ljudsko zdravlje. MTT test je kolorimetrijska metoda za ispitavanje stanične metaboličke aktivnosti uz bojanje (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol bromid) bojom. MTT test daje kvantitativnu procjenu citotoksičnosti i proliferacije (umnažanja) stanica mjerenjem aktivnosti mitohondrijskih enzima koji reduciraju tetrazonijeve soli (MTT) u kristale formazana koji se otapaju zakiseljenim izopropilnim alkoholom. Rezultirajuća ljubičasta otopina spektrofotometrijski se kvantificira na čitaču za mikrotitarske pločice pri valnoj duljini od 570 nm (slika 3) [18].



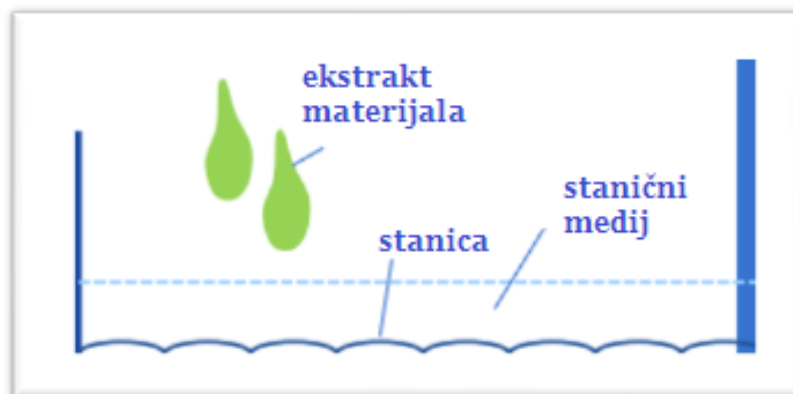
Slika 3. Slika lijevo: mikrotitarska pločica s obojenim medijem za spektrofotometrijsku analizu [20]. Slika desno: Grafički prikaz kvantitativne analize MTT-om. Materijal se smatra citotoksičnim ako životna aktivnost stanica padne ispod 70 % [18].

Stanični mitohondriji osjetljivi su na toksične spojeve zbog svoje ključne uloge u održavanju stanične strukture i funkcija putem aerobne proizvodnje ATP-a (adenozin trifosfata). Veći intenzitet razvijene ljubičaste boje ukazuje na veći broj živih stanica što znači da je ispitivani biomaterijal pogodan za primjenu u inženjerstvu tkiva [16].

MTT test može se provesti na 2 načina:

❖ Ekstrakcijskom metodom

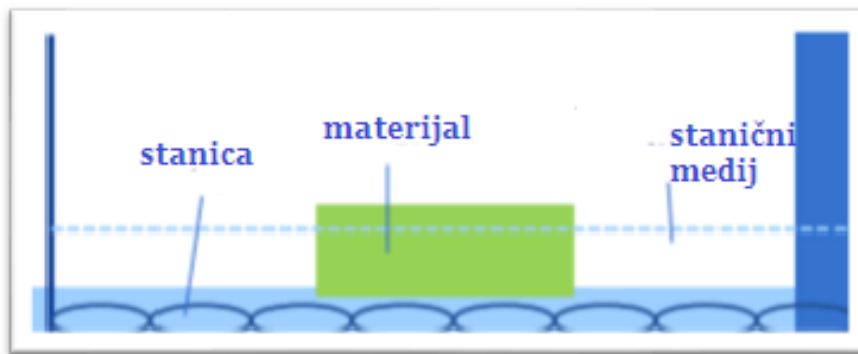
Temelji se na ispitivanju utjecaja ekstrakta biološkog medija u kojem se ispitivani biomaterijal namakao. Nakon određenog vremena namakanja materijala, medij se ekstrahira te koristi za hranjenje i uzgajanje stanica u mikrotitarskoj pločici (slika 4). Nakon određenog perioda uzgajanja, na stanice se stavlja MTT boja te spektrofotometrijski se dobiva informacija o broju živih stanica, odnosno toksičnosti materijala.



Slika 4. Hranjenje uzgojenih stanica ekstraktom medija biomaterijala [16].

❖ Izravna metoda

Citotoksičnost se ispituje izravno na materijalu. Stanice se nasađuju na trodimenzijski porozni biomaterijal te uzgajaju kroz određeni period (slika 5). Nakon inkubacije, na biomaterijal se stavlja MTT boja. Centrifugiranjem uzorka dobiva se obojeni medij koji se potom analizira na spektrofotometru.



