

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Darian Volarić

USPOREDBA CIJELJENJA KRITIČNO VELIKOG DEFEKTA
KALVARIJE ŠTAKORA PRIMJENOM PULSIRAJUĆEG
ULTRAZVUKA NISKOG INTENZITETA I AUTOLOGNE KOSTI

Doktorski rad

Rijeka, 2025.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Darian Volarić

USPOREDBA CIJELJENJA KRITIČNO VELIKOG DEFEKTA
KALVARIJE ŠTAKORA PRIMJENOM PULSIRAJUĆEG
ULTRAZVUKA NISKOG INTENZITETA I AUTOLOGNE KOSTI

Doktorski rad

Mentor: prof. dr. sc. Gordana Žauhar, prof. fizike i kemije
Komentor: prof. dr. sc. Olga Cvijanović Peloza, dr.med.

Rijeka, 2025.

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF MEDICINE

Darian Volarić

COMPARISON OF RAT CALVARIA CRITICAL-SIZE BONE
DEFECT HEALING USING LOW-INTENSITY PULSED
ULTRASOUND AND AUTOLOGOUS BONE GRAFT

Doctoral Thesis

Mentor: Full professor Gordana Žauhar, PhD

Co-mentor: Full professor Olga Cvijanović Peloza, MD, PhD

Rijeka, 2025.

Mentor rada: prof. dr. sc. Gordana Žauhar, prof. fizike i kemije

Komentor rada: prof. dr. sc. Olga Cvijanović Peloza, dr.med.

Doktorski rad obranjen je dana _____ 2025. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____ (titula, ime i prezime)

2. _____ (titula, ime i prezime)

3. _____ (titula, ime i prezime)

Rad ima _____ listova.

UDK: _____

PREDGOVOR

Doktorski rad je izrađen pri Zavodu za anatomiju i Katedri za medicinsku fiziku i biofiziku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci u suradnji s Fakultetom za fiziku Sveučilišta u Rijeci.

Istraživanje je provedeno u sklopu projekata Sveučilišta u Rijeci prof. dr. sc. Gordane Žauhar (uniri-iskusni-prirod-23-53; Istraživanje utjecaja pulsirajućeg ultrazvuka niskog intenziteta na cijeljenje kostiju i uniri-prirod-18-75-1208; Kontrola kvalitete ultrazvučnih snopova korištenjem termokromatskih materijala) te projekta prof. dr. sc. Olge Cvijanović Peloza (uniri-biomed-18-280; Reparacija i imunosni odgovor koštanog tkiva nakon primjene novog biomaterijala te imunosni odgovor mekog tkiva na Jason membranu u štakoru) kao i projekta Hrvatske zaklade za znanost prof. dr. sc. Olge Cvijanović Peloza (IP-2020-02-7875; Usporedba reparacijskog odgovora koštanog tkiva upotrebom dentina, ksenogenog biomaterijala i autologne kosti).

ZAHVALE

Zahvaljujem mojoj mentorici prof. dr. sc. Gordani Žauhar i komentorici prof. dr. sc. Olgi Cvijanović Peloza što su me uvele u svijet znanosti. Hvala Vam na povjerenju, podršci i strpljenju. Bez Vaših dragocjenih savjeta i pomoći ovaj doktorski rad ne bi bio moguć.

Veliko hvala mojoj majci Patriciji i bratu Kristianu na ljubavi i podršci kroz čitavo moje akademsko obrazovanje i bez kojih ne bih bio tu gdje jesam.

Naposljetku, hvala mojoj supruzi Nikolini i sinu Noi na razumijevanju tijekom izrade doktorskog rada. Vaša potpora i ljubav daju mi snagu da budem najbolja verzija sebe. Ovaj rad posvećujem vama.

*Doktorski rad posvećujem
supruzi Nikolini i sinu Noi*

SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Glavni cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj pulsirajućeg ultrazvuka niskog intenziteta (engl. *low-intensity pulsed ultrasound*, LIPUS) i autologne kosti na cijeljenje kritično velikog defekta kalvarije štakora (engl. *critical-size bone defect*, CSBD) i usporediti ih sa cijeljenjem kontrolne skupine. Pojedinačni ciljevi bili su; uspostaviti model CSBD-a, kvantificirati novostvorenu kost koristeći mikro-računalnu tomografiju (engl. *computed tomography*, CT) i koštanu histomorfometriju te imunohistokemijski odrediti dinamiku izražaja ciklooksigenaze-2 (engl. *cyclooxygenase-2*, COX-2), čimbenika tumorske nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- α), osterixa (engl. *osterix*, Osx), koštanih morfogenetskih proteina -2/4, -7 (engl. *bone morphogenetic proteins*, BMP-2/4, BMP-7) te njihovih unutarstaničnih glasničkih molekula SMAD-1/5/8.

Materijal i metode: Istraživanje je provedeno na 45 mužjaka Wistar štakora koji su nasumično podijeljeni u 3 skupine po 15 jedinki te žrtvovani 7., 15. i 30. dan. CSBD je proveden na svim životinjama. U prvoj skupini primjenjen je LIPUS, u drugoj autologna kost, dok je treća predstavljala kontrolnu skupinu, gdje se promatralo spontano cijeljenje CSBD-a. Za kvantifikaciju novostvorene kosti korišteni su mikro-CT i koštana histomorfometrija dok je izražaj upalnih i osteogenih čimbenika te njihovih unutarstaničnih molekula određen imunohistokemijski. Rezultati su uspoređeni jednosmjernom i dvosmjernom analizom varijance (ANOVA) i naknadno testirani post-hoc Scheffe testom.

Rezultati: Mjerenja su pokazala da su LIPUS i autologna kost potaknuli osteogenezu, pridonoseći zatvaranju CSBD-a. Obujam novostvorene kosti mjeren mikro-CT-om i histomorfometrijom pokazao je trend porasta tijekom vremena. 30. dan, najveće vrijednosti novostvorene kosti postignute su u skupini autologne kosti, potom u LIPUS skupini, a najniže vrijednosti u kontrolnoj skupini. Obje eksperimentalne metode su potaknule tkivni izražaj svih imunohistokemijski ispitivanih parametara.

Zaključak: Ovo istraživanje je pokazalo da LIPUS predstavlja perspektivnu, neinvazivnu alternativu autolognim koštanim presadcima u regeneraciji koštanih defekata kosti koje osificiraju intramembranskom osifikacijom.

Ključne riječi: Autografti; Lubanja; Regeneracija kosti; Ultrazvučni valovi.

SUMMARY

Objectives: The main research objective was to evaluate the effect of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) and autologous bone grafts on the regeneration of the critical-size bone defect (CSBD) of the rat calvary and to compare them with the spontaneous healing of the control group. Specific objectives included establishing an animal model of the CSBD, quantifying the volume of newly formed bone using micro-computed tomography (CT) and histomorphometry as well as immunohistochemical analysis of the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), osterix (Osx), bone morphogenetic proteins -2/4, -7 (BMP-2/4, BMP-7) along with their intracellular signaling molecules (SMAD-1/5/8).

Material and Methods: The study was conducted on 45 male Wistar rats, randomly distributed into 3 groups, 15 animals per group, and sacrificed on the 7th, 15th and 30th day. All animals underwent the surgical procedure of forming the CSBD of the rat calvary. The first group was treated with LIPUS, the second with autologous bone graft, and the control group was observed for spontaneous healing. Osteogenesis was quantified via micro-CT and histomorphometry, while the expression of inflammatory and osteogenic factors and their intracellular signaling molecules was assessed through immunohistochemistry. The bone regeneration results within individual groups were compared by one-way and two-way ANOVA including subsequent post-hoc Scheffe tests.

Results: Measurements indicated that LIPUS and autologous bone stimulated osteogenesis, contributing to the closure of the CSBD. The values of newly formed bone volume, showed an increasing trend over time. At day 30, the greatest volume of new bone was observed in the autologous bone group, followed by the LIPUS group, with the lowest values in the control group. Both interventions induced the immunohistochemical expression of all investigated parameters.

Conclusion: This research showed that LIPUS presents a potential, non-invasive alternative to autologous bone grafts for regenerating bone defects which ossify via intramembranous ossification.

Keywords: Autografts; Bone regeneration; Skull; Ultrasonic Waves.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	6
1.1. Širenje ultrazvučnog vala.....	6
1.2. Akustička snaga i intenzitet.....	7
1.3. Mehanizmi djelovanja ultrazvuka na tkiva.....	9
1.3.1. Zagrijavanje	9
1.3.2. Mehanički učinci: kavitacija i tlak zračenja	10
1.4. Prolazak ultrazvuka kroz tkivo	11
1.5. Bioučinci ultrazvuka na stanice.....	13
1.5.1. Liza stanica.....	14
1.5.2. Promjene unutar stanice inducirane ultrazvukom.....	15
1.5.3. Učinci ultrazvuka na DNA i kromosome	15
1.5.4. Funkcionalne promjene stanica	16
1.6. Biološki učinci ultrazvuka na tkiva.....	17
1.6.1. Učinci ultrazvuka na kost.....	17
1.6.2. Učinci ultrazvuka na meka tkiva	19
1.6.3. Učinci ultrazvuka na krv i krvožilni sustav	19
1.6.4. Pulsirajući ultrazvuk niskog intenziteta	20
1.7. Koštano tkivo	22
1.8. Koštane stanice	23
1.8.1. Osteoblasti.....	23
1.8.2. Koštane pokrovne stanice	24
1.8.3. Osteociti.....	25

1.8.4. Osteoklasti	28
1.9. Izvanstanični koštani matriks	31
1.10. Rast i razvoj kosti	37
1.10.1. Intramembranska osifikacija	37
1.10.2. Endohondralna osifikacija	39
1.11. Koštano oblikovanje i preoblikovanje	44
1.12. Cijeljenje kosti – kaskada transkripcijskih čimbenika	44
1.13. Autologna kost	47
1.14. Koštani defekt kritične veličine	48
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	49
3. MATERIJAL I METODE	50
3.1. Eksperimentalni model i plan istraživanja	50
3.2. Insonacija LIPUS uređajem	53
3.3. Materijal	55
3.4. Metode istraživanja	55
3.4.1. Mikro-CT	55
3.4.2. Histološko bojenje	55
3.4.3. Histomorfometrija	56
3.4.4. Imunohistokemijska metoda	57
3.4.5. Statistička analiza	58
4. REZULTATI	59
4.1. Mikro-CT	59
4.2. Histološka analiza	63
4.3. Histomorfometrijska analiza	66
4.4. Imunohistokemijska analiza	67

5. RASPRAVA.....	75
6. ZAKLJUČCI.....	84
7. LITERATURA.....	86
POPIS SLIKA	96
POPIS TABLICA	98
POPIS POKRATA	99
ŽIVOTOPIS	101

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Širenje ultrazvučnog vala

Ultrazvuk je mehanički val, frekvencije više od 20 kHz odnosno 20 000 ciklusa u sekundi. U medicini, uobičajeno se koriste frekvencije više od 1MHz.

Ultrazvuk se širi na isti način, kao i čujni zvuk, titranjem molekula koje čine medij kroz koji val putuje. Ultrazvučni val može se širiti u istom smjeru kao što titraju čestice, pri čemu se to onda naziva longitudinalni val. Također, čestice mogu oscilirati poprečno, okomito na smjer širenja vala. Takav val naziva se transversalni ili val smicanja. Iako se transversalni valovi mogu širiti kroz krute tvari, te stoga prolaziti kroz kalcificirana tkiva poput kosti ili zuba, oni su od male važnosti u mekim tkivima, koja jedva podržavaju njihovo širenje pri ultrazvučnim frekvencijama.

Longitudinalni val ima primarnu važnost za medicinske primjene ultrazvuka. U longitudinalnom valu, pojedinačne molekule ili čestice u mediju osciliraju sinusoidno oko fiksne točke, krećući se naprijed i nazad duž smjera širenja valne energije. Kako se čestice pomiču naprijed, dolazi do povećanja lokalne gustoće i tlaka u mediju zbog smanjenja udaljenosti između njih i čestica ispred. Nakon maksimalnog pomicanja naprijed, čestice se vraćaju prema svojoj ravnotežnoj poziciji te prolaze nju, što dovodi do blagog smanjenja gustoće i lokalnog tlaka. Razlika između tlaka u sredstvu (približno atmosferskog tlaka) i lokalnog tlaka dok val prolazi naziva se akustični tlak. Ovaj tlak može biti kompresija (tlak veći od tlaka u sredstvu) ili razrjeđenje (tlak manji od tlaka u sredstvu). Maksimalna vrijednost akustičnog tlaka je od velike važnosti pri raspravi o sigurnosnim aspektima vezanim uz primjenu ultrazvuka u medicini. Posebno, maksimalni tlak razrjeđenja (engl. *peak rarefaction pressure*) snažno je povezan s pojavom kavitacija. U dijagnostičkim ultrazvučnim skenerima ti akustični tlakovi mogu doseći više od 2 MPa na površini sonde, što je otprilike 20 atmosfera. Što se tiče tlaka razrjeđenja, to znači da se tkivo "razvlači" silom jednakom onoj koja komprimira tkivo pod tlakom od oko 20

atmosfera. Razlog zbog kojeg tkivo obično ne puca je dvostruk: prvo, tkivo, slično vodi, može izdržati ovaj stres u mnogim uvjetima; drugo, stres traje vrlo kratko: na 1 MHz razrjeđenje traje samo 0,5 mikrosekundi, a ovo razdoblje postaje sve kraće kako frekvencija raste [1].

Udaljenost između jedne kompresije (ili razrjeđenja) i njene neposredne susjedne kompresije definira valnu duljinu (λ). Za bilo koju specifičnu frekvenciju (f), valna duljina (λ) može se izračunati pomoću brzine zvuka (c), koristeći izraz $\lambda = c / f$. Pri frekvenciji od 1 MHz, valna duljina u mekim tkivima je tipično između 1,5 mm i 1,6 mm, dok je pri istoj frekvenciji valna duljina u kosti između 3 mm i 4 mm, jer se ultrazvučni val širi otprilike dvostruko brže kroz kost nego kroz meka tkiva.

U vrlo specifičnim okolnostima može se generirati stojni val. To se događa kada se dio energije longitudinalnog kompresijskog vala reflektira natrag i interagira s nadolazećim valom. Iako se ovakva situacija može stvoriti u laboratorijskim uvjetima, rijetko se događa u ultrazvučnom polju unutar tijela. Nadalje, kod pulsnog ultrazvuka, interferencija se pojavljuje samo prolazno i vrlo blizu reflektirajuće površine [2].

1.2. Akustička snaga i intenzitet

Akustička snaga i intenzitet su ključni parametri pri razmatranju sigurnog korištenja ultrazvuka. Akustička snaga mjeri brzinu kojom sonda emitira energiju i izražava se u vatima (W). U ultrazvučnim snopovima koji se koriste u dijagnostičke svrhe, akustička snaga varira od manje od 1 mW do nekoliko stotina mW. Prolaskom ultrazvuka kroz tkivo dio energije apsorbira se u tkivu, što rezultira blagim porastom temperature. Iako se energija isporučuje u vrlo kratkim impulsima, za procjenu zagrijavanja tkiva relevantnije je promatrati prosječnu snagu ultrazvučnog snopa tijekom duljeg vremenskog perioda.

Osim akustičke snage, važna je i raspodjela te snage unutar ultrazvučnog snopa i

skenirane ravnine, kako bi se mogle kvantificirati lokalne "vruće točke" (engl. *hot spots*; područja jačeg zagrijavanja). Akustički intenzitet snopa se izračunava kao omjer prosječne snage snopa po jedinici površine i najčešće se izražava u milivatima po kvadratnom centimetru (mW/cm^2). Površina može pokrivati cijeli snop ili samo njegov lokalni dio. Pri razmatranju sigurne primjene ultrazvuka često se navodi prostorno - vršni vremenski-prosječni intenzitet (engl. *spatial-peak temporal-average intensity*; I_{spta}), koji predstavlja vremenski prosječni, a prostorno najveći intenzitet u snopu, tj. daje informaciju o tome gdje je snop "najsnažniji". Kod neskeniranih snopova, kao što su oni korišteni za pulsni Doppler, najveći intenzitet bit će u fokalnoj zoni, dok će kod skeniranih snopova (npr. sektorskih skenova), ovaj intenzitet biti bliže sondi [3]. Bitan je također i prostorno - vremenski prosjek intenziteta (engl. *spatial-average temporal-average intensity*; I_{sata}) koji označava prosječni intenzitet ultrazvuka tijekom određenog vremenskog razdoblja, ali uzima u obzir prosjek na cijeloj površini koju ultrazvučni snop obuhvaća. Koristi se za procjenu ukupne prosječne izloženosti u određenom prostoru, a ne samo na mjestu najveće jakosti.

Akustička snaga i prostorno - vršni vremenski - prosječni intenzitet daju informacije o deponiranju energije i zagrijavanju osobito kad se promatraju tijekom duljih vremenskih razdoblja. Međutim, za opisivanje jačine samog impulsa koriste se drugi akustički parametri, osobito kod razmatranja mehaničkih učinaka koji mogu nastati iz interakcije pojedinačnog impulsa s tkivom, a ne serije impulsa. Najvažniji od tih parametara je maksimalni tlak pri razrjeđenju (p_r). Dvije su dodatne veličine obično vidljive na ekranu monitora koje se koriste za opis jačine impulsa, a to su: mehanički indeks (koji je povezan s maksimalnim tlakom pri razrjeđenju) i termički indeks (koji je povezan s prosječnim intenzitetom impulsa) [4].

1.3. Mehanizmi djelovanja ultrazvuka na tkiva

Kao rezultat različitih procesa apsorpcije, dolazi do predaje energije tkivu. Odgovor tkiva na ovu apsorpciju energije djelomično ovisi o mehanizmu same pohrane, a time i o određenim karakteristikama ultrazvučnog snopa. Uobičajeno je razlikovati dvije glavne vrste učinaka: termičke i mehaničke. Mehanički učinci najbolje se mogu predvidjeti poznavanjem karakteristika pojedinačnih ultrazvučnih impulsa, dok se termički učinci preciznije procjenjuju na temelju analize prijenosa energije tijekom duljih vremenskih razdoblja.

1.3.1. Zagrijavanje

Akustična energija može se pretvoriti u toplinu koja se prenosi u tkivo putem različitih procesa apsorpcije. Brzina kojom se stvara toplina po jedinici volumena, dQ/dt , jednaka je $2\alpha_a I$, gdje je α_a koeficijent apsorpcije (koji raste s frekvencijom), a I je intenzitet ultrazvučnog snopa. U početku brzina porasta temperature iznosi $2\alpha_a I / C$, gdje je C toplinski kapacitet sredstva. Daljnji proces zagrijavanja ovisi o širini snopa. Širi snopovi mogu uzrokovati veći porast temperature za danu vršnu vrijednost intenziteta u usporedbi s užim, više fokusiranim snopovima. Uspostavljena ravnotežna temperatura također ovisi o toplinskoj vodljivosti tkiva te učincima perfuzije krvi na provođenje topline strujanjem. U proračunima se često koristi „efektivna toplinska vodljivost“ kako bi se u obzir uzeli i gubici topline strujanjem, uslijed protoka krvi. Međutim, perfuzija postaje važna samo u širim dijelovima snopa, udaljenim od fokalnog područja.

Tkiva s višim koeficijentom apsorpcije mogu se jače zagrijavati od onih s nižim koeficijentom. Površine kalcificirane kosti intenzivno apsorbiraju energiju i zagrijavaju se više nego meka tkiva. Transmisija ultrazvuka u kost i porast temperature mogu biti smanjeni ako je upadni kut valova različit od onog blizu okomite orijentacije. Fetalne kosti

apsorbiraju energiju snažnije od okolnog fetalnog mekog tkiva, a ta razlika postaje još izraženija kako fetalne kosti kalcificiraju. Susjedna meka tkiva mogu doživjeti sekundarno zagrijavanje putem prenošenja topline vođenjem iz kosti u okolna tkiva [5].

1.3.2. Mehanički učinci: kavitacija i tlak zračenja

Kada je mjehurić plina u tekućini podvrgnut promjenama akustičnog tlaka, on mijenja svoj volumen, te dolazi do njegovog širenja tijekom faze smanjenog tlaka i kontrakcije tijekom faze kompresije vala. Ova pojava naziva se akustična kavitacija. Pri malim vršnim vrijednostima akustičnog tlaka, oscilacije radijusa mjehura uglavnom prate promjene tlaka. Međutim, s povećanjem vrijednosti maksimalnog akustičnog tlaka, mjehurić postaje nestabilan i tijekom kontrakcije se kataklizmički urušava pod utjecajem inercije okolne tekućine. Ova vrsta kavitacije naziva se „inercijska kavitacija“ za razliku od stabilne ili neinercijske kavitacije. Termin akustična kavitacija također se koristi za opis stvaranja mjehurića u tekućini pod utjecajem promjenjivog akustičnog polja na specifičnim mjestima, kao što su mikroskopske nečistoće, površinska hrapavost posude ili lokalne varijacije gustoće u mediju.

Kompleksne mehaničke sile djeluju na okolnu tekućinu, kao i na bilo koju površinu u blizini mjehurića, te između samih mjehurića. Biološki najvažnije sile uključuju smične sile koje se javljaju na površini mjehurića. Ove mehaničke sile prisutne su u oba oblika kavitacije, i neinercijske i inercijske, no znatno su izraženije u inercijskoj kavitaciji. Također, tijekom inercijske kavitacije može doći do kemijskih reakcija. Adijabatski uvjeti koji prate izuzetno brzu kompresiju mjehura rezultiraju vrlo visokim trenutačnim temperaturama unutar mjehura, što može dovesti do stvaranja visoko reaktivnih slobodnih radikala [6].

Malo je vjerojatno da će bilo koji oblik kavitacije nastati pri dijagnostičkim razinama ultrazvuka u mekim tkivima ili tekućinama u tijelu, osim u prisutnosti ultrazvučnih

kontrastnih sredstava koja sadrže plin. Ipak, postoje dvije situacije u kojima prisutnost plina može uzrokovati mehaničku traumu susjednim mekim tkivima zbog procesa sličnog kavitaciji: na površini pluća i u crijevima.

Konačno, tkiva mogu biti izložena i drugim silama koje nastaju prolaskom ultrazvuka. Konkretno, unutar tkiva i tekućina javlja se radijacijski stres kako ultrazvučni impuls putuje, a osobito na granicama sredstava koja se razlikuju po akustičkoj impedanciji. Kada je prisutan u tekućini, ovaj stres uzrokuje akustično strujanje, pri čemu se tekućina kreće u smjeru širenja vala. Ovaj radijacijski stres znatno je manjeg intenziteta od onog povezanog s oscilacijama mjehurića, ali je univerzalno prisutan i ne zahtijeva prisutnost plinskih tijela [7].

1.4. Prolazak ultrazvuka kroz tkivo

Ultrazvučni valovi se stvaraju piezoelektričnom sondom ili pretvaračem (engl. *transducer*) u kojoj se električna energija pretvara u mehaničku. Takve sonde obično imaju nisku učinkovitost u pretvorbi električne energije u akustičku, što dovodi do stvaranja topline u sondi, pri čemu se ona zagrijava. Vjerojatno najveće zagrijavanje tkiva tijekom primjene ultrazvuka u medicini potječe iz ovog izvora, stoga je to potrebno imati na umu kada se toplinski osjetljiva tkiva nalaze blizu ultrazvučne sonde, kao što je slučaj kod oftalmoloških pregleda.

Prodiranje ultrazvuka u tkivo ovisi o učinkovitosti ostvarivanja dobrog kontakta sonde s tkivom. Kod spajanja s kožom, koeficijent atenuacije dermalnih i subdermalnih slojeva može značajno utjecati na prolazak ultrazvuka, jer može biti velik, ovisno o hidraciji, te sadržaju masti i kolagena. Ultrazvučni impuls obično sadrži široki spektar frekvencija raspoređenih oko centralne koja je jednaka rezonantnoj frekvenciji piezoelektričnog izvora. Amplituda i intenzitet vala smanjuju se s udaljenošću od sonde uz atenuaciju od oko $0,5 \text{ dB cm}^{-1} \text{ MHz}^{-1}$ za ultrazvučni val frekvencije 3,5 MHz, što znači da se amplituda

smanji na polovicu, a intenzitet za četiri puta (-6 dB) nakon što prijeđe put od otprilike 4 cm, što je uglavnom posljedica viskoznosti i apsorpcijskih procesa. Preostala energija se raspršuje, što uzrokuje širenje snopa, a raspršena energija može uzrokovati dodatne interakcije raspršivanja. Samo vrlo mali dio energije vraća se natrag do ultrazvučne sonde [8].

Ako postoji ponavljajući slijed impulsa, kao u većini dijagnostičkih primjena, tkivo će se zagrijati zbog apsorpcije akustičke energije. Porast temperature ovisi o prosječnom intenzitetu, koeficijentu apsorpcije, toplinskim svojstvima tkiva (toplinskoj vodljivosti i specifičnom toplinskom kapacitetu), perfuziji tkiva (protoku krvi), veličini snopa, načinu skeniranja i vremenu koje sonda provede na istoj poziciji. Svaki put kada impuls prođe kroz tkivo ono doživljava mali prolazni impuls u smjeru širenja ultrazvuka. Ako ultrazvučni val prolazi kroz tekućinu, tekućina će se pomicati u smjeru širenja vala, a niz impulsa uzrokuje pojavu akustičkog strujanja [8].

Kako se ultrazvučni val širi frekvencijski spektar se mijenja. U mekim tkivima, ova promjena uglavnom je uzrokovana frekvencijski ovisnom atenuacijom tkiva. Kao rezultat, više frekvencije u spektru impulsa smanjuju se u većoj mjeri od nižih frekvencija, što snižava prosječnu frekvenciju u spektru. Za impulse vrlo velikih amplituda, pojavljuju se i učinci konačne amplitude, pri čemu se dio energije prenosi na više harmonike. Ovi učinci su izraženiji prilikom prolaska ultrazvuka kroz tekućine, gdje je to dominantan mehanizam koji mijenja spektar impulsa [4].

Kako se ultrazvučni val širi dublje u tkivo, može naići na granicu između medija s veoma različitim akustičnim svojstvima. Tako na primjer, ako je drugi medij kost, otprilike polovica energije vala se reflektira, dok druga polovica ulazi u kost. Smjer širenja reflektirane energije će ovisiti o svojstvima granice između tkiva i kosti, a daljnje širenje raspršenog vala kroz meko tkivo teško je predvidjeti. Vrlo je malo vjerojatno da će se formirati stojni valovi. Preostala energija koja ulazi u kortikalnu kost može se širiti kao longitudinalni, transverzalni ili površinski valovi, a svi oni se brzo apsorbiraju, što rezultira lokalnim porastom temperature. Ovo zagrijavanje kosti uzrokuje sekundarno zagrijavanje okolnih

mekih tkiva vođenjem topline [1].

Gotovo sva energija upadnog ultrazvučnog vala reflektira se s bilo koje granice između mekog tkiva i plina. Plin može biti prisutan unutar alveola pluća, crijeva ili na izlaznoj točki snopa. Također, plinski mjehurići mogu biti umjetno uvedeni kao kontrastno sredstvo u krvi. Granice tkivo-plin predstavljaju za ultrazvuk velike promjene u akustičkoj impedanciji, pri čemu je odbijeni val, u prvoj aproksimaciji, jednak po amplitudi, ali suprotan u fazi u odnosu na upadni val. Mehanički stres koji doživljava meko tkivo na granici tkivo-plin može biti dovoljan kako bi uzrokovao trajno oštećenje membrana (npr. lizu eritrocita u prisutnosti mjehurića) ili slabih struktura vezivnog tkiva, posebice tkiva s niskom smičnom čvrstoćom uzrokujući npr. kapilarno krvarenje u plućima. Ako bi došlo do inercijske kavitacije, mogli bi se lokalno stvoriti ekstremni uvjeti temperature i tlaka, što bi u teoriji moglo dovesti do stvaranja slobodnih radikala. Osim mehaničkih učinaka, međudjelovanje između akustičnog vala i mjehurića može također lokalno stvoriti toplinu, zbog porasta koeficijenta apsorpcije [4].

Još je jedna važna granica, a to je ona između mekog tkiva i tekućine. Na toj se granici vrlo malo energije ultrazvuka reflektira jer je promjena akustičkih impedancija između ovih medija neznatna. Val prelazi u prostor ispunjen, primjerice, krvlju, amnionskom tekućinom ili urinom. Raspršivanje je minimalno, apsorpcija je mala, a procesi distorzije vala nisu snažno potisnuti. Ultrazvučni val stoga sadrži frekvencijske komponente kroz tekućinu koje su znatno više od onih koje stvara sonda, osobito u fokalnoj zoni. Kada ovaj impuls dođe do sljedeće granice između tekućine i tkiva, većina visokofrekvencijskog sadržaja apsorbirati će se u površinskim slojevima tkiva, što dovodi do većeg zagrijavanja i radijacijskog stresa nego kod ekvivalentnih impulsa bez distorzije [1].

1.5. Bioučinci ultrazvuka na stanice

Interakcija ultrazvučnog snopa s tkivima kroz koja prolazi ključna je za stvaranje dijagnostičkog ultrazvučnog prikaza. Naime, raspršeni snop služi za formiranje slike.

Dugo je poznato da ultrazvuk može izazvati promjene u biološkim tkivima, što je temelj primjene u fizikalnoj medicini, gdje se traže korisne promjene (koje su često reverzibilne) u funkciji stanica, te u kirurgiji, gdje je cilj uništenje stanica.

Poznato je da prolazak ultrazvučnih valova kroz tkiva može uzrokovati termičke i mehaničke učinke (vibracije, mikrostrujanje). Ovi učinci se koriste u fizikalnoj medicini kako bi se postigli klinički učinci poput zagrijavanja tkiva, povećanja aktivnosti stanica i smanjenja boli [9, 10]. Aplikacija terapijskog ultrazvuka visokog intenziteta se primarno bazira na termičkim učincima [11], dok je učinkovitost ultrazvuka niskog intenziteta primarno bazirana na netermičkim odnosno mehaničkim efektima poput akustičkog strujanja [12]. Za sigurno korištenje dijagnostičkog ultrazvuka ključno je da sve promjene u stanicama budu reverzibilne i ne predstavljaju opasnost za bolesnika.

1.5.1. Liza stanica

Nesumnjivo je da izloženost ultrazvuku može uzrokovati liziranje stanica. Pokazano je da je kavitacija glavni mehanizam koji dovodi do potpune destrukcije stanica, što su potvrdili brojni autori [13–15]. Međutim, nije jasno može li ultrazvuk izazvati liziranje stanica u odsutnosti kavitacije. Također, ustanovljeno je da postotak liziranih stanica ovisi o broju stanica; kod većeg broja stanica postoji manji postotak oštećenih stanica nego kod manjeg broja stanica [16]. Ovaj učinak gustoće stanica može se djelomično objasniti većom potrošnjom kisika u gustim staničnim suspenzijama, što dovodi do oslobađanja CO₂ u medij suspenzije, čime se smanjuje vjerojatnost pojave kavitacije [17]. Čini se da je liza stanica neposredna posljedica izloženosti ultrazvuku, a ne odgođeni učinak. Stanice koje su u aktivnoj fazi diobe (u mitozu) osjetljivije su na liziranje pri određenoj izloženosti ultrazvuku nego one koje se nalaze u drugim fazama staničnog ciklusa [18].

1.5.2. Promjene unutar stanice inducirane ultrazvukom

Postoji obilje literature koja se bavi utjecajem ultrazvuka na stanicu. Prijavljen je niz promjena, od kojih su mnoge subletalne ili reverzibilne.

Izvanstanična membrana najčešći je predmet istraživanja. Učinci izazvani ultrazvukom obično se manifestiraju promjenama u propusnosti za prijenos iona. Primjeri uključuju subletalnu promjenu u plazmatskoj membrani timocita, što dovodi do smanjenja koncentracije kalija nakon ozračivanja *in vitro* s 1 W/cm^2 pri 1,8 MHz [19], te reverzibilno povećanje unosa kalcija u fibroblastima, kako su pokazali Mortimer i Dyson [1 MHz, 0,5– $1,0 \text{ W/cm}^2$ I_{spta}] [20]. Ovi učinci su predmet brojnih istraživanja, posebice u kontekstu povećanog interesa za primjenu ultrazvuka u pojačavanju isporuke lijekova i gena [21].

