SZKOŁA DOKTORSKA BioMedChem





Paulina Katarzyna Rusek-Wala

Praca doktorska:

Angiogenne i proregeneracyjne właściwości cholesterolu oraz osteogenne działanie biokompozytu modyfikowanego cholesterolem

Doctoral thesis:

Angiogenic and pro-regenerative properties of cholesterol and osteogenic effects of cholesterol-modified biocomposite

- Promotor/Supervisor
 dr hab. Agnieszka Krupa, prof. UŁ
 Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
 Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
 Uniwersytet Łódzki
- Promotor pomocniczy/Assistant Supervisor dr hab. Przemysław Płociński, prof. UŁ Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Łódzki

Spis treści

Źródł	o finansowania	5
Dorob	bek naukowy	6
Zgłos	zenia patentowe	8
Stresz	zczenie	9
Abstr	act	10
Wyka	z skrótów	11
1. W	stęp	17
1.1 (Charakterystyka stanu zapalnego śródbłonka naczyniowego	17
1.1.1	Reaktywne formy tlenu i inne czynniki w przebiegu stanu zapalnego śródbłonka	19
1.1.2	Zmiany w komórkach na poziomie transkryptomu i uruchamiane szlaki sygnałowe	20
1.2 R	egeneracja śródbłonka w odpowiedzi na uszkodzenie i stan zapalny	21
1.2.1	Rola VEGF w regeneracji śródbłonka naczyniowego	.21
1.2.2	Mechanizmy zachodzące w czasie regeneracji śródbłonka	25
1.2.2.	1 Apoptoza	26
1.2.2.	2 Migracja	26
1.2.2.	3 Proliferacja	28
1.2.2.	4 Angiogeneza	30
1.3 S	tan zapalny komórek kostnych i ich remodeling	33
1.4 K	Compozyty biologicznie aktywne do zastosowania w regeneracji	35
1.5 S	terole jako potencjalne czynniki mające wpływ na regenerację	38
2. Uz	zasadnienie podjęcia tematu	42
3. Hi	potezy badawcze	43
4. Ce	le pracy doktorskiej	44
5. Ma	ateriały i metody	45
5.1 M	lateriały	45
5.1.1	Materiały plastikowe, szklane i metalowe	45
5.1.2	Odczynniki	46
5.1.3	Linie komórkowe i zwierzęta	49
5.1.4	Kompozyty i wypełniacze	50
5.1.5	Sprzęty	50
5.1.6	Oprogramowanie	51
5.2 N	fetody	51
5.2.1	Hodowla linii komórkowych adherentnych HMEC-1, hFOB 1.19 i L929	51
5.2.2	Hodowla linii komórek nieadherentnych THP1-Blue™	52
5.2.3	Ocena aktywności metabolicznej komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 w obecności steroli	53
5.2.4	Ocena migracji komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 w teście gojenia się	52
575	Coore elementi reconterity trey 2 die VECE (VECED2) ne revierschei komérek	33
3.2.3	śródkienka nasymiewaca szławieka UMEC 1 w odrowiedzi na stymulacja staralomi	51
576	sroubionka naczyniowego człowieka Hwiec-i w odpowiedzi na stymułację steroiami	34
5.2.0	romai siężenia kolagenu i wydzielonego przez komorki srodołonka naczyniowego	55
5 7 7	Oceana stresu akaydaayinaga komérali érédhlarita nagyrijewara arlawista ID/IEC 1	55 55
5.2.1	Ocena stresu oksydacyjnego komorek srodolonka naczyniowego człowieka HMEC-1	55
3.2.8	wolzenia tworzenia tubul przez komorki srodołonka naczyniowego człowieka HMEC-1	54
520	w obechosci steroii iuo wiokien apatytowych (ang. <i>tube formation assay</i>)	30
5.2.9	sprouting assay)	57
	sprouing ussuy)	51

5.2.10	Izolacja RNA z komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 po stymulacji cholesterolem
5.2.11	Analiza transkryptomiczna przygotowanych bibliotek po izolacji RNA z komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 po stymulacji cholesterolem
5.2.12	Ocena ekspresji wybranych genów w komórkach śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 po stymulacji cholesterolem
5.2.13	Synteza hydroksyapatytowego wypełniacza w postaci wielofazowych włókien apatytowych i jego modyfikacja cholesterolem
5.2.14	Otrzymywanie kompozytów polilaktydowych z dodatkiem włókien apatytowych niemodyfikowanych lub modyfikowanych cholesterolem w procesie liofilizacji
5.2.15	Badanie cytobiozgodności kompozytów przy użyciu fibroblastów myszy L929 i osteoblastów człowieka hFOB 1.19
5.2.16	Ocena aktywacji szlaku sygnałowego zależnego od NF-κB w monocytach reporterowych człowieka THP1-Blue™ NF-κB eksponowanych na działanie badanych kompozytów 62
5.2.17	Ocena zasiedlania kompozytów przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 i osteoblasty człowieka hFOB 1.19
5.2.18	Ocena stężenia alkalicznej fosfatazy i interleukiny 6 wyprodukowanej przez osteoblasty człowieka hFOB 1.19 hodowane w obecności kompozytów
5.2.19	Badanie bezpieczeństwa <i>in vivo</i> kompozytu polilaktydowego z dodatkiem włokien apatytowych modyfikowanych cholesterolem
5.2.20	Badanie bioefektywności zarastania ubytków w kościach czaszki po implantacji kompozytów polilaktydowych z dodatkiem włókien apatytowych niemodyfikowanych lub modyfikowanych cholesterolem
5 2 21	Analiza historatologiczna kompozytów po implantaciach do szczurów (modele <i>in vivo</i>) 67
5.2.21	Ekspresja cząsteczek CD31 na komórkach zasiedlających kompozyty polilaktydowe
	z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych cholesterolem, wszczepione podskórnie szczurom
5.2.23	Ocena mineralizacji obszarów kostnych czaszek szczurów po implantacji kompozytów polilektydowych z dodatkiem włókien apatytowych niemodyfikowanych
	lub modyfikowanych cholesterolem
5.2.24	Analiza statystyczna
6. W	vniki
6.1	Badanie działania proregeneracyjnego wybranych steroli z wyłonieniem kandydata
(o najsilniejszym potencjale promującym
6.1.1	Cholesterol jako czynnik modulujący migrację i proliferację komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1
6.1.2	Cholesterol jako czynnik promujący tworzenie tubul przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1
6.1.3	Wpływ cholesterolu na zmiany w komórkach śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 zachodzące na poziomie transkrypcji genów
6.1.3.1	Odpowiedź komórek śródbłonka naczyniowego na cholesterol na poziomie transkryptomu w obecności czynnika zakaźnego
6.2 I	Przygotowanie i charakterystyka kompozytów polilaktydowych wykazujących potencjał
1	proregeneracyjny względem komórek śródbłonkowych i kostnych
6.2.1	Charakterystyka właściwości fizyko-chemicznych i biologicznych włókien apatytowych przeznaczonych do modyfikacji cholesterolem stanowiących wypełniacz kompozytów
	polilaktydowych
6.2.2	Charakterystyka fizyko-chemiczna i biologiczna kompozytów polilaktydowych z dodatkiem włókien apatytowych niemodyfikowanych i modyfikowanych cholesterolem. 91

6.2.	2.1 Badanie właściwości kompozytów polilaktydowych z dodatkiem włókien apatytowych				
	niemodyfikowanych i modyfikowanych cholesterolem do promowania zasiedlania				
	komórek kostnych i śródbłonkowych	97			
6.2.	2.2 Badanie biozgodności kompozytu polilaktydowego z dodatkiem włókien apatytowych				
	niemodyfikowanych i modyfikowanych cholesterolem na modelu in vivo	102			
6.3	6.3 Badanie bioefektywności kompozytu polilaktydowego z dodatkiem włókien apatytowych				
	niemodyfikowanych i modyfikowanych cholesterolem na modelu in vivo	104			
7.	Dyskusja	. 108			
8.	Podsumowanie wyników				
9.	Wnioski	. 123			
10.	Literatura	124			

Źródło finansowania



Projekt "Wielofunkcyjne kompozyty aktywne biologicznie do zastosowań w medycynie regeneracyjnej układu kostnego" (POIR.04.04.00-00-16D7/18) realizowany w ramach programu TEAM-NET Fundacji na rzecz Nauki Polskiej finansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

Dorobek naukowy

1. Helicobacter pylori Infection Acts Synergistically with a High-Fat Diet in the Development of a Proinflammatory and Potentially Proatherogenic Endothelial Cell Environment in an Experimental Model

Krupa A., Gonciarz W., <u>Rusek-Wala P.</u>, Rechciński T., Gajewski A., Samsel Z., Dziuba A., Śmiech A., Chmiela M.