Slika 5. Određivanje citotoksičnosti izravnim kontaktom materijala sa stanicama [16].

Prilikom ispitivanja citotoksičnosti, vrše se ispitivanja pozitivne i negativne probe [19].

3.2. Proliferacija i diferencijacija

Materijali koji se upotrebljavaju za dizajniranje umjetnih tkiva trebaju imati takvu površinu koja će omogućiti adheziju stanica, proliferaciju i diferencijaciju. Proliferacija se odnosi na proces povećanja broja stanica kako bi se stvorilo tkivo potrebne veličine. Stanična diferencijacija je proces kod kojeg se stanice mijenjaju iz jednog oblika stanice u drugi, tj. proces razvoja u konačan oblik stanice. Mogućnost proučavanja proliferacije i diferencijacije *in vitro* izuzetno je važno za razumijevanje osnovnih mehanizama tih procesa i razvoja inženjerstva tkiva [10].

3.2.1. Inženjerstvo koštanog tkiva

Važnost područja inženjerstva tkiva posebno se uočava kod regeneracije koštanog tkiva gdje se javlja velika potreba za zamjenskim dijelovima. Važno je razviti biomaterijal koji

može kemijski i strukturno oponašati prirodnu izvanstaničnu matricu kosti. Pri tome kombiniraju se uzgojene osteogene (koštane) stanice, osteoblasti izolirani iz pacijenta ili donora, nasađene na porozni nosač u svrhu stvaranja koštanog tkiva. Za razvoj koštanih nadomjestaka u svrhu zacjeljivanja oštećenog područja primjenjuju se dva pristupa:

1. Prvi pristup uključuje izolaciju osteogenih stanica na nosaču te neposrednu ugradnju nosača *in vivo* s ciljem poticanja i usmjeravanja razvoja tkiva *in situ*;
2. U drugom pristupu izvodi se *in vitro* uzgajanje kako bi se odredilo širenje stanica i osteogena diferencijacija na nosaču. To rezultira višim stupnjem zacjeljivanja kosti u odnosu na pristup neposredne ugradnje. U ovom pristupu, osteogene stanice se nasađuju na trodimenzijske porozne biorazgradive nosače željenog oblika koji odgovara koštanom oštećenju. Stanice se uzgajaju u pogodnom okruženju kako bi se utvrdio rast stanica i diferencijacija istih. Konačno, nosač s razvijenim stanicama se ugrađuje na mjestu ozljede kako bi se izazvao i usmjerio rast kosti s kontroliranom razgradnjom materijala [21].

U svrhu uspješne integracije koštanog nadomjestka sa okolnim tkivom, materijal bi trebao biti osteogeni (s karakteristikama koštanog tkiva), osteoinduktivni (inicirati stvaranje izvanstanične matrice) i osteokonduktivni (poticati daljnje stvaranje koštane matrice) [22].

Kost je dinamičko, prokrvljeno tvrdo tkivo koje služi za vitalne funkcije kod kralješnjaka. Kao glavna komponenta koštanog sustava, kost podržava težinu tijela, omogućava kretanje i štiti vitalne organe te djeluje kao spremište raznih ionskih vrsta (kalcija, fosfora, magnezija, fluora itd.) koji su neophodni za mineralnu homeostazu (funkcijsku ravnotežu) i druge metaboličke procese. Organska matrica kosti čini 20 – 40 % mase i uglavnom se sastoji od kolagena tipa I. Osim kolagena, u proteinskoj matrici nalaze se proteoglikani, glikoproteini i γ -karboksi glutaminske kiseline koji određuju strukturnu organizaciju, posreduju kod vezivanja stanica i reguliraju mineralizaciju matrice. Stanice odgovorne za taloženje mineralizirane matrice kostiju zovu se osteoblasti, izvorno proizvedeni iz matičnih stanica. Osteoblasti imaju potencijal za proliferaciju i sposobnost da diferenciraju u nekoliko tipova stanica vezivnog tkiva [22]. Diferencijacija matičnih stanica uglavnom slijedi niz:

matične stanice → nezreli osteoprogenitor → zreli osteoprogenitor → preosteoblast → zreli osteoblast → osteocit (stanica zrele kosti) [23].

Dovoljna količina koštanih stanica lako je dostupna, te je većina osteoblastih staničnih linija izvedeno iz miša (MC3T3-E1 preosteoblasti). Ovakvi preosteoblasti diferenciraju u osteoblaste koji proizvode temeljne enzime poput alkalne fosfataze i specifične proteine kao što su osteopontin, osteokalcin, koštani sijaloprotein, kolagen tip I koji su izvrsni lokatori i sustavni markeri osteodiferencijacije i mineralizacije.