Koristeći elektronsku mikroskopiju uočeno je oštećenje organela nakon izloženosti ultrazvuku. Najčešće su pogođeni mitohondriji i lizosomi. Prošireni hrapavi endoplazmatski retikulum (engl. *rough endoplasmic reticulum*; RER) i nepravilne unutarstanične lezije, uz učinke na membranu i mitohondrije, primijećeni su pri intenzitetima iznad praga kavitacije. Općenito, u odsutnosti kavitacije, čini se da jezgra stanice nije pogođena ultrazvučnim zračenjem. Jedine lezije koje su zabilježene uključuju prorezaste vakuole na jezgrinoj membrani [22].

1.5.3. Učinci ultrazvuka na DNA i kromosome

Ultrazvuk može degradirati DNA u otopini. Čini se da je za ovaj proces neophodna kavitacija, a oštećenja su uzrokovana hidrodinamičkim smičnim naprezanjima, stvaranjem slobodnih radikala ili prekomjernim zagrijavanjem koje može pratiti nastanak kavitacija. Takva pojavnost kavitacija malo je vjerojatna tijekom dijagnostičkih izlaganja ultrazvuku. Značajni naponi uloženi su u istraživanje mogućih kromosomskih aberacija

induciranih ultrazvukom te razmjene sestrinskih kromatida. Dokazi su uvjerljivi, pa tako i pri relativno visokim intenzitetima (do 100 W/cm²) ultrazvuk ne uzrokuje kromosomska oštećenja. Iako su povremeno postojala izvješća kako ultrazvuk može izazvati kromosomske učinke, ta izvješća nikada nisu neovisno potvrđena dodatnim istraživanjima, a velika većina literature daje negativne rezultate. Međutim, postoji mogućnost sinergijskog učinka kada izlaganje ultrazvuku slijedi nakon izlaganja X-zrakama, ali ne i kada mu prethodi (810 kHz, 3 W/cm²) [23]. Analiza razmjene sestrinskih kromatida često se koristi za ispitivanje učinaka potencijalno mutagenih agenasa na stanice sisavaca [24]. Liebeskind i sur. izvijestili su kako dijagnostički ultrazvuk može inducirati razmjenu sestrinskih kromatida *in vitro*. Ovaj zaključak potaknuo je mnoge studije, pri čemu je većina istraživača izvijestila o negativnim rezultatima, čak i pri intenzitetima do 3.0 W/cm². Značaj povećanja razmjene sestrinskih kromatida za stanice ili cijeli organizam još uvijek nije potpuno objašnjen [25].

1.5.4. Funkcionalne promjene stanica

Ultrazvuk može na stanične funkcije djelovati stimulativno ili inhibitorno. Na primjer, ultrazvuk može povećati sintezu proteina kod ljudskih fibroblasta *in vitro*. Dokazano je da ultrazvuk ima značajan učinak na sintezu kolagena posredovanu fibroblastima i *in vitro* i *in vivo*. Elektronska mikroskopija ovih stanica otkrila je više slobodnih ribosoma, proširenje grubog endoplazmatskog retikuluma, više citoplazmatskih vakuola, autofagičnih vakuola te oštećenja lizosoma i mitohondrija u usporedbi s kontrolnom skupinom stanicama. Naknadne studije iste grupe [26] sugerirale su da kavitacija može biti uključena u poticanje sinteze kolagena. Također je pokazano kako ultrazvuk može potaknuti oslobađanje histamina iz mastocita kroz degranulaciju, najvjerojatnije povećanjem transporta kalcijevih iona preko njihovih membrana [20]. Druge funkcionalne promjene povezane su s kretanjem stanica. U studijama vremenske (engl. *time-lapse*) fotomikroskopije, primijećene su promjene u staničnom kretanju uzrokovane ultrazvukom,

koje su trajale nekoliko generacija [25]. Ultrazvuk može djelovati na elektroforetsku pokretljivost stanica, što je odraz promjena u površinskoj gustoći stanica uzrokovanih povećanjem volumena stanice. Ove promjene su uglavnom zabilježene *in vitro* i povezane su s nastankom kavitacija [27].

1.6. Biološki učinci ultrazvuka na tkiva

1.6.1. Učinci ultrazvuka na kost

Glavni razlog za zabrinutost kada je kost izložena ultrazvučnom snopu je pregrijavanje periosta, budući da je atenuacija energije u kosti prevelika da bi se omogućila značajna prodornost pri dijagnostičkim frekvencijama. Ovo zagrijavanje vjerojatno predstavlja ograničavajući čimbenik u primjeni ultrazvuka u fizioterapiji ili terapiji hipertermijom, s obzirom na to da je periost bogat živčanim završecima. Također postoji mogućnost značajnog zagrijavanja kosti tijekom pulsnih Doppler pregleda pri maksimalnim razinama izlazne snage. Kod osoba s normalnom osjetljivošću na bol, prekomjerno zagrijavanje periosta najvjerojatnije će izazvati bol. Ako se liječenje prekine čim se bol osjeti, vjerojatno će se izbjeći oštećenje tkiva.

Od svih mogućih Doppler pregleda, oni u opstetriciji izazivaju najveću zabrinutost zbog mogućeg toplinskog oštećenja, budući da je proliferativno tkivo posebno osjetljivo na toplinska oštećenja. U laboratorijskim eksperimentima na životinjama zabilježena su biološki značajna povećanja temperature ($> 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) u blizini kostiju lubanje kao posljedica ultrazvučne izloženosti [28].

Ultrazvuk može ubrzati cijeljenje kostiju [29]. Mehanizam ovog učinka nije potpuno razjašnjen. Eksperimentalna studija prijeloma fibule kod štakora pokazuje da ultrazvučno zračenje tijekom upalne i rane proliferativne faze reparacije ubrzava i poboljšava cijeljenje [30]. Pri tome je zabilježena izravna osifikacija uz minimalnu proizvodnju hrskavice.

Međutim, tretman u kasnoj proliferativnoj fazi pokazao se nepovoljnim jer je potaknuta proizvodnja hrskavice, što je odgodilo koštano spajanje [30]. Pilla i suradnici pokazali su da je čvrstoća ultrazvučno tretiranih fibula kod zečeva dostigla razinu netretiranih kostiju nakon 17 dana od osteotomije, u usporedbi s 28 dana kod kontrolnih životinja (1,5 MHz, I_{sata} 0,03 W/cm², 200 μ s: 800 μ s, 20 minuta dnevno) [31]. Heckman i sur. u kliničkom ispitivanju na ljudima pokazali su slično ubrzanje cijeljenja. Liječili su otvorene prijelome tibije i zabilježili značajno smanjenje vremena potrebnog za postizanje kliničkog i radiografskog cijeljenja ($96 \pm 4,9$ dana za ultrazvučno tretiranu skupinu, $154 \pm 13,7$ dana za kontrolnu skupinu) (1,5 MHz, I_{sata} 0,03 W/cm², 200 μ s: 800 μ s, svakodnevno, počevši unutar 7 dana nakon prijeloma). Izgleda da nije samo važno kada se započinje s tretmanom, već i doza. Prevelik intenzitet može dovesti do inhibicije sinteze proteina ili, u najgorem slučaju, do štetnih učinaka [32]. Tsai i sur. otkrili su da je intenzitet od 0,5 W/cm² (I_{sata}) značajno ubrzao popravak kostiju, dok je 1,0 W/cm² (I_{sata}) potisnuo proces popravka (1,5 MHz, 200 μ s, 5–20 minuta dnevno) [33]. Reher i sur. u *in vitro* studiji učinaka ultrazvuka na mišju kalvarijalnu kost otkrili su da je intenzitet od 0,1 W/cm² (3 MHz, 2 ms:8 ms, 5 minuta) stimulirao sintezu kolagena i nekolagenih proteina, dok su intenziteti od 0,5–2 W/cm² inhibirali ove procese. Stimulacija sinteze proteina pripisana je aktivnosti osteoblasta [34]. Yang i sur. pronašli su statistički značajno povećanje mehaničke čvrstoće kod prijeloma femura štakora pri intenzitetu od 0,05 W/cm² (I_{sata} , 0,5 MHz), ali ne i pri 0,1 W/cm². Zabilježili su promjenu u izražaju gena povezanih s formiranjem hrskavice u tretiranim kostima. Izražaj gena koji kodira sintezu agrekana bila je veća od kontrolnih vrijednosti na sedmi dan, ali niža od kontrolnih vrijednosti na 21. dan [35]. Wang i sur. otkrili su ubrzano zarastanje prijeloma kod štakora nakon 21 dana, ali samo pri frekvenciji od 1,5 MHz (I_{sata} 0,03 W/cm², 200 μ s: 800 μ s), dok nije bilo učinaka pri 0,5 MHz [36].

1.6.2. Učinci ultrazvuka na meka tkiva

Promjene u stanici uzrokovane primjenom ultrazvuka na netaknuta meka tkiva već su prethodno opisane. Najviše su pogođene izvanstanične membrane, lizosomi i mitohondriji. Ultrazvučna izloženost rana na mekim tkivima može ubrzati zacjeljivanje što se vjerojatno pripisuje poticanju sinteze proteina [37]. Intenziteti iznad 1 W/cm^2 pokazali su da proizvode različite učinke u glatkim mišićima, uključujući promjenu kontraktilne aktivnosti i inhibiciju akcijskih potencijala. Smatra se da su ovi učinci rezultat akustičkog strujanja koje mijenja prijenos iona preko staničnih membrana [1].

1.6.3. Učinci ultrazvuka na krv i krvožilni sustav

Najosjetljiviji dio krvožilnog sustava su trombociti. Oštećenje trombocita je važno jer povećava rizik od stvaranja ugruška. Williams je pokazao da se oštećenje trombocita može inducirati *in vitro* putem smičnih naprezanja povezanih s ultrazvučnom izloženošću, pri razinama intenziteta manjim od onih potrebnih za oštećenje eritrocita. U prisutnosti stabilnih mjehurića, trombociti u suspenziji mogu biti oštećeni već pri prosječnim prostornim intenzitetima od samo $0,8 \text{ W/cm}^2$ [38].

S druge strane, eritrociti su otporniji na djelovanje ultrazvuka. U prisutnosti inercijske kavitacije, primijećena je hemoliza [39]. ATP se može osloboditi pri manjim prosječnim prostornim intenzitetima u prisutnosti neinerijske kavitacije [40].

Puna krv *in vivo* kontinuirano filtrira nečistoće, stoga nije bogata potencijalnim jezgrama kavitacije, što otežava induciranje kavitacije u cijeloj krvi. Ipak, Brayman i sur. dokazali su da se kavitacija može dogoditi ako je akustični tlak dovoljno velik ($\sim 17 \text{ MPa}$). Dodavanje kontrastnih sredstava punjenih plinom u punu ili razrijeđenu krv može smanjiti minimalne vrijednosti akustičkog tlaka kod kojih može doći do kavitacija na samo 11 MPa . Međutim,

ovaj tlak je i dalje znatno viši od tlakova koji se stvaraju u komercijalnim dijagnostičkim ultrazvučnim uređajima [17].

Pokušaji otkrivanja oštećenja krvnih sastojaka *in vivo* uglavnom nisu dali pozitivne rezultate. To nije bilo iznenađujuće jer je i očekivano da će samo mali volumen stanica biti pogođen, a oštećene stanice brzo su bile razrijeđene normalnim stanicama koje cirkuliraju u tom području. Dalecki i sur. uspjeli su detektirati klinički beznačajnu razinu hemolize (<4%) nakon ultrazvučnog izlaganja krvi miševa kroz stijenku prsnog koša. Pri frekvenciji od 2,35 MHz otkriveno je samo 0,46% hemolize pri amplitudi tlaka od 10 MPa [41].

Ekstravazacija eritrocita primijećena je kod sisavaca nakon izlaganja njihovih pluća djelovanju ultrazvuka. Krvarenje je također primijećeno u blizini fetalnih kostiju (uz frekvenciju 1,2 MHz; maksimalni tlak pri kompresiji 4 MPa, maksimalni negativni tlak 2,5 MPa). Ovo se pripisuje relativnom gibanju između djelomično osificiranih kostiju i okolnog tkiva, što može rezultirati oštećenjem osjetljivih fetalnih krvnih žila [42].

Oštećenja plazmatske membrane luminalnog dijela endotelnih stanica krvnih žila u embriju pilića i maternici miša zabilježena su nakon izlaganja ultrazvučnim stojnim valovima *in vivo* [22].

1.6.4. Pulsirajući ultrazvuk niskog intenziteta

Pulsirajući ultrazvuk niskog intenziteta (engl. *low-intensity pulsed ultrasound*, LIPUS) je specifična vrsta ultrazvuka niskog intenziteta koji isporučuje akustičku energiju tkivima u obliku impulsa ultrazvučnih valova [43]. Prostorno - vremenski prosjek intenziteta (I_{sata}) LIPUS-a je uobičajeno manji od 100 mW/cm². Najveći broj aktualno dostupnih, komercijalnih LIPUS uređaja uobičajeno emitiraju ultrazvuk prosječnog intenziteta u

vremenu i prostoru od 30 mW/cm^2 I_{sata} , frekvencije 1.5 MHz, uz frekvenciju ponavljanja impulsa od 1kHz na 20% radnoga ciklusa. Pri intenzitetu 30 mW/cm^2 , kavitacijski i termički učinci su zanemarivi [44].

Primjenu pulsirajućeg ultrazvuka niskog intenziteta u ubrzavanju cijeljenja kosti su prvi put objavili Xavier i Duarte još 1983. godine [29]. Nakon toga uslijedile su kliničke studije koje su pokazale da LIPUS ubrzava cijeljenje svježih prijeloma [32, 45]. Uspješna primjena LIPUS-a u kliničkim istraživanjima je u SAD-u rezultirala s registracijom prvih uređaja u komercijalne svrhe od strane Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA), a indikacije za primjenu jesu od, 1994. godine, cijeljenje svježih prijeloma, a od 2000. godine i liječenje nesraslih prijeloma (pseudoartroza) [46, 47]. Primjena LIPUS-a se pokazala učinkovitom i u regeneraciji mekih tkiva, poput tetiva, ligamenata i hrskavice kroz poticanje sinteze fibroblasta i kolagena te angiogene, hondrogene i osteogene aktivnosti [48–50]. Recentnije su studije istraživale mogućnost korištenja LIPUS-a u dentalnoj medicini za stimulaciju nastanka kosti i osteointegraciju dentalnih titanskih implantata [51].

Iako je veliki broj *in vivo* i *in vitro* studija ustanovio da LIPUS stimulira cijeljenje koštanih prijeloma, mehanizmi nisu u potpunosti objašnjeni. Mogući mehanizmi uključuju izravne i neizravne mehaničke utjecaje kao što su akustička radijacijska sila, akustičko strujanje, propagacija površinskih valova, cirkulacija inducirana protokom tekućine te redistribucija nutrijenata, kisika i signalnih molekula [52–56].

Brojnim se kliničkim i pretkliničkim istraživanjima analiziralo molekulske mehanizme uključene u proces cijeljenja kosti primjenom LIPUS-a. Ustanovljeno je da mehanički stimulus facilitira tranziciju mezenhimalnih matičnih stanica (engl. *mesenchymal stem cells*, MSC) u osteogene stanice i inducira stanice koštanoga tkiva da proizvode osteoid i njegovu mineralizaciju [57, 58]. Primjenom LIPUS-a u kulturi stanica, uočena je značajna diferencijacija mezenhimalnih matičnih stanica u osteogene stanice te razvoj preosteoblasta u zrele diferencirane osteoblaste, što se može objasniti razvojem

mehanoprijenosnih puteva (engl. *gap junctions*) [59]. Također, pokazano je da LIPUS inducira adheziju i proliferaciju mezenhimalnih matičnih stanica dovodeći do stvaranja klastera kao budućih osifikacijskih centara [60, 61].

Neke studije predlažu da je upravo COX-2 ključna molekula koja prilikom stimulacije LIPUS-om utječe na proizvodnju prostaglandina E2 (PGE2). Ovaj mehanizam je opisan na način da LIPUS proizvodi nano-pokrete na mjestu koštanog defekta te ti pokreti bivaju detektirani od strane transmembranskih receptora, integrina, koji pretvaraju mehanički val u biokemijski. Integrini tada utječu na COX-2 koja djeluje kao posrednik u proizvodnji PGE2 koji pak stupa u međudjelovanje s okolnim stanicama i pospješuje proces regeneracije kosti [61]. Prema tome, LIPUS bi trebao predstavljati vrijednu neinvazivnu alternativu za cijeljenje kosti zbog toga što COX-2 čini ključnu ulogu prilikom endohondralne, ali i intramembranske osifikacije tijekom cijeljenja ljudskoga skeleta [62].

1.7. Koštano tkivo

Koštano tkivo je specijalizirani oblik mineraliziranog potpornog tkiva, koje se odlikuje specifičnim biomehaničkim svojstvima, uključujući visoku čvrstoću i elastičnost. Ova svojstva omogućuju koštanom tkivu otpornost na različite fizičke sile, osobito na vlačne i tlačne sile. Strukturalna organizacija koštanog tkiva izuzetno je ekonomična, što se očituje u optimalnoj ravnoteži između njegove funkcije i minimalne mase građevinskog materijala, poznato kao Rouxov zakon. Poput drugih tkiva, koštano tkivo se sastoji od stanica i međustanične tvari uz dominaciju međustanične tvari u sastavu.

1.8. Koštane stanice

U koštanom tkivu prisutno je nekoliko tipova stanica koje imaju specifične funkcije: osteoblasti, pokrovne stanice (engl. *lining cells*), osteociti i osteoklasti.

1.8.1. Osteoblasti

Osteoblasti su kuboidne stanice smještene uz površinu kosti, čineći 4-6% ukupnog broja stanica koštanog tkiva i poznati su po svojoj funkciji formiranja kosti. Imaju morfološke karakteristike stanica koje sintetiziraju proteine, uključujući obilno razvijen hrapavi endoplazmatski retikulum i izražen Golgijev kompleks, kao i brojne sekrecijske vezikule. Kao polarizirane stanice, osteoblasti luče osteoid prema koštanom matriksu [63].

Osteoblasti potječu iz mezenhimalnih matičnih stanica (engl. *mesenchymal stem cells*, MSC). Diferencijacija MSC-a u osteoprogenitorsku lozu zahtijeva izražaj specifičnih gena, uključujući sintezu koštanih morfogenetskih proteina (engl. *bone morphogenetic proteins*, BMP-ova) i proteina iz Wingless (Wnt) signalnih putova. Izražaj runt-srodnog transkripcijskog čimbenika-2 (engl. *runt-related transcription factor 2*, Runx2), Distal-less homeobox 5 (Dlx5) i osterixa (Osx) ključna je za diferencijaciju osteoblasta. Runx2 je ključni gen za diferencijaciju osteoblasta, što je potvrđeno činjenicom da miševi bez Runx2 gena nemaju osteoblaste [63, 64]. Runx2 potiče izražaj gena povezanih s osteoblastima poput COL1A1, ALP, koštanog sijaloproteina i osteokalcina [65].

Tijekom diferencijacije osteoblasta, nakon što se uspostavi populacija osteoprogenitornih stanica koje izražavaju Runx2 i COL1A1, dolazi do faze proliferacije. U ovoj fazi osteoprogenitorne stanice pokazuju aktivnost alkalne fosfataze (ALP) i smatraju se preosteoblastima [63]. Prijelaz iz preosteoblasta u zrele osteoblaste karakterizira povećani izražaj Osx-a i sekrecija proteina koštanog matriksa poput osteokalcina, koštanog sijaloproteina I/II i kolagena tipa I. Također, osteoblasti prolaze kroz morfološke

promjene i postaju velike kuboidne stanice [64, 66].

Sinteza koštanog matriksa od strane osteoblasta odvija se u dvije glavne faze: taloženje organskog matriksa i njegova kasnija mineralizacija. U prvoj fazi osteoblasti izlučuju kolagen, uglavnom kolagen tipa I te nekolagene proteine (osteokalcin, osteonektin, koštani sijaloprotein II i osteopontin) i proteoglikane, uključujući dekorin i biglikan, koji čine organski matriks. Mineralizacija koštanog matriksa odvija se u dvije faze: vezikularna i fibrilarna faza [67]. Vezikularna faza započinje kada se iz apikalne membrane osteoblasta otpuštaju vezikule, koje se vežu na proteoglikane i druge organske komponente u novonastalom koštanom matriksu. Sulfatizirani proteoglikani, zbog svog negativnog naboja, vežu kalcijeve ione koji se pohranjuju unutar vezikula matriksa. Enzimi koje osteoblasti izlučuju razgrađuju proteoglikane, oslobađajući kalcijeve ione, koji prolaze kroz kalcijeve kanale na membrani vezikula matriksa [67]. Unutar vezikula matriksa fosfatni ioni se oslobađaju razgradnjom fosfatnih spojeva, što vodi stvaranju kristala hidroksiapatita. U fibrilarnoj fazi, supersaturacija kalcijevih i fosfatnih iona unutar vezikula dovodi do njihovog pucanja, te se kristali hidroksiapatita šire u okolni matriks [68].

Zreli osteoblasti tvore jednostruki sloj kuboidnih stanica s obilnim hrapavim endoplazmatskim retikulumom i velikim Golgijevim kompleksom. Neki osteoblasti pokazuju citoplazmatske izdanke prema koštanom matriksu, povezujući se s izdancima osteocita. U ovoj fazi, zreli osteoblasti mogu ući u apoptozu, diferencirati se u osteocite ili postati pokrovne stanice [69].

1.8.2. Koštane pokrovne stanice

Koštane pokrovne stanice su uspavani, plosnati osteoblasti koji prekrivaju površine kostiju na kojima se ne odvija ni resorpcija ni formiranje kosti [70]. Ove stanice imaju tanku i plosnatu jezgru; njihova citoplazma proteže se duž površine kosti te sadrži malo

citoplazmatskih organela, uključujući hrapavi endoplazmatski retikulum i Golgijev aparat [70]. Neke od tih stanica imaju produžetke koji se protežu u kanalikule, a također su primijećeni spojne veze (engl. *gap junctions*) između susjednih stanica koje oblažu kost i između njih i osteocita [70].

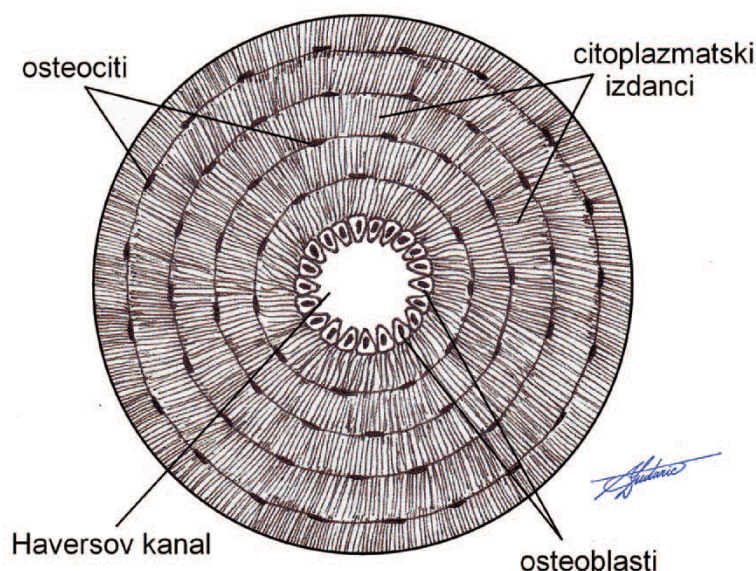
Sekretorna aktivnost ovih stanica ovisi o fiziološkom stanju kosti, pri čemu ove stanice mogu ponovno steći sekretornu aktivnost, povećati veličinu i poprimiti kuboidni oblik. Funkcije stanica koje oblažu kost nisu potpuno razumljive, ali se zna da ove stanice sprječavaju izravnu interakciju između osteoklasta i koštanog matriksa kada se ne bi trebala odvijati resorpcija kosti te sudjeluju u diferencijaciji osteoklasta, proizvodeći osteoprotegerin (OPG) i receptor aktivator jezgrinog činitelja κ B ligand, (engl. *receptor activator of nuclear factor κ B ligand*, RANKL) [71].

1.8.3. Osteociti

Osteociti, koji čine 90–95% ukupnih koštanih stanica, najzastupljenije su i najdugovječnije stanice, s životnim vijekom do 25 godina [72]. Za razliku od osteoblasta i osteoklasta, čije su funkcije definirane tijekom formiranja i resorpcije kosti, osteociti su u početku definirani svojom morfologijom i lokalizacijom. Zbog poteškoća u izolaciji osteocita iz koštanog matriksa dugo se smatralo da su ove stanice pasivne i njihove funkcije su bile krivo tumačene [73]. Usavršavanje naprednih tehnika i inovativnih tehnologija, uključujući identifikaciju specifičnih biomarkera osteocita, uspostavu novih *in vivo* modela, metoda za izolaciju i *in vitro* kultivaciju osteogenih stanica, doprinio je temeljitijem shvaćanju bioloških procesa povezanih s osteocitima. Uočeno je da osteociti imaju ključnu ulogu u koštanom metabolizmu. [74].

Osteociti su smješteni unutar lakuna, okruženi mineraliziranim koštanim matriksom, gdje pokazuju dendritičku morfologiju (Slika 1). Morfologija osteocita razlikuje se ovisno o vrsti

kosti. Na primjer, osteociti trabekularne kosti su više zaobljeni u usporedbi s osteocitima iz kortikalne kosti, koji su izduženi [73].



Slika 1. Grafički prikaz Haversovog osteona građen od 5 koštanih lamela. Osteociti se međusobno povezuju koristeći citoplazmatske izdanke. Preuzeto iz Đudarić i sur. [75].

Osteociti potječu iz loze MSC-a diferencijacijom osteoblasta. U ovom procesu predložene su četiri prepoznatljive faze: osteoid-osteocit, preosteocit, nezreli osteocit i zreli osteocit [72]. Na kraju ciklusa formiranja kosti, podskupina osteoblasta postaje osteocit ugrađen u koštani matriks. Ovaj proces prate morfološke i strukturalne promjene, uključujući smanjenje veličine okruglih osteoblasta. Broj organela, poput hrapavog endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog aparata, smanjuje se, dok se omjer jezgre i citoplazme povećava, što odgovara smanjenju sinteze i sekrecije proteina [76].

Tijekom tranzicije osteoblasta u osteocite, citoplazmatski izdanci počinju se pojavljivati prije nego što osteociti budu potpuno ugrađeni u koštani matriks [63]. Mehanizmi koji sudjeluju u razvoju tih citoplazmatskih procesa nisu u potpunosti shvaćeni. Međutim,

protein E11/gp38, poznat i kao podoplanin, mogao bi imati ključnu ulogu. E11/gp38 je visoko izražen u osteocitima koji se ugrađuju ili su nedavno ugrađeni, slično drugim stanicama s dendritičkom morfologijom, poput podocita, alveolarnih stanica tipa II u plućima te stanica koroidnog plexusa [77]. Smatra se da E11/gp38 koristi energiju iz aktivnosti GTPaze kako bi stupio u međudjelovanje sa sastavnicama citoskeleta i molekulama uključenima u staničnu pokretljivost, regulirajući dinamiku aktinskog citoskeleta [60, 61]. U skladu s tim, inhibicija izražaja E11/gp38 u osteocitima sličnim MLO-Y4 stanicama pokazala je blokiranje izduživanja dendrita, sugerirajući da je E11/gp38 uključen u stvaranje dendrita kod osteocita [77].

Nakon što osteocit dosegne zrelu fazu gdje je potpuno zarobljen unutar mineraliziranog koštanog matriksa, nekoliko markera ranije izraženih kod osteoblasta, poput OCN, BSP, kolagen tipa I i ALP, se smanjuju. S druge strane, markeri osteocita, uključujući dentinski matriksni protein 1 (DMP1) i sklerostin, postaju visoko izraženi [78, 79].

Dok se tijelo osteocita nalazi unutar lakune, njegovi citoplazmatski izdanci (do 50 po svakoj stanici) prolaze kroz male kanale koji potječu iz lakune, zvani kanalikuli, tvoreći osteocitni lakunokanalikularni sustav. Ovi citoplazmatski izdanci povezani su s procesima susjednih osteocita putem spojnih veza (engl. *gap junctions*), kao i s citoplazmatskim nastavcima osteoblasta i pokrovnim stanicama na površini kosti, čime se olakšava međustanični transport malih signalnih molekula poput prostaglandina i dušikovog oksida između tih stanica. Nadalje, lakunokanalikularni sustav osteocita nalazi se u blizini krvožilne opskrbe, preko koje osteociti dobivaju kisik i hranjive tvari [80].

Procijenjeno je da je površina osteocita 400 puta veća od svih Haversovih i Volkmannovih sustava zajedno te više od 100 puta veća od površine trabekularne kosti [81]. Komunikacija između stanica se odvija i putem intersticijske tekućine koja prolazi između nastavaka osteocita i kanalikula [81]. Pomoću lakunokanalikularnog sustava, osteociti djeluju kao mehanosenzori jer njihova međusobno povezana mreža ima sposobnost otkrivanja mehaničkih pritisaka i opterećenja, pomažući prilagodbi kosti svakodnevnim

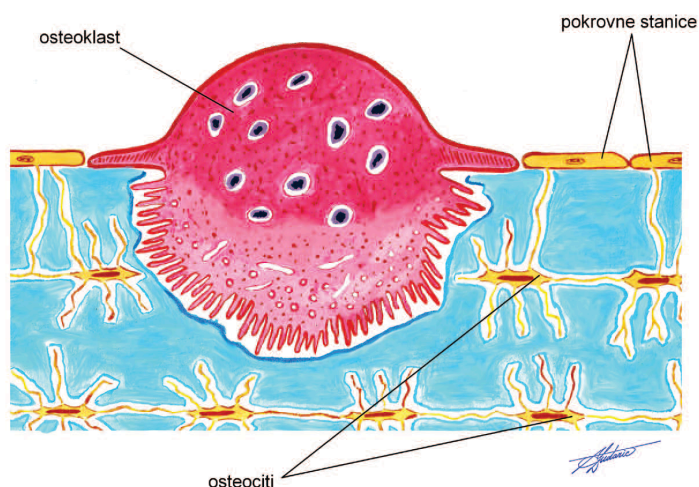
mehaničkim silama [73]. Zbog ovoga čini se da su upravo osteociti glavni regulatori pregradnje kosti, regulirajući aktivnost osteoblasta i osteoklasta [74, 80]. Štoviše, apoptoza osteocita prepoznata je kao kemotaktički signal za resorpciju kosti osteoklastima [82]. U skladu s tim, pokazano je da tijekom resorpcije kosti apoptotske osteocite fagocitiraju osteoklasti [83].

Mehanosenzorska funkcija osteocita ostvaruje se zahvaljujući strateškom položaju ovih stanica unutar koštanog matriksa. Oblik i prostorni raspored osteocita u skladu su s njihovom funkcijom otkrivanja i prijenosa signala, omogućujući prevođenje mehaničkih podražaja u biokemijske signale, fenomen poznat kao piezoelektrični učinak [84]. Mehanizmi i sastavnice pomoću kojih osteociti pretvaraju mehaničke podražaje u biokemijske signale nisu u potpunosti razjašnjeni. Međutim, predložena su dva mehanizma. Jedan od njih uključuje proteinski kompleks sastavljen od cilija i njegovih pridruženih proteina, polycistina 1 i 2, koji su ključni za mehanosenzaciju osteocita i za osteoblastima/osteocitima posredovano stvaranje kosti [85]. Drugi mehanizam uključuje sastavnice citoskeleta osteocita, uključujući kompleks fokalne adhezije i njegove brojne aktinom povezane proteine kao što su paksilin, vinkulin, talin i ziksin [86]. Nakon mehaničke stimulacije, osteociti proizvode nekoliko sekundarnih glasnika, poput ATP-a, dušikovog oksida, Ca^{2+} i prostaglandina (PGE_2 i PGI_2), koji utječu na fiziologiju kosti [78, 87]. Neovisno o uključenom mehanizmu, važno je napomenuti da je mehanosenzorska funkcija osteocita moguća zbog složene kanalikularne mreže koja omogućuje komunikaciju između koštanih stanica.

1.8.4. Osteoklasti

Osteoklasti su terminalno diferencirane multinuklearne stanice koje nastaju od mononuklearnih stanica hematopoetske loze pod utjecajem nekoliko čimbenika (Slika 2).

Među tim čimbenicima su čimbenik koji stimulira kolonije makrofaga (engl. *macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF), kojeg izlučuju osteoprogenitorne mezenhimalne stanice i osteoblasti, te RANK ligand, kojeg izlučuju osteoblasti, osteociti i stromalne stanice [88]. Ovi čimbenici zajedno potiču aktivaciju transkripcijskih čimbenika [89] i izražaj gena u osteoklastima [90].