International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(7), 3394 DOI: 10.3390/ijms22073394 $IF_{2021}/MNiSW = 6,208/140$

2. Composites Based on Hydroxyapatite and Whey Protein Isolate for Applications in Bone Regeneration

Słota D., Głąb M., Tyliszczak B., Douglas T., Rudnicka K., Miernik K., Urbaniak M. M., <u>Rusek-Wala P.</u>, Sobczak-Kupiec A.
Materials, 2021, 14, 2317
DOI: 10.3390/ma14092317
IF₂₀₂₁/MNiSW = 3,748/140

3. Effects of Sterilization and Hydrolytic Degradation on the Structure, Morphology and Compressive Strength of Polylactide-Hydroxyapatite Composites

Kasprzak, M., Szabłowska, A., Kurzyk, A., Tymowicz-Grzyb, P., Najmrodzki, A., Woźniak, A., Antosik, A., Pagacz, J., Szterner, P., Plichta, A., Wieciński, P., <u>Rusek-Wala, P.</u>, Krupa, A., Płociński, P., Rudnicka, K., Biernat, M. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(18), 10454 DOI: 10.3390/ijms231810454 IF₂₀₂₂/MNiSW = 5,6/140

4. Dual Modification of Porous Ca-P/PLA Composites with APTES and Alendronate Improves Their Mechanical Strength and Cytobiocompatibility towards Human Osteoblasts

Biernat M., Szwed-Georgiou A., Rudnicka K., Płociński P., Pagacz J., Tymowicz-Grzyb P., Woźniak A., Włodarczyk M., Urbaniak M. M., Krupa A., <u>Rusek-Wala P.</u>, Karska N., Rodziewicz-Motowidło S.

International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23, 14315 DOI: 10.3390/ijms232214315

 $IF_{2022}/MNiSW = 5,6/140$

5. Bioactive Materials for Bone Regeneration: Biomolecules and Delivery Systems Szwed-Georgiou A., Płociński P., Kupikowska-Stobba B., Urbaniak M. M., <u>Rusek-Wala P.</u>, Szustakiewicz K., Piszko P., Krupa A., Biernat M., Gazińska M., Kasprzak M., Nawrotek K., Mira N. P., Rudnicka K. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2023, 9, 5222–5254 DOI: 10.1021/acsbiomaterials.3c00609 IF₂₀₂₃/MNiSW = 5,8/140

Łączny IF oraz sumaryczna liczba punktów MNiSW:

26,956/700

Zgłoszenia patentowe

Zgłoszenie patentowe pt. "Porowate kompozyty polimerowo-ceramiczne modyfikowane cholesterolem do zastosowania do wypełnień i regeneracji tkanki kostnej oraz sposób otrzymywania porowatych kompozytów polimerowo-ceramicznych modyfikowanych cholesterolem" (zgłoszenie nr P.447908, z dnia 1.03.2024)

Streszczenie

Medycyna regeneracyjna jest obecnie jedną z najintensywniej rozwijających się gałęzi nauki, a wdrażane technologie pozwalają na proponowanie pacjentom coraz bardziej nowoczesnych rozwiązań terapeutycznych. Poszukuje się substancji aktywnych biologicznie, w celu wzbogacania nimi nowych kompozytów, a tym samym modulowania procesu regeneracji uszkodzonej tkanki kostnej i śródbłonkowej.

Badania składające się na niniejszą rozprawę doktorską skupiały się na określeniu roli cholesterolu w procesie regeneracji uszkodzonego śródbłonka i tkanki kostnej. Cholesterol posiada wielofunkcyjne właściwości biologiczne i pełni ważną rolę w kluczowych procesach fizjologicznych, a jego rola w regeneracji śródbłonka i angiogenezie wzbudza zainteresowanie badaczy w ostatnich latach.

Uzyskane w rozprawie doktorskiej wyniki badań dały podstawę, aby wyłonić cholesterol, spośród badanych w doświadczeniach *in vitro* steroli (cholesterolu, 7-ketocholesterolu i kalcytriolu) jako substancję biologicznie aktywną o największym potencjale promującym proces regeneracji śródbłonka naczyniowego, na który składają się migracja, proliferacja oraz angiogeneza, procesy zależne od receptora VEGFR2.

W oparciu o uzyskane wyniki zastosowano cholesterol jako substancję biologicznie aktywną do modyfikacji włókien apatytowych w kompozycie polilaktydowym (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%), w celu zwiększenia jego efektywności w procesach regeneracyjnych. W doświadczeniach wykonanych z użyciem modeli *in vitro* i *in vivo* potwierdzono cytobiozgodność badanego kompozytu oraz jego potencjał promujący zasiedlanie przez komórki kostne i formowanie się bogato unaczynionej tkanki łącznej. Bioefektywność biokompozytu 5PLA10WMCH(H₂O)0,15% potwierdzono w badaniu zarastania ubytków kości czaszki szczura, w którym wykazano nasilenie i przyspieszenie procesu regeneracji uszkodzonej tkanki kostnej w środowisku implantacji kompozytu, a także silne działanie inicjujące procesy mineralizacji i tworzenia się "nowej kości" w porównaniu do kompozytu referencyjnego (5PLA10W).

Podsumowując, przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej badania *in vitro* i *in vivo* wskazują, że cholesterol może pełnić rolę potencjalnego, biozgodnego stymulatora procesu angiogenezy i kościotworzenia, co czyni go obiecującym składnikiem do modyfikacji biokompozytów stosowanych w regeneracji tkanki kostnej.

9

Abstract

Regenerative medicine is one of the most intensively developing scientific fields, and the technologies implemented make modern therapeutic solutions available to patients. Biologically active substances are being sought to enrich new composites with them and thus modulate damaged bone and endothelial tissue regeneration.

The research presented in this thesis focused on determining the role of cholesterol in the regeneration of damaged endothelial and bone tissue. Cholesterol has multifunctional biological properties and is vital in key physiological processes. Its role in endothelial regeneration and angiogenesis has recently attracted researchers' interest.

In this study, cholesterol was selected from among the sterols tested in *in vitro* experiments (cholesterol, 7-ketocholesterol, and calcitriol) as the biologically active substance with the most significant potential to promote vascular endothelial regeneration, i.e., VEGFR2 receptor-dependent migration, proliferation, and angiogenesis.

Based on the results, cholesterol was used as a biologically active substance to modify apatite fibers in a polylactide composite (5PLA10WMCH(H2O)0.15%) to increase its efficiency in regenerative processes. In experiments performed with *in vitro* and *in vivo* models, the cytocompatibility of tested composite and its potential to promote colonization by bone cells and the formation of richly vascularized connective tissue was confirmed. The effectiveness of the 5PLA10WMCH(H2O)0,15% biocomposite was confirmed in a rat cranial bone defect overgrowth study, which showed enhanced regeneration of damaged bone tissue in the composite implantation environment, as well as a strong initiating effect on mineralization processes and the formation of new bone compared to the reference composite (5PLA10W).

In conclusion, this dissertation's *in vitro* and *in vivo* studies indicate that cholesterol can be a potential biocompatible stimulator of angiogenesis and bone formation, making it a promising ingredient for modifying composites in bone tissue regeneration.