In vitro pridruživanje određenih staničnih svojstava, poput stanične pokretljivosti, proliferacije i diferencijacije, služi kao pokazatelj staničnog sazrijevanja. U slijedu sazrijevanja osteogenih stanica smanjuju se stanična pokretljivost i proliferacija, a povećava diferencijacija, što rezultira stvaranjem zrelih osteoblasta. Osim toga, brza i učinkovita stanična adhezija nužna je za daljnju diferencijaciju stanica. Stoga su istraživanja jasno dodjelila određenu staničnu morfologiju i organizaciju citoskeleta određenim stupnjevima sazrijevanja osteogenih stanica i biokompatibilnosti supstrata [24].

3.2.2. Kvantitativno određivanje osteogenih markera

Pri analizi materijala umjetnog tkiva ili proučavanju interakcija između stanica i materijala, potrebno je kvantificirati učinak materijala u uvjetima *in vitro* i *in vivo*. Mjerenja se obično izvode na makroskopskoj i mikroskopskoj razini. Međutim, često je potrebno mjeriti utjecaj materijala na molekularnoj razini poput određivanja ekspresije određenih gena [25]. Mjerenjem ekspresije gena može se identificirati tip stanice ili tkiva, otkriti pojedine razine iste stanice u određenom biološkom stanju (npr. bolest, razvoj, diferencijacija) te otkriti promjenu u razini ekspresije kao odziv na specifični biološki podražaj (npr. faktor rasta) [26].

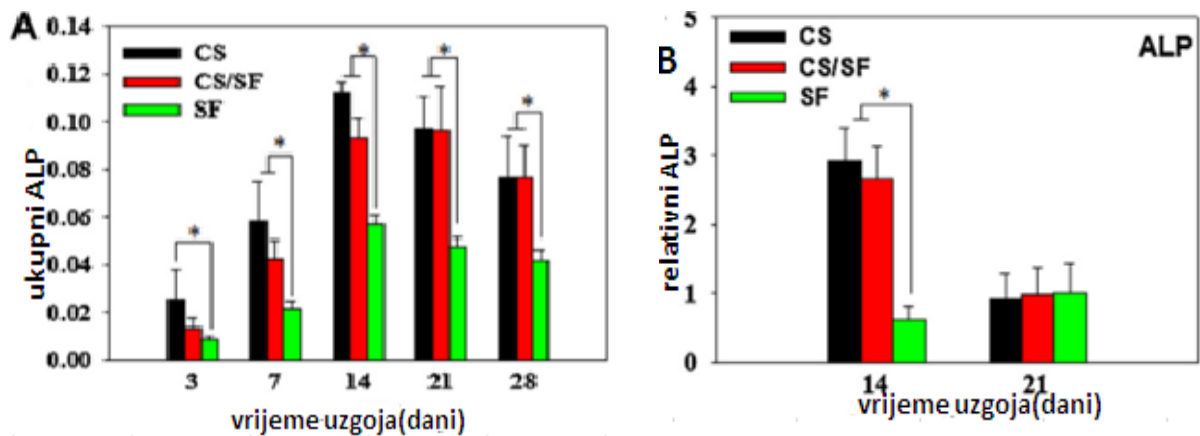
Svaka stanica prisutna u tkivu nosi informaciju u svojem DNA koja se prepisuje u mRNA tijekom stanične diferencijacije. Kad su tkivne konstrukcije uzgojene u *in vitro* okruženju, trebaju se usporediti s odgovarajućim organskim tkivom. Kroz takvu usporedbu

može se pokazati da, stanice koje su izolirane iz tijela pacijenta i proliferirale i diferencirale u materijalu, sadržavaju količinu mRNA koja je potrebna za sintezu određenih proteina.

PCR analiza (eng. *polymerase chain reaction*) je biokemijski alat koji detektira staničnu proizvodnju mRNA na razini transkripcije [10]. Real-time PCR (eng. *real time polymerase chain reaction*) metoda omogućuje preciznu kvantifikaciju pojedinih nukleinskih kiselina. To se postiže nadgledanjem ciljane sekvence RNA u realnom vremenu pomoću fluorescentne tehnologije. Kvantifikacija pomoću „real-time PCR“ može biti relativna ili apsolutna. Relativno kvantificiranje se provodi s normaliziranom razinom ekspresije promatranih gena u odnosu na originalne gene. Međutim, relativnom kvantifikacijom dobiva se samo omjer promatranih gena, a ne broj kopija u definiranoj koncentraciji mRNA populacije. Apsolutna kvantifikacija oslanja se na standardnom nacrtu iz poznatih koncentracija standardnih predložaka i odgovarajućoj razini „real-time PCR“ podataka. Vrijednost se kvantificira spektroskopski pri valnoj duljini od 260 nm ili pomoću DNA fluorescentne boje te pretvara u broj kopija pomoću molekulske težine RNA ili sekvence DNA [25].