Slika 2. Grafički prikaz osteoklasta u Howshipovoj lakuni. Preuzeto iz Đudarić i sur. [75].

M-CSF se veže na svoj receptor (cFMS) prisutan u prekursorima osteoklasta, čime potiče njihovu proliferaciju i inhibira apoptozu [89]. RANKL je ključan čimbenik za osteoklastogenezu i izražavaju ga osteoblasti, osteociti i stromalne stanice. Kada se veže na svoj receptor RANK u prekursorima osteoklasta, potiče se stvaranje osteoklasta [91]. S druge strane, osteoprotegerin (OPG), kojeg proizvode brojne stanice uključujući osteoblaste, stromalne stanice te gingivalne i periodontalne fibroblaste, veže se na RANKL, sprječavajući interakciju RANK/RANKL i tako inhibira osteoklastogenezu [92]. Ovaj sustav RANKL/RANK/OPG ključni je posrednik osteoklastogeneze [92, 93].

Međudjelovanje RANKL/RANK također potiče izražaj drugih osteoklastogenih čimbenika

kao što su NFATc1 i DC-STAMP. NFATc1, u međudjelovanju s transkripcijskim čimbenicima PU.1, cFos i MITF, regulira gene specifične za osteoklaste, uključujući TRAP i katepsin K, koji su ključni za aktivnost osteoklasta. Pod utjecajem međudjelovanja RANKL/RANK, NFATc1 također potiče izražaj DC-STAMP-a, što je važno za fuziju prekursora osteoklasta [94, 95].

Tijekom remodeliranja kosti osteoklasti se polariziraju, pa se mogu uočiti četiri tipa membranskih domena osteoklasta: zona zatvaranja (engl. *sealing zone*) i naborana granica (engl. *ruffled border*) koje su u kontaktu s koštanim matriksom, kao i bazolateralne i funkcionalne sekretorne domene koje nisu u kontaktu s koštanim matriksom [96, 97]. Polarizacija osteoklasta tijekom resorpcije kosti uključuje reorganizaciju citoskeleta, pri čemu se formira F-aktinski prsten koji obuhvaća gusti, kontinuirani pojas visoko dinamičnih podosoma, čime se izolira područje membrane koje se razvija u naboranu granicu. Važno je napomenuti da se ove domene formiraju samo kada su osteoklasti u kontaktu s izvanstaničnim mineraliziranim matriksom, pri čemu sudjeluju $\alpha_v\beta_3$ -integrin i CD44, koji omogućuju pričvršćivanje podosoma osteoklasta za površinu kosti [98].

Gledajući njihovu strukturu, naborana granica je membranska domena formirana mikrovilima, a izolirana je od okolnog tkiva čistom zonom, poznatom i kao zona zatvaranja. Čista zona je područje bez organela smješteno na periferiji osteoklasta uz koštani matriks [99]. Ova zona formira se aktinskim prstenom i brojnim drugim proteinima, uključujući aktin, talin, vinkulin, paksilin, tensin i proteine povezane s aktinom, poput α -aktinina, fimbrina, gelsolina i dinamina [97]. $\alpha_v\beta_3$ - integrin veže se na nekolagenozni koštani matriks koji sadrži RGD sekvencu, kao što su koštani sialoprotein, osteopontin i vitronektin, stvarajući periferno zatvaranje koje ograničava centralno područje gdje se nalazi naborana granica [99].

Održavanje naborane granice ključno je za aktivnost osteoklasta; ova struktura nastaje zbog intenzivnog transporta lizosomalnih i endosomalnih komponenti. U naboranoj granici prisutan je vakuolarni tip H^+ -ATPaze (V-ATPaza), koji pomaže acidifikaciji resorpcijske

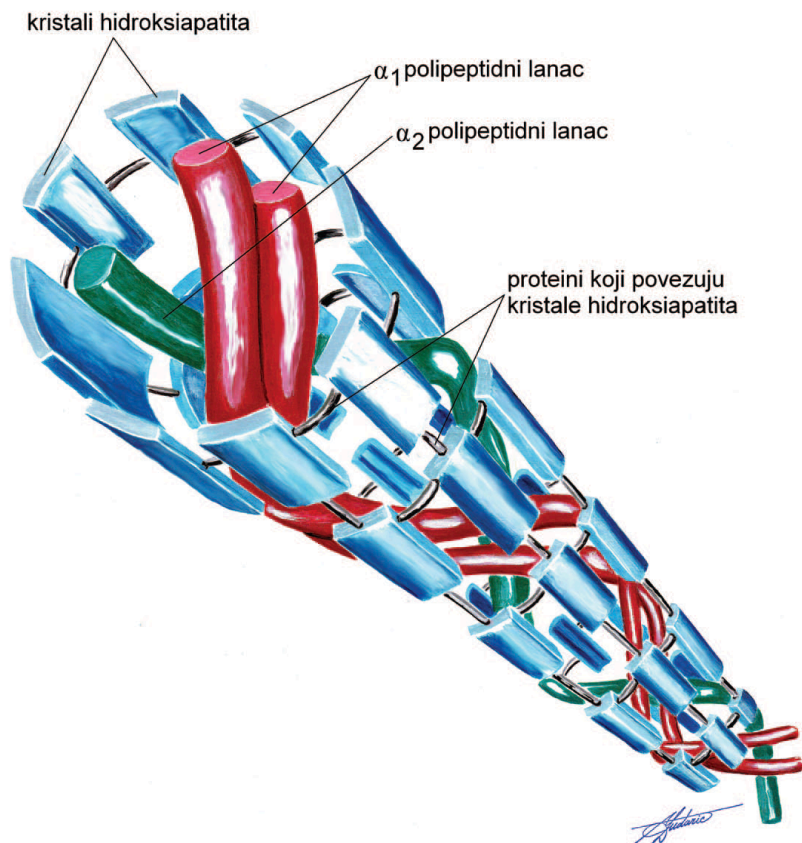
lakune i tako omogućava otapanje kristala hidroksiapatita [88, 100]. U tom području protoni i enzimi, poput tartrat-rezistentne kisele fosfataze (engl. *tartrate-resistant acid phosphatase*, TRAP), katepsina K i matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9), transportiraju se u Howshipovu lakunu, što dovodi do degradacije kosti [96, 100, 101]. Produkti ove degradacije zatim se endocitozom prenose preko naborane granice i transcitozom do funkcionalne sekretorne domene na plazmatskoj membrani [97].

Pokazano je da osteoklasti proizvode čimbenike zvane klastokini koji kontroliraju osteoblaste tijekom ciklusa remodeliranja kosti. Recentna studija upućuje na to da osteoklasti mogu izravno regulirati nišu hematopoetskih matičnih stanica [102]. Ova otkrića ukazuju na to da osteoklasti nisu samo stanice koje resorbiraju kost, već i izvor citokina koji utječu na aktivnost drugih stanica [102].

1.9. Izvanstanični koštani matriks

Kost se sastoji od anorganskih soli i organskog matriksa. Organski matriks sadrži kolagenske proteine (90%), pretežno kolagen tipa I, te nekolagenske proteine, uključujući osteokalcin, osteonektin, osteopontin, fibronektin, koštani sijaloprotein II, BMP-ove i čimbenike rasta. Također su prisutni i mali leucinom bogati proteoglikani poput dekorina, biglikana, lumikana i osteoadherina [103].

Anorganski materijal kosti pretežno se sastoji od fosfatnih i kalcijevih iona, no sadrži i veće količine bikarbonata, natrija, kalija, citrata, magnezija, karbonata, fluorida, cinka, barija i stroncija. Kalcij i fosfatni ioni spajaju se i formiraju kristale hidroksiapatita, koji su predstavljeni kemijskom formulom $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Zajedno s kolagenom, nekolagenski proteini matriksa formiraju rešetku za taloženje hidroksiapatita, a ova povezanost odgovorna je za tipičnu čvrstoću i otpornost koštanog tkiva (Slika 3) [104].



Slika 3. Grafički prikaz prostorne organizacije kristala hidroksiapatita i molekule kolagena tipa I. Preuzeto iz Đudarić i sur. [75].

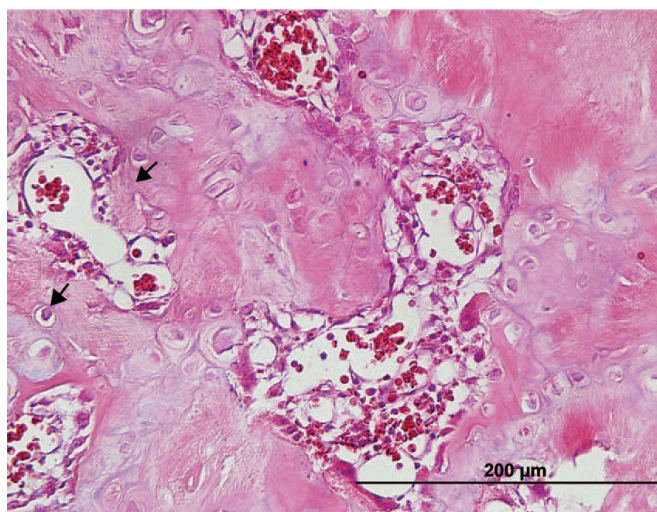
Koštani matriks predstavlja složen i organiziran okvir koji pruža mehaničku potporu i igra ključnu ulogu u održavanju homeostaze kostiju. Koštani matriks može oslobađati različite molekule koje utječu na aktivnost koštanih stanica i tako sudjelovati u procesu remodeliranja kosti. S obzirom na to da sam gubitak koštane mase nije dovoljan da uzrokuje prijelome, sugerira se da su drugi čimbenici, uključujući promjene u proteinskom sastavu koštanog matriksa i njegove modifikacije, od ključne važnosti za razumijevanje i predviđanje prijeloma kostiju [105]. Naime, poznato je da kolagen igra ključnu ulogu u strukturi i funkciji koštanog tkiva [106].

Prema tome, pokazano je da koncentracija proteina koštanog matriksa varira s dobi,

prehranom, bolestima i antiosteoporotičkim tretmanima, što može doprinijeti deformacijama i prijelomima kosti [105]. Na primjer, *in vivo* i *in vitro* studije su pokazale da je povećana sinteza hijaluronske kiseline nakon liječenja paratireoidnim hormonom (PTH) bila povezana s posljedičnom resorpcijom kosti, sugerirajući moguću povezanost između sinteze hijaluronske kiseline i povećane aktivnosti osteoklasta [107].

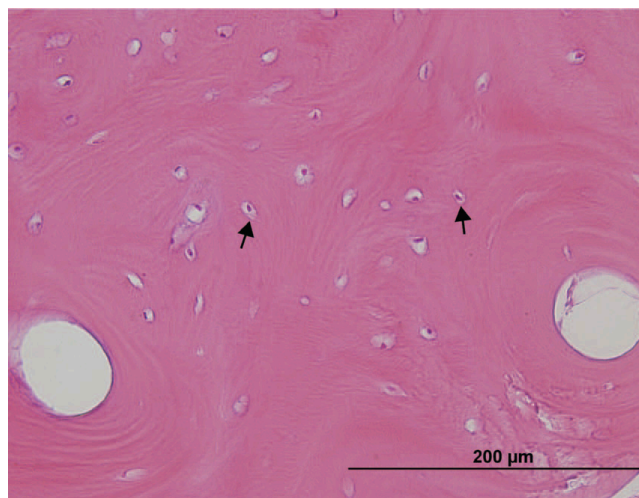
U koštanom tkivu, prema pravilnosti rasporeda njegovih elemenata i stupnju zrelosti, razlikujemo dvije vrste: nezrelo i zrelo koštano tkivo.

Nezrelo koštano tkivo, poznato i kao grubo vlaknato koštano tkivo, karakterizira nepravilna unutarnja arhitektura i nasumično raspoređena kolagena vlakna. Nalazimo ga kod nezrelih jedinki, tijekom rasta i razvoja skeleta, dok kod odraslih osoba ostaje prisutno u područjima kao što su zubni cement, šavovi lubanje, koštani labirint i entezama. Ovo tkivo se također naziva isprepletano koštano tkivo zbog nepravilno usmjerenih kolagenih vlakana različitih debljina. Stanice su brojnije po jedinici volumena u usporedbi sa zrelim koštanim tkivom, te su nepravilno raspoređene unutar međustanične tvari (Slika 4) [108].



Slika 4. Mikrofotografija nezrelog koštanog tkiva. HE bojanje, 400x povećanje. Crne strelice prikazuju osteocite. Preuzeto iz Đudarić i sur. [75].

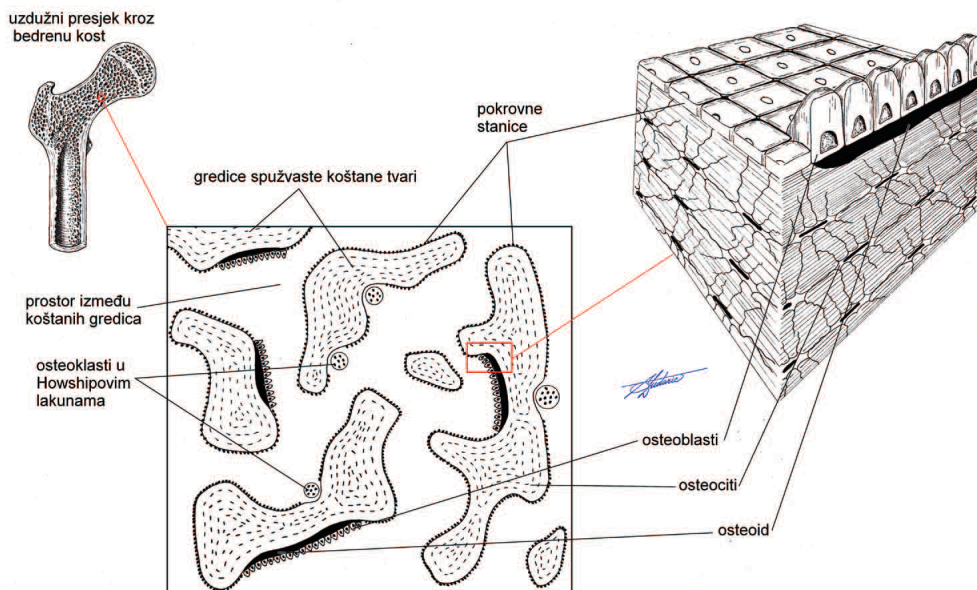
Zrelo koštano tkivo, poznato i kao lamelarno koštano tkivo, najzastupljenije je kod odraslih. Mikroskopski pregled otkriva pravilno raspoređene koštane lamele debljine 5-10 μm , u kojima se nalaze šupljine koje sadrže tijela osteocita. Te su šupljine povezane tankim koštanim kanalićima koji omogućuju komunikaciju između osteocita pomoću njihovih citoplazmatskih izdanaka. Ovi izdanci prolaze kroz kanaliće promjera manjeg od 1 μm (Slika 5) [109].



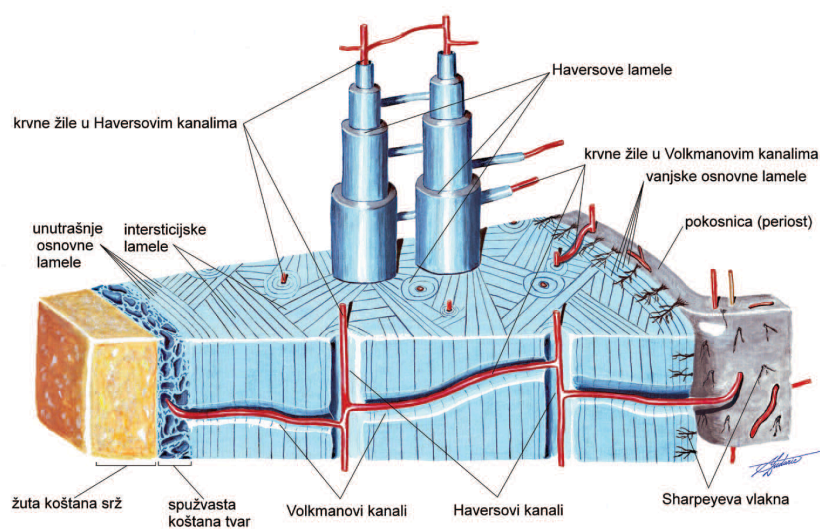
Slika 5. Mikrofotografija zrelog koštanog tkiva. HE bojanje, 400x povećanje. Crne strelice prikazuju osteocite. Preuzeto iz Đudarić i sur. [75].

Zrelo koštano tkivo može biti organizirano u dva osnovna oblika: spužvasto koštano tkivo (lat. *substantia spongiosa*) (Slika 6) i kompaktno koštano tkivo (lat. *substantia compacta*) (Slika 7).

Spužvasto koštano tkivo sadrži koštane gredice koje su raspoređene u pravcima sile koje djeluju na kost, pružajući specifične biomehaničke karakteristike. Prostori između gredica ispunjeni su koštanom srži. U dugim kostima, spužvasto tkivo najviše je prisutno na krajevima kostiju (epifizama) (Slika 6) [108].

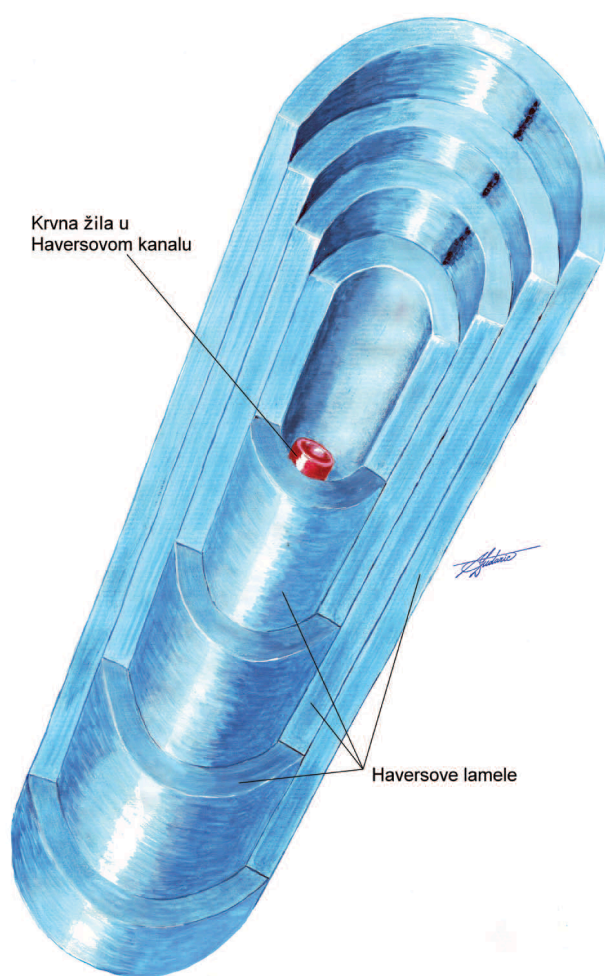


Slika 6. Organizacija spužvastog koštanog tkiva. Preuzeto iz Đudarić i sur. [75].



Slika 7. Organizacija kompaktnog koštanog tkiva na primjeru isječka trupa duge cjevaste kosti. Preuzeto iz Đudarić i sur. [75].

Kompaktno koštano tkivo čini vanjsku površinu svih kostiju i naziva se kortikalna kost. Ono je solidne strukture i nema šupljine ispunjene koštanom srži. Unutar trupa cjevastih kostiju kompaktno tkivo organizirano je u četiri sustava lamela (Slika 7). Ovi sustavi uključuju rubni osnovni sustav lamela, smješten neposredno ispod periosta, te središnji osnovni sustav lamela u dubini kosti. Haversove lamele koncentrično okružuju Haversove kanale, koji sadrže krvne žile i živce, dok su povezani poprečnim Volkmanovim kanalima. Svaki Haversov kanal s odgovarajućim lamelama predstavlja temeljnu jedinicu koštanog tkiva, poznatu kao – osteon (Slika 8) [109].



Slika 8. Grafički prikaz osteona. Preuzeto iz Đudarić i sur. [75].

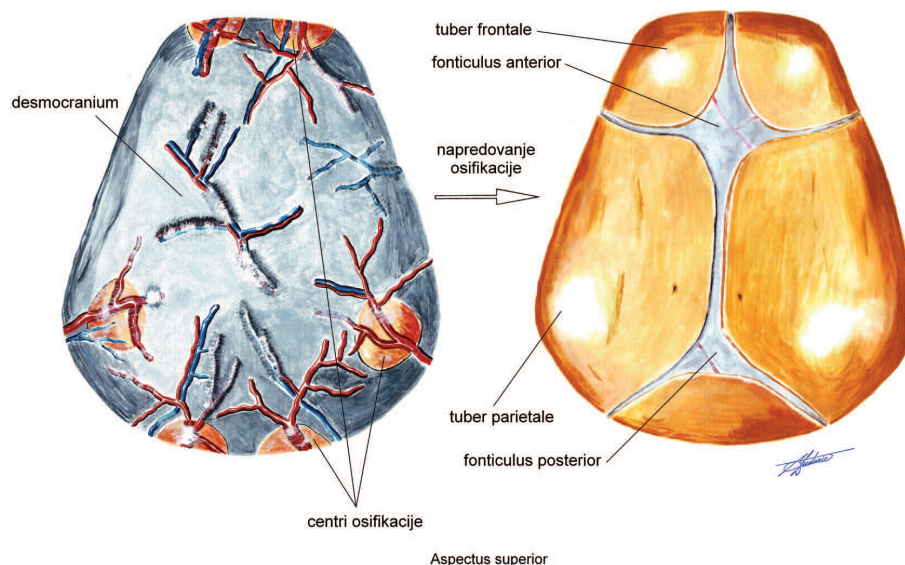
Opisano koštano tkivo čini temeljnu strukturu koštanog sustava, koji ima višestruke funkcije: određuje veličinu i oblik tijela, omogućava pokretanje tijela kao dio lokomotornog sustava, štiti unutrašnje organe, sudjeluje u metabolizmu kalcija te pohranjuje rezerve ovog važnog minerala. Također, koštani sustav sadrži čimbenike rasta i krvotvorne organe.

1.10. Rast i razvoj kosti

Razvoj koštanog sustava započinje u prvom tromjesečju gestacije i traje do postnatalnih godina. Taj razvoj se odvija kroz dva različita procesa: intramembransku osifikaciju i endohondralnu osifikaciju, koji se razlikuju prema okolišu u kojem započinje osifikacija te prema tipu stanica koje proizvode međustanični matriks. Intramembranska osifikacija odvija se u skupini ili kondenzaciji mezenhimalnih stanica koje se izravno diferenciraju u osteoblaste, dok se endohondralna osifikacija odvija na temelju hrskavičnog predloška koji proizvode hondrociti. Oba procesa prisutna su tijekom embriogeneze, kao i postnatalno.

1.10.1. Intramembranska osifikacija

Pločaste kosti krova lubanje, kao i neke kosti visceralnog dijela lubanje te ključna kost, formiraju se tijekom embrionalnog razdoblja putem intramembranske osifikacije. Proces intramembranske osifikacije započinje i odvija se unutar mezenhima, embrionalnog ili primitivnog vezivnog tkiva koje se primarno sastoji od mezenhimalnih stanica (Slika 9). Iako se intramembranska osifikacija uglavnom povezuje s embrionalnim razvojem, može se odvijati i postnatalno (na primjer, tijekom cijeljenja kostiju nakon prijeloma) [110].



Slika 9. Shematski prikaz intramembranske osifikacije kostiju lubanjskog krova. Preuzeto iz Đudarić i sur. [75].

Prvi korak u intramembranskoj osifikaciji je kondenzacija mezenhimalnih stanica, koja se obično naziva koštani blastem. Stanice unutar blastema diferenciraju se u osteoblaste i počinju proizvoditi matriks. Transkripcijski čimbenik Runx2 ima ključnu ulogu u pokretanju diferencijacije stanica blastema prema osteoblastičnoj lozi. Početna proizvodnja koštanog matriksa od strane osteoblasta formira primarni osifikacijski centar, tj. specifično područje gdje se odvijaju procesi rasta kosti. Kako osteoblasti u pojedinim osifikacijskim centrima proizvode sve više matriksa, neki osteoblasti postaju inkapsulirani i tada prelaze u osteocite. Osteoblasti stvaraju nezrelu kost, koja je obilježena neorganiziranom kolagenskom strukturom, što je posljedica brzog stvaranja [110].

Jednom kada je proizvedeno dovoljno koštanog matriksa da formira mali otočić kosti, dodatni osteoblasti se regrutiraju na površinu gdje nastavljaju proizvodnju nezrele kosti ili organizirane primarne lamelarne kosti. Tijekom razvoja, neke kosti nastaju spajanjem nekoliko manjih koštanih otočića. Neke kosti formirane intramembranskom osifikacijom, poput čeljusti, razvijaju šupljine ispunjene koštanom srži. Te šupljine nastaju kada kost postane toliko velika da su centralni osteociti predaleko od dovoljne opskrbe krvlju, što

potiče razvoj krvnih žila u sredini osifikacijskog centra kako bi formirale šupljinu sa srži. Druge kosti formirane ovim procesom, poput ključne kosti, ne razvijaju šupljinu ispunjenu sa srži [111].

1.10.2. Endohondralna osifikacija

Ostatak kostiju skeleta formira se putem endohondralne osifikacije, pri čemu se matriks hijaline hrskavice postupno zamjenjuje mineraliziranim koštanim tkivom. Ovaj proces nije ograničen samo na embrionalni razvoj; također igra važnu ulogu u cijeljenju prijeloma. Slično kao kod intramembranske osifikacije, proces počinje kondenzacijom mezenhimalnih stanica koje se, umjesto u osteoblaste, diferenciraju u hondroblaste pod utjecajem transkripcijskog čimbenika SOX-9. Ti hondroblasti stvaraju matriks hrskavice koji obuhvaća stanice koje se zatim diferenciraju u hondrocite. Hijalina hrskavica je obavijena perihondrijem, membranom koja osigurava stanice za daljnji rast hrskavice. Ovaj predložak hrskavice nalikuje budućoj kosti i naziva se hrskavični model [111].

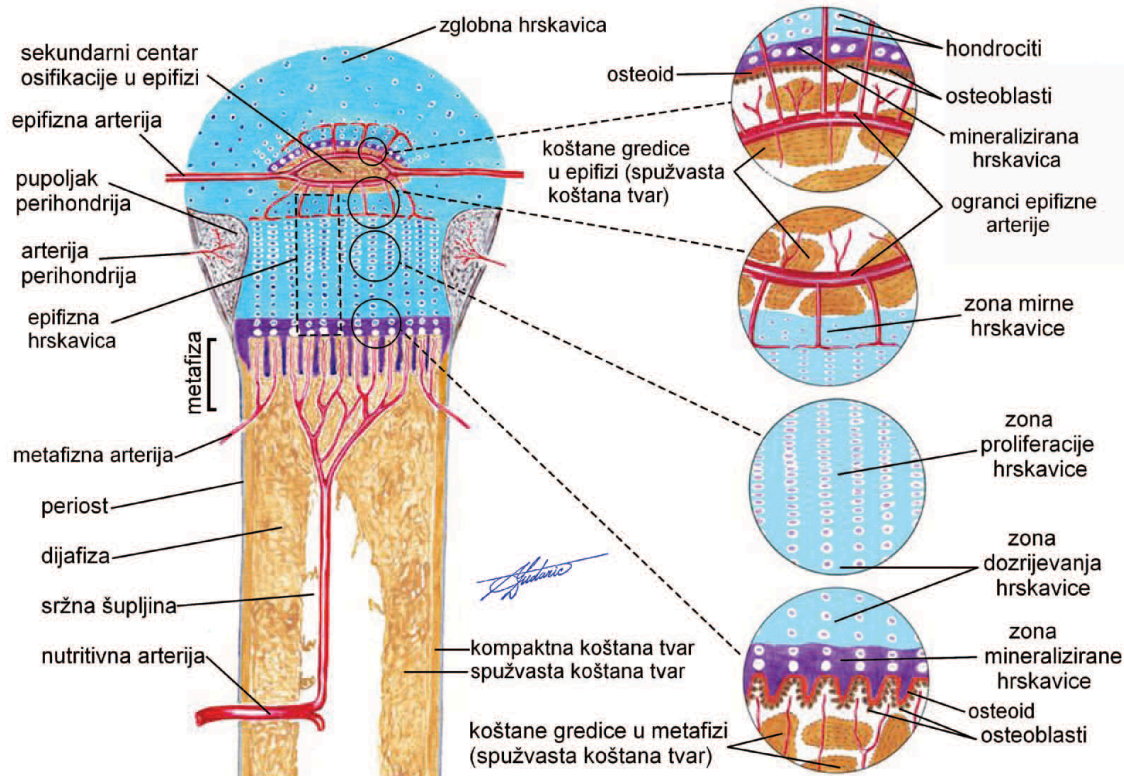
U ranoj fazi razvoja, stanice perihondrija diferenciraju se u osteoblaste i započinju formiranje kosti na površini hrskavičnog modela. Kao i kod intramembranske osifikacije, ovaj proces diferencijacije osteoblasta regulira transkripcijski čimbenik Runx2. Formiranje kosti u početku je lokalizirano na obujam dijafize dugih kostiju i rezultira strukturom koja se naziva koštani ovratnik (engl. *bone collar*). Koštani ovratnik predstavlja lamelarnu kost, a nakon formiranja, susjedno vezivno tkivo prelazi iz perihondrija u periost, postajući naseljeno prekursorima osteogenih stanica. Formiranje koštanog ovratnika ograničava sposobnost hranjivih tvari da difundiraju u obližnju hrskavicu, što rezultira kalcifikacijom lokalnog matriksa i, na kraju, smrću hondrocita. Ovi procesi signaliziraju regrutiranje primarne krvne žile koja prodire kroz koštani ovratnik (uz pomoć osteoklasta) i ulazi u područje kalcificirane hrskavice. Ova krvna žila donosi hranjive tvari preživjelim stanicama i transportira osteoklaste koji uklanjaju kalcificirani matriks. Rezultat ove vaskularne

invazije je formiranje prostora za koštanu srž i primarnog centra osifikacije — mjesta za koordiniranu staničnu aktivnost za daljnji razvoj. Kako se koštana srž polako formira i naseljava stanicama, dodatna kost nastavlja se formirati na periostalnoj površini koštanog ovratnika. Sekundarni centri osifikacije na kraju se formiraju na krajevima dugih kostiju (epifizama) kroz sličan proces. Većina kostiju formira sekundarni centar osifikacije na oba kraja, dok neke (poput metakarpalnih i kostiju falangi) imaju samo jedan. Druge krvne žile prodiru u područje kako bi opskrbile stanice i hranjive tvari potrebne za daljnji razvoj. Poremećaj opskrbe krvlju ima značajne učinke na razvoj kostiju i može uzrokovati izostanak formiranja sekundarnih centara osifikacije [112].

Kako primarni centar osifikacije raste, na kraju zauzima otprilike srednju trećinu modela hijaline hrskavice. Posljedično tome, model ima dva hrskavična kraja s centralnom dijafiznom regijom koja uključuje šupljinu koštane srži. Na spoju između srži i hrskavice na svakom kraju kosti nalazi se struktura koja se naziva epifizna ploča (ili ploča rasta).

Epifizna ploča odgovorna je za longitudinalni rast kostiju. Unutar određene kosti, stopa longitudinalnog rasta može se razlikovati dva do tri puta, a obično jedna od dviju epifiznih ploča odgovara za većinu rasta kosti. Stope rasta mogu varirati čak i do sedam puta među različitim kostima unutar pojedinca [113].

Epifizna ploča sastoji se od pet morfološki različitih zona koje se praktično klasificiraju prema glavnim staničnim procesima koji se odvijaju na svakoj lokaciji (Slika 10). U stvarnosti, one postoje kao kontinuum stanica koje postupno prelaze iz jedne zone u drugu tijekom rasta [114].



Slika 10. Prikaz endohondralne osifikacije duge cjevaste kosti. Preuzeto iz Đudarić i sur. [75].

Područje najdalje od primarnog centra osifikacije (blizu krajeva hrskavičnog modela) naziva se zona mirne hrskavice (engl. *resting zone*) i sastoji se od matriksa hijaline hrskavice s ugrađenim hondrocitima. Novi matriks zone mirovanja, bogat tipom II kolagena, kontinuirano proizvode hondroblasti blizu perihondrija. Hondroblasti koji se ugrađuju u ovaj matriks diferenciraju se u zrele hondroците. Hondrociti ugrađeni u matriks također proizvode novi matriks. Ova regija aktivne proizvodnje ponekad se naziva rezervna zona (engl. *reserve zone*), jer pojam zona mirovanja podrazumijeva da su stanice neaktivne. Hondrociti unutar zone mirovanja imaju slične morfološke i fiziološke karakteristike kao i oni u hijalinskoj hrskavici u drugim dijelovima tijela [114].