Wykaz skrótów

4-HNE (4-hydroxynonenal) – 4-hydroksynonenal

7-KCh – 7-ketocholesterol

ABCG1 (ATP-binding cassette sub-family G member 1) – białko podrodziny G z kasetą wiążącą ATP

ADA2 (adenosine deaminase 2) – gen kodujący deaminazę adenozyny 2

ADAM9 (disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9) – gen kodujacy białko 9 zawierające domenę dezintegryny i metaloproteinazy

AGS (gastric adenocarcinoma epithelial cells) - komórki nabłonkowe raka żołądka

AIBP (apoA-I binding protein) - białko wiążące apoA-I

ALK1 (activin receptor type 1) – receptor aktywiny typu 1

ALP (alkaline phosphatase) – fosfataza alkaliczna

ANG2 (angiopoietin-2) – angiopoetyna 2

API5 (*apoptosis inhibitor 5*) – inhibitor apoptozy 5

apoM (apolipoprotin M) – apolipoprotieina M

ARP2/3 (actin-related proteins 2/3) – białka 2/3 związane z aktyną

ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) – białko związane z apoptozą zawierające CARD)

ATF3 (activating transcription factor 3) – czynnik transkrypcyjny 3

 β -TCP (*β*-tricalcium phosphate) – β-fosforan trójwapniowy

Bad (Bcl-2 associated agonist of cell death) – agonista śmierci komórkowej związany z Bcl-2)

Bax (Bcl-2 associated X, apoptosis regulator) - regulator apoptozy X związany z Bcl-2

Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) – białko 2 chłoniaka z komórek B

Bcl-XL (B-cell lymphoma-extra large) – białko XL chłoniaka z komórek B

BMP (bone morphogenetic protein) – białko morfogenetyczne kości

BSA (bovine serum albumin) - albumina surowicy wołowej

Cas9 (*caspase* 9) – kaspaza 9

CASP10 (caspase 10) – gen kodujący kaspazę 10

CD31 (cluster of differentiation 31) - klaster różnicowania 31

Cdc42 (cell division control protein 42 homolog) – homolog 42 białka kontroli podziału komórkowego

CDK2 (cyclin-dependent kinase 2) - kinaza 2 zależna od cykliny

CIB1 (calcium and integrin binding 1) – gen kodujacy białko 1 wiążące wapń i integrynę

CH - cholesterol

CML (chronic myeloid leukemia) - przewlekła białaczka szpikowa

CTD (C-terminal domain) - domena C-końcowa

CTGF (connective tissue growth factor) - czynnik wzrostu tkanki łącznej

CXCL (*C-X-C motif chemokine ligand* 10) – chemokinowe białko indukowane interferonem- γ o masie 10 kDa

DAG (diacylglycerol) - diacyloglicerol

DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) – wzorce molekularne związane z uszkodzeniem

DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) – 4', 6-diamidyno-2-fenyloindol

DLL4 (*delta-like ligand 4*) – ligand 4 delta-podobny

DMSO (dimethyl sulfoxide) - dimetylosulfotlenek

DNA (deoxyribonucleic acid) - kwas deoksyrybonukleinowy

DNAza (deoxyribonuclease) - deoksyrybonukleaza

ECM (extracellular matrix) – macierz zewnątrzkomórkowa

EGF (epidermal growth factor) – naskórkowy czynnik wzrostu

eNOS (nitric oxide syntase) - syntaza tlenku azotu

ERK-1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*) – zewnątrzkomórkowa kinaza regulowana sygnałem

EtOH - etanol

FAK (focal adhesion kinase) - kinaza ogniskowo-adhezyjna

FBS (fetal bovine serum) - surowica płodów cielęcych

FGF (fibroblast growth factor) - czynnik wzrostu fibroblastów

FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1) – gen kodujący receptor 1 czynnika wzrostu fibroblastów

FTIR (*Fourier-transform infrared spectroscopy*) – spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera

GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) – dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanu

GATA-2 (GATA-binding factor 2) – czynnik transkrypcyjny wiążący fragment GATA

 $H_2O-woda \\$

 $H_2O_2-nadtlenek \ wodoru$

HAEC (human aortic endothelial cells) - komórki śródbłonka aorty człowieka

HDL (high-density lipoprotein) - lipoproteina o wysokiej gęstości

hFOB 1.19 (human fetal osteoblastic cells) - osteoblasty człowieka

HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) – czynnik indukowany hipoksją 1

HMEC-1 (*dermal microvascular endothelial cells*) – komórki śródbłonka naczyniowego skóry człowieka

HMVEC-L (human lung microvascular endothelial cells) – komórki śródbłonka naczyniowego płuc człowieka

HP – *Helicobacter pylori*

HRP (horseradish peroxidase) - peroksydaza chrzanowa

HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) – komórki śródbłonka naczyniowego żyły płodowej

ICAM-1 (*intercellular cell adhesion molecule-1*) – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna 1 ICAM2 (*intercellular cell adhesion molecule 2*) – gen kodujacy międzykomórkową cząsteczkę adhezyjną 2

IGF (insulin-like growth factor) – insulinopodobny czynnik wzrostu

IL (interleukin) - interleukina

IP3 (inositol 1,4,5-trisphosphate) – 1,4,5-trifosforan inozytolu

K562 (myelogenous leukemia cell line) – linia komórkowa białaczki szpikowej

KCTD10 (potassium channel tetramerisation domain containing 10) - gen kodujący białko 10

zawierające domenę tetrameryzacji kanału potasowego

LDL (low-density lipoprotein) - lipoproteina o niskiej gęstości

LOX-1 (lectin-like oxLDL 1) - receptorów lektynopodobnych dla ox-LDL

LPS (lipopolysaccharide) – lipopolisacharyd

LXR (liver X receptors) – receptory X wątroby

LYRM1 (LYR motif containing 1) – gen kodujący białko 1 zawierające motyw LYR

M-CSF (macrophage colony stimulating factor) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów

MAPK (mitogen-activated protein kinase) - kinaza proteinowa aktywowana mitogenem

MAPKAPK2/3 (*MAP kinase-activated protein kinase 2*) – kinaza białkowa 2 aktywowana kinaza MAP

MARVELD1 (MARVEL domain containing 1) – gen kodujacy białko 1 zawierające domenę MARVEL

MCP1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) – białko chemotaktyczne monocytów MMP (*matrix metalloproteinase*) – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkkomórkowej MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) – bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy

NCK (*non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1*) – niekatalityczny region białka adaptorozwego 1 kinazy tyrozynowej

NF-κB (nuclear factor κB) – jądrowy czynnik transkrypcyjny κB

NLR (NOD-like receptors) - receptory NOD-podobne

NLRP3 (*NLR-family pyrin domain-containing protein 3*) – białko z rodziny NLR zawierające domenę pirynową 3

NM-M II (non-muscle myosin II) – niemięśniowa miozyna II

NO (*nitric oxide*) – tlenek azotu

Notch (*neurogenic locus notch homolog proteins*) – neurogenne białka homologiczne dla *locus* notch

OCN (osteocalcin) - osteokalcyna

OPD (o-phenylenediamine) - o-fenylodiamina

OPG (osteoprotegerin) - osteoprotegeryna

OPN (osteopontin) – osteopontyna

 $OsO_4-czterotlenek \ osmu$

ox-LDL (oxidized low-density lipoprotein) - utleniona lipoproteina o niskiej gęstości

p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1) – inhibitor kinaz zależnych od cyklin

p38 (p38 mitogen-activated protein kinases) – rodzina kinaz białkowych aktywowanych mitogenem 38

PA2G4 (proliferation-associated 2G4) – gen kodujący białko 2G4 związane z proliferacją PAFAH1B1 (platelet-activationg factor acetylhydrolase 1b) – gen kodujący czynnik aktywacji

płytek krwi, acetylohydrolaza 1b

PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*) – wzorce molekularne związane z patogenem

PBS (phosphate buffered saline) - sól fizjologiczna buforowana fosforanami

PDGF (platelet-derived growth factor) – płytkowy czynnik wzrostu

PEAK1 (*pseudopodium-enriched atypical kinase 1*) – atypowa kinaza wzbogacona w pseudopodium 1

PEAK1 (*pseudopodium-enriched atypical kinase 1*) – gen kodujący atypową kinazę
1 wzbogaconą w pseudopodium

PGA (polyglycolic acid) – kwas poliglikolowy

PI3K (phosphoinositide 3-kinase) – kinaza 3-fosfoinozytydu

PIGF (placenta growth factor) – łożyskowy czynnik wzrostu

PIP2 (phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate) – (4,5)-bifosforan fosfatydyloinozytolu

PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-tris-phosphate) – (3,4,5)-trifosforan fosfatydyloinozytolu

PKB (protein kinase B) – kinaza białkowa B; znana również jako AKT

PGE2 (*prostaglandin E2*) – prostaglandyna E2

PKC (protein kinase C) – kinaza białkowa C

PLA (*polylactic acid*) – kwas polilaktydowy (polilaktyd)