„Real-time PCR“ analiza je vrlo korisna metoda za određivanje ekspresije specifičnih markera pri diferencijaciji osteogenih stanica (preosteoblasta) u osteoblaste. Odgovarajuća količina specifičnih markera diferencijacije potvrđuje osteogeni signal biomaterijala, tj. pogodnost njegove primjene u inženjerstvu koštanog tkiva. U odnosu na druge metode kvantificiranja ekspresije gena, „real-time PCR“ koristi relativno male količine uzorka potrebne za analizu, daje brze i točne podatke te analizira više gena odjednom [26].

Osteoblastne stanične linije i uzgojeni sustavi nalaze široku primjenu u istraživanju razvoja kostiju te u staničnoj biologiji u laboratorijskom okruženju. Najčešće osteoblastne stanične linije koje se koriste kao model proučavanja diferencijacije koštanih stanica i biološkog mehanizma kalcifikacije (okoštavanja) *in vitro* su preosteoblastne mišje stanice (MC3T3-E1). Proliferacija stanica utvrđuje se određivanjem ukupne količine DNA koju stanice proizvode tijekom ispitivanja. Nakon faze proliferacije stanice, slijedi faza diferencijacije koja se utvrđuje mjerenjem količina ranih markera diferencijacije. Tijekom diferencijacije osteoblasta, u *in vitro* i *in vivo* modelima, dolazi do ekspresije nekoliko proteina tipičnih za stvaranje kostiju i mineralizaciju izvanstanične matrice. „Real-time PCR“ metodom detektiraju se tipični proteini (slika 6) poput alkalne fosfataze koji se ubraja u rane markere osteogenog fenotipa, osteokalcina koji je obično uključen u gradnju nove izvanstanične matrice te osteonektina i kolagena tipa I [27].



Slika 6. Ekspresija alkalne fosfaze (ALP) pomoću „real-time PCR“ analize: A) apsolutna kvantifikacija; B) relativna kvantifikacija proteina tijekom diferencijacija osteoblasta na različitim nosačima [28].

„Real-time PCR“ jednostavna je metoda kada su poznati proteini koji bi se trebali otkriti. Kako bi se na morfološkoj razini pojasnila proizvodnja mRNA, provodi se *in situ* hibridizacija tkiva koja podliježu optičkoj i elektronskoj mikroskopiji. Prisutnost specifičnih proteina može se prikazati metodom bojanja tkiva (npr. Wester blotting, imunocitokemijske metode) uz pomoć specifičnih antitijela [10].

3.2.3. Imunološke metode

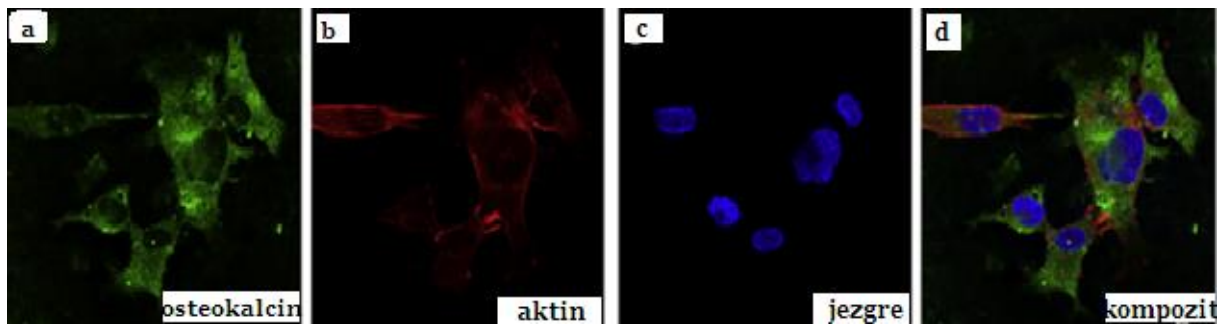
Detekcija imunološkim metodama temelji se na specifičnom antigen-antitijelo vezanju. Imunohistokemijska metoda je metoda otkrivanja tkivnih antigena (proteina, glikoproteina, lipoproteina) sa specifičnom *in situ* imunodetekcijom, dok se imunocitokemijska metoda odnosi na otkrivanje površinskih antigena (markera) na izoliranim stanicama [29]. Pri analizi markera koriste se specifična antitijela za detekciju jezgre stanica, citoskeleta (aktina) i specifičnog proteina (markera). Određivanje morfologije i organizacije citoskeleta može

poslužiti kao pokazatelj prvih znakova utjecaja funkcionalnih supstrata na pojačano sazrijevanje osteogenih stanica [24].