Druga regija naziva se zona proliferacije hrskavice (engl. *proliferative zone*) i, kako ime implicira, to je mjesto aktivne mitoze hondrocita. Ova regija lako se identificira histološki

po svom izgledu nalik naslaganim novčićima, što je rezultat diobe stanica u kolonama duž longitudinalne osi. Svaka od ovih stanica proizvodi otprilike dvostruko svoj volumen matriksa, koji je bogat tipom II kolagena. Zona proliferacije regulirana je brojnim čimbenicima rasta. Somatotropin/hormon rasta, inzulinu slični čimbenici rasta, BMP-ovi i Wnt- β -katenin signalni put imaju važne uloge u poticanju proliferacije hondrocita. Čimbenik rasta fibroblasta jedan je od rijetkih čimbenika za koji je pokazano da inhibira proliferaciju hondrocita u ovoj regiji [114].

Treća regija je zona dozrijevanja hrskavice ili zona hipertrofije (engl. *hyperthrophic zone*). Rast dugih kostiju pokreću stanice u gornjim regijama ove zone (ili prehipertrofičnoj zoni), gdje, kako stanice stare, povećavaju svoj volumen i površinu do 10 puta. U donjoj hipertrofičnoj zoni, stanice počinju rasti i umirati. Čini se da je tiroksin glavni promotor hipertrofije hondrocita, iako su i drugi čimbenici (npr., komponente Wnt- β -kateninskog puta) također važni za poticanje hipertrofije. Hipertrofija poboljšava rast stanica i proizvodnju izvanstaničnog matriksa, koji je u početku bogat kolagenom tipa II. Hipertrofija je također povezana s povećanim izražajem čimbenika rasta endotelnih krvnih žila, za koji se smatra da regulira propusnost krvnih žila i mineralizaciju. Stanice u ovoj regiji nastavljaju proizvoditi matriks, od kojeg je veliki dio tip X kolagen (nasuprot tipu II kolagena u proliferativnoj zoni). Tip X kolagen je jedinstven za hipertrofične hondroците u kosti u razvoju (iako se također može naći u kalusu prijeloma i oštećenoj zgloboj hrskavici kod odraslih) i obično je povezan s degradacijom hrskavice ili starenjem. Razlikuje se od tipa II kolagena po tome što sadrži vlakna, koja su odsutna u matriksu tipa II kolagena. Iako vlakna kolagena tipa X pružaju krutost toj regiji, stvaraju matriks manje sposoban za difuziju hranjivih tvari do stanica. Tip X kolagen je usko povezan s urastanjem krvnih žila, koja se događa u susjednim regijama. Ako u zoni hipertrofije nije prisutan tip X kolagen, tada izostaje urastanje krvnih žila, a rast je poremećen [114].

Kondenzirani matriks oko hipertrofiranih hondrocita na kraju počinje mineralizirati (ili kalcificirati). Mineralizacija matriksa se ne događa u odsutnosti hipertrofije. Regija u kojoj se može uočiti kalcifikacija hrskavice je četvrta regija rasta, zona kalcificirane hrskavice

(engl. *calcified cartilage zone*). Hondrociti u ovoj regiji su ili mrtvi ili u procesu propadanja, zbog nedostatka difuzije hranjivih tvari ili uklanjanja staničnog otpada. Signal za apoptozu čini se da je povezan sa staničnom hipoksijom, budući su stanice u donjoj proliferativnoj zoni i gornjoj hipertrofičnoj zoni pokazale veću hipoksiju nego one u površnijim regijama rasta. Kalcifikacija matriksa aktivan je proces kojim upravljaju hondrociti, te ovaj proces nije u potpunosti razjašnjen. Hondrociti otpuštaju vezikule u izvanstanični matriks. Ove vezikule sadrže alkalnu fosfatazu (ključnu u mineralizaciji matriksa), ATPazu (za opskrbu energijom potrebnu za transport kalcijevih iona u vezikule) i enzime koji razgrađuju kalcij i fosfat iz okoline. Povećanje lokalne mineralne koncentracije dovodi do stvaranja agregata kalcija i fosfata te kalcifikacije matriksa. Kako regija postaje više kalcificirana i gubi više stanica, lokalno signaliziranje dovodi do urastanja krvnih žila. Hondroklasti, stanice koje su slične osteoklastima, ali specijalizirane za uklanjanje kalcificirane hrskavice, dolaze na to mjesto kako bi započele resorpciju hrskavice [115].

Zadnja zona rasta je zona osifikacije ili mineralizirane hrskavice (engl. *zone of ossification*), gdje se kost prvotno formira. Ovo koštano tkivo formiraju osteoblasti koji su regrutirani na površinu kalcificiranog tkiva kako bi proizveli novu nezrelu kost. U zoni osifikacije također se nalaze osteoklasti, koji rade na uklanjanju kalcificirane hrskavice i novoproducirane nezrele kosti — potonja se zamjenjuje zrelijom lamelarnom kosti kroz remodelaciju kosti [116].

Iako postoji veza između osifikacije epifizne ploče i prestanka longitudinalnog rasta, ta dva procesa su zapravo odvojena, pri čemu prvo prestaje rast, a zatim dolazi do osifikacije ploče rasta. Prestanku rasta pridonosi zaustavljanje diobe stanica, kroz starenje hondrocita, u zoni mirovanja. Za većinu kostiju to se događa u kasnim tinejdžerskim godinama i ranim dvadesetima. Ovaj proces je ubrzan estrogenom. Više razine estrogena u ranijim godinama kod žena u usporedbi s muškarcima razlog su ranijem prestanku rasta kod žena. Nakon prestanka rasta, epifizna ploča se osificira, ostavljajući mineraliziranu regiju kosti koja razdvaja epifizu i metafizu. Ova tanka koštana ploča naziva se epifizna linija (engl. *epiphyseal line*) [116].

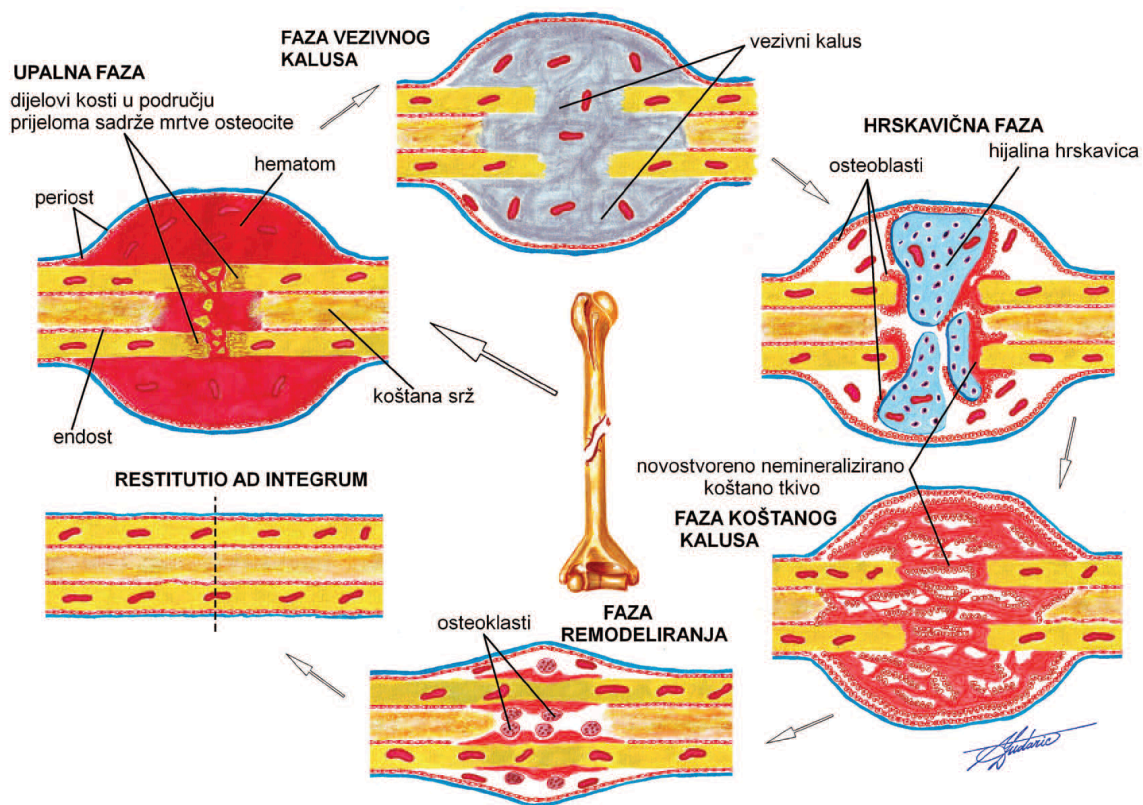
1.11. Koštano oblikovanje i preoblikovanje

Koštano oblikovanje (engl. *bone modeling*) karakterizira intenzivna osteoprodukcija, odnosno aktivnost osteoblasta, uz minimalnu osteoresorpciju. Osteoresorpcija se odvija na bitnim mjestima kako bi se formirala sržna šupljina u dijafizi budućih dugih kostiju te specifični reljef na površini kostiju. Ovaj proces omogućuje postizanje anatomske norme kostiju, koja se odnosi na oblik i veličinu specifičnu za svaku kost. U fiziološkim uvjetima, oblikovanje kostiju ograničeno je na razdoblje embrionalnog rasta i postnatalnog razvoja te završava otprilike u trećem desetljeću života [117].

S druge strane, koštano preoblikovanje (engl. *bone remodeling*) histološki predstavlja mirniji proces u kojem su osteoprodukcija i osteoresorpcija uravnotežene, odvijajući se u istim regijama kostiju. Ovim procesom ne dolazi do promjene ukupne mase koštanog tkiva; umjesto toga, postojeća masa se reorganizira i preoblikuje. Svrha remodeliranja kostiju je prilagodba morfologije koštanog sustava biomehaničkim uvjetima tijekom života. Istraživanja su pokazala značajan kapacitet kostiju za promjenu veličine, oblika i rasporeda koštane mase, osobito kod sportaša. Preoblikovanjem se omogućuje biomehanička prilagodba kosti uz minimalnu količinu koštanog materijala. Kada bi čvrstoća kostiju bila postignuta isključivo povećanjem koštane mase, taj masivni sustav bi predstavljao dodatno opterećenje za organizam [118].

1.12. Cijeljenje kosti – kaskada transkripcijskih čimbenika

Tijekom cijeljenja kost prolazi kroz nekoliko faza. Prvotno nastaje krvni ugrušak, nakon kojega slijedi faza upale, potom formiranje granulacijskog tkiva te kalusa i u konačnici faza remodelacije (Slika 11) [119]. Važno je naglasiti da oba tipa osifikacije (endohondralna i intramembranska osifikacija) sudjeluju u regeneraciji kosti nakon nastanka povrede, s time da samo tvrdi kalus izravno nastaje iz mineraliziranog kolagena tipa I kojeg luče osteoblasti bez prethodnog hrskavičnog modela [120].



Slika 11. Shematski prikaz kaskade cijeljenja kosti kalusom. Preuzeto iz Đudarić i sur. [75].

Na mjestu prijeloma kosti u početku se stvara krvni ugrušak koagulacijom plazme te izlaganjem trombocita okolišu izvan krvnih žila. Ugrušak regrutira neutrofile na mjesto ozljede koji izlučuju proupalne kemokine poput interleukina 6 (IL-6) i time regrutiraju monocite i makrofage. Makrofazi uklanjaju privremeni fibrinski matriks i nekrotične stanice putem fagocitoze a osim što uklanjaju stanične i ekstracelularne ostatke, makrofazi luče niz upalnih i kemotaktičkih posrednika, poput čimbenika tumorske nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- α), interleukina 6 (IL-6) i interleukina 1 (IL-1). Tijekom upalne faze dolazi i do pojačanog izražaja COX-2, koji ima ulogu u nastanku prostaglandina te time pridonosi započinjanju odgovora i migraciji upalnih stanica do mjesta koštanog defekta. Kemotaktički citokini regrutiraju menzenhimalne matične

stanice i fibroblaste koji doprinose cijeljenju po završetku akutne faze upale. Mezenhimalne matične stanice stvaraju razne BMP-ove koji imaju ulogu u proliferaciji, mitogenezi, angiogenezi i kemotaksiji. Oni su dio superobitelji transformirajućeg činitelja rasta tip β te participiraju u transdukciji intracelularnih signalnih puteva fosforilacijom SMAD 1/5/8. BMP -2, -6 i -9 su presudni u diferencijaciji mezenhimalnih matičnih u osteoprogenitorne stanice (engl. *osteoprogenitor cells*, OPC), dok BMP -2, -4 i -7 ih dalje diferenciraju u osteoblaste [121, 122]. Iz upalne faze, a potaknuto lokalnim hipoksičnim okolišem nakon ozljede, nastati će granulacijsko tkivo. Ovo tkivo bogato je progenitornim stanicama i novostvorenim krvnim žilama, a nastaje iz neorganiziranog izvanstaničnog matriksa [122]. U kasnoj fazi upale, nastaje mekani kalus. Mekani kalus sadrži hrskavični i vezivni matriks, nezrelu kost te je bogat hondrocitima i fibroblastima diferenciranim iz progenitornih stanica. Mekani kalus omogućuje mehaničku potporu tkiva koju slijedi resorpcija hrskavičnog matriksa i apoptoza hondrocita. Stvaranje kalusa je obilježeno proporcionalnim smanjenjem razine upalnih citokina i porastom izražaja Runx2 i Osx, koji predstavljaju najbitnije transkripcijske čimbenike u diferencijaciji osteoblasta. Izražaj Osx je visoko specifičan za osteoblaste i preosteoblaste, što ga čini korisnim markerom za praćenje cijeljenja kosti. Osx se smatra najviše izražen transkripcijski čimbenik tijekom finalnih stadija diferencijacije osteoblasta unutar novostvorene kosti i potiče nastanak osteokalcina (OCN), kolagena i osteopontina (OPN), potičući na taj način remodelaciju kosti [66, 123, 124]. Postepeno matriks kalcificira, a mineralizirano tkivo zamjenjuje hrskavični kalus te se počinje formirati tvrdi kalus [125]. Tijekom 7. - 10. dana dolazi do najveće proliferacije osteoblasta te izražaja OCN-a. Dva tjedna od ozljede neoangiogeneza je na vrhuncu uz izražaj vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF). Tijekom 14. - 21. dana osteogeneza je maksimalno izražena, te dolazi do drugog porasta izražaja upalnih citokina (TNF- α , IL-6, IL-1), što je vezano za koštanu pregradnju. Tijekom 21. - 35. dana nezrela kost nastavlja remodeliranje u mineraliziranu zrelu kost [126–128]. Ovaj proces je popraćen smanjenjem razine transformirajućeg činitelja rasta tip β 1 (engl. *transforming growth factor* β 1, TGF- β 1) te povećanje izražaja sklerostina. Tvrdi kalus s vremenom poprima lamelarnu strukturu i nastaje kost tipičnih morfoloških i histoloških značajki. Ova posljednja faza se

naziva faza remodeliranja [120].

1.13. Autologna kost

Kada govorimo o metodama koje mogu stimulirati cijeljenje kosti, presadci autologne kosti (AK) su smatrani zlatnim standardom jer pokazuju osteokonduktivna, osteoinduktivna i osteogena svojstva. Osteokonduktivno svojstvo očituje se u funkciji rešetke pri čemu autologna kost veže na sebe osteocite i osteoblaste čime potiče cijeljenje koštanih defekata iz sredine prema rubovima. Osteokonduktivna svojstva ovise o trodimenzionalnoj strukturi transplantata i određuju brzinu osteointegracije. Autologna kost je osteoinduktivna jer sadrži čimbenike rasta, matriksne proteine i signalne molekule koje potiču cijeljenje kosti. Osteogeno svojstvo se očituje u omogućavanju osteogenskih prekursorskih stanica i osteoblasta koji će sudjelovati u stvaranju nove kosti. Najčešće donorsko mjesto kod ljudi jest greben crijevne kosti, koji se koristi uglavnom za veće koštane defekte, a alternativna donorska mjesta predstavljaju; proksimalna tibija, kalkaneus, veliki trohanter femura i distalni radijus. Najčešća komplikacija prikupljanja autolognog koštanog transplantata jest bolnost na donorskom mjestu, a kao rjeđe komplikacije mogu se javiti ozljeda živca, hematoma ili infekcija [129]. Glavni nedostatak autolognog transplantata je u činjenici da se brzo razgrađuje pri čemu je evidentiran gubitak od 40% obujma kosti tijekom zacijeljivanja i remodelacije. Iz toga razloga često se s autolognom kosti kombiniraju ksenografti (nadomjestak za kost dobiven od životinjskih vrsta poput goveda, svinja, konja), zbog svojih prednosti u pogledu mehaničkih svojstava i otpornosti na resorpciju, kako bi se postigla stabilnost koštanog volumena [130].

1.14. Koštani defekt kritične veličine

Koštani defekt kritične veličine (engl. *critical-size bone defect*, CSBD), najmanji je defekt koštanog tkiva koji neće zacijeliti spontano tijekom životnog vijeka životinje. Kada govorimo o kalvarijskom defektu štakora, uobičajeno je prihvaćeno da je kritičan onaj defekt veličine 8 milimetara. Međutim i manji defekti su bili proučavani kod istih eksperimentalnih modela gdje su izvedena 2 defekta po životinji, kako bi bilo potrebno manje životinja za određenu studiju [131]. S obzirom da je tip cijeljenja kosti kalvarije istovjetan s tipom osifikacije tijekom embrionalnog razvoja te uz činjenicu da pločaste kosti krova lubanje osificiraju intramembranskom osifikacijom, može se reći da je koštani defekt u području kalvarije životinje najbolji model za proučavanje intramembranskog cijeljenja kosti [132, 133].

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Zbog neistražene dinamike cijeljenja CSBD-a nakon primjene LIPUS-a, a i s obzirom da se isti nije uspoređivao s dinamikom cijeljenja CSBD-a nakon primjene autologne kosti, glavni cilj istraživanja jest primjenom LIPUS-a i autologne kosti ispitati učinke istih na cijeljenje kritično velikog defekta kalvarije štakora i usporediti ih sa spontanijem cijeljenjem kontrolne skupine.

Pojedinačni ciljevi su:

1. Uspostaviti životinjski model CSBD-a u vremenskim točkama (7., 15., 30. dan).
2. Odrediti vrijednosti 3D parametara pomoću mikro-CT-a i 2D parametara koštanom histomorfometrijom iz uzoraka koštanog tkiva.
3. Imunohistokemijskom analizom odrediti dinamiku izražaja upalnih parametara: COX-2, TNF- α ; osteogenih čimbenika: Osx, BMP-2/4, BMP-7 te njihovih unutarstaničnih glasničke molekule SMAD-1/5/8 na koštanim uzorcima.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalni model i plan istraživanja

Istraživanje je provedeno na 45 mužjaka štakora soja Wistar, koji su uzgojeni i čuvani pri Zavodu za fiziologiju, patofiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Životinje su nasumično podijeljene u 3 skupine po 15 jedinki te su žrtvovane u intervalima 7., 15. i 30. dan (Tablica 1). Kritično veliki defekt kalvarije je proveden na svim životinjama te prekriven kolagenom membranom kako bi oponašala periost. U prvoj skupini primjenjen je isključivo LIPUS, u drugoj skupini isključivo autologni koštani transplantat, dok je treća predstavljala kontrolnu skupinu, gdje se promatralo spontano cijeljenje kritično velikog defekta kalvarije štakora. Istraživanje je odobreno od strane Povjerenstva za dobrobit životinja i Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja Medicinskog Fakulteta Sveučilišta u Rijeci kao i Ministarstva poljoprivrede (EP 302/2021). Prema svim životinjama je postupano prema Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13).

Tablica 1. Raspored životinja po skupinama.

Redni broj grupe	Naziv skupine	Broj životinja (N)	Vremenske točke	UKUPNO
1.	LIPUS	5	3 (7, 15, 30 dana)	15
2.	Autologna kost	5	3 (7, 15, 30 dana)	15
3.	Kontrola	5	3 (7, 15, 30 dana)	15

Kirurški protokol izvođenja kritično velikog defekta kalvarije štakora započinje steriliziranjem svih kirurških instrumenata u autoklavu do hlađenja na sobnu temperaturu uz prethodnu dezinfekciju operacijske površine etanolom od 70% (vol/vol). Štakori su anestetizirani koristeći ketamin (80 mg/kg) i ksilazin (5 mg/kg tjelesne težine, i.p.), nakon čega se životinji primijenio tramadol (10mg/kg) intraperitonealno. Lidokain 1% (0,3-0,4 ml) se subkutano upotrebljavao kao lokalni anestetik na mjestu incizije. U tijeku zahvata, primijenila se i injekcija fiziološke otopine subkutano (0,9% NaCl, Henry Schein, NY, SAD)

u dozi od 10 ml/kg/h kako bi se kompenzirao gubitak tekućine tijekom operacijskog zahvata. Koristeći pulsni oksimetar (MouseSTAT, Pulse Oximeter & Heart Rate Monitor Module, Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA) monitorirana je razina zasićenosti krvi kisikom.

Nastavno, koristeći električni trimmer koji je modificiran za male životinje (MOSER 1556 AKKU, professional cordless hair trimmer, BIOSEB In Vivo Research Instruments, Njemačka), glava životinje je obrijana od hrpta njuške između očiju do kaudalnog kraja lubanje. Nakon što se dlaka uklonila s područja operacijskog polja, isto se premazalo jodnim premazom koristeći jodne štapiće (Impregnated Swabstick Dynarex 10% Strength Povidone- Iodine Individual Packet, NY, SAD). Nakon toga se učinila incizija u koži operacijskog polja. Skalpelom se napravio rez otprilike 1,5 cm do periosta preko tjemena od nosne kosti do bregme. Potom je učinjena incizija periosta koji se odmaknuo u stranu te se primijenila bočna kontrakcija i vizualizirala kalvarija. Trepanom vanjskog promjera 8 mm (Helmut Zepf, Njemačka) na 1500 o/min izbušio se u fronto-parietalnom kompleksu intrakranijalni defekt. Uz pomoć elevatora, koristeći blagi pritisak, podignut je koštani defekt, čime ga se oslobodilo od dure s donje strane. Mjesto uklonjenog defekta detaljno je isprano sterilnom fiziološkom otopinom kako bi se uklonili koštani fragment i prašina od bušenja. Držalac za glavu štakora (Model 920-E Rat Head Holder, David Kopf Instruments, CA, SAD) i instrument za markaciju tkiva (Biopsy Punch, Kai medical, Tokyo, Japan) korišteni su za standardizaciju mjesta defekta (Slika 12).



Slika 12. Kritično veliki defekt kalvarije štakora.

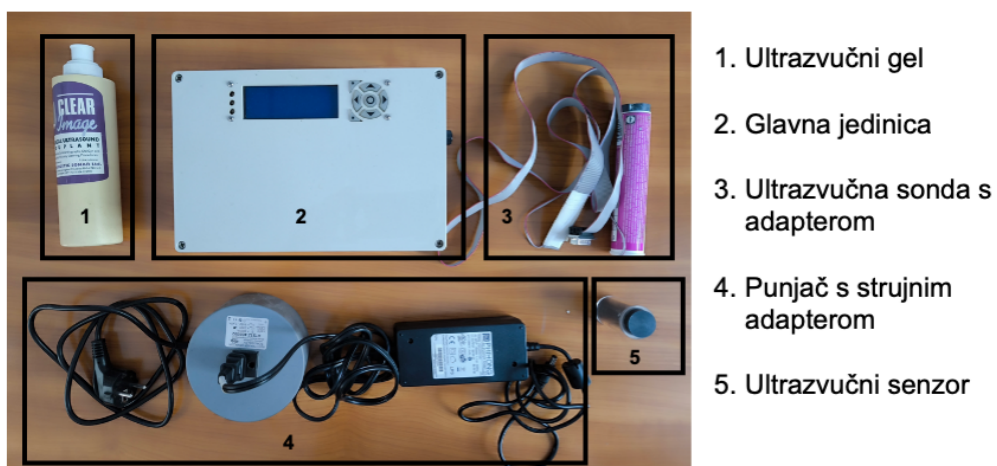
Defekt je na svim životinjama prekriven kolagenom membranom (Mucoderm®, acellular dermal collagen matrix, Botiss Biomaterials GmbH, Berlin, Germany) kako bi imitirala periost, dok je u skupini životinja s autolognom kosti, između defekta i kolagene membrane umetnut autologni koštani transplantat. Autologni koštani transplantat je dobiven mljevenjem odstranjenog dijela kalvarije koristeći drobilicu (Knochenquetsche 67-680-000, Ustomed instruments, Tuttlingen, Njemačka).

Preko kolagene membrane, kod svih životinja, korišten je jednostavni šav za šivanje kože (3-0 USP, Hu-Friedy Perma Sharp Sutures, polypropylene, sterile, Chicago, IL, USA). Nakon završetka zahvata, mjesto incizije je oprezno očišćeno sterilnom fiziološkom otopinom ili razrijeđenim vodikovim peroksidom (3%). Životinje su potom, smještene u kaveze s grijanom podlogom (Heating pad for rats—20.5 x 12 cm, DC temperature controller, FHC, Bowdoin, ME, USA) radi ubrzanog zagrijavanja, smanjujući na taj način poslijeoperacijsku traumu. Životinje svaka od 3 skupine, nasumično su podijeljene u dodatne 3 skupine s po 3 životinje ovisno o vremenu žrtvovanja, koje je provedeno u

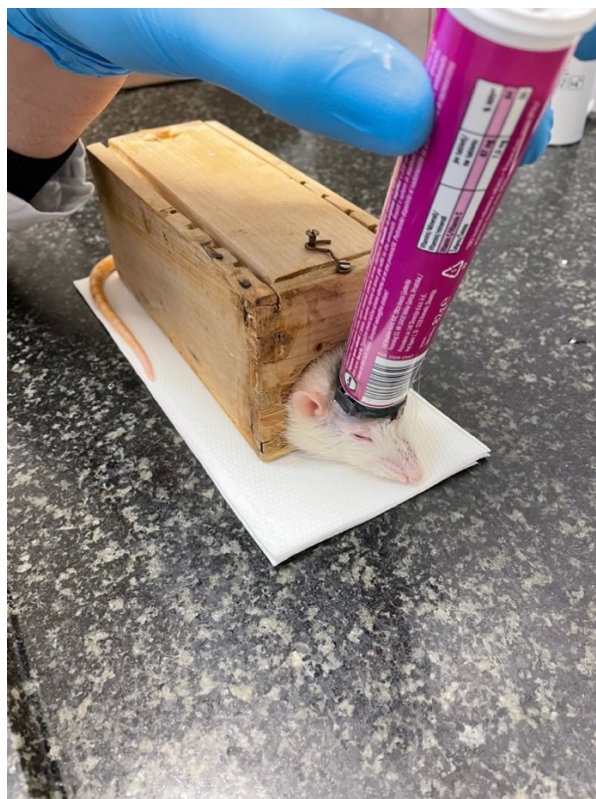
intervalima od 7, 15 i 30 dana od operacijskog zahvata (Tablica 1). Žrtvovanje je izvršeno standardiziranim protokolom, na humani način, primjenom anestetika u tri puta većom dozom od anestetske - ketamin (240 mg/kg) i ksilazin (15 mg/kg tjelesne težine, i.p.).

3.2. Insonacija LIPUS uređajem

Za stvaranje ultrazvučnih valova niskog intenziteta u pulsnom modu korišten je LIPUS uređaj SonaCell (IntelligentNano Inc. Canada) (Slika 13). Postavke ultrazvučnog LIPUS uređaja bile su sljedeće: frekvencija ultrazvuka od 1.5 MHz, frekvencija ponavljanja pulsa od 1kHz na 20% radnoga ciklusa dok je ultrazvučna sonda bila intenziteta 30mW/cm². Za insonaciju životinja korištena je ultrazvučna sonda kružnog oblika, promjera 24mm. Kako bi se ograničile kretnje životinje tijekom primjene ultrazvuka eksperimentalna životinja smještena je u drveni stalak, čime joj se fiksirala glava i reducirala mogućnost prekomjernih kretnji te je potom na mjesto kalvarijskog defekta štakora stavljen ultrazvučni gel i sonda LIPUS-a (Slika 14). Ultrazvuk se primjenjivao isključivo u LIPUS eksperimentalnoj skupini prema protokolu 3 puta tjedno, a pojedinačno trajanje tretmana iznosilo je 20 minuta. Aplikacija ultrazvuka je počela već prvi dan nakon operacijskog zahvata kritično velikog defekta kalvarije štakora i nastavljena je do tridesetog dana, ovisno o pojedinim vremenskim točkama žrtvovanja.



Slika 13. LIPUS uređaj koji je korišten za stvaranje ultrazvučnih valova.



Slika 14. Prikaz ograničavanja kretnji štakora tijekom primjene ultrazvuka.

3.3. Materijal

Nakon žrtvovanja eksperimentalnih životinja prikupljeni su uzorci kalvarijskog koštanog tkiva te fiksirani u 4% paraformaldehidu pri temperaturi od 4°C do transporta. Kako bi se pripremili za transport, koštani uzorci su uronjeni u 70% alkohol do primjene daljnjih analiza.

3.4. Metode istraživanja

3.4.1. Mikro-CT

Svaki koštani uzorak je obrađen mikro-računalnim tomografom (engl. *computed tomography*, CT) (NeoScan N80, NEOSCAN BVBA, Belgium). Korištena je razlučivost od 10 µm s rotacijom na 0.30, uz uporabu 0.25 mm aluminijskog filtera. Prosječni okvir slike je bio namješten na 2. Procesuirane slike su rekonstruirane koristeći NRecon (Bruker, Kontich, Belgium) računalni program te protumačene uz pomoć CTAn (Bruker, Belgium) računalnog programa.

Skeniranjem mikro-CT uređajem dobivene su vrijednosti trodimenzionalnih parametara koštane strukture: obujam kosti (engl. *bone volume*, BV/TV; %), debljina koštanih gredica (engl. *trabecular thickness*, Tb.Th.; mm) i broj koštanih gredica (engl. *trabecular number*, Tb. N; /mm).

3.4.2. Histološko bojenje

Nakon skeniranja mikro-CT-om, uzorci kalvarije štakora su podvrgnuti dekalcinaciji u Osteofast 2 (Biognost, Zagreb, Croatia) tekućini kroz 2 dana te uklopljeni u parafinske blokove. Blokovi su narezani na mikrotomu (Leica RM 2155-Rotary Microtome, Leica

instruments, Ballerup, Njemačka) na debljinu 3-5 μm . Područje interesa (engl. *region of interest*, ROI) odgovara rubovima koštanog defekta i zoni unutar rubova defekta. Tkivni rezovi su obojeni histološkim bojama hematoksilin - eosin (HE) koristeći sljedeći standardizirani protokol.

Tkivni rezovi su prvotno deparafinizirani koristeći otopinu ksilola te potom dehidrirani u nizu etilnih alkohola padajućih koncentracija (100%, 96%, 75%). Uzorci su potom isprani destiliranom vodom i bojeni Ehrlichovim hemalaunom tijekom 10 minuta. Slijedilo je ispiranje vodom kroz 10 minuta, nakon čega je primijenjen kiseli alkohol (HCl-etanol) te ponovno ispiranje vodom 10 minuta uz još dodatno ispiranje destiliranom vodom 5 minuta. Uzorci su potom obojeni 1% vodenom otopinom hematoksilina kroz 5 minuta te isprani u destiliranoj vodi još 5 minuta. Nakon ispiranja tkivo je dehidrirano u nizu alkohola rastuće koncentracije i izbistreno u ksilolu te uklopljeno u balzam. Finalni rezultat bojanja tkiva hematoksilin-eozinom jest plavo bojenje jezgara te ružičasto obojenje citoplazme i dijela međustanične tvari.