PLGA (poly(lactic-coglycolic acid) – kwas polilaktydo-koglikolidowy

PLC γ (phospholipase C- γ) – fosfolipaza C- γ

PLXND1 (plexin D1) – pleksyna D1

PLXND1 (plexin D1) – gen kodujący pleksynę D1

p-NPP (*para-nitrophenylphosphate*) – para-nitrofenylofosforan

pRB (retinoblastoma protein) – białko pochodzące z siatkówczaka

PRR (pattern recognition receptors) - receptory rozpoznające wzorce

qRT-PCR (*quantitative real-time polymerase chain reaction*) – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma) – szybkorosnący włókniakomięsak

RANK (*receptor activator of nuclear factor-kappa B*) – receptor aktywujący czynnik jądrowy kappa B

RANKL (*receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand*) – ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B

RNA (ribonucleic acid) - kwas rybonukleinowy

RNAza (ribonuclease) - rybonukleaza

ROS (reactive oxygen species) – reaktywne formy tlenu

RSF1 (remodeling and spacing factor 1) - czynnika przebudowy i odstępu 1

RSPO3 (R-spondin-3) - R-spondyna 3

Runx2 (Runt-related transcription factor 2) – czynnik transkrypcyjny 2 związany z Runt

S1P (sphingosine-1-phosphate) – sfingozyno-1-fosforan

SAPK2 (p38 MAPK inhibitor) – inhibitor p38

 $SAv-HRP\ (strept avidin-horse radish\ peroxidase)-strepawidyna-perok sydaza\ chrzanowa$

SEAP (secreted embryonic alkaline phosphatase) – wydzielona embrionalna fosfataza alkaliczna

SEM (scanning electron microscopy) – elektronowa mikroskopia skaningowa

SH2 (*Src homology domain-2*) – 2 domena homologiczna Src

SHB (*SH2 domain-containing adapter protein B*) – adaptorowe białko B zawierające domenę SH2

SR (*scavenger receptors*) – receptory zmiatacze

Src (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*) – protoonkogenowa kinaza tyrozynowa Src

TG-DTA (*thermogravimetric/differential thermal analysis*) – analiza termograwimetryczna/różnicowa analiza termiczna

TGF- β (*transforming growth factor* β) – transformujący czynnik wzrostu β

TGF β *1* (transforming growth factor β 1) – gen kodujący transformujący czynnik wzrostu β 1

TKD (tyrosine kinase domain) – domena kinazy tyrozynowej

TLR (Toll-like receptors) – receptory Toll-podobne

TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) – 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna

TNF- α (tumor necrosis factor α) – czynnik martwicy guza

TSAd (T-cell-specific adapter) – łącznik specyficzny dla komórek T

VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) – cząsteczka adhezyjna komórek naczyniowych 1

VEGF (vascular endothelial growth factor) - czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego

VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) – receptor dla czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego

XRD (X-ray diffraction) – dyfrakcja rentgenowska

1. Wstęp

Śródbłonek składa się z wyspecjalizowanych komórek o jednowarstwowej strukturze, co wyróżnia go pod względem histologicznym. Występuje m.in. w ścianach naczyń krwionośnych (żył i tętnic) oraz w jamie serca. Komórki śródbłonka w naczyniach krwionośnych ściśle przylegają do siebie tworząc połączenia typu *occludens* (zamykające, gdzie wewnętrzne błony komórek łączą się) oraz *neksus* (szczelinowe, wyposażone w kanały komunikacyjne jonowo-metaboliczne). Śródbłonek pełni kluczowe funkcje, takie jak transport substancji chemicznych między krwią i tkankami, utrzymanie prawidłowego przepływu krwi, produkcja biologicznie aktywnych substancji, np. czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF – *vascular endothelial growth factor*) oraz udział w angiogenezie, czyli tworzeniu nowych naczyń włosowatych (Cichocki i wsp. 2009, Sawicki i Malejczyk 2012).

Dysfunkcja śródbłonka to stan zachwiania równowagi pomiędzy wytwarzaniem czynników rozszerzających i zwężających naczynia, co może prowadzić do zaburzeń procesu krzepnięcia, zapalenia naczyń, a w konsekwencji do wystąpienia niewydolności naczyniowej (Incalza i wsp. 2018). Zakłócenie homeostazy śródbłonka naczyniowego jest często wynikiem stanu zapalnego indukowanego przez czynniki zewnątrzpochodne o charakterze mechanicznym bądź zakaźnym, a także wewnątrzpochodne, wydzielone do organizmu w odpowiedzi na bodźce egzo- lub endogenne. Wzbudzenie reakcji zapalnej prowadzi do aktywacji szeregu szlaków sygnałowych w komórkach, które skutkują syntezą różnych białek, np. cytokin zapalnych, a także śmiercią komórki (Sawicki i Malejczyk 2012). W odpowiedzi na działanie wydzielonych cytokin uruchamiane są również sygnały i mechanizmy komórkowe, które wspólnie prowadzą do regeneracji mającej na celu przywrócenie homeostazy i pełnej funkcjonalności bariery śródbłonka naczyniowego.

1.1. Charakterystyka stanu zapalnego śródbłonka naczyniowego

Rolą komórek śródbłonka jest nie tylko wyścielanie ścian naczyń, ale również pierwotna reakcja na pojawiające się czynniki prozapalne, takie jak czynniki bakteryjne i elementy pochodzące z uszkodzonych komórek. Komórki śródbłonka, podobnie jak komórki odpornościowe, wykazują ekspresję receptorów rozpoznających wzorce molekularne (PRR – *pattern recognition receptors*), których funkcją jest wiązanie wzorców molekularnych związanych z patogenem (PAMP – *pathogen-associated molecular patterns*) oraz wzorców molekularnych związanych z uszkodzeniem (DAMP – *damage-associated molecular patterns*) pojawiających się w środowisku reakcji zapalnej. W wyniku połączenia PRR z PAMP

albo DAMP dochodzi do indukcji szlaku sygnałowego związanego z receptorem, co prowadzi do aktywacji komórki. Aktywowane komórki śródbłonka wydzielają cytokiny zapalne i czynniki wzrostu, które są mediatorami w uruchamianiu procesów naprawczych komórek (Shao i wsp. 2020, Chipurupalli i wsp. 2021). Konsekwencją uszkodzenia struktury śródbłonka jest:

- rozwój stanu zapalnego,
- rozszczelnienie bariery śródbłonka, a tym samym wzmożona jego przepuszczalność,
- transmigracja komórek o charakterze zapalnym oraz erytrocytów,
- obrzęk tkanki.

Cytokiny zapalne wydzielane przez komórki śródbłonka w odpowiedzi na bodziec zapalny są indukowane działaniem wewnątrzkomórkowych inflamasomów, będących białkowymi kompleksami aktywacyjnymi w komórce zależnymi od PRR (Bai i wsp. 2020). Najważniejszym inflamasomem jest białko z rodziny NLR zawierające domenę pirynową 3 (NLRP3 – NLR-family pyrin domain-containing protein 3), który składa się z białka należącego do rodziny receptorów NOD-podobnych (NLR - NOD-like receptors), białka adaptorowego związanego z apoptozą zawierającego CARD (ASC – apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) i kaspazy 1, która stanowi enzym efektorowy (Bai i wsp. 2020, Scheiblich i wsp. 2021). Wśród PRR aktywujących NLRP3 znajdują się receptory Toll-podobne (TLR - Toll-like receptors), receptory zmiatacze (SR - scavenger receptors) i receptory lektynowe (Gołab i wsp. 2017). W wyniku rozpoznania PAMP lub DAMP przez receptory TLR wzbudzany jest szlak sygnałowy jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B (NF-κB - nuclear factor kappa – B), który prowadzi do wytwarzania białek składowych NLRP3 i jego aktywacji (Zhaolin i wsp. 2018, Scheiblich i wsp. 2021), a to skutkuje wydzielaniem prekursorów cytokin prozapalnych - interleukiny-1ß (IL-1ß) i interleukiny-18 (IL-18). Konsekwencją aktywacji inflamasomu NLRP3 jest indukcja śmierci komórki na drodze pyroptozy. W wyniku pyroptozy do organizmu przedostaje się zawartość komórek oraz dochodzi do wzmożenia stanu zapalnego (Erdei i wsp. 2018, Zhaolin i wsp. 2018, Bai i wsp. 2020, Huang i wsp. 2022). Taka kaskada zdarzeń jest typowa dla rozwoju chorób o podłożu sercowo-naczyniowym (Evans i wsp. 2021).