Imunofluorescentna tehnika bojanja s konfokalnom mikroskopijom snažan je alat za staničnu biologiju. Konfokalnim mikroskopom omogućeno je snimanje trodimenzijskih struktura. Među najčešćim bojama jezgre stanica je Dapi (4',6-diamidin-2-fenilindol) boja plavog obojenja [31].

Aktinski citoskelet je spoj između izvanstanične matrice i unutarstanične reakcije te je važan za staničnu adheziju i migraciju. Osim toga, regulacija prenošenja signala za proliferaciju i staničnu diferencijaciju u unutrašnjost stanice obavlja se preko aktinskoga signalnog puta od izvanstanične matrice do odgovarajućih unutarstaničnih odjeljaka. Mnoga istraživanja pokazala su da su spomenuta svojstva osteoblastnih stanica, poput adhezije i diferencijacije, usko povezana s njihovom karakterističnom staničnom morfologijom [24]. Citoskelet ima ulogu u transportu organela, stanične diobe i pokretljivosti. Bojanje aktina s fluorescentnim antitijelima služi kao pokazatelj živih i fiksiranih stanica pomoću fluorescentne slike. Falacidin je biciklički peptid koji se konjugiran u fluorescentnu boju upotrebljava za detekciju aktina [30].

Imunološkim metodama dokazuje se prisutnost i raspodijela specifičnih proteina u uzgojenom tkivu. Imuno-bojanje je opći pojam u području biokemije koje se odnosi na metodu primjene antitijela za detekciju specifičnog proteina u uzorku. Nakon staničnog uzgajanja na nosaču u kontroliranim *in vitro* ili *in vivo* uvjetima, uzorci tkiva se fiksiraju otopinom formalina i fosfatnog pufera te inkubiraju s primarnim antitijelima. Specifični proteini oboje se bojom koju sadrži odgovarajuće antitijelo za vezanje dotičnog proteina. Na slici 7 prikazan je primjer rezultata imunološkog bojanja uzgojenog tkiva dobivenih konfokalnom mikroskopijom. Jezgre stanica obojane su plavom DAPI bojom, dok je detekcija citoskeleta aktina postignuta primjenom konjugiranog falacidina s tetrametilirodaminom. Detekcija specifičnog proteina osteokalcina pomoću antitijela konjugiranih s Alexa Fluor 488 fluorescentnom bojom, ukazuje na stvaranje izvanstanične matrice, odnosno okoštavanje [32].



Slika 7. Imunološka kvalitativna metoda bojanja sa specifičnim antitijelima: a) osteokalcin (osteogeni marker); b) aktin (citoskelet); c) stanična jezgra; d) preklapanje kanala [32].