3.4.3. Histomorfometrija

Na tkivnim rezovima koji su obojeni histološkim bojama hematoksilin-eozin provedena je metoda koštane histomorfometrije. Koristeći svjetlosni mikroskop Olympus BHA (Olympus, Tokyo, Japan) s prilagođenom digitalnom Sony kamerom (Sony, Tokyo, Japan) učinjene su mikrofotografije tkivnih rezova. Mikrofotografije su potom analizirane računalnim programom za obradu slike (VAMS, Zagreb, Hrvatska) kako bi se kvantificirala vrijednost obujma kosti (engl. *bone volume*, BV/TV; %). Sva mjerenja koštane histomorfometrije učinjena su slijedeći preporuke i standarde Američkog društva za istraživanje kosti i mineraliziranih tkiva (engl. *American Society of Bone and Mineral Research*).

3.4.4. Imunohistokemijska metoda

Pripremljeni tkivni rezovi debljine 3–5 μm , kako je ranije opisano, deparafinizirani su koristeći otopinu ksilola te potom dehidrirani u nizu etilnih alkohola padajućih koncentracija (100%, 96%, 75%). Nakon deparafinizacije i dehidracije blokirana je aktivnost endogene peroksidaze pomoću vodikovog peroksida u metanolu (0,3%). Potom su uzorci dodani citratnom puferu te zagrijavani kroz 10 min na temperaturi od 60°C, kako bi se identificirao antigen. Uzorci su tada inkubirani preko noći sa sljedećim primarnim protutijelima:

- COX-2 (PA5-27238, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD), 1:100
- TNF- α (ab 270264 abcam, Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo), 1:200
- Osx (ab 22552 abcam, Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo), 1:200
- BMP-2/4 (sc-137087 SCBT, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, SAD), 1:200
- BMP-7 (ab 93636 abcam, Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo), 1:200
- SMAD-1/5/8 (#95115 CST, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, SAD), 1:100.

Nakon inkubacije s primarnim protutijelima, slijedilo je ispiranje te inkubacija sa sekundarnim biotiniziranim protutijelima tijekom 45 minuta na sobnoj temperaturi. Radi vizualizacije, primjenjen je streptavidin konjugiran na peroksidazu (LSAB + Kit, DakonCytomation, Denmark) i 3,3' Diaminobenzidin (DAB, Dakocytomation, Denmark). Za kontrastno bojenje jezgara korišten je hematoksilin. Potom je učinjena rehidracija tkiva etilnim alkoholima rastućih koncentracija (75%, 96% i 100%). Nakon bistrenja ksilolom preparat je uklopljen u entalan. Intenzitet imunohistokemijskog obojenja dobivenih mikrofotografija interpretiran je koristeći računalni program ImageJ v1.53 (Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

3.4.5. Statistička analiza

Statistička analiza podataka provedena je pomoću računalnog programa Statistica 14.0.1.25 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). Normalnost distribucije podataka je testirana Kolmogorov-Smirnovim testom, koji je pokazao da je distribucija podataka normalna. Stoga su podaci mjerenja različitih parametara prikazani u obliku: aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija (SD). Razlike između više skupina su testirane jednosmjernom i dvosmjernom analizom varijance (ANOVA), uključujući naknadno testiranje post-hoc Scheffe testom. Svi podaci su pokazali homogenost varijance. Statistička značajnost postavljena je na $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$ se smatralo statistički značajno).

4. REZULTATI

4.1. Mikro-CT

Skeniranjem mikro-CT uređajem dobivene su vrijednosti trodimenzionalnih parametara koštanog tkiva: obujam kosti (engl. *bone volume*, BV/TV; %), debljina koštanih gredica (engl. *trabecular thickness*, Tb.Th.; mm) i broj koštanih gredica (engl. *trabecular number*, Tb. N; /mm).

Rezultati ukazuju na statistički značajne razlike između ispitivanih skupina za sva tri parametra BV/TV i Tb.Th ($p < 0.001$) te Tb.N ($p < 0.05$).

Vrijednosti parametra obujma kosti (BV/TV) određenih mikro-CT-om u određenim vremenskim točkama prikazane su u Tablici 2. Usporedba rezultata BV/TV-a, testom analize varijance (ANOVA), pokazala je da postoje statistički značajne razlike između svih ispitivanih skupina, po specifičnim vremenskim točkama i to za 7. dan, 15. dan i 30. dan. Za svaku od vremenskih točki razlika je bila statistički značajna među skupinama ($p < 0.001$). Daljnjom analizom, post-hock Scheffe testom, dokazano je da postoji statistički značajna razlika između svih kombinacija (parova) skupina po pojedinim vremenskim točkama ($p < 0.001$).

Tablica 2. Mikro-CT rezultati parametra BV/TV (%). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ SD.

Dan	LIPUS skupina	Skupina autologne kosti	Kontrolna skupina	Ukupna vrijednost	p	Razlike u parovima*
7	14.81 $\pm$ 0.39	18.94 $\pm$ 1.85	11.92 $\pm$ 0.06	< 0.001		kl, ka, al
15	20.78 $\pm$ 1.31	23.15 $\pm$ 0.36	13.13 $\pm$ 0.17	< 0.001		kl, ka, al
30	23.74 $\pm$ 0.42	26.83 $\pm$ 0.28	15.85 $\pm$ 0.49	< 0.001		kl, ka, al

*kl – statistički značajna razlika između kontrolne i LIPUS skupine. ka – statistički značajna razlika

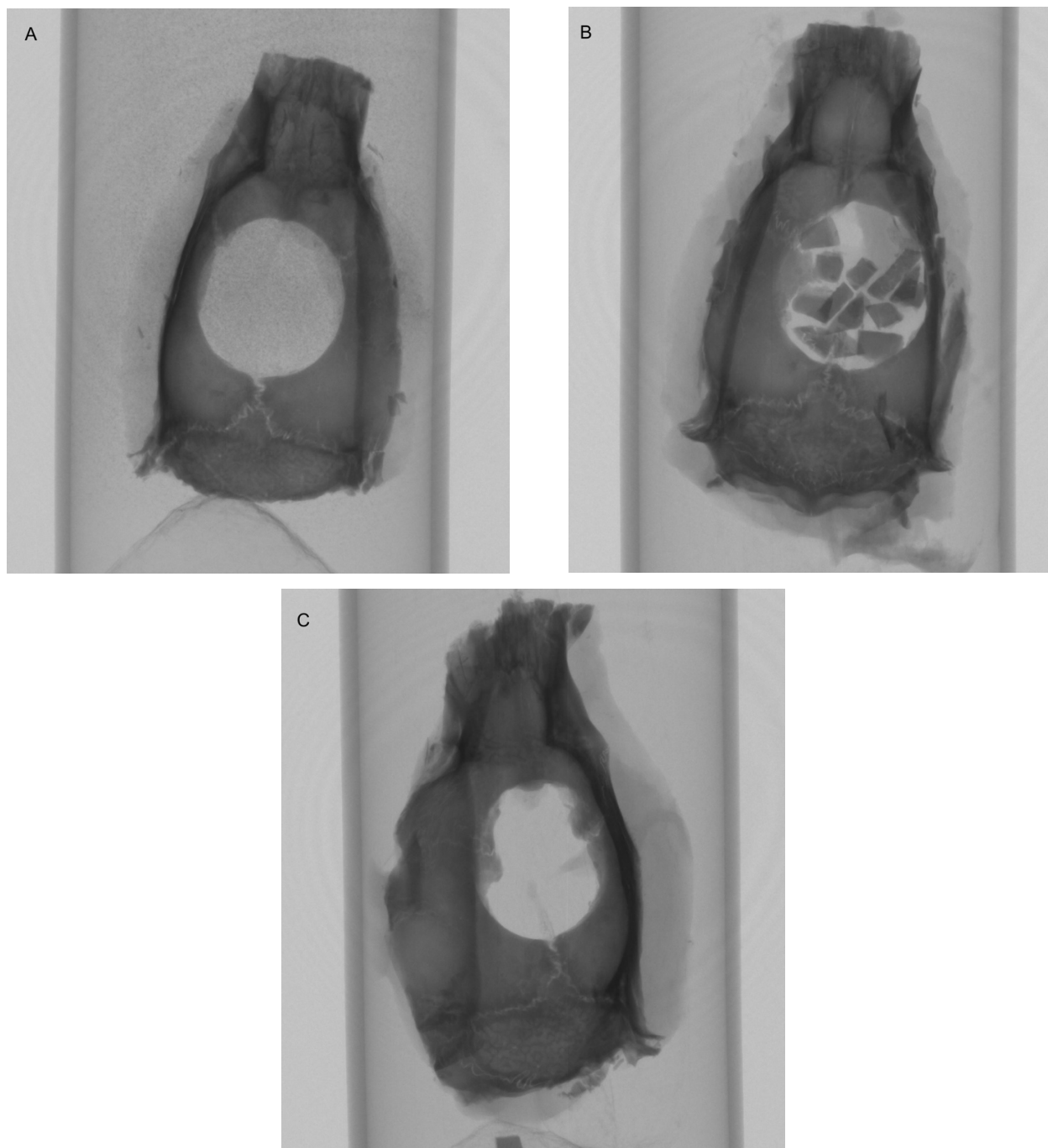
između kontrolne skupine i skupine s autolognom kosti. al – statistički značajna razlika između skupine autologne kosti i LIPUS skupine.

Na Slici 15 prikazani su reprezentativni primjeri frontoparietookcipitalnog kompleksa kalvarije štakora snimljenih mikro-CT uređajem za sve skupine.

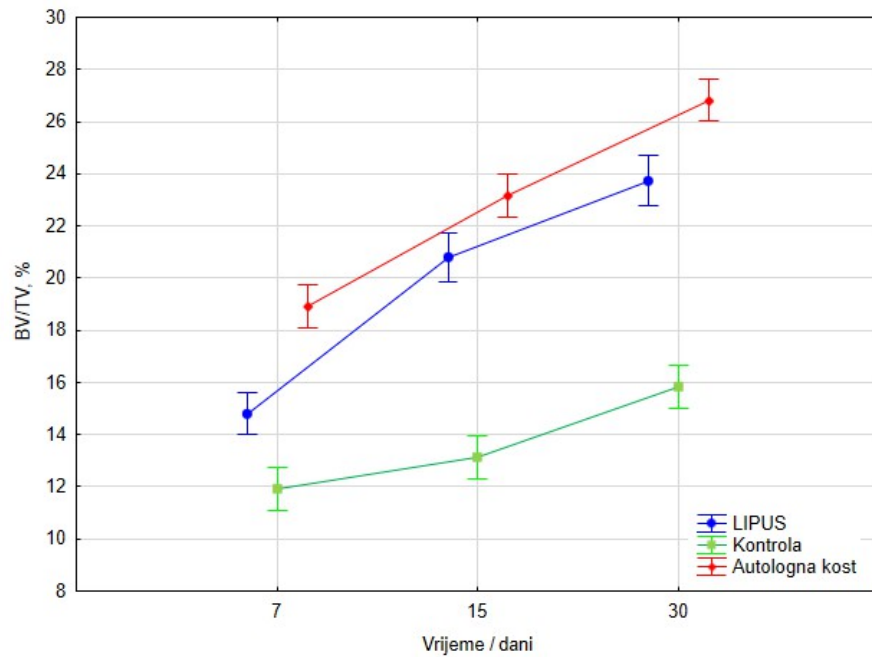
Na Slici 16 prikazan je trend progresije vrijednosti obujma kosti (BV/TV) vrijednosti tijekom vremena, uzimajući u obzir specifične vremenske točke (7., 15. i 30. dan) za sve ispitivane skupine. Analiza je pokazala da u svakoj skupini postoji statistički značajna razlika ($p < 0.001$) između rezultata ovisno o vremenu koje je proteklo od ozljede te je pokazano da vrijeme statistički značajno utječe na povećanje BV/TV vrijednosti. Najveće povećanje BV/TV vrijednosti tijekom vremena zamjećeno je u skupini autologne kosti, a nešto manje povećanje BV/TV vrijednosti tijekom vremena bilo je u skupini kod koje je primjenjen LIPUS. Očekivano, najmanje povećanje BV/TV vrijednosti tijekom vremena bilo je u kontrolnoj skupini.

Na Slici 17 prikazan je trend progresije vrijednosti debljine koštanih gredica (Tb.Th) tijekom vremena, uzimajući u obzir specifične vremenske točke (7., 15. i 30. dan) za sve ispitivane skupine. Analiza je pokazala da u svakoj skupini postoji statistički značajna razlika ($p < 0.001$) između rezultata ovisno o vremenu koje je proteklo nakon ozljede te je pokazano da vrijeme pozitivno utječe na povećanje vrijednosti debljine koštanih gredica.

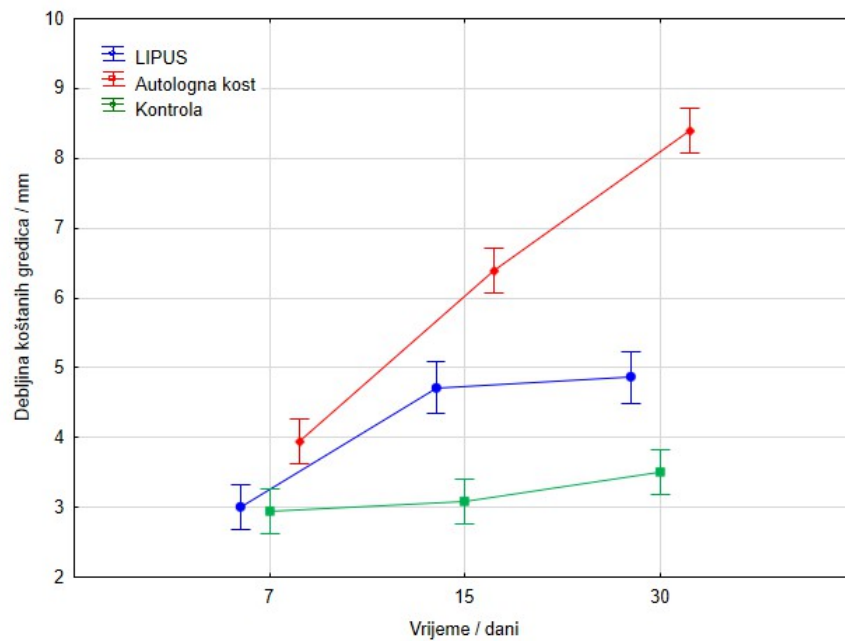
Na Slici 18 prikazan je trend progresije vrijednosti broja koštanih gredica (Tb.N) tijekom vremena, uzimajući u obzir specifične vremenske točke (7., 15. i 30. dan) za sve ispitivane skupine. Analiza je pokazala da u svakoj skupini postoji statistički značajna razlika ($p < 0.001$) između rezultata ovisno o vremenu koje je proteklo nakon ozljede te je pokazano da vrijeme pozitivno utječe na povećanje vrijednosti broja koštanih gredica.



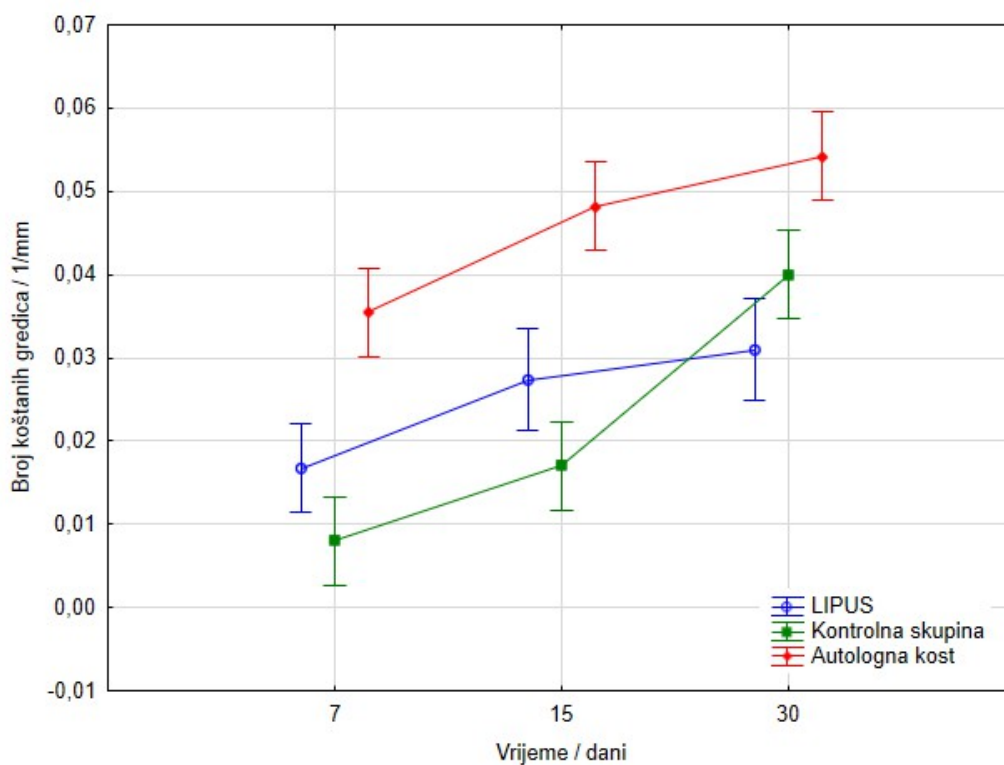
Slika 15. Reprezentativni primjeri 30. dan cijeljenja frontoparietookcipitalnog kompleksa kalvarije štakora, snimljenih mikro-CT uređajem iz kontrolne skupine (A), skupine autologne kosti (B) i LIPUS skupine (C).



Slika 16. Promjene mikro-CT parametra BV/TV tijekom vremena u skupini tretiranom LIPUS-om, skupini autologne kosti i kontrolnoj skupini.



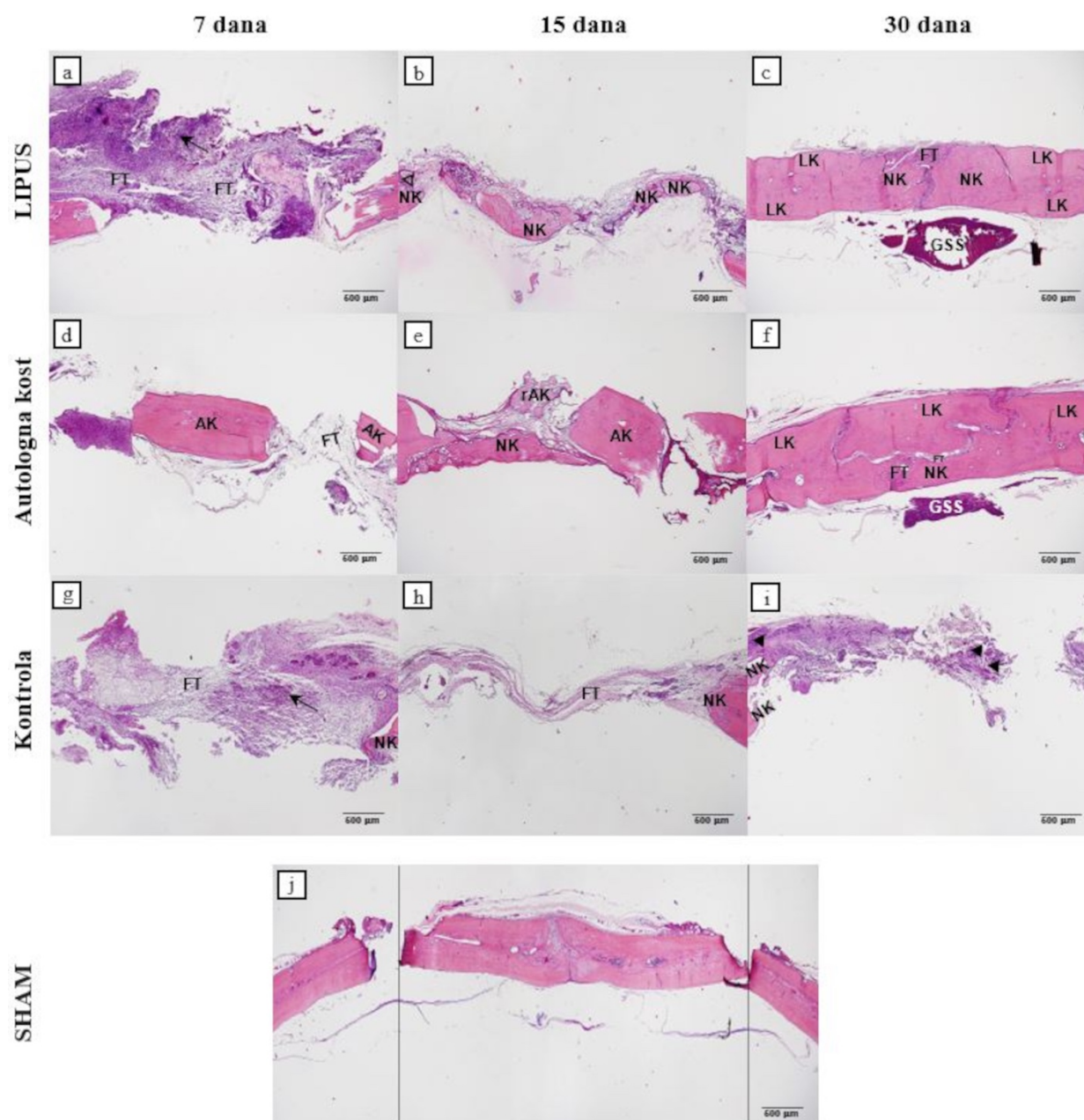
Slika 17. Promjene mikro-CT parametra Tb.Th tijekom vremena u skupini tretiranom LIPUS-om, skupini autologne kosti i kontrolnoj skupini.



Slika 18. Promjene mikro-CT parametra Tb.N tijekom vremena u skupini tretiranom LIPUS-om, skupini autologne kosti i kontrolnoj skupini.

4.2. Histološka analiza

Slika 19 prikazuje reprezentativne mikrofotografije koronarnih presjeka defekata lubanjske kosti štakora za sve ispitivane skupine: LIPUS (a–c), autologna kost (d–f) i kontrola (g–i).



Slika 19. Reprezentativne mikrofotografije koronarnih presjeka defekata lubanjske kosti štakora za sve ispitivane skupine: LIPUS (a–c), autologna kost (d–f) i kontrola (g–i). Za svaku skupinu odabrane su tri reprezentativne vremenske točke: 7. dan (a,d,g), 15. dan (b,e,h) i 30. dan (c,f,i). SHAM prikaz (j) ilustrira defekt kosti u njegovoj punoj dužini. U histološkim presjecima označene su sljedeće strukture: novostvorena kost (NK), lamelarna kost (LK), autologna kost (AK), resorbirana autologna kost (rAK), fibrozno tkivo (FT), nakupine upalnih stanica (crne strelice),

osteoblasti (trokuti bez ispune), nakupine mezenhimalnih matičnih stanica (trokuti s ispunom), gornji sagitalni sinus (GSS) te interesno područje (*engl. region of interest*; ROI, prostor između isprekidanih linija). Preparati su obojeni hematoksilin-eozinom (HE), povećanje 40×, jedinična dužina = 500 µm.

Sedmog poslijeoperacijskog dana histološka analiza je pokazala da je koštani defekt u svim ispitivanim skupinama bio premošten fibroznim tkivom. Najveća količina fibroznog matriksa, unutar kojeg su se nalazile skupine upalnih stanica, opažena je u skupini tretiranoj LIPUS-om. Osim toga, duž rubova defekta zabilježena je početna osteogeneza. Analogni histološki nalazi uočeni su i u kontrolnoj skupini, dok je u AK skupini fibrozna reakcija bila manje izražena, obuhvaćajući čestice autologne kosti (Slika 19 a,d,g).

Petnaestog dana LIPUS skupina pokazala je stvaranje novonastalih koštanih trabekula koje su povezivale središnji dio defekta, uz prisutnost rubne osteogeneze i aktivnih osteoblasta na površini novostvorene kosti (Slika 19b). U AK skupini pojedinačne koštane trabekule protezale su se od rubova prema središtu defekta. Dok je dio čestica autologne kosti bio podvrgnut resorpciji, pojedine čestice su preostale (Slika 19e). Kontrolna skupina i dalje je bila obilježena dominacijom fibroznog matriksa, pri čemu su minimalne količine novostvorene kosti bile ograničene na periferne dijelove defekta (Slika 19h).

Tridesetog dana LIPUS stimulacija rezultirala je gotovo potpunim zatvaranjem defekta, pri čemu je veći dio područja bio ispunjen nezrelom kosti, dok je u središnjem dijelu perzistiralo obilno fibrozno tkivo. Lamelarna kost bila je prisutna na periferiji defekta (Slika 19c). U AK skupini novonastala kost uočena je u središnjem i donjem dijelu defekta, uz jasne znakove integracije koštanog tkiva. U gornjem dijelu defekta prevladavao je fibrozni matriks, koji je razdvajao novonastalu od lamelarne kosti (Slika 19f). U kontrolnoj skupini novonastala kost bila je prisutna duž rubova defekta, dok je središnje područje i dalje bilo ispunjeno fibroznim tkivom, unutar kojega su bile prisutne nakupine pluripotentnih mezenhimalnih matičnih stanica (MSC), s početnim depozitima mineraliziranog koštanog matriksa (Slika 19i).

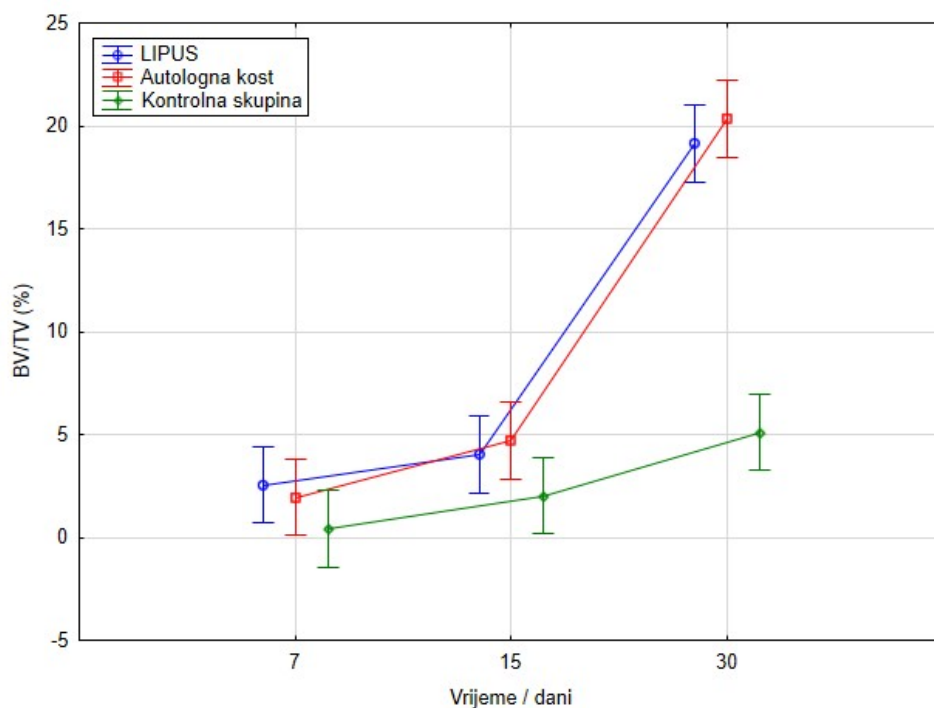
4.3. Histomorfometrijska analiza

Histomorfometrijske vrijednosti parametra obujma kosti (engl. *bone volume*, BV/TV; %) u određenim vremenskim točkama prikazane su u Tablici 3. Rezultati ukazuju na statistički značajne razlike između ispitivanih skupina, kao i između pojedinih vremenskih točaka. Količina novostvorene kosti pokazala je statistički značajnu razliku između 30. dana u odnosu na ranije vremenske točke, 15. i 7. dan, u svim skupinama ($p < 0.001$). Ova statistička značajnost najizraženija je bila u skupini tretiranoj LIPUS-om, gdje je p-vrijednost najmanja ($p = 0.000001$). Dodatno, u svim skupinama (LIPUS, AK i kontrolna skupina) zabilježena je statistički značajna razlika u BV/TV vrijednostima između 30. dana i ranijih vremenskih točaka, 15. i 7. dana ($p < 0.001$). Na Slici 20 prikazan je trend progresije BV/TV (%) vrijednosti tijekom vremena, uzimajući u obzir specifične vremenske točke (7., 15. i 30. dan) za sve ispitivane skupine.

Tablica 3. Histomorfometrijski rezultati parametra BV/TV (%). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ SD.

Dan	LIPUS skupina	Skupina autologne kosti	Kontrolna skupina	Ukupna p vrijednost	Razlike u parovima*
7	2.56 $\pm$ 1.87	1.95 $\pm$ 1.32	0.42 $\pm$ 0.24	0.007	kl
15	4.02 $\pm$ 2.09	4.71 $\pm$ 4.65	2.03 $\pm$ 1.56	0.180	/
30	19.12 $\pm$ 8.53	20.35 $\pm$ 12.64	5.11 $\pm$ 3.71	0.002	kl, ka

*kl – statistički značajna razlika između kontrolne i LIPUS skupine. ka – statistički značajna razlika između kontrolne skupine i skupine s autolognom kosti.



Slika 20. Promjene histomorfometrijskog parametra BV/TV tijekom vremena u skupini tretiranom LIPUS-om, skupini autologne kosti i kontrolnoj skupini.

4.4. Imunohistokemijska analiza

U Tablici 4 prikazani su rezultati intenziteta imunohistokemijskog izražaja za sve ispitivane parametre. Navedena analiza je pokazala da postoji statistički značajna razlika ($p < 0.001$) između svih ispitivanih skupina (LIPUS skupina, AK skupina i kontrolna skupina) za sve ispitivane vremenske točke (7., 15. i 30. dan) te za sve ispitivane imunohistokemijske parametre (COX-2, TNF- α , Osx, BMP-2/4, BMP-7 i SMAD-1/5/8). Daljnjom analizom dokazano je da postoji statistički značajna razlika između svih kombinacija (parova) skupina za sve vremenske točke ($p < 0.001$) kod COX-2, Osx, BMP-7 i SMAD-1/5/8. Kada govorimo o TNF- α pokazana je statistički značajna razlika između svih kombinacija (parova) skupina za 7. i 15. dan ($p < 0.001$) dok je 30. dan ustanovljena statistički značajna razlika između kontrolne skupine te obje eksperimentalne skupine (LIPUS i autologna

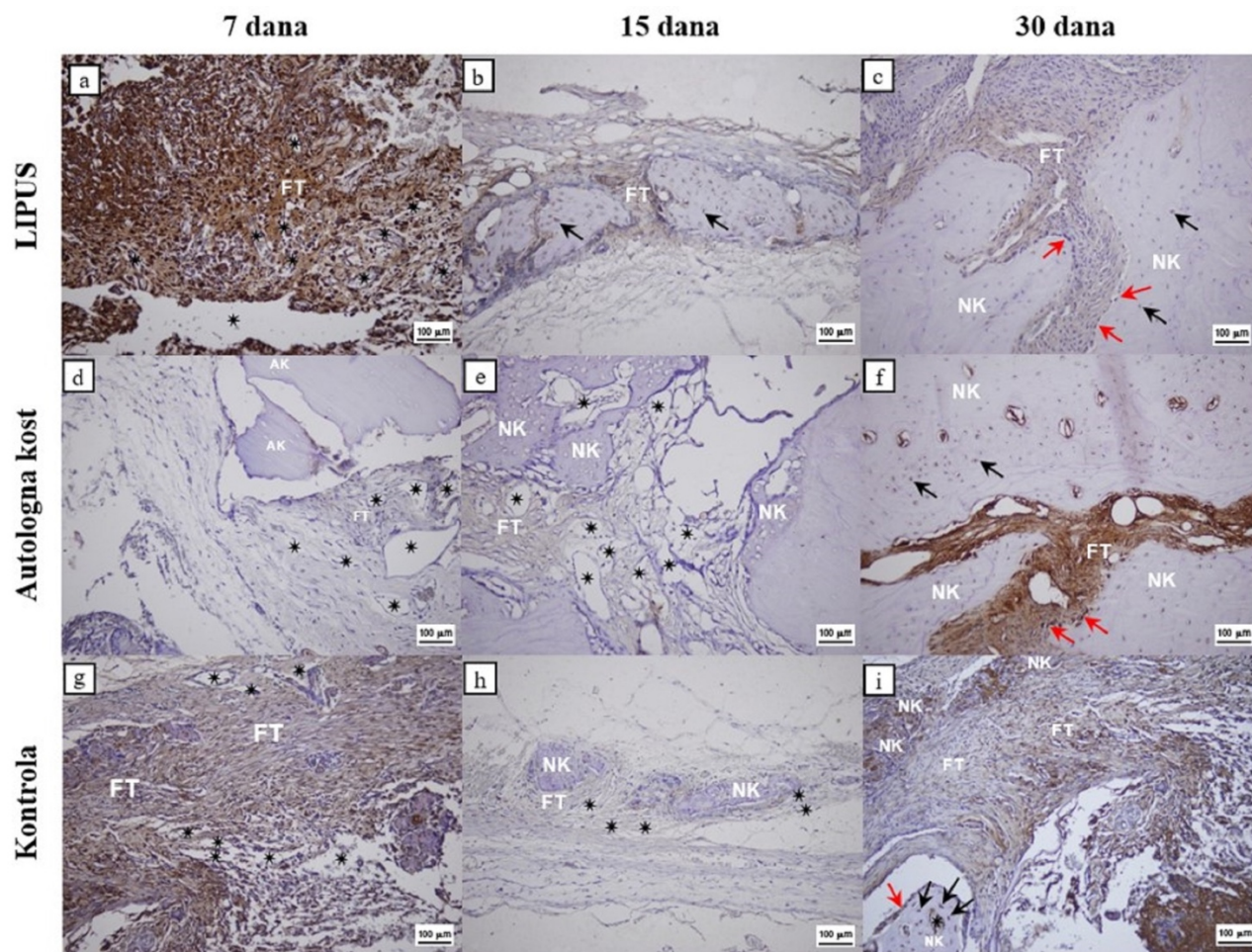
kost) ($p < 0.001$). Kada govorimo o BMP-2/4 pokazana je statistički značajna razlika između svih kombinacija (parova) skupina za 7. ($p < 0.001$) dok je kod 15. dana ustanovljena statistički značajna razlika između kontrolne skupine te obje eksperimentalne skupine (LIPUS i autologna kost) ($p < 0.001$) a kod 30. dana statistički značajna razlika između kontrolne i LIPUS skupine ($p < 0.001$) te LIPUS skupine i skupine autologne kosti ($p < 0.001$).