1.1.1. Reaktywne formy tlenu i inne czynniki w przebiegu stanu zapalnego śródbłonka

Dysfunkcja śródbłonka powodowana jest także przez stres oksydacyjny, który prowadzi do wytworzenia się reaktywnych form tlenu (ROS – reactive oxygen species). W przebiegu chorób o podłożu sercowo-naczyniowym stan patologiczny organizmu przyczynia się do wzbudzenia stresu oksydacyjnego prowadząc do apoptozy i uszkodzenia śródbłonka (Scioli i wsp. 2020, Huang i wsp. 2022). Czynniki takie jak otyłość, cukrzyca, zaburzenia metaboliczne, nadciśnienie tętnicze i palenie tytoniu sprawiają, że dochodzi do intensyfikacji produkcji ROS przez mitochondria. Fizjologicznie mitochondria odpowiadają nie tylko za metabolizm energetyczny, ale również za produkcję tlenku azotu (NO - nitric oxide) biodostępnego dla komórek śródbłonka, który pozwala utrzymać homeostazę naczyniowa poprzez hamowanie wytwarzania cytokin i chemokin, oksydacji frakcji LDL (low-density lipoprotein) cholesterolu, czy ekspresji cząsteczek adhezyjnych (VCAM-1 komórek naczyniowych _ vascular cell adhesion molecule 1i międzykomórkowych cząsteczek adhezyjnych (ICAM-1 – intercellular adhesion molecule 1) (Incalza 2017, Scioli i wsp. 2020). Konsekwencją zwiększonej ilości ROS w środowisku jest zachwiana równowaga pomiędzy ROS i NO. Spadek biodostępności NO wynika z jego degradacji przez anionorodnik ponadtlenkowy, a to skutkuje wystąpieniem dysfunkcji śródbłonka. Następnie dochodzi do zwiększonej produkcji i wydzielania cytokin prozapalnych, takich jak interleukina-6 (IL-6) czy czynnik martwicy guza a (TNF-a - tumor necrosis factor a), uszkodzenia mitochondrialnego kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA – *deoxyribonucleic acid*) czy aktywacji szlaku sygnałowego -NF-κB, co w dalszych etapach prowadzi do rozwoju stanu zapalnego i apoptozy komórek (Bai i wsp. 2020, Scioli i wsp. 2020). ROS prowadzą także do utleniania się frakcji LDL cholesterolu, a forma oksydowana LDL (ox-LDL - oxidized low-density lipoprotein) z dużym powinowactwem wiąże się z receptorami SR obecnymi na makrofagach indukując transformację tych komórek w komórki piankowate uczestniczące w formowaniu się blaszki miażdżycowej (Zhaolin i wsp. 2018). Działanie ox-LDL również powoduje powstawanie ROS, takich jak anionorodnik ponadtlenkowy (O₂^{-•}), nadtlenek wodoru (H₂O₂) czy rodnik hydroksylowy (OH[•]) (Huang i wsp. 2022). Ponadto, w przebiegu miażdżycy w komórkach śródbłonka dochodzi do zwiększenia ekspresji receptorów lektynopodobnych dla ox-LDL (LOX-1 - lectin-like oxLDL 1), które są receptorami typu SR. W ostatnim czasie wskazuje się, że w warunkach miażdżycy czy nadciśnienia tętniczego LOX-1 może być czynnikiem ryzyka rozwoju chorób o podłożu sercowo-naczyniowym (Lubrano i Balzan 2014, He i wsp. 2020, Shao i wsp. 2020).

Interakcja oxLDL/LOX-1 wzbudza aktywację czynnika NF-κB w komórkach śródbłonka, który odpowiada za zwiększoną ekspresję genów związanych z rozwojem reakcji zapalnej o podłożu immunologicznym (He i wsp. 2019, Sánchez-León i wsp. 2024). LOX-1 odpowiada także za formowanie się komórek piankowatych z monocytów. Jego zwiększona ekspresja występuje we wczesnych fazach miażdżycy (Sánchez-León i wsp. 2024) i ma negatywny wpływ na rozwój choroby prowadząc do apoptozy komórek, produkcji metaloproteinaz i dysfunkcji śródbłonka (He i wsp. 2020).

W odpowiedzi na uszkodzenie komórki śródbłonka wydzielają różne czynniki wpływające na przebieg stanu zapalnego i regenerację miejsca uszkodzenia. Komórki czynniki takie jak śródbłonka mogą wydzielać angiogenne, angiopoetyna 2 (ANG2-angiopoietin-2) czy R-spondyna 3 (RSPO3 - R-spondin-3), które zapewniają homeostazę wątroby. Komórki śródbłonka płuc, jak i inne komórki śródbłonka specyficzne dla tkanki, produkują VEGFA i czynnik wzrostu fibroblastów (FGF - fibroblast growth factor), które aktywują metaloproteinazę macierzy zawnątrzkomórkowej 14 (MMP14 - matrix metalloproteinase 14) i białko morfogenetyczne kości 4 (BMP4 – bone morpogenetic protein 4), które warunkuja wzrost biodostępności ligandów naskórkowego czynnika wzrostu (EGF-epidermal growth factor) prowadząc do regeneracji śródbłonka (Gomez-Salinero i Rafii 2018). Do czynników wydzielanych przez komórki śródbłonka w trakcie regeneracji należą również IL-1a, insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-1 – insulin-like growth factor), czynnik wzrostu tkanki łącznej (CTGF – connective tissue growth factor), łożyskowy czynnik wzrostu (PIGF - placenta growth factor) i BMP9 (Shao i wsp. 2020).

1.1.2. Zmiany w komórkach na poziomie transkryptomu i uruchamiane szlaki sygnałowe

W uszkodzonych komórkach śródbłonka dochodzi do wzmożonej ekspresji transkryptów związanych z przeżywalnością komórek śródbłonka czy ich proliferacją. Jednym z uruchamianych szlaków sygnałowych jest szlak związany z konserwatywnym aktywującym czynnikiem transkrypcyjnym 3 (ATF3 – *activating transcription factor 3*). ATF3 przejawia wysoką ekspresję w proliferujących komórkach śródbłonka. Mimo jego niezaprzeczalnego udziału w rozwoju miażdżycy i chorób nowotworowych jest on niezbędnym czynnikiem do prawidłowego procesu regeneracji – wykazano, że brak genu *atf3* u zwierząt doświadczalnych znacząco wpływa na spadek zdolności komórek śródbłonka do efektywnej proliferacji, a to skutkuje nieprawidłowym gojeniem się w miejscu uszkodzenia (McDonald i wsp. 2018, Evans i wsp. 2021). Kolejnym istotnym szlakiem sygnałowym uruchamianym

podczas regeneracji komórek śródbłonka jest szlak rodziny neurogennych białek homologicznych dla *locus* notch (NOTCH – *neurogenic locus notch homolog protein*). Prawidłowa ekspresja genów dla białek rodziny NOTCH (NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 i NOTCH4) pozwala na regulowanie przeżycia oraz proliferacji komórek śródbłonka (Shawber i Kitajewski 2007). Szlak sygnałowy NOTCH jest także związany z ekspresją receptorów VEGF. Szlak sygnałowy uruchamiany przez VEGF ma wpływ na proliferację, angiogenezę i procesy warunkujące regenerację komórek śródbłonka (Simons i wsp. 2016, Evans i wsp. 2021).

Oprócz komórek śródbłonka będących w pobliżu miejsca uszkodzenia, do procesu regeneracji mogą być rekrutowane krążące komórki progenitorowe śródbłonka, które następnie różnicują się do komórek śródbłonka. Doniesienia literaturowe wskazują, że krążące komórki progenitorowe mogą wykazywać ekspresję tych samych markerów powierzchniowych i mogą w warunkach *in vitro* wykazywać podobne właściwości do dojrzałych komórek śródbłonka. Jednak najbardziej prawdopodobne jest, że krążące komórki progenitorowe przyczyniają się do regeneracji śródbłonka poprzez wspomaganie całego procesu (Bautch 2011, Medina i wsp. 2017, Evans i wsp. 2021).