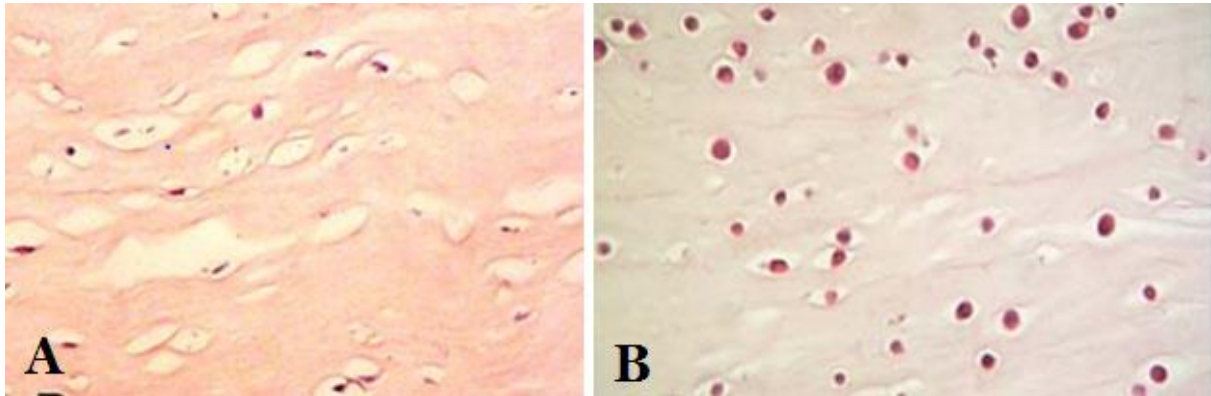
3.2.4. Histološko snimanje

Kolagen je većinski protein izvanstanične matrice koji pruža stuktorni okvir mnogim tkivima u ljudskom tijelu te je odgovoran za njihov oblik i biomehanička svojstva. Kod kralješnjaka je identificirano 27 različitih vrsta kolagena, a svaki od njih ima svoj jedinstveni biokemijski sastav i strukturnu značajku. Među svim tim proteinima, kolagen tipa I je najobilniji kolagen koji se nalazi u kostima, koži, tetivama, ligamentima, rožnici i drugim tkivima ljudskog tijela [22]. Kako kolagen igra važnu ulogu u održavanju tkiva, metode određivanja i kvantifikacije kolagena su od iznimne važnosti za ispitivanje sposobnosti materijala za stvaranje umjetnih tkiva *in vitro* [33]. Nakon ugradnje materijala *in vivo* važno je nadgledati rast tkiva i njegovu integraciju s okolnim tkivom.

Analiza kolagena u tkivu razvijenom na ugrađenom skeletu zajedno s okolnim tkivom temelji se na mikroskopskoj analizi obojanog uzorka. Histološko ispitivanje materijala s nasađenim stanicama provodi se radi utvrđivanja rasta stanica, citokompatibilnosti i stanične životne aktivnosti. Ukoliko se oko stanica nasađenih na nosaču stvara mrežasta struktura kolagena, materijal je pogodan za *in vivo* testiranje. Tkiva koja pod mikroskopom ne pokazuju mrežastu strukturu posjeduju mrtve stanice [34].

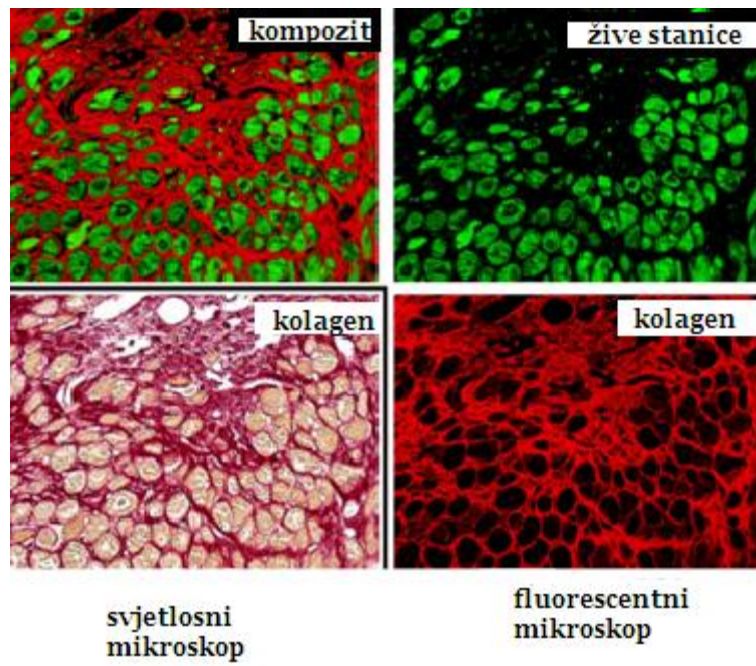
Jedne od glavnih boja koje se primjenjuju u histološkim ispitivanjima su hematoksilin (HE), eosin i „picrosirius red“ boja. Hematoksilin posjeduje plavo-ljubičastu boju te se njime bojaju

nukleinske kiseline u jezgrama stanica tkiva. Eosin je roza boje kojom se detektiraju proteini, odnosno kolagen tipa I. U tkivu, jezgre su obojane plavom bojom, dok citoplazma i izvanstanična matrica posjeduju različite nijanse roza boje (slika 8) [35].



Slika 8. Bojanje materijala hematoksilinom. Slika A prikazuje mrežastu strukturu oko stanice i stanice su žive. Slika B prikazuje izostanak mrežaste strukture što upućuje na smrt stanica [34].

„Picosirius red“ boja često se koristi kao histološka tehnika za određivanje raspodjele kolagena u zdravom dijelu tkiva pomoću svjetlosnog ili polarizirajućeg mikroskopa. Međutim, određivanje kolagena polarizirajućom mikroskopijom je vrlo složeno te se ne primjenjuje za brze analize. Pod svjetlosnim i fluorescentnim mikroskopom kolagen je obojen u crvenu boju, dok žive stanice imaju izrazitu zelenu fluorescenciju pod fluorescentnim mikroskopom (slika 9) [33].