Tablica 4. Rezultati intenziteta imunohistokemijskog izražaja. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ SD.

	Dan	LIPUS skupina	Skupina autologne kosti	Kontrolna skupina	Ukupna p vrijednost *	Razlike u parovima **
COX-2	7	169.7 $\pm$ 1.6	55.5 $\pm$ 1.1	131.1 $\pm$ 1.6	< 0.001	kl, ka, al
	15	92.7 $\pm$ 2.2	72.5 $\pm$ 2.2	64.3 $\pm$ 1.7	< 0.001	kl, ka, al
	30	81.4 $\pm$ 1.8	167.7 $\pm$ 1.1	111.0 $\pm$ 1.5	< 0.001	kl, ka, al
TNF-α	7	125.2 $\pm$ 0.8	133.8 $\pm$ 0.9	172.0 $\pm$ 1.1	< 0.001	kl, ka, al
	15	137.7 $\pm$ 1.3	134.2 $\pm$ 1.8	126.6 $\pm$ 2.2	< 0.001	kl, ka, al
	30	147.6 $\pm$ 1.9	146.3 $\pm$ 0.8	115.8 $\pm$ 0.9	< 0.001	kl, ka
Osx	7	131.9 $\pm$ 0.9	23.5 $\pm$ 0.9	102.2 $\pm$ 1.2	< 0.001	kl, ka, al
	15	42.9 $\pm$ 0.9	64.7 $\pm$ 0.7	81.5 $\pm$ 1.8	< 0.001	kl, ka, al
	30	128.9 $\pm$ 1.2	177.1 $\pm$ 0.9	130.9 $\pm$ 0.5	< 0.001	kl, ka, al
BMP-2/4	7	134.7 $\pm$ 1.7	156.2 $\pm$ 1.3	147.4 $\pm$ 1.3	< 0.001	kl, ka, al
	15	153.8 $\pm$ 1.5	154.9 $\pm$ 0.7	128.3 $\pm$ 5.4	< 0.001	kl, ka
	30	161.4 $\pm$ 1.5	154.5 $\pm$ 1.2	154.5 $\pm$ 2.1	< 0.001	kl, al
BMP-7	7	111.4 $\pm$ 0.8	146.9 $\pm$ 1.4	127.6 $\pm$ 1.3	< 0.001	kl, ka, al
	15	121.7 $\pm$ 1.5	132.8 $\pm$ 0.4	115.4 $\pm$ 1.3	< 0.001	kl, ka, al
	30	146.9 $\pm$ 0.9	121.4 $\pm$ 0.4	105.8 $\pm$ 1.2	< 0.001	kl, ka, al
SMAD-1/5/8	7	126.2 $\pm$ 2.9	156.2 $\pm$ 0.2	140.4 $\pm$ 0.2	< 0.001	kl, ka, al
	15	144.1 $\pm$ 1.1	152.6 $\pm$ 1.1	134.6 $\pm$ 0.2	< 0.001	kl, ka, al
	30	138.7 $\pm$ 0.7	168.4 $\pm$ 0.9	153.6 $\pm$ 1.1	< 0.001	kl, ka, al

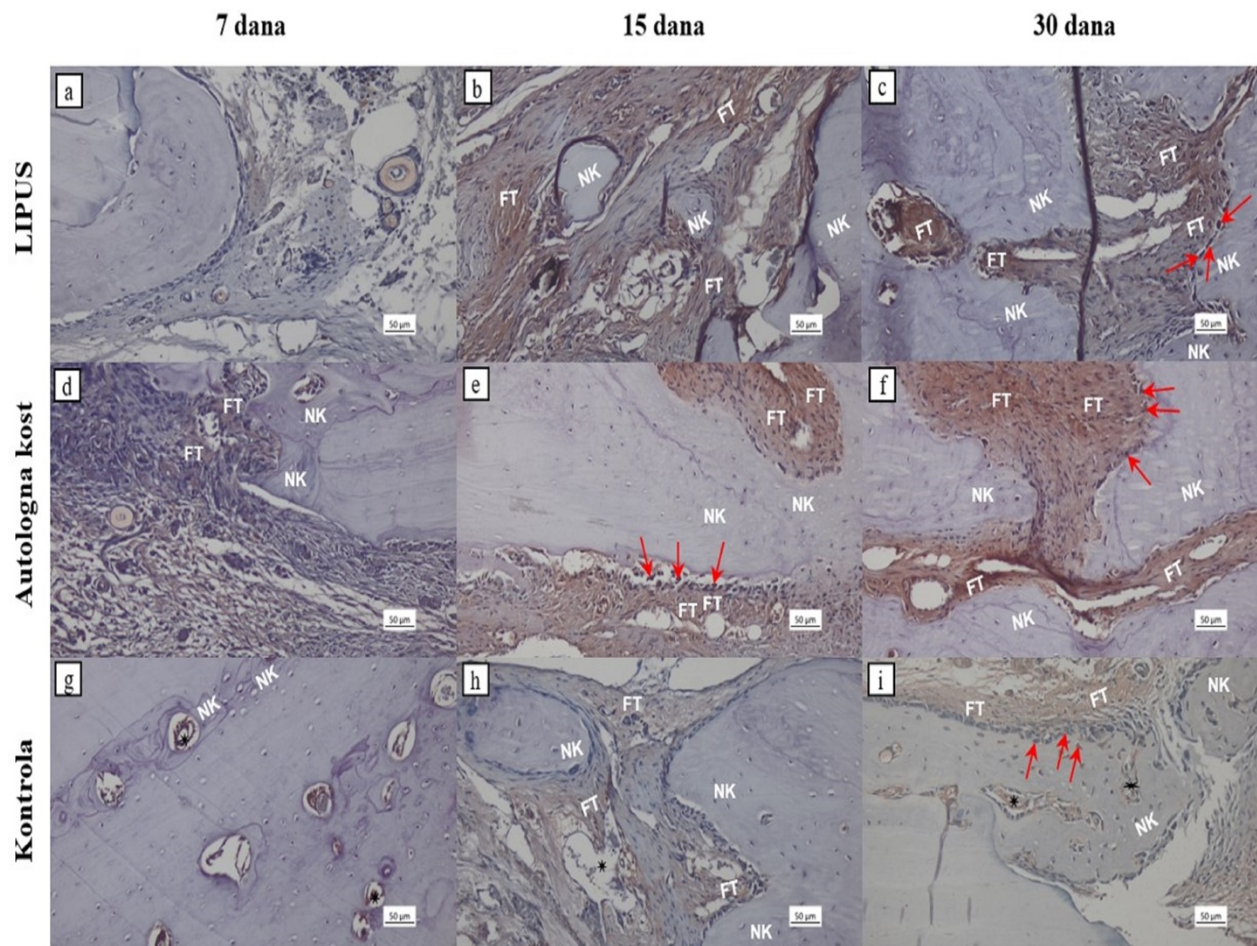
* Analiza varijance. **kl – statistički značajna razlika između kontrolne skupine i LIPUS skupine.
ka – statistički značajna razlika između kontrolne skupine i skupine s autolognom kosti. al –
statistički značajna razlika između skupine s autolognom kosti i LIPUS skupine.

Imunohistokemijske analize izražaja COX-2, TNF- α , Osx, BMP-2/4, BMP-7 i SMAD-1/5/8
kritično velikog defekta kalvarije štakora prikazane su na Slikama 21-26.

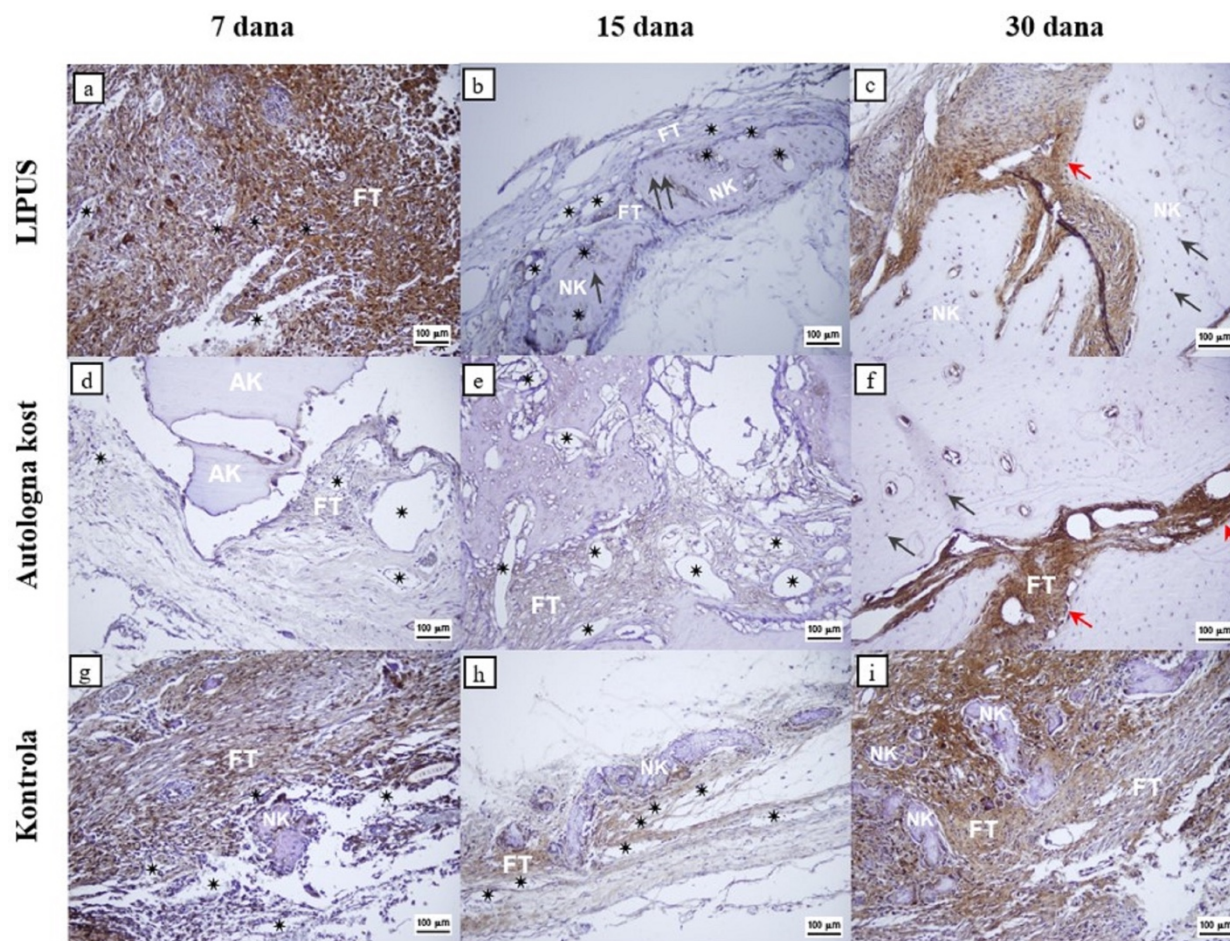


Slika 21. Imunohistokemijsko bojenje ciklooksigenaze-2 (COX-2) u koronarnim presjecima defekata kalvarije štakora za sve ispitivane skupine: LIPUS (a–c), autologna kost (d–f) i kontrolna skupina (g–i). Za svaku skupinu odabrane su tri reprezentativne vremenske točke radi prikaza prostorne i vremenske lokalizacije COX-2 izražaja: 7. Dan (a, d, g), 15. dan (b, e, h), 30. dan (c, f,

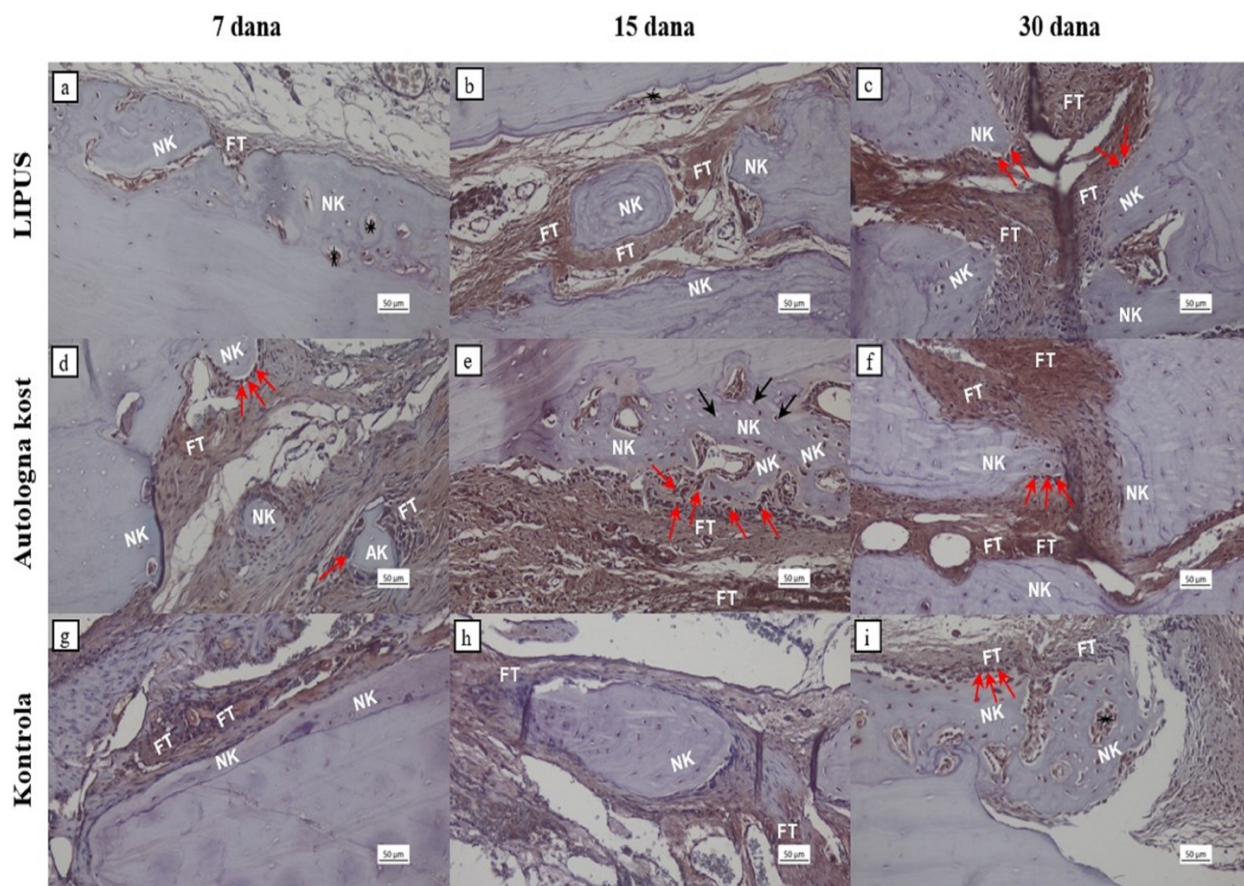
i). Na presjecima su označene sljedeće histološke strukture: novostvorena kost (NK), autologna kost (AK), fibrozno tkivo (FT), osteociti (crne strelice), osteoblasti (crvene strelice), krvne žile (crne zvjezdice). Povećanje: 200×, jedinična dužina = 100 μm .



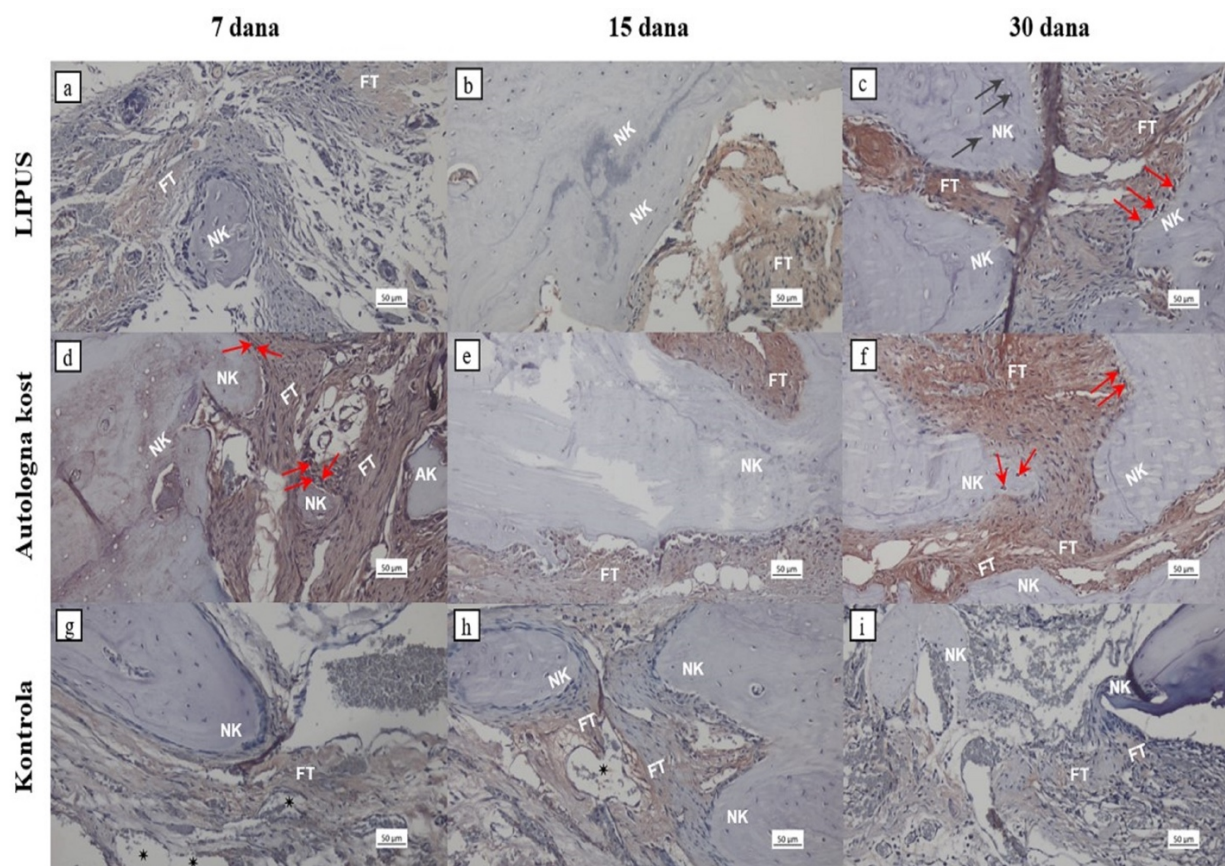
Slika 22. Imunohistokemijsko bojenje čimbenika tumorske nekroze alfa ($\text{TNF-}\alpha$) u koronarnim presjecima defekata kalvarije štakora za sve ispitivane skupine: LIPUS (a–c), autologna kost (d–f) i kontrolna skupina (g–i). Za svaku skupinu odabrane su tri reprezentativne vremenske točke radi prikaza vremenske i prostorne lokalizacije $\text{TNF-}\alpha$ izražaja: 7. dan (a, d, g), 15. dan (b, e, h), 30. dan (c, f, i). Na presjecima su označene sljedeće histološke strukture: novostvorena kost (NK), autologna kost (AK), fibrozno tkivo (FT), osteociti (crne strelice), osteoblasti (crvene strelice), krvne žile (crne zvjezdice). Povećanje: 200×, jedinična dužina = 50 μm .



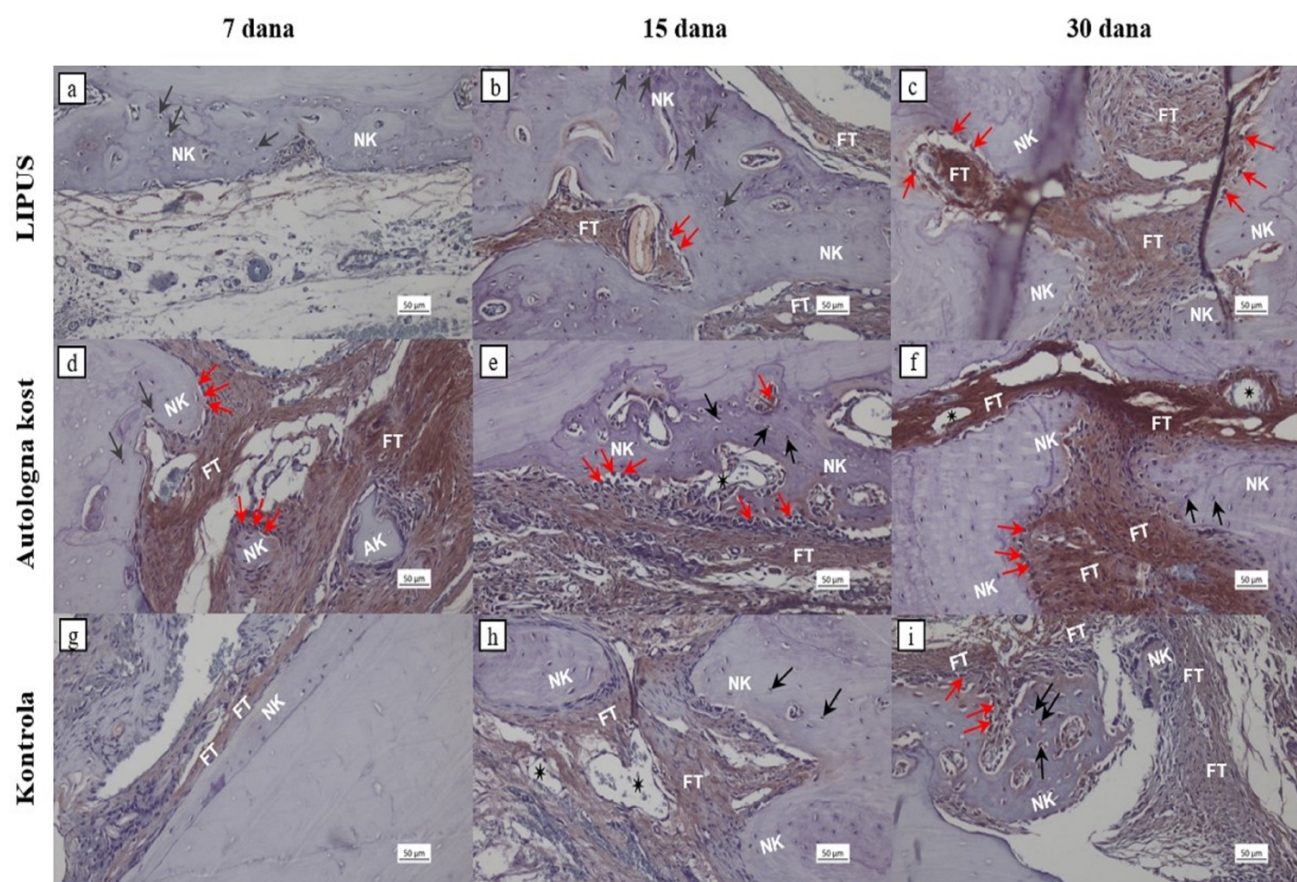
Slika 23. Imunohistokemijsko bojenje osterixa (Osx) u koronarnim presjecima defekata kalvarije štakora za sve ispitivane skupine: LIPUS (a–c), autologna kost (d–f) i kontrolna skupina (g–i). Za svaku skupinu odabrane su tri reprezentativne vremenske točke radi prikaza vremenske i prostorne lokalizacije Osx izražaja: 7. dan (a, d, g), 15. dan (b, e, h), 30. dan (c, f, i). Na presjecima su označene sljedeće histološke strukture: novostvorena kost (NK), autologna kost (AK), fibrozno tkivo (FT), osteociti (crne strelice), osteoblasti (crvene strelice), krvne žile (crne zvjezdice). Povećanje: 200×, jedinična dužina = 100 μm.



Slika 24. Imunohistokemijsko bojenje BMP-2/4 u koronarnim presjecima defekata kalvarije štakora za sve ispitivane skupine: LIPUS (a–c), autologna kost (d–f) i kontrolna skupina (g–i). Za svaku skupinu odabrane su tri reprezentativne vremenske točke radi prikaza vremenske i prostorne lokalizacije BMP-2/4 izražaja: 7. dan (a, d, g), 15. dan (b, e, h), 30. dan (c, f, i). Na presjecima su označene sljedeće histološke strukture: novostvorena kost (NK), autologna kost (AK), fibrozno tkivo (FT), osteociti (crne strelice), osteoblasti (crvene strelice), krvne žile (crne zvjezdice). Povećanje: 200×, jedinična dužina = 50 µm.



Slika 25. Imunohistokemijsko bojenje BMP-7 u koronarnim presjecima defekata kalvarije štakora za sve ispitivane skupine: LIPUS (a–c), autologna kost (d–f) i kontrolna skupina (g–i). Za svaku skupinu odabrane su tri reprezentativne vremenske točke radi prikaza vremenske i prostorne lokalizacije BMP-7 izražaja: 7. dan (a, d, g), 15. dan (b, e, h), 30. dan (c, f, i). Na presjecima su označene sljedeće histološke strukture: novostvorena kost (NK), autologna kost (AK), fibrozno tkivo (FT), osteociti (crne strelice), osteoblasti (crvene strelice), krvne žile (crne zvjezdice). Povećanje: 200×, jedinična dužina = 50 µm.



Slika 26. Imunohistokemijsko bojenje SMAD-1/5/8 u koronarnim presjecima defekata kalvarije štakora za sve ispitivane skupine: LIPUS (a–c), autologna kost (d–f) i kontrolna skupina (g–i). Za svaku skupinu odabrane su tri reprezentativne vremenske točke radi prikaza vremenske i prostorne lokalizacije SMAD-1/5/8 izražaja: 7. dan (a, d, g), 15. dan (b, e, h), 30. dan (c, f, i). Na presjecima su označene sljedeće histološke strukture: novostvorena kost (NK), autologna kost (AK), fibrozno tkivo (FT), osteociti (crne strelice), osteoblasti (crvene strelice), krvne žile (crne zvjezdice). Povećanje: 200×, jedinična dužina = 50 µm.

5. RASPRAVA

Kosti ljudskog tijela koje osificiraju putem intramembranske osifikacije uključuju većinu kostiju lubanje i lica, kao i klavikulu. Budući da većina ovih kostiju štiti vitalne strukture, nije neočekivano da u slučaju ozljede postoji potreba za ubrzavanjem i poboljšanjem njihove regeneracije. Iako se autologna kost (AK) smatra zlatnim standardom među presadcima koštanog tkiva, moguće komplikacije povezane s njezinom primjenom usmjerile su istraživački fokus prema razvoju alternativnih pristupa [134].

Model kritično velikog koštanog defekta (CSBD) pokazao se izuzetno pogodnim za ispitivanje različitih čimbenika kao i biomaterijala te pruža ključne informacije o osteokonduktivnim i osteoinduktivnim svojstvima biomaterijala. S obzirom na činjenicu da kalvarija osificira intramembranskom osifikacijom, CSBD model kod štakora predstavlja optimalni model za proučavanje ovog procesa [135, 136]. Budući da je pulsirajući ultrazvuk niskog intenziteta (LIPUS) već dokazan kao vrijedan neinvazivni akcelerator cijeljenja dugih kostiju koje cijele putem endohondralne osifikacije, odlučili smo ga primijeniti na CSBD model kalvarije štakora i usporediti ga s aktualnim zlatnim standardom u transplantacijskoj i regenerativnoj kirurgiji - autolognim koštanim presadkom.

Uzimajući u obzir prethodne činjenice, histološki i imunohistokemijski smo analizirali proces cijeljenja CSBD defekta kalvarije štakora nakon primjene LIPUS-a i AK. Do danas je objavljeno nekoliko studija koje su dobro dokumentirale *in vivo* cijeljenje kalvarijalnih koštanih defekata kod štakora nakon primjene LIPUS-a. Međutim, nedostaju sustavni podaci koji bi usporedili učinkovitost LIPUS-a s cijeljenjem defekata korištenjem AK presadka, kao i analize imunohistokemijskih parametara [137–140].

Jung i sur. primijenili su LIPUS snage 1 W/cm^2 na 4 mm kalvarijalne defekte kod štakora dva puta tjedno po 20 minuta tijekom osam tjedana. Njihovi rezultati potvrdili su povoljan

učinak LIPUS-a na stvaranje nove kosti, s otprilike 20% višim vrijednostima koštanog volumena u eksperimentalnoj skupini u usporedbi s kontrolom [137]. Lavandier i sur. koristili su LIPUS snage 100 i 300 mW/cm² na 3 mm kalvarijalne defekte pet minuta dnevno, pet dana u tjednu, tijekom dva tjedna nakon stvaranja defekta. Snimanja su provedena na 3., 30. i 60. poslijeoperacijski dan. Rezultati su pokazali značajan učinak ultrazvuka pri snazi od 300 mW/cm², dok pri 100 mW/cm² učinak nije bio značajan. Prosječni postotak povećanja regeneracije kosti u skupini s 300 mW/cm² nakon 60 dana bio je oko 20% koštanog volumena [138]. Hasuike i sur. primijenili su LIPUS snage 30 mW/cm² na 2,7 mm defekte kod štakora tijekom 20 minuta dnevno kroz 28 dana. Nakon četiri tjedna, opažena je značajna razlika u stopi reosifikacije (18,1% u LIPUS skupini naspram 9,8% u kontrolnoj) [139]. Imafuji i sur. stvorili su četiri kružna defekta promjera 2,7 mm na kalvariji štakora te podijelili životinje u dvije glavne skupine - LIPUS i nesonificiranu kontrolnu skupinu. LIPUS skupina (30 mW/cm²) je imala 3 podskupine; kontrolnu podskupinu kod koje je primjenjen samo ultrazvuk, podskupinu s apsorbirajućim kolagenskim spužvama (ACS) i podskupinu gdje je primjenjena kombinacija ACS-a s koštanim morfogenetskim proteinom - 9 (rhBMP-9/ACS). Sonikacija je trajala svakodnevno tijekom četiri tjedna nakon operacije. Skupine tretirane LIPUS-om pokazale su povećanu osifikaciju u odnosu na skupine bez ultrazvučne stimulacije [140].

U svim navedenim studijama kvantifikacija novoformirane kosti izvedena je pomoću računalne tomografije.

Naše istraživanje provedeno je na 45 mužjaka štakora soja Wistar koji su nasumično podijeljeni u 3 skupine po 15 jedinki te su žrtvovani u intervalima 7., 15. i 30. dan. Kritično veliki defekt kalvarije promjera 8 mm proveden je na svim životinjama te prekriven kolagenom membranom kako bi imitirala periost. U prvoj skupini primjenjen je isključivo LIPUS, u drugoj skupini isključivo autologni koštani transplantat, dok je treća predstavljala kontrolnu skupinu, gdje se promatralo spontano cijeljenje kritično velikog defekta kalvarije štakora. LIPUS uređaj korišten u ovom istraživanju imao je frekvenciju ultrazvuka od 1.5 MHz, frekvenciju ponavljanja pulsa od 1kHz na 20% radnoga ciklusa dok je ultrazvučna

sonda bila intenziteta 30mW/cm^2 . Za insonaciju životinja korištena je ultrazvučna sonda kružnog oblika, promjera 24mm. Ultrazvuk se primjenjivao isključivo u LIPUS eksperimentalnoj skupini prema protokolu 3 puta tjedno, a pojedinačno trajanje tretmana iznosilo je 20 minuta. Aplikacija ultrazvuka je počela već prvi dan nakon operacijskog zahvata kritično velikog defekta kalvarije štakora i nastavljena je do tridesetog dana, ovisno o pojedinim vremenskim točkama žrtvovanja [141].