1.2. Regeneracja śródbłonka w odpowiedzi na uszkodzenie i stan zapalny

Odpowiedź komórek śródbłonka na uszkodzenie i rozwijający się stan zapalny jest złożona i wieloetapowa. Podczas uruchamiania procesu regeneracji komórek śródbłonka w miejscu uszkodzenia obserwowana jest zmiana polarności komórek o czym świadczy powiększona struktura aparatu Golgiego w komórkach oraz jego orientacja przestrzenna w komórce w kierunku uszkodzenia. Co ciekawe, orientacja aparatu Golgiego podczas uszkodzenia w naczyniu nie jest zależna od kierunku przepływu krwi. Kolejną ważną zmianą, która potwierdza wczesny proces regeneracji jest wydłużanie się komórek w celu przywrócenia połączeń międzykomórkowych, co pozwoliłoby na proliferację komórek w miejscu uszkodzenia i odnowienia ścisłej budowy śródbłonka, niezwykle istotnej dla jego prawidłowego funkcjonowania (McDonald i wsp. 2018, Evans i wsp. 2021).

1.2.1. Rola VEGF w regeneracji śródbłonka naczyniowego

VEGF obejmuje całą rodzinę białek regulujących angiogenezę i proces regeneracji. W grupie białek VEGF wyróżnić można VEGFA, PIGF, VEGFB, VEGFC oraz VEGFD. VEGFC i VEGFD są istotnymi czynnikami w procesie powstawania nowych naczyń limfatycznych (limfangiogenezie), natomiast VEGFA, VEGFB i PIGF

21

w waskulo- i angiogenezie (Haiko i wsp. 2007). Waskulogeneza to rozwój naczyń *de novo* w stadium zarodka, podczas którego dochodzi do różnicowania się komórek prekursorowych śródbłonka w komórki śródbłonka, co poprzedza formowanie się sieci naczyń. Natomiast angiogeneza jest procesem, podczas którego dochodzi do wzrostu komórek z istniejących już naczyń, remodelowania i dalszego formowania się sieci naczyń (Patan 2004, Wang i wsp. 2020a, Goncalves i wsp. 2021). Białka VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD i PIGF łączą się z receptorami dla VEGF (VEGFR – *vascular endothelial growth factor receptor*) – VEGFR1, VEGFR2 lub VEGFR3, przy czym VEGFR1 i VEGFR2 są niezbędne w regulowaniu angiogenezy i przepuszczalności naczyń, natomiast VEGFR3 bierze udział głównie w regulacji limfangiogenezy (Simons i wsp. 2016, Wang i wsp. 2020a).

VEGFA jest głównym czynnikiem odpowiadającym za proces angiogenezy. Może wiązać się z VEGFR1 i VEGFR2 regulując przez to migrację oraz proliferację komórek śródbłonka, przepuszczalność naczyń oraz sekrecję różnych substancji (Eichmann i Simons 2012, Shibuya 2013, Simons i wsp. 2016, Wang i wsp. 2020a). Receptory VEGF ulegają ekspresji głównie w komórkach śródbłonka i przejawiają pewne podobieństwo strukturalne i funkcjonalne do płytkowego czynnika wzrostu (PDGF – *platelet-derived growth factor*) (Shibuya 2012). Ekspresja VEGFR2 zachodzi w komórkach śródbłonka naczyniowego; dojrzały receptor ma postać transbłonowej glikoproteiny i jest odpowiedzialny głównie za transdukcję sygnału do angiogenezy poprzez następujące szlaki sygnałowe:

- PLCγ (*phospholipase C-γ* fosfolipaza C-γ)-PKC (*protein kinase C* kinaza białkowa C)-MAPK (*mitogen-activated protein kinase* kinaza proteinowa aktywowana mitogenem),
- PLCγ-PKC-eNOS (*nitric oxide syntase* syntaza tlenku azotu)-NO (*nitric oxide* tlenek azotu),
- TSAd (*T-cell-specific adapter* łącznik specyficzny dla komórek T)-Src (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src* – protoonkogenowa kinaza tyrozynowa Src)-PI3K (*phosphoinositide 3-kinase* – kinaza 3-fosfoinozytydu)-PKB/AKT (*protein kinase B* – kinaza białkowa B, znana również jako AKT),
- SHB (SH2 domain-containing adapter protein B adaptorowe białko B zawierające domenę SH2)-FAK (focal adhesion kinase – kinaza ogniskowo-adhezyjna)-paksylina,
- SHB-PI3K-PKB/AKT,

NCK (non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1 – niekatalityczny region białka adaptorowego 1 kinazy tyrozynowej)-p38 (p38 mitogen-activated protein kinases – rodzina kinaz białkowych aktywowanych mitogenem 38)-MAPKAPK2/3 (MAP kinase-activated protein kinase 2 – kinaza białkowa aktywowana kinazą MAP).

VEGF, poprzez wiązanie się z VEGFR2 i jego aktywację, promuje przeżycie, migrację i proliferację komórek śródbłonka oraz wpływa na wzrost przepuszczalności naczyń.

Wpływ VEGFR2 na przeżycie komórek śródbłonka opiera się głównie o aktywację szlaku sygnałowego TSAd-Src-PI3K-PKB/AKT. Dzięki tej interakcji oraz wynikającej z niej aktywacji PI3K, VEGFA może regulować przeżycie komórek ludzkiego śródbłonka żyły pępowinowej (Tsuji-Tamura and Ogawa 2018, Wang i wsp. 2020a). Następnie dochodzi do wytworzenia 3,4,5-trifosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP3 – *phosphatidylinositol 3,4,5-tris-phosphate*), cząsteczki sygnałowej rekrutującej inne cząsteczki sygnałowe w błonie komórkowej (Corti i Simons 2017), która doprowadza do fosforylacji i aktywacji PKB i aktywacji szlaku (Downward 2004, Karali i wsp. 2014, Tsuji-Tamura i Ogawa 2018). Konsekwencją aktywacji szlaku jest fosforylacja białek związanych z apoptozą, białka 2 chłoniaka z komórek B (Bcl-2 –*B cell lymphoma 2*) oraz kaspazy 9 (Cas9 – *caspase 9*), co ostatecznie prowadzi do zahamowania apoptozy i przeżycia komórek śródbłonka (Ryc. 1) (Lee i wsp. 2014, Simons i wsp. 2016).

Migracja, jeden z kluczowych mechanizmów niezbędnych do procesu regeneracji śródbłonka, również podlega wpływowi szlaku VEGF/VEGFR2 i aktywacji kolejnych szlaków sygnałowych. Udowodniono wpływ VEGFR2 na migrację komórek śródbłonka poprzez aktywację białek SHB, NCK i PI3K, które są mediatorami sygnału i wpływają na fosforylację domeny C-końcowej (CTD – *C-terminal domain*) u VEGFR2 (Wang i wsp. 2020a). W przypadku sygnału zależnego od białka SHB fosforylowany obszar CTD wiąże się z domeną SH2 (*Src homology domain-2*) białka SHB, co prowadzi do migracji komórek śródbłonka i aktywacji PI3K (Holmqvist i wsp. 2004). Z kolei fosforylacja VEGFR2 od strony domeny kinazy tyrozynowej (TKD – *tyrosine kinase domain*) sprawia, że możliwe jest wiązanie z kompleksem TSAd i Src, co odpowiada za regulację migracji komórek śródbłonka naczyniowego rozwijającego się nowotworu (Ryc. 1) (Wang i wsp. 2020a, Abdel Rahman i wsp. 2023). Natomiast szlak sygnałowy zależny od białka NCK, NCK/Src-p21 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1* – inhibitor kinaz zależnych od cyklin)/Cdc42 (*cell division control protein 42 homolog* – homolog 42 białka kontroli podziału komórkowego)-SAPK2 (*p38 MAPK inhibitor* – inhibitor p38)/p38-MAPK, jest związany z fosforylacją odpowiedniego miejsca CTD na VEGFR2 i bierze udział w regulacji przebudowywania aktyny (Wang i wsp. 2020a).