Slika 9. Bojanje tkiva „picrosirius red“ bojom pod svjetlosnim i fluorescentnim mikroskopom: kolagen (crveno); žive stanice (zeleno) [33].

4. Zaključak

In vitro metode ispitivanja biokompatibilnosti imaju veliku ulogu u procjeni materijala za stvaranje umjetnih tkiva. Kako bi se neki materijal mogao smatrati potencijalnim materijalom za primjenu u inženjerstvu tkiva, mora zadovoljavati određene kriterije poput biorazgradivosti i poroznosti, omogućiti prijanjanje stanica, njihovo širenje kroz materijal i razvoj u konačan oblik stanice.

U kontroliranom *in vitro* okruženju, trodimenzijski materijal i stanice dolaze u doticaj, nakon čega slijedi biološko ispitivanje njihove interakcije. Materijal ne smije biti citotoksičan, tj. ne smije izazivati staničnu smrt. Metode koje se koriste za ispitivanje citotoksičnosti materijala mogu biti kvalitativne, poput „live/dead“ i kvantitativne, poput MTT spektrofotometrijske metode kojom se određuje broj živih stanica na materijalu.

Materijal potencijalan za inženjerstvo koštanog tkiva mora posjedovati osteogeni signal koji se može utvrditi određivanjem ekspresije (količine) specifičnih markera (proteina) pri diferencijaciji stanica. Imunološke metode kvalitativne su metode koje uz pomoć konfokalnog fluorescentnog mikroskopa i fluorescentnih boja vezanih s antitijelima daju informaciju o postojanju specifičnih markera na materijalu nastalih tijekom diferencijacije. Kvantitativna metoda kojom se mjeri ukupna količina specifičnih markera je „real-time PCR analiza. Dokaz o proliferaciji i diferencijaciji stanica daje i histološko određivanje kolagena.

In vitro metode su jeftine, brze i korisne za biološku karakterizaciju materijala, tj. njegovih interakcija sa stanicama. Nakon uzgoja tkiva *in vitro* slijedi ugradnja *in vivo*. Testiranjem materijala *in vitro* smanjuje se i broj testiranja nepovoljnih materijala na životinjskim vrstama.

5. Popis literature

1. Bačáková, L.; Filová, E.; Rypáček, F.; Švorčík, V.; Starý, V. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering, *Physiological Research* **53** (2004) 35 – 45.
2. Moroni, L.; Elisseff, J.H. Biomaterials engineered for integration, *Materials Today* **5** (2008) 44 – 51.
3. O'Brien, F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials Today* **14** (2011) 88 – 90.
4. Recum, A.F. Handbook of biomaterials evaluation: Scientific, technical and clinical testing of implant materials, Taylor&Francis, London 1999.
5. Badylak, S.F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material, *Biomaterials* **28** (2007) 3587 – 3593.
6. Korištenje internetom: http://www.wikilectures.eu/index.php/Tissue_engineering_principle (pristup: 17.6.2015.)
7. Chen, F-M.; Liu, X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering, *Progress in Polymer Science* (2015), doi:10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004.
8. Anderson, J.M. Biological responses to materials, *Annual Review of Materials Research* **31** (2001) 81–110.
9. Reis, R.L.; Román, J.S. Biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine, CRC Press, Boca Raton 2004.
10. Minuth W.W.; Strehl, R.; Schumacher, K. Tissue engineering: From cell biology to artificial organs, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Heidelberg 2005.
11. Ali, S.H.R.; Almaatog, M.M.A.; Mohamed, A.S.A. Classifications, surface characterization and standardization of nanobiomaterials, *International Journal of Engineering and Technology* **2(3)** (2013) 187 – 199.
12. Dumitriu, S.; Popa, V.I. Polymeric biomaterials: Structure and function, CRC Press, Boca Raton 2013.
13. Fisher, J.P.; Mikos, A.G. Tissue engineering; u Tissue engineering and artificial organs (ur. Bronzino J.D.), CRC Press, Boca Raton 2006, 490 – 1039.