Ovo istraživanje potvrdilo je povoljne učinke LIPUS-a i AK presađka na cijeljenje CSBD defekta u smislu gotovo potpune regeneracije koštanog defekta te razlika u intenzitetu izražaja imunohistokemijskih parametara između analiziranih skupina.

Prema rezultatima ovoga istraživanja, obujam kosti varirao je među skupinama i vremenskim točkama. Trend je pokazao porast obujma kosti tijekom vremena s najvišim vrijednostima zabilježenim 30. poslijeoperacijski dan. Trend porasta vrijednosti novostvorene kosti pokazale su obje metode za kvantifikaciju kosti; mikro-CT i koštana histomorfometrija te je pokazana statistički značajna razlika između 30. dana u odnosu na dvije ranije vremenske točke, 15. i 7. dan, u svim skupinama ($p < 0.001$) (Tablice 2 i 3, Slike 16 i 20).

Koristeći metodu mikro-CT-a najviše vrijednosti su postignute u AK skupini (26,83%), zatim u LIPUS skupini (23,74%), dok su najniže vrijednosti zabilježene u kontrolnoj skupini (15,85%) (Tablica 2). Koristeći metodu histomorfometrije najviše vrijednosti su postignute u AK skupini (20,35%), zatim u LIPUS skupini (19,12%), a najniže vrijednosti su također zabilježene u kontrolnoj skupini (5,11%) (Tablica 3). U obje korištene metode, na 30. dan, pronađen je značajno veći obujam kosti u obje eksperimentalne skupine u odnosu na kontrolnu. Primjenom koštane histomorfometrije, LIPUS je pokazao značajno veći BV/TV 7. dan te 30. dan u usporedbi s kontrolnom skupinom dok je autologna kost pokazala statistički značajno veći BV/TV u odnosu na kontrolnu skupinu tek 30. dan. Korištenjem metode mikro-CT-a utvrđene su statistički značajne razlike u vrijednostima BV/TV između sve tri skupine za sve tri vremenske točke (7., 15. i 30. dan) (Tablice 2 i 3, Slike 16 i 20).

Cijeljenje koštanog defekta započinje s procesom stvaranja krvnog ugruška. Paralelno, upalne stanice, orkestriraju upalni odgovor putem lučenja proupalnih citokina. Dominantni posrednik u ovoj početnoj fazi jest TNF- α , koji slijedi lučenje IL-1 i IL-6. Istovremeno, mezenhimalne matične stanice (MSC) ispoljavaju pleiotropne učinke lučenjem niza od preko 40 različitih BMP-ova. Ove signalne molekule igraju važnu ulogu u modulaciji ključnih staničnih procesa uključujući angiogenezu, kemotaksiju, mitogenezu i proliferaciju. Sami BMP-ovi služe kao potentni induktori diferencijacije osteoprogenitornih stanica u zrelije osteocite. Specifično, BMP-2, -6 i -9 demonstriraju kritičnu ulogu u transformaciji mezenhimalnih matičnih stanica u osteoprogenitorne stanice. Daljnja diferencijacija ovih osteoprogenitornih stanica u osteoblaste primarno je posredovana BMP-2, -4 i -7. Ova rana faza regenerativnog procesa karakterizirana je intenzivnom proliferacijom MSC-a i njihovom diferencijacijom u osteoblaste. Sukladno tome, dolazi do postupnog smanjenja izražaja proupalnih citokina, dok se razina izražaja Runx2 značajno povećava. Runx2 predstavlja jedan od najvažnijih transkripcijskih regulatora u procesu diferencijacije osteoblasta.

U ovom istraživanju imunohistokemijski su analizirani upalni parametri: COX-2, TNF- α ; osteogeni čimbenici: Osx, BMP-2/4, BMP-7 te njihove unutarstanične glasničke molekule SMAD-1/5/8.

U procesu reparacije koštanog tkiva, prostaglandini predstavljaju klasu signalnih molekula s pleiotrofnim učinkom na sekvencijalne događaje cijeljenja. Njihov utjecaj na osteogenezu je složen, budući da posjeduju sposobnost stimulacije koštanog remodeliranja, što uključuje proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta i diferencijaciju, kao i indukciju koštane resorpcije posredovanu osteoklastima [142]. Posebice COX-2, ključni enzim u sintezi prostaglandina, biva izražen kao odgovor na široki raspon staničnih stimulusa. Među njima se ističu specifični citokini, čimbenici rasta [143, 144], te mehanički stres [145, 146]. Prostaglandini sintetizirani putem COX-2 potenciraju proliferaciju osteoblasta i njihovu diferencijaciju [142]. Studije, poput one koju su proveli Sato i

suradnici, ukazuju na temeljnu ulogu COX-2 u ranim fazama osteogeneze [147]. Nadalje, COX-2 sudjeluje i u sazrijevanju osteoblasta. Zhang i suradnici su demonstrirali utjecaj COX-2 na regulaciju izražaja *Osx*, transkripcijskog čimbenika nužnog za diferencijaciju osteoblasta i stvaranje koštanog matriksa [62]. Usprkos značaju, proizvodnja prostaglandina tijekom cijeljenja kosti još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Istraživanje na zečjim tibijama nakon osteotomije pokazalo je povišenu razinu prostaglandina u kalusu i okolnom tkivu tijekom prvih 14 dana poslijeoperacijskog perioda [148]. Međutim, do sada nedostaju studije koje bi precizno opisale vremenski profil izražaja prostaglandina tijekom cijeljenja kosti kod drugih laboratorijskih životinjskih modela ili u humanim kliničkim studijama. Važno je napomenuti da COX-2 uobičajeno ima minimalni bazalni izražaj u većini tkiva, ali se brzo inducira kao odgovor na proupalne i mitogene stimuluse. Njena funkcija se podrazumijeva u raznolikim staničnim mehanizmima, uključujući angiogenezu, staničnu proliferaciju i inhibiciju apoptoze [149].

Imunohistokemijski rezultati našeg istraživanja vezani za COX-2 su pokazali da je 7. dan zabilježen značajno veći izražaj COX-2 u LIPUS skupini u usporedbi s AK i kontrolnom skupinom. Imunopozitivnost COX-2 prvenstveno je bila prisutna u upalnim stanicama, što sugerira da LIPUS potiče upalu, ključni događaj koji započinje koštanu reparaciju (Slika 21a). 15. dan, LIPUS skupina pokazala je značajno veći izražaj COX-2 u odnosu na ostale dvije skupine. COX-2 je bio imunolokaliziran u osteoprogenitornim stanicama uz novoformirane koštane trabekule te u nezrelim osteocitima unutar koštanih lakuna (Slika 21b). 30. dan, pozitivnost COX-2 je bila najizraženija u AK skupini, značajno se razlikujući od LIPUS i kontrolne skupine (Tablica 4). Izražaj je bio prisutan u proliferacijskim područjima mezenhimalnih stanica i preosteoblasta na rubovima defekta koji još nisu potpuno osificirali, kao i u osteocitima novoformirane kosti (Slika 21f). Ovi rezultati ukazuju na to da je mehanička stimulacija inducirana LIPUS-om dovela do najvećeg izražaja COX-2 7. i 15. dan cijeljenja defekta. Time je potaknuta proliferacija mezenhimalnih matičnih stanica i njihova diferencijacija u osteogene stanice, što je rezultiralo značajnom regeneracijom kosti i superiornim zatvaranjem defekta.

TNF- α ima ključnu ulogu u regulaciji koštanog metabolizma. Zajedno s RANKL-om, TNF- α promovira osteoklastogenezu i resorpciju kosti. Međutim, važno je napomenuti da TNF- α sam po sebi ne potiče diferencijaciju osteoklasta [150–152]. Brojna istraživanja ukazuju na inhibicijski učinak TNF- α na osteogenezu. Taj učinak se primarno ostvaruje supresijom diferencijacije osteoblasta. Jedan od mehanizama kojim TNF- α postiže ovu inhibiciju je smanjenje izražaja ključnih transkripcijskih čimbenika poput *Osx* i *Runx2*, koji su neophodni za diferencijaciju osteoblasta [153, 154]. Međutim, utjecaj TNF- α na diferencijaciju mezenhimalnih matičnih stanica u osteoblaste ostaje problematičan u znanstvenoj literaturi. Neke studije sugeriraju da TNF- α inhibira osteogenu diferencijaciju MSC-a putem Notch signalnih puteva [155, 156]. S druge strane, postoje radovi koji pokazuju da TNF- α može inducirati osteogenu diferencijaciju MSC stanica regulacijom izražaja *Runx2*, *Osx* i *BMP-2* [157–160]. Ovi paradoksalni nalazi u velikoj se mjeri objašnjavaju različitim eksperimentalnim uvjetima, prvenstveno razlikama u koncentraciji TNF- α korištenoj u studijama te vremenu izlaganja stanica ovom citokinu. Različito doziranje i trajanje izloženosti TNF- α mogu rezultirati suprotnim učincima na staničnu diferencijaciju.

Imunohistokemijski rezultati našeg istraživanja vezani za TNF- α pokazali su da je na 7. dan zabilježena značajno veći izražaj TNF- α u kontrolnoj skupini u usporedbi s AK i LIPUS skupinom. Na 15. dan LIPUS skupina pokazala je veći izražaj TNF- α , značajno se razlikujući od AK i kontrolne skupine, a iako je 30. dan LIPUS skupina pokazala značajno veći izražaj TNF- α u odnosu na kontrolnu skupinu, izražaj nije bio značajno veći u odnosu na AK skupinu (Tablica 4). Budući da TNF- α promovira osteoklastogenezu te potiče aktivnost osteoklasta, a time i koštanu resorpciju kroz RANK/RANKL/OPG put [161], opravdano je reći i da rezultati ove studije podupiru ovu tvrdnju, upravo radi povišenih vrijednosti TNF- α u kasnijim fazama osteogeneze, ponajviše u LIPUS skupini. Na temelju ovih rezultata opravdano je zaključiti da LIPUS potiče i povećanu razgradnju odnosno pregradnju kosti. U kasnijoj fazi osteogeneze izražaj TNF- α je vidljiv u koštanim stanicama posebice preosteoblastima i osteoblastima na mjestima apozicije koštanog tkiva te u multinuklearnim stanicama sličnim osteoklastima (Slika 22).

Osx, također poznat kao Sp7, je transkripcijski čimbenik koji pripada SP obitelji proteina i specifičan je za osteoblaste. Osx ima ključnu ulogu u započinjanju izražaja gena koji kodiraju zrele osteoblastne proteine. Među njima su osteonektin, osteopontin, osteokalcin i koštani sijaloprotein, čija je prisutnost nužna za funkciju osteoblasta tijekom osifikacije kosti [162]. Dosadašnja istraživanja pokazala su da je Osx specifično prisutan u osteoblastima i osteocitima, dok ga nema u osteoklastima. Osim svoje presudne uloge u diferencijaciji i sazrijevanju koštanih stanica putem regulacije izražaja različitih gena, Osx također ima utjecaj na koštani mikrookoliš [163]. Osx je nužan za diferencijaciju, sazrijevanje i aktivnost osteoblasta, kao i za sazrijevanje i funkciju osteocita [146]. Zanimljivo je da, unatoč tome što nije izražen u osteoklastima, brojne studije sugeriraju da Osx posredno utječe na aktivnost osteoklasta. U tom kontekstu, RANKL je glavna odrednica stvaranja i aktivacije osteoklasta, dok osteoprotegrin (OPG) štiti kost od prekomjerne resorpcije vežući se za RANKL i inhibirajući njegovo međudjelovanje s receptorom na osteoklastima. Tijekom osteogeneze, izražaj Osx-a potiče prekursorske stanice na diferencijaciju u zrele osteoblaste, te posljedično i u osteocite [66, 164–166]. Dok je Runx2 bitan za započinjanje segregacije prehondrogenog mezenhima prema prekursorskoj lozi osteoblasta, s druge strane, Osx je potom neophodan za završavanje puta diferencijacije osteoblasta. Kaback i suradnici su pokazali da se porast izražaja Osx poklapa s početkom i napredovanjem diferencijacije osteoblasta, međutim tek po završetku sazrijevanja hondrocita. Nadalje, vrijednosti Osx mRNA ostaju visoke i nakon stvaranja hrskavice i remodelacije u kost. Prethodno upućuje na dvojaku ulogu Osx: inhibicija nastanka hondrocita i potenciranje diferencijacije osteoblasta [167].

Imunohistokemijski rezultati našeg istraživanja vezani za Osx su pokazali da je na 7. dan zabilježen značajno veći izražaj Osx u LIPUS skupini u usporedbi s AK i kontrolnom skupinom. Izražaj Osx u pluripotentnim mezenhimalnim matičnim stanicama odražava njihovu proliferaciju, koja prethodi diferencijaciji u osteogene stanice (Slika 23a). Na 15. dan, kontrolna skupina je pokazala značajno veći izražaj Osx u odnosu na ostale dvije skupine. 30. dana, Osx je bio najizraženiji u AK skupini, značajno se razlikujući od LIPUS i kontrolne skupine (Tablica 4). Izražaj je bio prisutan u proliferacijskim područjima

mezenhimalnih stanica i preosteoblasta na rubovima defekta koji još nisu potpuno osificirali, kao i u osteocitima novoformirane kosti (Slika 23f).

BMP-ovi, bitni članovi superporodice transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF- β), predstavljaju heterogenu skupinu od preko dvadeset poznatih članova u sisavaca, podijeljenih u nekoliko podskupina na temelju strukturne homologije i funkcionalnih karakteristika [168, 169]. BMP -2, -6 i -9 su presudni u diferencijaciji mezenhimalnih matičnih u osteoprogenitorne stanice, dok BMP -2, -4 i -7 ih dalje diferenciraju u osteoblaste [170]. Iako dijele zajedničku sposobnost induciranja formiranja kosti i hrskavice, pokazuju jedva zamjetne razlike u izražajnim obrascima tijekom razvoja tkiva, specifičnosti vezanja na receptore i potencijalne uloge u različitim fiziološkim i patološkim procesima. Svojim djelovanjem putem specifičnih receptorskih serin/treonin kinaza na površini stanica, BMP-i pokreću unutarstanične signalne putove, primarno SMAD put, koji dovodi do transkripcije gena uključenih u stvaranje koštanog i hrskavičnog tkiva, proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu stanica [171, 172].

Imunohistokemijski rezultati našeg istraživanja vezani za BMP-2/4 su pokazali da je na 7. dan zabilježen značajno veći izražaj BMP-2/4 u AK skupini u usporedbi s LIPUS i kontrolnom skupinom. Na 15. dan, iako je AK skupina pokazala najveći izražaj BMP-2/4 koja se razlikovala značajno u odnosu na kontrolnu skupinu, ona se nije značajno razlikovala od LIPUS skupine. 30. dana, BMP-2/4 je bio najizraženiji u LIPUS skupini, značajno se razlikujući od AK i kontrolne skupine. Vrijednosti BMP-2/4 su imale dinamiku rasta tijekom cijeljenja u LIPUS i kontrolnoj skupini s najvećom zabilježenom vrijednosti 30. dan u LIPUS skupini. Vrijednosti BMP-2/4 u skupini AK su imale dinamiku smanjenja (Tablica 4).

Imunohistokemijski rezultati našeg istraživanja vezani za BMP-7 su pokazali da je na 7. dan zabilježena značajno veći izražaj BMP-7 u AK skupini u usporedbi s LIPUS i kontrolnom skupinom. Na 15. dan, AK skupina je pokazala značajno veći izražaj BMP-7 u odnosu na ostale dvije skupine. 30. dana, BMP-7 je bio najizraženiji u LIPUS skupini,

značajno se razlikujući od AK i kontrolne skupine. Vrijednosti BMP-7 su imale dinamiku rasta tijekom cijeljenja u LIPUS skupini s najvišom zabilježenom vrijednosti 30. dan, dok su vrijednosti BMP-7 u AK i kontrolnoj skupini imale dinamiku pada (Tablica 4).

SMAD proteini predstavljaju ključne unutarstanične signalne molekule koje posreduju u prijenosu signala izvana stanice, započetog vezanjem liganada iz superobitelji transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF- β), uključujući sam TGF- β i BMP-ove, na njihove specifične transmembranske serin/treonin kinazne receptore. Ova složena signalna kaskada započinje fosforilacijom i aktivacijom receptorskih SMAD-ova. Ovi aktivirani SMAD kompleksi premještaju se u jezgru, gdje djeluju kao transkripcijski čimbenici, regulirajući izražaj ciljnih gena međudjelovanjem s DNK i drugim transkripcijskim regulatorima [173]. Precizna regulacija SMAD signalizacije ključna je za niz temeljnih bioloških procesa, uključujući regulaciju diferencijaciju osteoblasta i osteoklasta tijekom razvoja skeleta, osteogeneze i koštane homeostaze, što upućuje na značajnu povezanost između SMAD signalizacije i pregradnje kosti. SMAD posreduje u prijenosu signala u TGF- β i BMP signalnom putu koji utječe i na funkcije osteoblasta i osteoklasta, te predstavlja značajnu ulogu u regulaciji pregradnje kostiju [174].

Imunohistokemijski rezultati našeg istraživanja vezani za SMAD-1/5/8 su pokazali da je na 7. dan zabilježen značajno veći izražaj SMAD-1/5/8 u AK skupini u usporedbi s LIPUS i kontrolnom skupinom. Na 15. dan, AK skupina je pokazala značajno veći izražaj SMAD-1/5/8 u odnosu na ostale dvije skupine. 30. dana, SMAD-1/5/8 je bio najizraženiji u skupini AK, značajno se razlikujući od LIPUS i kontrolne skupine (Tablica 4).

6. ZAKLJUČCI

Prema rezultatima dobivenim ovim istraživanjem možemo zaključiti sljedeće:

1. LIPUS i autologna kost su stimulirali osteogenezu i njihova primjena je dovela do gotovo potpunog zatvaranja kritično velikog defekta kalvarije štakora.
2. Primjenom 3D metode - mikro-CT i 2D metode - koštana histomorfometrija utvrđeno je da su najveće vrijednosti novostvorene kosti postignute u skupini autologne kosti, zatim u LIPUS skupini, dok su najniže vrijednosti zabilježene u kontrolnoj skupini.
3. Trend je pokazao porast obujma kosti tijekom vremena s najvećim vrijednostima zabilježenim 30. poslijeoperacijski dan te je uočena statistički značajna razlika između 30. dana u odnosu na dvije ranije vremenske točke, 15. i 7. dan, u svim skupinama.
4. LIPUS je potaknuo povećani tkivni izražaj upalnih čimbenika COX-2 i TNF- α . Kad govorimo o COX-2, povećani izražaj je bio zamijećen u ranijim fazama osteogeneze upućujući na to da mehanička stimulacija LIPUS-om potiče upalu kao prvu fazu cijeljenja kosti. TNF- α je bio povećano izražen u kasnijim fazama što govori o njegovoj ulozi u stimuliranju osteoklasta i koštane resorpcije u kasnijim fazama osteogeneze.
5. Autologna kost je također potaknula povećani izražaj upalnih čimbenika COX-2 i TNF- α . Kad govorimo o COX-2, povećani izražaj je bio zamijećen u kasnijim fazama osteogeneze za razliku od LIPUS skupine. Tkivni izražaj TNF- α je bio povećan u kasnijim fazama što korelira sa rezultatima LIPUS stimulacije i potvrđuje ulogu autologne kosti u poticanju osteoklastogeneze.
6. Skupina autologne kosti je 30. poslijeoperacijski dan pokazala najveći tkivni izražaj Osx što korelira s najvećim potencijalom stvaranja kosti a posljedično i najvećim vrijednostima novostvorene kosti u istoj skupini.
7. LIPUS skupina je 30. dan cijeljenja pokazala najveći tkivni izražaj BMP-2/4 i BMP-7 što upućuje na izrazitu osteoindukciju koja je dovela do zatvaranja defekta.
8. Skupina autologne kosti je 30. dan cijeljenja pokazala najveći tkivni izražaj SMAD-1/5/8 koji je pokazatelj unutarstaničnog prijenosa osteoinduktivnog signala.
9. Ovo istraživanje je pokazalo da pulsirajući ultrazvuk niskog intenziteta predstavlja

perspektivnu alternativu autolognim koštanim presadcima u regeneraciji koštanih defekata kosti koje osificiraju intramembranskom osifikacijom.

10. Ova studija potvrđuje regeneracijski potencijal pulsirajućeg ultrazvuka niskog intenziteta te utvrđuje perspektivu cijeljenja kosti neinvazivnom ultrazvučnom metodom u dobroj kliničkoj praksi.

7. LITERATURA

1. Ziskin MC. Fundamental physics of ultrasound and its propagation in tissue. *Radiographics* 1993;13:705–9.
2. Shpak O, Verweij M, de Jong N, Versluis M. Droplets, Bubbles and Ultrasound Interactions. *Adv Exp Med Biol* 2016;880:157–74.
3. Zhou Y. Theoretically Estimating the Acoustic Intensity of High-Intensity Focused Ultrasound (HIFU) Using Infrared Thermography. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 2020;67:1159–65.
4. Shriki J. Ultrasound physics. *Crit Care Clin* 2014;30:1–24, v.
5. ter Haar G. Heat and sound: focused ultrasound in the clinic. *Int J Hyperthermia* 2015;31:223–4.
6. Wu J, Nyborg WL. Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:1103–16.
7. Vignon F, Shi WT, Powers JE i sur. Microbubble cavitation imaging. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 2013;60:661–70.
8. Aldrich JE. Basic physics of ultrasound imaging. *Crit Care Med* 2007;35:S131-7.
9. ter Haar G. Therapeutic applications of ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol* 2007;93:111–29.
10. Miller DL, Smith NB, Bailey MR, Czarnota GJ, Hynynen K, Makin IRS. Overview of therapeutic ultrasound applications and safety considerations. *J Ultrasound Med* 2012;31:623–34.
11. Watson T. Ultrasound in contemporary physiotherapy practice. *Ultrasonics* 2008;48:321–9.
12. Žauhar G, Duck FA, Starritt HC. Comparison of the acoustic streaming in amniotic fluid and water in medical ultrasonic beams. *Ultraschall Med* 2006;27:152–8.
13. Morton KI, ter Haar GR, Stratford IJ, Hill CR. The role of cavitation in the interaction of ultrasound with V79 Chinese hamster cells in vitro. *Br J Cancer Suppl* 1982;5:147–50.
14. Hallow DM, Mahajan AD, McCutchen TE, Prausnitz MR. Measurement and correlation of acoustic cavitation with cellular bioeffects. *Ultrasound Med Biol* 2006;32:1111–22.
15. Lai CY, Wu CH, Chen CC, Li PC. Quantitative relations of acoustic inertial cavitation with sonoporation and cell viability. *Ultrasound Med Biol* 2006;32:1931–41.
16. Brayman AA, Azadniv M, Cox C, Miller MW. Hemolysis of albumin-supplemented, 40% hematocrit human erythrocytes in vitro by 1-MHz pulsed ultrasound: acoustic pressure and pulse length dependence. *Ultrasound Med Biol* 1996;22:927–38.
17. Brayman AA, Doida Y, Miller MW. Apparent contribution of respiratory gas exchange to the in vitro ‘cell density effect’ in ultrasonic cell lysis. *Ultrasound Med Biol* 1992;18:701–14.
18. Clarke PR, Hill CR. Biological action of ultrasound in relation to the cell cycle. *Exp Cell Res* 1969;58:443–4.
19. Chapman I V. The effect of ultrasound on the potassium content of rat thymocytes

- in vitro. *Br J Radiol* 1974;47:411–5.
20. Mortimer AJ, Dyson M. The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts. *Ultrasound Med Biol* 1988;14:499–506.
 21. ter Haar G. Therapeutic applications of ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol* 2007;93:111–29.
 22. ter Haar G, Dyson M, Smith SP. Ultrastructural changes in the mouse uterus brought about by ultrasonic irradiation at therapeutic intensities in standing wave fields. *Ultrasound Med Biol* 1979;5:167–79.
 23. Kunze-Mühl E. Observations on the effect of X-ray alone and in combination with ultrasound on human chromosomes. *Hum Genet* 1981;57:257–60.
 24. Gebhart E. Sister chromatid exchange (SCE) and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. *Hum Genet* 1981;58:235–54.
 25. Liebeskind D, Padawer J, Wolley R, Bases R. Diagnostic ultrasound time-lapse and transmission electron microscopic studies of cells insonated in vitro. *Br J Cancer Suppl* 1982;5:176–86.
 26. Webster DF, Harvey W, Dyson M, Pond JB. The role of ultrasound-induced cavitation in the ‘in vitro’ stimulation of collagen synthesis in human fibroblasts. *Ultrasonics* 1980;18:33–7.
 27. Taylor KJ, Newman DL. Electrophoretic mobility of Ehrlich cell suspensions exposed to ultrasound of varying parameters. *Phys Med Biol* 1972;17:270–6.
 28. Horder MM, Barnett SB, Vella GJ, Edwards MJ, Wood AK. In vivo heating of the guinea-pig fetal brain by pulsed ultrasound and estimates of thermal index. *Ultrasound Med Biol* 1998;24:1467–74.
 29. C.A.M. Xavier, L.R. Duarte. Ultrasonic stimulation of bone callus: clinical applications. *Rev Brazil Orthop* 1983;18:73–80.
 30. Dyson M, Brookes M. Stimulation of bone repair by ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1983;Suppl 2:61–6.
 31. Pilla AA, Mont MA, Nasser PR i sur. Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. *J Orthop Trauma* 1990;4:246–53.
 32. Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Kilcoyne RF. Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Joint Surg Am* 1994;76:26–34.
 33. Tsai CL, Chang WH, Liu TK. Preliminary studies of duration and intensity of ultrasonic treatments on fracture repair. *Chin J Physiol* 1992;35:21–6.
 34. Reher P, Elbeshir el-NI, Harvey W, Meghji S, Harris M. The stimulation of bone formation in vitro by therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1997;23:1251–8.
 35. Han JJ, Yang HJ, Hwang SJ. Enhanced Bone Regeneration by Bone Morphogenetic Protein-2 after Pretreatment with Low-Intensity Pulsed Ultrasound in Distraction Osteogenesis. *Tissue Eng Regen Med* 2022;19:871–86.
 36. Wang SJ, Lewallen DG, Bolander ME, Chao EY, Ilstrup DM, Greenleaf JF. Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* 1994;12:40–7.
 37. Young SR, Dyson M. Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesions. *Ultrasonics* 1990;28:175–80.
 38. Williams AR. Release of serotonin from human platelets by acoustic

- microstreaming. *J Acoust Soc Am* 1974;56:1640–9.
39. Rooney JA. Hemolysis near an ultrasonically pulsating gas bubble. *Science* 1970;169:869–71.
 40. Williams AR, Miller DL. Photometric detection of ATP release from human erythrocytes exposed to ultrasonically activated gas-filled pores. *Ultrasound Med Biol* 1980;6:251–6.
 41. Dalecki D, Raeman CH, Child SZ i sur. Hemolysis in vivo from exposure to pulsed ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1997;23:307–13.
 42. Dalecki D, Child SZ, Raeman CH, Cox C. Hemorrhage in murine fetuses exposed to pulsed ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1999;25:1139–44.
 43. Jiang X, Savchenko O, Li Y i sur. A Review of Low-Intensity Pulsed Ultrasound for Therapeutic Applications. *IEEE Trans Biomed Eng* 2019;66:2704–18.
 44. Leskinen JJ, Hynynen K. Study of factors affecting the magnitude and nature of ultrasound exposure with in vitro set-ups. *Ultrasound Med Biol* 2012;38:777–94.
 45. Kristiansen TK, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Roe LR. Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:961–73.
 46. Nolte PA, van der Krans A, Patka P, Janssen IM, Ryaby JP, Albers GH. Low-intensity pulsed ultrasound in the treatment of nonunions. *J Trauma* 2001;51:693–702; discussion 702-3.
 47. Gebauer D, Mayr E, Orthner E, Ryaby JP. Low-intensity pulsed ultrasound: effects on nonunions. *Ultrasound Med Biol* 2005;31:1391–402.
 48. Chen C, Zhang T, Liu F i sur. Effect of Low-Intensity Pulsed Ultrasound After Autologous Adipose-Derived Stromal Cell Transplantation for Bone-Tendon Healing in a Rabbit Model. *Am J Sports Med* 2019;47:942–53.
 49. Lai WC, Iglesias BC, Mark BJ, Wang D. Low-Intensity Pulsed Ultrasound Augments Tendon, Ligament, and Bone-Soft Tissue Healing in Preclinical Animal Models: A Systematic Review. *Arthroscopy* 2021;37:2318-2333.e3.
 50. Vahedi P, Hosainzadegan H, Brazvan B, Roshangar L, Shafaei H, Salimnejad R. Treatment of cartilage defects by Low-intensity pulsed ultrasound in a sheep model. *Cell Tissue Bank* 2021;22:369–78.
 51. Hsu SK, Huang WT, Liu BS, Li SM, Chen HT, Chang CJ. Effects of near-field ultrasound stimulation on new bone formation and osseointegration of dental titanium implants in vitro and in vivo. *Ultrasound Med Biol* 2011;37:403–16.
 52. Padilla F, Puts R, Vico L, Raum K. Stimulation of bone repair with ultrasound: a review of the possible mechanic effects. *Ultrasonics* 2014;54:1125–45.
 53. Rubin C, Bolander M, Ryaby JP, Hadjiargyrou M. The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83:259–70.
 54. Dalecki D. Mechanical bioeffects of ultrasound. *Annu Rev Biomed Eng* 2004;6:229–48.
 55. Bhan K, Patel R, Hasan K i sur. Fracture Nonunions and Delayed Unions Treated With Low-Intensity Pulsed Ultrasound Therapy: A Clinical Series. *Cureus* 2021;13:e17067.