Proliferacja to kolejny etap na drodze efektywnej regeneracji śródbłonka, który również wymaga aktywacji VEGFR2. Sygnał wzbudzany na szlaku VEGF/VEGFR2 związany z proliferacją komórek śródbłonka jest przekazywany do jądra komórkowego ścieżką PLCy-PKC-Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma – szybkorosnący włókniakomięsak)-MEK (MAPK kinase – kinaza MAPK)-MAPK w celu aktywacji genów odpowiedzialnych za proces proliferacji (Karali i wsp. 2014). Sygnał rozpoczyna się od PLCy, z którą wiąże się VEGFR2, co doprowadza do jego aktywacji w wyniku fosforylacji w odpowiednim obszarze - CTD hydrolize na VEGFR2. Aktywacja kinazy PLCγ powoduje 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP2 - phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), z którego powstaje diacyloglicerol (DAG - diacylglycerol) oraz 1,4,5-trifosforan inozytolu (IP3 - inositol 1,4,5trisphosphate) (Karali i wsp. 2014, Wang i wsp. 2020a, Abdel Rahman i wsp. 2023). Dla dalszego przebiegu szlaku istotne jest, że DAG jest fizjologicznym aktywatorem PKC (Koivunen i wsp. 2006). W wyniku aktywacji PKC dochodzi do fosforylacji MAPK i kinazy regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym 1/2 (ERK-1/2 – extracellular signal-regulated kinase 1/2), czego konsekwencją jest uruchomienie całej kaskady sygnałowej PKC-Raf-MEK-ERK, która ostatecznie prowadzi do proliferacji komórek śródbłonka (Ryc. 1) (Eichmann i Simons 2012, Karali i wsp. 2014, Wang i wsp. 2020a).



Ryc. 1 Uproszczone szlaki sygnałowe VEGF/VEGFR2 warunkujące przeżycie, migrację i proliferację komórek śródbłonka. Bcl-2 (B-cell lymphoma 2 – białko 2 chłoniaka z komórek B), Cas9 (caspase 9 - kaspaza 9), DAG (diacylglycerol - diacyloglicerol), ERK (extracellular signal-regulated kinase – zewnątrzkomórkowa kinaza regulowana sygnałem), MAPK (mitogen-activated protein kinase - kinaza proteinowa aktywowana mitogenem), MEK (MAPK kinase – kinaza MAPK), PI3K (phosphoinositide 3-kinase – kinaza 3-fosfoinozytydu), PIP2 (phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate – (4,5)-bifosforan fosfatydyloinozytolu), PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-tris-phosphate – (3,4,5)-trifosforan fosfatydyloinozytolu), PKB/AKT (protein kinase B - kinaza białkowa B, znana również jako AKT), PKC (protein kinase C – kinaza białkowa C), PLCy (phospholipase $C-\gamma$ – fosfolipaza C- γ), Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma – szybkorosnacy włókniakomiesak), SHB (SH2 domain-containing adapter protein B – adaptorowe białko B zawierające domenę), Src (proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src - protoonkogenowa kinaza tyrozynowa Src), TSAd (T-cell-specific adapter - łącznik specyficzny dla komórek T), VEGF (vascular endothelial growth factor - czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego), VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor – receptor dla naczyniowego czynnika wzrostu).

1.2.2. Mechanizmy zachodzące w czasie regeneracji śródbłonka

Mechanizmy warunkujące regenerację śródbłonka są uruchamiane w odpowiedzi na wzbudzone szlaki sygnałowe i wydzielane mediatory prozapalne. W grupie tych mechanizmów wyróżnić możemy:

- apoptozę,
- migrację komórek,
- proliferację komórek,
- angiogenezę, w skład której wchodzi kiełkowanie komórek śródbłonka, tworzenie tubul i formowanie się komórek w kształt naczynia oraz tworzenie sieci naczyniowej podczas dojrzewania (Potente i Carmeliet 2017).

1.2.2.1. Apoptoza

Apoptoza jest zjawiskiem naturalnej śmierci komórek i ma na celu usunięcie uszkodzonych komórek powstałych w wyniku destruktywnego działania danego czynnika (Ghavami i wsp. 2014). Kaspazy apoptotyczne, wśród których znajdują się kaspazy inicjatorowe oraz kaspazy efektorowe, są białkami odpowiedzialnymi za regulację sygnału prowadzącego do apoptozy (Ola i wsp. 2011, Shalini i wsp. 2015). W przekazie sygnału apoptotycznego kaspazom towarzyszą konkretne białka apoptotyczne, które można podzielić na białka proapoptotyczne (np. Bad (*Bcl-2 associated agonist of cell death* – agonista śmierci komórkowej związany z Bcl-2), Bax (*Bcl-2 associated X apoptosis regulator* – regulator apoptozy X związany z Bcl-2)) i białka antyapoptotyczne (np. Bcl-2, Bcl-XL (*B-cell lymphoma-extra large* – białko XL chłoniaka z komórek B)) (Ola i wsp. 2011, Choi i wsp. 2016, Gross 2016).

W poprzednim podrozdziale rozprawy **1.2.1. Rola VEGF w regeneracji śródbłonka naczyniowego** opisany został wpływ białek związanych z apoptozą na przeżycie komórek śródbłonka. W wyniku działania szlaku sygnałowego TSAd-Src-PI3K-PKB/AKT dochodzi ostatecznie do aktywacji kompleksu białek Bcl-2/Cas9, co skutkuje zahamowaniem apoptozy komórek, a w konsekwencji ich przeżycie (Ryc. 1) (Lee i wsp. 2014, Simons i wsp. 2016). Obserwuje się również związek między aktywacją apoptozy, a wzbudzeniem proliferacji w procesie regeneracji komórek. Podczas eksperymentalnie indukowanej apoptozy zaobserwowano jednoczesne pobudzenie komórek do proliferacji, co zaowocowało rozpoczęciem procesu regeneracji. Kluczem kompensacyjnej proliferacji okazało się utrzymanie przy życiu komórek, które zaczęły ulegać apoptozie poprzez wzbudzenie ekspresji p35, który jest silnym inhibitorem kaspaz efektorowych (Bergmann i Steller 2010).

1.2.2.2. Migracja

Migracja jest jednym z podstawowych mechanizmów komórek, który prowadzi do zmiany pozycji komórki w obrębie tkanki. Przemieszczanie się komórek może dotyczyć:

- migracji pojedynczych komórek
- migracji wielu komórek z zachowanymi połączeniami komórka-komórka (migracja kolektywna).

Poruszające się grupy komórek różnią się pomiędzy sobą pod względem morfologicznym i organizacyjnym oraz zależnie od tego w jakim celu występuje migracja. Komórki mogą przemieszczać się jako wielokomórkowe zorganizowane pasma utrzymujące kontakt komórka-komórka bądź w sposób bardziej chaotyczny w przypadku rozwoju nowotworu (Khalil i Friedl 2010).

Ruch komórek śródbłonka zapewniany jest przez skoordynowaną pracę aktyny cytoszkieletu oraz kompleksów białkowych, które oddziałują na substraty komórek oraz na miejsca styku komórek. Aktyna może tworzyć włókna zorganizowane w sieci, które później ulegają polimeryzacji w wyniku działania białek 2/3 związanych z aktyną (ARP2/3 – actin-related proteins 2/3) i powstaje specyficzny rodzaj wypustek komórkowych, lamellipodia, a wpływ niemięśniowej miozyny II (NM-M II – non-muscle myosin II) prowadzi do wywierania skurczu przez włókna aktynowe (Vicente-Manzanares 2009, Rotty i wsp. 2013, Michaelis 2014). Komórki przylegają do macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM – extracellular matrix) w wyniku działania kompleksu integryn, czyli transbłonowych receptorów wiążących specyficzne białka ECM. Następnie kompleksy adhezyjne przenoszą siłę skurczową aktomiozyny na ECM i napędzają aktywny ruch – takie działanie określa się mianem modelu sprzęgła molekularnego (Michaelis 2014, Elosegui-Artola i wsp. 2018, Fonseca i wsp. 2020).

Podczas migracji związanej z angiogenezą komórki śródbłonka, spośród kilku trybów ruchu preferują tryb mezenchymalny, który związany jest właśnie z lamellipodiami (Yamada i Sixt 2019). Aby migracja była efektywna wymagany jest ciągły ruch; podczas poruszania się komórki śródbłonka reagują na wiele bodźców zewnętrznych:

- chemotaktycznych działanie rozpuszczalnych substancji aktywnych biologicznie,
- haptotaktycznych działanie ligandów ECM,
- mechanotaktycznych działanie sił mechanicznych,
- elektrotaktycznych działanie pola elektrycznego (Fonseca i wsp. 2020).