14. Eisenbranda, G.; Pool-Zobel, B.; Bakerc, V.; Ballsd, M.; Blaauboere, B.J.; Boobisf, A.; Carereg, A.; Kevekordesh, S.; Lhuguenoti, J.C.; Pieterse, R.; Kleinerj, J. Methods of *in vitro* toxicology, *Food and Chemical Toxicology* **40** (2002) 193 – 236.
15. Cregger, M.; Berger, A.; Rimm, D. Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression, *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **130** (2006) 1026 – 1030.
16. Korištenje internetom: <http://www.biotinet.eu/downloads> (pristup: 10.6.2015.)
17. Korištenje internetom: <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp03224.pdf> (pristup: 5.6.2015.)
18. Korištenje interneta: <http://www.ifyber.com/biocompatibility-testing/> (pristup: 10.6.2015.)
19. Woodruff, M.A; Hutmacher, D.W. The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in 21st century, *Progress in Polymer Science* **35** (2010) 1217 – 1256.
20. Korištenje interneta: http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay#/media/File:MTT_Plate.jpg (pristup: 10.6.2015.)
21. Eberli, D. Tissue engineering for tissue and organ regeneration, InTeh, Croatia 2010, 317 – 346.
22. Burdick, J.A.; Mauck, R.L. Biomaterials for tissue engineering applications, Springer-Verlag, Wien 2011.
23. Filipiak, W.; Saunders, T. Advances in transgenic rat production, *Transgenic Research* **15** (2006) 673 – 686.
24. Reichert, C.; Klein, M.; Kasaj, A.; Kuhn, S.; Götz, H.; Hommel, G.; Duschner, H.; Al-Nawas, B. Modulacija morfologije osteogenih stanica pomoću ECM liganada i derivata caklinskogmatriksa, *Acta Stomatologica Croatica* **43(3)** (2009) 188 – 201.
25. Tai Leong, D.; Gupta, A.; Hui, F.B.; Wan, G.; Li, F.Y.; Too, H-P.; Chew, F.T.; Hutmacher, D.W. Absolute quantification of gene expression in biomaterials research using real-time PCR, *Biomaterials* **28** (2007) 203 – 210.
26. Fraga, D.; Meulia, T.; Fenster, S. Real-time PCR; u Current protocols essential laboratory techniques, John Wiley & Sons, 2008, 10.3.1 – 10.3.33.
27. Cenni, E.; Ciapetti, G.; Granchi, D.; Arciola, C.; Savarino, L.; Stea, S.; Montanaro, L.; Pizzoferrato, A. Established cell lines and primary cultures in testing medical devices *in vitro*, *Toxicology in Vitro* **13** (1999) 801 – 810.

28. Lai, G-J.; Shalumon, K.T.; Chen, S-H.; Chen, J-P. Composite chitosan/silk fibroin nanofibers for modulation of osteogenic differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells, *Carbohydrate Polymers* **111** (2014) 288 – 297.
29. Korištenje internetom: http://web.med.u-szeged.hu/mdbio/eng/materials/2013-2014/2nd_semester/cell_p/Immunohistochem.pdf (pristup: 9.6.2015.)
30. Korištenje internetom: <http://www.lifetechnologies.com/hr/en/home/life-science/cell-analysis/cell-structure/cytoskeleton/phalloidin-and-phalloidin-conjugates-for-staining-actin.html> (pristup: 7.6.2015.)
31. Suzuki, T.; Fujikura, K.; Higashiyama, T.; Takata, K. DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy, *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **45(1)** (1997) 49 – 53.
32. Liu, H.; Peng, H.; Wu, Y.; Zhang, C.; Cai, Y.; Xu, G.; Li, Q.; Chen, X.; Ji, J.; Zhang, Z.; OuYang, H.W. The promotion of bone regeneration by nanofibrous hydroxyapatite/chitosan scaffolds by effects on integrin-BMP/Smad signaling pathway in BMSCs, *Biomaterials* **34** (2013) 4404 – 4417.
33. Vogel, B.; Siebert, H.; Hofmann, U.; Frantz, S. Determination of collagen content within picosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy, *MethodsX* **2** (2015) 124 – 134.
34. Bitar, M.; Salih, V.; Brown, R.A.; Nazhat, S.N. Effect of multiple unconfined compression on cellular dense collagen scaffolds for bone tissue engineering, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **18(2)** (2007) 237 – 44.
35. Fischer, A.H.; Jacobson, K.A.; Rose, J.; Zeller, R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections (abstract), *Cold Spring Harbor Protocols* (2008), <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot4986>.

Životopis

Rođena sam 28.listopada.1993. u Puli, gdje sam i završila srednju školu u Gimnaziji Pula. Iste godine,2012,.upisujem prediplomski studij na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije,smjer kemijsko inženjerstvo.