56. Zhang N, Chow SKH, Leung KS, Cheung WH. Ultrasound as a stimulus for musculoskeletal disorders. *J Orthop Translat* 2017;9:52–9.
57. Li JK, Chang WH, Lin JC, Ruaan RC, Liu HC, Sun JS. Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation. *Biomaterials* 2003;24:2379–85.
58. Uddin SMZ, Qin YX. Enhancement of osteogenic differentiation and proliferation in human mesenchymal stem cells by a modified low intensity ultrasound stimulation under simulated microgravity. *PLoS One* 2013;8:e73914.
59. Tang CH, Yang RS, Huang TH i sur. Ultrasound stimulates cyclooxygenase-2 expression and increases bone formation through integrin, focal adhesion kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt pathway in osteoblasts. *Mol Pharmacol* 2006;69:2047–57.
60. Lai CH, Chen SC, Chiu LH i sur. Effects of low-intensity pulsed ultrasound, dexamethasone/TGF-beta1 and/or BMP-2 on the transcriptional expression of genes in human mesenchymal stem cells: chondrogenic vs. osteogenic differentiation. *Ultrasound Med Biol* 2010;36:1022–33.
61. Harrison A, Lin S, Pounder N, Mikuni-Takagaki Y. Mode & mechanism of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) in fracture repair. *Ultrasonics* 2016;70:45–52.
62. Zhang X, Schwarz EM, Young DA, Puzas JE, Rosier RN, O’Keefe RJ. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest* 2002;109:1405–15.
63. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys* 2014;561:3–12.
64. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89:747–54.
65. Fakhry M, Hamade E, Badran B, Buchet R, Magne D. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World J Stem Cells* 2013;5:136–48.
66. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G i sur. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002;108:17–29.
67. Yoshiko Y, Candelieri GA, Maeda N, Aubin JE. Osteoblast autonomous *Pi* regulation via *Pit1* plays a role in bone mineralization. *Mol Cell Biol* 2007;27:4465–74.
68. Boivin G, Bala Y, Doublier A i sur. The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. *Bone* 2008;43:532–8.
69. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* 1998;13:793–802.
70. Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM, Jee WS. Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc* 1989;3:953–60; discussion 960-1.
71. Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE i sur. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *Am J Pathol* 2009;174:239–47.
72. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become

- osteocytes. *Dev Dyn* 2006;235:176–90.
73. Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int* 2010;21:1457–69.
74. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1116:281–90.
75. Đudarić L, Zoričić Cvek S, Cvijanović O, Fužinac-Smojver A, Čelić T, Martinović D. Osnove biologije koštanog tkiva. *Medicina Fluminensis* 2014;50:21–38.
76. Schaffler MB, Cheung WY, Majeska R, Kennedy O. Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcif Tissue Int* 2014;94:5–24.
77. Zhang K, Barragan-Adjemian C, Ye L i sur. E11/gp38 selective expression in osteocytes: regulation by mechanical strain and role in dendrite elongation. *Mol Cell Biol* 2006;26:4539–52.
78. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 2011;26:229–38.
79. Ubaidus S, Li M, Sultana S i sur. FGF23 is mainly synthesized by osteocytes in the regularly distributed osteocytic lacunar canalicular system established after physiological bone remodeling. *J Electron Microsc (Tokyo)* 2009;58:381–92.
80. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev* 2013;34:658–90.
81. Mullender MG, van der Meer DD, Huiskes R, Lips P. Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. *Bone* 1996;18:109–13.
82. Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 2014;94:25–34.
83. Boabaid F, Cerri PS, Katchburian E. Apoptotic bone cells may be engulfed by osteoclasts during alveolar bone resorption in young rats. *Tissue Cell* 2001;33:318–25.
84. Knothe Tate ML. 'Whither flows the fluid in bone?' An osteocyte's perspective. *J Biomech* 2003;36:1409–24.
85. Xiao Z, Zhang S, Mahlios J i sur. Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression. *J Biol Chem* 2006;281:30884–95.
86. Santos A, Bakker AD, Zandieh-Doulabi B, de Blieck-Hogervorst JMA, Klein-Nulend J. Early activation of the beta-catenin pathway in osteocytes is mediated by nitric oxide, phosphatidylinositol-3 kinase/Akt, and focal adhesion kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:364–9.
87. Burger EH, Klein-Nulend J. Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J* 1999;13 Suppl:S101-12.
88. Crockett JC, Mellis DJ, Scott DI, Helfrich MH. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos Int* 2011;22:1–20.
89. Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008;8:204–16.
90. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 2007;7:292–304.
91. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000 2000;24:99–126.
92. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and

- remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:139–46.
93. Phan TCA, Xu J, Zheng MH. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histol Histopathol* 2004;19:1325–44.
 94. Miyamoto T. The dendritic cell-specific transmembrane protein DC-STAMP is essential for osteoclast fusion and osteoclast bone-resorbing activity. *Mod Rheumatol* 2006;16:341–2.
 95. Kobayashi Y, Udagawa N, Takahashi N. Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2009;19:61–72.
 96. Mulari M, Vääräniemi J, Väänänen HK. Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts. *Microsc Res Tech* 2003;61:496–503.
 97. Arana-Chavez VE, Bradaschia-Correa V. Clastic cells: mineralized tissue resorption in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:446–50.
 98. Chabadel A, Bañon-Rodríguez I, Cluet D i sur. CD44 and beta3 integrin organize two functionally distinct actin-based domains in osteoclasts. *Mol Biol Cell* 2007;18:4899–910.
 99. Luxenburg C, Geblinger D, Klein E i sur. The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. *PLoS One* 2007;2:e179.
 100. Graves AR, Curran PK, Smith CL, Mindell JA. The Cl⁻/H⁺ antiporter CIC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes. *Nature* 2008;453:788–92.
 101. Faloni AP de S, Sasso-Cerri E, Rocha FRG, Katchburian E, Cerri PS. Structural and functional changes in the alveolar bone osteoclasts of estrogen-treated rats. *J Anat* 2012;220:77–85.
 102. Charles JF, Aliprantis AO. Osteoclasts: more than ‘bone eaters’. *Trends Mol Med* 2014;20:449–59.
 103. Aszódi A, Bateman JF, Gustafsson E, Boot-Handford R, Fässler R. Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix: what can we learn from knockout mice? *Cell Struct Funct* 2000;25:73–84.
 104. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 2008;61:577–87.
 105. Vashishth D. Collagen glycation and its role in fracture properties of bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2005;5:316.
 106. Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int* 2006;17:319–36.
 107. Prince CW. Roles of hyaluronan in bone resorption. *BMC Musculoskelet Disord* 2004;5:12.
 108. Shapiro F, Wu JY. Woven bone overview: structural classification based on its integral role in developmental, repair and pathological bone formation throughout vertebrate groups. *Eur Cell Mater* 2019;38:137–67.
 109. Hart NH, Newton RU, Tan J i sur. Biological basis of bone strength: anatomy, physiology and measurement. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2020;20:347–71.
 110. Franz-Odenaal TA. Induction and patterning of intramembranous bone. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011;16:2734–46.
 111. Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. *Bone* 2015;80:14–8.
 112. Long F, Ornitz DM. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb*

- Perspect Biol 2013;5:a008334.
113. Ortega N, Behonick DJ, Werb Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol* 2004;14:86–93.
 114. Amizuka N, Hasegawa T, Oda K i sur. Histology of epiphyseal cartilage calcification and endochondral ossification. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012;4:2085–100.
 115. Nasu M, Takayama S, Umezawa A. Endochondral ossification model system: designed cell fate of human epiphyseal chondrocytes during long-term implantation. *J Cell Physiol* 2015;230:1376–88.
 116. Galea GL, Zein MR, Allen S, Francis-West P. Making and shaping endochondral and intramembranous bones. *Dev Dyn* 2021;250:414–49.
 117. Henriksen K, Neutzsky-Wulff A V, Bonewald LF, Karsdal MA. Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone* 2009;44:1026–33.
 118. Parfitt AM. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* 2002;30:5–7.
 119. Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin T hua, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone* 2016;86:119–30.
 120. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury* 2011;42:551–5.
 121. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:133–43.
 122. 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.
 123. Liu Q, Li M, Wang S, Xiao Z, Xiong Y, Wang G. Recent Advances of Osterix Transcription Factor in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:601224.
 124. Hojo H, Ohba S, He X, Lai LP, McMahon AP. Sp7/Osterix Is Restricted to Bone-Forming Vertebrates where It Acts as a Dlx Co-factor in Osteoblast Specification. *Dev Cell* 2016;37:238–53.
 125. Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury* 2007;38 Suppl 1:S11-25.
 126. Probst A, Spiegel HU. Cellular mechanisms of bone repair. *J Invest Surg* 1997;10:77–86.
 127. Rawat S, Gupta S, Mohanty S. Mesenchymal Stem Cells Modulate the Immune System in Developing Therapeutic Interventions. In: *Immune Response Activation and Immunomodulation*. IntechOpen; 2019.
 128. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis P V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 2005;36:1392–404.
 129. Tomas M, Čandrlić M, Juzbašić M i sur. Synthetic Injectable Biomaterials for Alveolar Bone Regeneration in Animal and Human Studies. *Materials (Basel)* 2021;14.
 130. Migliorini F, Cuozzo F, Torsiello E, Spiezia F, Oliva F, Maffulli N. Autologous Bone Grafting in Trauma and Orthopaedic Surgery: An Evidence-Based Narrative Review. *J Clin Med* 2021;10.
 131. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*

- 2012;7:1918–29.
132. de Freitas Silva L, de Carvalho Reis ENR, Barbara TA i sur. Assessment of bone repair in critical-size defect in the calvarium of rats after the implantation of tricalcium phosphate beta (β -TCP). *Acta Histochem* 2017;119:624–31.
 133. Kasuya S, Kato-Kogoe N, Omori M i sur. New Bone Formation Process Using Bio-Oss and Collagen Membrane for Rat Calvarial Bone Defect: Histological Observation. *Implant Dent* 2018;27:158–64.
 134. Gillman CE, Jayasuriya AC. FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021;130:112466.
 135. Jerbić Radetić AT, Zoričić Cvek S, Tomas M i sur. CSBD Healing in Rats after Application of Bovine Xenogeneic Biomaterial Enriched with Magnesium Alloy. *Int J Mol Sci* 2021;22:9089.
 136. Cvijanović Pelloza O, Jerbić Radetić AT, Baričić M, Bukovac L, Zoričić Cvek S. Dynamics of CSBD Healing after Implementation of Dentin and Xenogeneic Bone Biomaterial. *Materials (Basel)* 2023;16.
 137. Jung YJ, Kim R, Ham HJ i sur. Focused low-intensity pulsed ultrasound enhances bone regeneration in rat calvarial bone defect through enhancement of cell proliferation. *Ultrasound Med Biol* 2015;41:999–1007.
 138. Lavandier B, Gleizal A, Béra JC. Experimental assessment of calvarial bone defect re-ossification stimulation using low-intensity pulsed ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 2009;35:585–94.
 139. Hasuike A, Sato S, Udagawa A, Ando K, Arai Y, Ito K. In vivo bone regenerative effect of low-intensity pulsed ultrasound in rat calvarial defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;111:e12-20.
 140. Imafuji T, Shirakata Y, Shinohara Y, Nakamura T, Noguchi K. Enhanced bone formation of calvarial bone defects by low-intensity pulsed ultrasound and recombinant human bone morphogenetic protein-9: a preliminary experimental study in rats. *Clin Oral Investig* 2021;25:5917–27.
 141. Volarić D, Žauhar G, Chen J i sur. The Effect of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Bone Regeneration and the Expression of Osterix and Cyclooxygenase-2 during Critical-Size Bone Defect Repair. *Int J Mol Sci* 2024;25:3882.
 142. Kawaguchi H, Pilbeam CC, Harrison JR, Raisz LG. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop Relat Res* 1995;36–46.
 143. Wadleigh DJ, Herschman HR. Transcriptional Regulation of the Cyclooxygenase-2 Gene by Diverse Ligands in Murine Osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:865–70.
 144. O'Banion MK, Winn VD, Young DA. cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992;89:4888–92.
 145. Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996;93:10417–22.
 146. Klein-Nulend J, Bakker AD, Bacabac RG, Vatsa A, Weinbaum S.

- Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bone* 2013;54:182–90.
147. Sato Y, Arai N, Negishi A, Ohya K. Expression of cyclooxygenase genes and involvement of endogenous prostaglandin during osteogenesis in the rat tibial bone marrow cavity. *J Med Dent Sci* 1997;44:81–92.
 148. Dekel S, Lenthall G, Francis M. Release of prostaglandins from bone and muscle after tibial fracture. An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 1981;63-B:185–9.
 149. Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll HJ. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:411–7.
 150. Boyce BF, Schwarz EM, Xing L. Osteoclast precursors: cytokine-stimulated immunomodulators of inflammatory bone disease. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18:427–32.
 151. Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF- α induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *Journal of Clinical Investigation* 2000;106:1481–8.
 152. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E i sur. Tumor Necrosis Factor α Stimulates Osteoclast Differentiation by a Mechanism Independent of the Odf/Rankl–Rank Interaction. *J Exp Med* 2000;191:275–86.
 153. Osta B, Benedetti G, Miossec P. Classical and Paradoxical Effects of TNF- α on Bone Homeostasis. *Front Immunol* 2014;5.
 154. Algate K, Haynes DR, Bartold PM, Crotti TN, Cantley MD. The effects of tumour necrosis factor- α on bone cells involved in periodontal alveolar bone loss; osteoclasts, osteoblasts and osteocytes. *J Periodontal Res* 2016;51:549–66.
 155. Zhao L, Huang J, Zhang H i sur. Tumor necrosis factor inhibits mesenchymal stem cell differentiation into osteoblasts via the ubiquitin E3 ligase Wwp1. *Stem Cells* 2011;29:1601–10.
 156. Zhang H, Hilton MJ, Anolik JH i sur. NOTCH inhibits osteoblast formation in inflammatory arthritis via noncanonical NF- κ B. *Journal of Clinical Investigation* 2014;124:3200–14.
 157. Briolay A, Lencel P, Bessueille L, Caverzasio J, Buchet R, Magne D. Autocrine stimulation of osteoblast activity by Wnt5a in response to TNF- α in human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;430:1072–7.
 158. Huang H, Zhao N, Xu X i sur. Dose-specific effects of tumor necrosis factor alpha on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell Prolif* 2011;44:420–7.
 159. Lu Z, Wang G, Dunstan CR, Zreikat H. Short-Term Exposure to Tumor Necrosis Factor-Alpha Enables Human Osteoblasts to Direct Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells into Osteogenic Differentiation. *Stem Cells Dev* 2012;21:2420–9.
 160. Glass GE, Chan JK, Freidin A, Feldmann M, Horwood NJ, Nanchahal J. TNF- α promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;108:1585–90.
 161. Fujikawa Y, Sabokbar A, Neale SD, Itonaga I, Torisu T, Athanasou NA. The effect

- of macrophage-colony stimulating factor and other humoral factors (interleukin-1, -3, -6, and -11, tumor necrosis factor-alpha, and granulocyte macrophage-colony stimulating factor) on human osteoclast formation from circulating cells. *Bone* 2001;28:261–7.
162. Renn J, Winkler C. *Osterix* -mCherry transgenic medaka for in vivo imaging of bone formation. *Developmental Dynamics* 2009;238:241–8.
 163. Xing W, Godwin C, Pourteymoor S, Mohan S. Conditional disruption of the *osterix* gene in chondrocytes during early postnatal growth impairs secondary ossification in the mouse tibial epiphysis. *Bone Res* 2019;7:24.
 164. Zhou X, Zhang Z, Feng JQ i sur. Multiple functions of *Osterix* are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010;107:12919–24.
 165. Karsenty G. Minireview: Transcriptional Control of Osteoblast Differentiation. *Endocrinology* 2001;142:2731–3.
 166. Nakashima K, de Crombrughe B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends in Genetics* 2003;19:458–66.
 167. Kaback LA, Soung DY, Naik A i sur. *Osterix/Sp7* regulates mesenchymal stem cell mediated endochondral ossification. *J Cell Physiol* 2008;214:173–82.
 168. Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res* 2014;93:335–45.
 169. Mulloy B, Rider CC. The Bone Morphogenetic Proteins and Their Antagonists. *Vitam Horm* 2015;99:63–90.
 170. Sampath TK, Reddi AH. Discovery of bone morphogenetic proteins - A historical perspective. *Bone* 2020;140:115548.
 171. Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications. *Arch Biochem Biophys* 2014;561:64–73.
 172. Ali IHA, Brazil DP. Bone morphogenetic proteins and their antagonists: current and emerging clinical uses. *Br J Pharmacol* 2014;171:3620–32.
 173. Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev* 2005;19:2783–810.
 174. Zou ML, Chen ZH, Teng YY i sur. The Smad Dependent TGF- β and BMP Signaling Pathway in Bone Remodeling and Therapies. *Front Mol Biosci* 2021;8:593310.

POPIS SLIKA

Slika 1. Grafički prikaz Haversovog osteona građen od 5 koštanih lamela	26
Slika 2. Grafički prikaz osteoklasta u Howshipovoj lakuni.....	29
Slika 3. Grafički prikaz prostorne organizacije kristala hidroksiapatita i molekule kolagena tipa I	32
Slika 4. Mikrofotografija nezrelog koštanog tkiva	33
Slika 5. Mikrofotografija zrelog koštanog tkiva	34
Slika 6. Organizacija spužvastog koštanog tkiva	35
Slika 7. Organizacija kompaktnog koštanog tkiva na primjeru isječka trupa duge cjevaste kosti.....	35
Slika 8. Shematski prikaz osteona	36
Slika 9. Shematski prikaz intramembranske osifikacije kostiju lubanjskog krova	38
Slika 10. Endohondralna osifikacija duge cjevaste kosti.....	41
Slika 11. Shematski prikaz kaskade cijeljenja kosti kalusom	45
Slika 12. Kritično veliki defekt kalvarije štakora.....	52
Slika 13. LIPUS uređaj koji je korišten za stvaranje ultrazvučnih valova	54
Slika 14. Prikaz ograničavanja kretanja štakora tijekom primjene ultrazvuka	54
Slika 15. Reprezentativni primjeri 30. dan cijeljenja frontoparietookcipitalnog kompleksa kalvarije štakora, snimljenih mikro-CT uređajem iz kontrolne skupine (A), skupine autologne kosti (B) i LIPUS skupine (C).....	61
Slika 16. Promjene mikro-CT parametra BV/TV tijekom vremena u skupini tretiranom LIPUS-om, skupini autologne kosti i kontrolnoj skupini.....	62
Slika 17. Promjene mikro-CT parametra debljine koštanih gredica tijekom vremena u skupini tretiranom LIPUS-om, skupini autologne kosti i kontrolnoj skupini	62
Slika 18. Promjene mikro-CT parametra broja koštanih gredica tijekom vremena u skupini tretiranom LIPUS-om, skupini autologne kosti i kontrolnoj skupini	63
Slika 19. Reprezentativne mikrofotografije koronarnih presjeka defekata lubanjske kosti štakora za sve ispitivane skupine: LIPUS (a–c), autologna kost (d–f) i kontrola (g–i)	64
Slika 20. Promjene histomorfometrijskog parametra BV/TV tijekom vremena u skupini	

tretiranom LIPUS-om, skupini autologne kosti i kontrolnoj skupini	67
Slika 21. Imunohistokemijsko bojenje ciklooksigenaze-2 (COX-2) u koronarnim presjecima defekata kalvarije štakora za sve ispitivane skupine: LIPUS (a–c), autologna kost (d–f) i kontrolna skupina (g–i)	69
Slika 22. Imunohistokemijsko bojenje čimbenika tumorske nekroze alfa (TNF- α) u koronarnim presjecima defekata kalvarije štakora za sve ispitivane skupine: LIPUS (a–c), autologna kost (d–f) i kontrolna skupina (g–i)	70
Slika 23. Imunohistokemijsko bojenje osterixa (Osx) u koronarnim presjecima defekata kalvarije štakora za sve ispitivane skupine: LIPUS (a–c), autologna kost (d–f) i kontrolna skupina (g–i).....	71
Slika 24. Imunohistokemijsko bojenje BMP-2/4 u koronarnim presjecima defekata kalvarije štakora za sve ispitivane skupine: LIPUS (a–c), autologna kost (d–f) i kontrolna skupina (g–i).....	72
Slika 25. Imunohistokemijsko bojenje BMP-7 u koronarnim presjecima defekata kalvarije štakora za sve ispitivane skupine: LIPUS (a–c), autologna kost (d–f) i kontrolna skupina (g–i).....	73
Slika 26. Imunohistokemijsko bojenje SMAD-1/5/8 u koronarnim presjecima defekata kalvarije štakora za sve ispitivane skupine: LIPUS (a–c), autologna kost (d–f) i kontrolna skupina (g–i).....	74

POPIS TABLICA

Tablica 1. Raspored životinja po skupinama.....	50
Tablica 2. Mikro-CT rezultati parametra BV/TV (%).	59
Tablica 3. Histomorfometrijski rezultati parametra BV/TV (%).	66
Tablica 4. Rezultati intenziteta imunohistokemijskog izražaja.	68

POPIS POKRATA (abecedno)

°C – Celzijev stupanj

AK – autologna kost

ACS – apsorbirajuće kolagenske spužve (engl. *absorbing collagen sponges*)

ALP – alkalna fosfataza

ATP – adenzin trifosfat

BMP – koštani morfogenetski proteini (engl. *bone morphogenetic proteins*)

BV/TV - obujam kosti (engl. *bone volume*, BV/TV; %)

Ca²⁺ - kalcijev ion

CO₂ - ugljični dioksid

COX-2 – ciklooksigenaza-2

CSBD - koštani defekt kritične veličine (engl. *critical-size bone defect*)

dB – decibel

DC-STAMP – transmembranski protein specifičan za dendritične stanice (engl. *dendritic cell-specific transmembrane protein*)

Dlx5 – Distal-less homeobox 5

DMP1 – dentinski matriksni protein 1

FDA – Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

HE – hematoksilin-eosin

IL-1 i IL-6 – interleukin 1 i 6

I_{sata} – prostorno - vremenski prosjek intenziteta (engl. *spatial-average temporal-average intensity*)

I_{spta} – vršni vremenski-prosječni intenzitet (engl. *spatial-peak temporal-average intensity*)

kHz – kiloherc

LIPUS – pulsirajući ultrazvuk niskog intenziteta (engl. *low-intensity pulsed ultrasound*)

M-CSF – faktor koji stimulira kolonije makrofaga (engl. *macrophage colony-stimulating factor*)

MHz – megaherc

mikro-CT – mikro računalna tomografija (engl. *computed tomography*)

MITF – transkripcijski faktor povezan s mikrofalmijom (engl. *microphthalmia-associated transcription factor*)

MMP-9 – matriks metaloproteinaza-9

MPa – megapaskal

MSC - mezenhimalne matične stanice (engl. *mesenchymal stem cells*, MSC)

NFATc1 – nuklearni faktor aktiviranih T stanica 1 (engl. *nuclear factor of activated T cells 1*)

OPC – osteoprogenitorne stanice (engl. *osteoprogenitor cells*)

OPG – osteoprotegrin

Osx – osterix

PGE2 i E1 – prostaglandin E2 i I2

PTH – paratireoidni hormon

RANKL – receptor aktivator jezgrinog činitelja κB ligand (engl. *receptor activator of nuclear factor κB ligand*)

RGD - arginilglicilaspartinska kiselina

ROI – područje interesa (engl. *region of interest*)

Runx2 – runt-srodni transkripcijski čimbenik-2 (engl. *runt-related transcription factor 2*)

SAD – Sjedinjene Američke Države

SOX-9 – transkripcijski faktor SOX-9 (engl. *SRY-box transcription factor 9*)

Tb.N – broj koštanih gredica (engl. *trabecular number*)

Tb.Th – debljina koštanih gredica (engl. *trabecular thickness*)

TGF- $\beta 1$ – transformirajući činitelj rasta tip $\beta 1$ (engl. *transforming growth factor $\beta 1$*)

TNF- α – čimbenik tumorske nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*)

TRAP – tartrat-rezistentna kisela fosfataza

VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)

ŽIVOTOPIS

Darian Volarić

OSOBNJE INFORMACIJE

Kućna adresa : Goranska 28, 51000, Rijeka, Hrvatska **E-adresa:** darian.volaric7@gmail.com

Telefonski broj: (+385) 915558152

Spol: Muško **Datum rođenja:** 14/10/1990 **Državljanstvo:** hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

- [18/04/2024 – Trenutačno] **Specijalist fizikalne medicine i rehabilitacije**
Thalassotherapie Crikvenica - Specijalna bolnica za medicinsku rehabilitaciju
- [01/08/2019 – Trenutačno] **Sportski liječnik; voditelj medicinske službe**
Hrvatski nogometni klub Orijent 1919
- [01/09/2019 – 17/04/2024] **Specijalizant fizikalne medicine i rehabilitacije**
Thalassotherapie Crikvenica - Specijalna bolnica za medicinsku rehabilitaciju
- [01/10/2018 – 31/08/2019] **Bolnički liječnik**
Thalassotherapie Crikvenica - Specijalna bolnica za medicinsku rehabilitaciju
- [04/12/2017 – 30/09/2018] **Bolnički liječnik**
Klinika za internu medicinu, Klinički bolnički centar Rijeka
- [04/12/2017 – 30/09/2018] **Asistent na Katedri za Internu Medicinu**
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
- [15/06/2016 – 03/12/2017] **Obiteljski liječnik**
Dom zdravlja Primorsko-goranske županije
- [01/07/2015 – 01/10/2015] **First Aider**
Cro medic d.o.o.

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

- [01/01/2021 – Trenutačno] **Poslijediplomski doktorski studij - Doktorska škola iz znanstvenog područja Biomedicine**
Medicinski Fakultet Sveučilišta u Rijeci
- [2021 – 2022] **Poslijediplomski specijalistički studij Fizikalna medicina i rehabilitacija**
Medicinski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- [29/01/2021 – 30/01/2021] **Football Doctor Education Programme (FDEP) 2021.**
Union of European Football Associations (UEFA)
- [24/01/2020 – 25/01/2020] **Football Doctor Education Programme (FDEP) 2020.**
Union of European Football Associations (UEFA)
- [03/06/2016 – 05/06/2016] **Certifikat o osposobljenosti u naprednim tehnikama održavanja života (Advanced Life Support)**
Hrvatsko društvo za reanimatologiju Hrvatskog liječničkog zbora
- [02/11/2015 – 01/04/2016] **Doktor medicine - pripravnik**
Dom Zdravlja Primorsko-goranske županije
- [2009 – 2015] **Doktor medicine**
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
- [2005 – 2009] **Srednjoškolsko obrazovanje**
Gimnazija Andrije Mohorovičića Rijeka

JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: Hrvatski

Drugi jezici:

engleski

SLUŠANJE C2 ČITANJE C2 PISANJE C2

GOVORNA PRODUKCIJA C2 GOVORNA INTERAKCIJA C2

njemački

SLUŠANJE B1 ČITANJE B1 PISANJE B1

GOVORNA PRODUKCIJA B1 GOVORNA INTERAKCIJA B1

Stupnjevi: A1/2: Temeljni korisnik - B1/B2: Samostalni korisnik - C1/C2 Iskusni korisnik

ORGANIZACIJSKE VJEŠTINE

Tijekom studentskog obrazovanja bio sam član studentske udruge Fakultetski odbor svih studenata Medicinskog fakulteta u Rijeci - FOSS MedRi. Kao redovni član FOSS MedRi stekao sam bogato iskustvo u organizaciji projekata i upravljanja timom. Bio sam član organizacijskog odbora brojnih projekata: "Kapi života", "Humanitarnog bala Medicinara", "Dani zdravlja", "Zdrave planine", "Karnevalske grupe Medicinskog fakulteta", "Humanijada 2014." i Petog studentskog kongresa „Prehrana i klinička dijetoterapija“ s međunarodnim sudjelovanjem.

KOMUNIKACIJSKE I MEĐULJUDSKE VJEŠTINE

Dobre organizacijske i koordinacijske sposobnosti, inicijativnost, odgovornost i samostalnost u radu. Sve stečeno praktičnim iskustvom na različitim organizacijskim razinama i sudjelovanjem na međunarodnim i domaćim kongresima i seminarima.

POSLOVNE VJEŠTINE

Član Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci u akademskoj godini 2014./2015. kao predstavnik studenata medicine.

DEMONSTRATURE

Tijekom fakultetskog obrazovanja bio sam demonstrator na slijedećim katedrama: Katedra za biologiju i medicinsku genetiku tijekom akademskih godina 2013./2014. i 2014./2015., na Katedri za medicinsku informatiku u akademskoj 2014./2015. godini i na Katedri za medicinsku fiziku i biofiziku tijekom akademskih godina 2013./2014. i 2014./2015.

STRUČNE AKTIVNOSTI I PUBLIKACIJE

Znanstveni projekti

1. Istraživanje utjecaja pulsirajućeg ultrazvuka niskog intenziteta na cijeljenje kostiju, Sveučilište u Rijeci, UniRi-Iskusni-Prirod-23-53, 2024. - 2025., suradnik
2. Kontrola kvalitete ultrazvučnih snopova korištenjem termokromatskih materijala, Sveučilište u Rijeci, UniRi-Prirod-18-75, 2018. - 2024., suradnik
3. Reparacija i imunosni odgovor koštanog tkiva nakon primjene novog biomaterijala te imunosni odgovor mekog tkiva na Jason membranu u

štakoru, Sveučilište u Rijeci, UniRi-Biomed-18-280, 2019. - 2024., suradnik

4. Usporedba reparacijskog odgovora koštanog tkiva upotrebom dentina, ksenogenog biomaterijala i autologne kosti, Hrvatska zaklada za znanost, IP-2020-02-7875, 2021. - 2025., vanjski suradnik

Sudjelovanje na međunarodnim i domaćim skupovima:

1. **Darian Volarić**, Gordana Žauhar, Jie Chen, Ana Terezija Jerbić Radetić, Olga Cvijanović Pelosa. Stimulation Of Critical Size Bone Defect Repair After Application Of Low-Intensity Pulsed Ultrasound, poster prezentacija. Sixth International conference on ultrasonic-based applications Ultrasonics. Caparica, Portugal, 2023. - nagrada za izvrsnu poster prezentaciju.
2. Sonja Gažan, Krešimir Vido, **Darian Volarić**, Nino Zahirović, Adelmo Šegota, Viviana Avancini-Dobrović, Tes Schnurrer-Luke-Vrbanić. Atipični prijelom dijafize lijeve bedrene kosti u pacijentice na peroralnoj terapiji bisfosfonatima, usmena prezentacija. 9. kongres HDFRM s međunarodnim sudjelovanjem. Šibenik, Hrvatska, 2019.
3. Nino Zahirović, Sonja Gažan, Krešimir Vido, **Darian Volarić**, Adelmo Šegota, Viviana Avancini-Dobrović Viviana, Tea Schnurrer-Luke-Vrbanić. Sarkopenija i mononeuropatija peronealnog živca u bolesnika s teškim oblikom COVID-19 infekcije, usmena prezentacija. 9. kongres HDFRM s međunarodnim sudjelovanjem. Šibenik, Hrvatska, 2019.
4. Veljko Flego, **Darian Volarić**, Gordana Zamolo, Andrea Dekanić, Christophe Štemberger, Neva Giroto, Silvana Petretić Majnarić, Sunčana Divošević, Ljiljana Bulat-Kardum. Primitive neuroectodermal tumor of the lung in a 29-year-old woman. 49. stručno-znanstveni skup hrvatskih pulmologa s međunarodnim sudjelovanjem, poster prezentacija. Pula, Hrvatska, 2017.
5. Veljko Flego, **Darian Volarić**, Ljiljana Bulat-Kardum. Dijagnostički značaj tumorskih markera u pleuralnom izljevu i serumu u bolesnika s pleuralnim izljevom, usmena prezentacija. 47. stručno-znanstveni skup hrvatskih pulmologa s međunarodnim sudjelovanjem. Vodice, Hrvatska, 2015.

Publikacije:

1. **Darian Volarić**, Gordana Žauhar, Jie Chen, Ana Terezija Jerbić Radetić, Hrvoje Omrčen, Antonio Raič, Roko Pirović, Olga Cvijanović Pelosa. The Effect of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Bone Regeneration and the Expression of Osterix and Cyclooxygenase-2 during Critical-Size Bone Defect Repair. International Journal of Molecular Sciences. 2024; 25(7):3882. doi.org/10.3390/ijms25073882

2. Sergej Nadalin, Veljko Flego, Sanja Dević Pavlić, **Darian Volarić**, Anđelka Radojčić Badovinac, Miljenko Kapović, Smiljana Ristić. Association between the ACE-I/D Polymorphism and Nicotine Dependence amongst Patients with Lung Cancer. *Biomedical Reports*. 2020;13(6): 1– 1. doi:10.3892/br.2020.1365.
3. Veljko Flego, **Darian Volarić**, Koviljka Matušan Ilijaš, Ljiljana Bulat-Kardum. Medijastinalni glatko mišićni tumor nepoznatog malignog potencijala: prikaz slučaja i pregled literature. *Medicina Fluminensis*. 2019;55(1): 89-94. doi.org/10.21860/medflum2019_216315
4. **Darian Volarić**, Veljko Flego, Gordana Žauhar, Ljiljana Bulat-Kardum. Diagnostic Value of Tumour Markers in Pleural Effusions. *Biochemia Medica*. 2018;28(1):010706. doi:10.11613/ BM.2018.010706.
5. Veljko Flego, **Darian Volarić**, Gordana Zamolo, Andrea Dekanić, Christophe Štemberger, Neva Giroto, Silvana Petretić Majnarić, Sunčana Divošević, Ljiljana Bulat-Kardum. Primitive Neuroectodermal Tumor Of The Lung With Pleural Effusion - a case report. *Medica Jadertina*. 2018;48(3):161-168
6. Veljko Flego, Helmut Popper, **Darian Volarić**, Ljiljana Bulat-Kardum. Pulmonary Histiocytic Sarcoma: A Case Report and Literature Review. *American Journal of Internal Medicine*. Vol. 5, No. 5, 2017, pp. 91-94. doi: 10.11648/j.ajim.20170505.16
7. Veljko Flego, **Darian Volarić**. Multisystem Langerhans Cell Histiocytosis with Fatal Outcome in Adult Patient: A Case Report. *Clinical Medicine Research*. Vol. 6, No. 4, 2017, pp. 139-142. doi: 10.11648/j.cmr.20170604.15

ČLANSTVA

Hrvatska liječnička komora
Hrvatski liječnički zbor
Hrvatsko društvo za fizikalnu i rehabilitacijsku medicinu

VOZAČKA DOZVOLA

Kategorija B