Migracja komórek śródbłonka, która ukierunkowana jest na jeden z działających bodźców, doprowadza do uruchomienia szlaków sygnałowych związanych z migracją oraz polaryzacji komórek, w wyniku której powstają przedni i tylny koniec komórki. Polaryzacja komórek wpływa na asymetryczne dostarczanie białek między przednim i tylnym

końcem komórki, co najprawdopodobniej wpływa na trwałość migracji. Hierarchiczna organizacja migracji komórek śródbłonka jest niezwykle istotna – w trakcie rozpoczęcia migracji komórek wyłaniają się populacje przywódcze komórek, które odbierają bodźce chemiczne, oraz mechaniczne, dające sygnał do migracji, a następnie przekazują sygnały reszcie komórek tzw. komórkom naśladowczym (Michaelis 2014, Mayor i Etienne-Manneville 2016, De Pascalis i Etienne-Manneville 2017, Fonseca i wsp. 2020).

Komórki śródbłonka są zaprogramowane tak, aby poruszać się w kierunku przeciwnym do kierunku przepływu krwi, a siła fizyczna przepływu krwi napędza migrację komórek. Tłumaczy się to zaangażowaniem w migrację ścieżki sygnałowej związanej z BMP. Zahamowanie składników sygnalizacyjnych receptora BMP takich jak receptor aktywiny typu 1 (Alk1 – *activin receptor type 1*) czy endoglina blokują migrację komórek śródbłonka kierowaną przez przepływ krwi. Okazuje się, że brak składników receptora BMP i zaburzenie migracji komórek śródbłonka prowadzi do powstawania malformacji tętniczo-żylnych (Trimm i Red-Horse 2023). Ponadto, sygnalizacja SMAD, wzbudzana przez oddziaływanie BMP i receptora 1A BMP pozwala na utworzenie pierwszych naczyń w zarodkach myszy i ryb (Neal i wsp. 2019).

W wyniku uszkodzenia komórek śródbłonka podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF – *basic fibroblast growth factor*) promuje migrację komórek do miejsca uszkodzenia. W wyniku stymulacji FGF komórki znajdujące się w pobliżu uszkodzenia śródbłonka przejmują funkcje przywódców w migracji do miejsca docelowego, podobnie jak komórki wierzchołkowe w formowaniu się nowych naczyń. W kolejnym etapie komórki przywódcze przekazują sygnał komórkom pączkującym odpowiedzialnym za formowanie nowych naczyń. W tej ukierunkowanej migracji uczestniczy VE-kadheryna. W przypadku braku sygnału stymulującego do ukierunkowanej migracji dochodzi do losowego przemieszczania się komórek i wypełniania przez nie miejsca uszkodzenia. Jest to skutek zahamowanej migracji wstecznej (Michaelis 2014).

1.2.2.3. Proliferacja

Proliferacja to zdolność komórek do dzielenia się. Podział oraz powstawanie nowych komórek w czasie odbywa się w cyklu komórkowym, w którym biorą udział enzymy i białka niezbędne do prawidłowego przebiegu poszczególnych faz cyklu komórkowego – fazę G1, S, G2 i M. Proliferacja komórek jest kontrolowana przez sygnały stymulujące do podziału (bądź hamujące) płynące z innych komórek. Komórki prawidłowe, znajdujące się w monowarstwie, w warunkach fizjologicznych przesyłają sobie nawzajem sygnał hamujący proliferację.

W przypadku powstania uszkodzenia, aby doszło do regeneracji, komórki znajdujące się w miejscu zdarzenia wysyłają sygnał do proliferacji, a komórki, które ten sygnał odbierają przechodzą w kolejne fazy cyklu komórkowego (Yang 2018).

Komórki, które się nie dzielą pozostają w fazie cyklu G0, a ich DNA występuje w formie niezduplikowanej. Po odebraniu sygnału komórki wchodzą w fazę G1 cyklu, która odpowiada za przygotowanie ich DNA do duplikacji w fazie S. Przejście z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego kontrolowane jest przez aktywność czynnika transkrypcyjnego E2F, co skutkuje aktywacją genów potrzebnych do syntezy DNA. Następuje hiperfosforylacja pRb (*retinoblastoma* – siatkówczak); białko to wchodzi w interakcję z E2F i dochodzi do wejścia komórek w fazę S cyklu komórkowego, W fazie S, w warunkach kontrolowanych dochodzi do powielenia materiału genetycznego, a komórka przechodzi do fazy G2 w wyniku związania się cykliny A z cyklinozależną kinazą 2 (CDK2 – *cyclin-dependent kinase 2*), co powoduje obniżenie aktywności E2F. W fazie G2 cyklu dochodzi do wiązania się cykliny B z CDK2. Kinaza CDK2 ulega aktywacji, co pozwala komórkom przygotować się do wejścia w ostatnią fazę cyklu komórkowego, czyli fazę M. W fazie mitozy dochodzi do podziału pojedynczej komórki na dwie i do rozdzielenia pomiędzy nie zduplikowanego materiału genetycznego w wyniku przejścia komórek przez poszczególne etapy podziału mitotycznego komórki (Joyce 2012, Yang 2018).

Migracja i proliferacja komórek śródbłonka muszą być w równowadze wobec siebie, aby dochodziło do efektywnej regeneracji śródbłonka pod wpływem rozpuszczalnych i fizycznych czynników mikrośrodowiska śródbłonka. W przypadku zachwiania równowagi pomiędzy migracją i proliferacją komórek śródbłonka w wyniku niezrównoważonego działania czynników mikrośrodowiskowych dochodzi do odrywania się komórek wierzchołkowych od komórek pączkujących zaburzając tworzenie struktury naczynia (Wang i wsp. 2020a).

Sąsiadujące komórki śródbłonka wokół komórek wierzchołkowych otrzymują sygnały za pośrednictwem NOTCH, VEGFR1 bądź PIGF, które promują podział i proliferację komórek. Nowopowstałe komórki tworzą niedojrzałe naczynia w odpowiedzi na działanie VE-kadheryny, CD34 (*cluster of differentiation*) czy VEGF podczas wydłużania formujących się komórek pączkujących (Li i wsp. 2024). Ponadto, kinazy Alk-1 i Alk-5 to receptory dla transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β – *transforming growth factor* β) o przeciwnym działaniu i zaangażowane w angiogenezę. Alk-1 występuje na powierzchni komórek śródbłonka i promuje proliferację oraz angiogenezę komórek na ścieżce sygnałowej Alk1/Smad1/5. Alk-5 promuje z kolei różnicowanie komórek śródbłonka poprzez obniżenie ekspresji VEGFR2 i zwiększenie ekspresji VEGFR1 (Jarad i wsp. 2017, Sweeney i Foldes 2018, Li i wsp. 2024).

1.2.2.4. Angiogeneza

Angiogeneza jest złożonym i kilkuetapowym procesem odgrywającym kluczową rolę w regeneracji śródbłonka. Polega ona na wytwarzaniu nowych naczyń z istniejących już struktur przy udziale komórek śródbłonka. Na etapy angiogenezy składają się:

- kiełkowanie komórek,
- tworzenie tubul i formowanie się komórek w kształt naczynia,
- tworzenie się sieci komórek.

Mechanizm formowania się nowych naczyń rozpoczyna się od kiełkowanie komórek pomiędzy komórkami i ich śródbłonka. Dochodzi do wielu interakcji wtedy mikrośrodowiskiem. Potrzeba zaspokojenia odpowiedniej ilości tlenu oraz substancji odżywczych w tkance powoduje wydzielanie cząsteczek proangiogennych, które działając na komórki śródbłonka przyczyniają się do wystawienia struktur komórkowych zwanych filopodiami. Takie komórki są komórkami wierzchołkowymi; to z nich wyłaniają się kiełkujące struktury i rozszerzają filopodia w kierunku sygnału do angiogenezy. Komórki wierzchołkowe znajdują się na szczycie całej struktury, za nimi znajdują się komórki pączkujące, które proliferują i wydłużają kiełkującą strukturę. Ostatecznie, komórki wierzchołkowe z dwóch kiełkujących sąsiadujących ze sobą struktur łączą się tworząc kształt obwodu naczynia (Ryc. 2) (Michaelis 2014, Vandekeere i wsp. 2015, Potente i Carmeliet 2016, Tsuji-Tamura i Ogawa 2018, Fonseca i wsp. 2020). Kiełkowanie komórek śródbłonka trwa ilości do momentu zaopatrzenia tkanki w odpowiednie tlenu i składników odżywczych - czynniki proangiogenne zostają wyciszone (Potente i Carmeliet 2016).

Kluczowym czynnikiem odpowiedzialnym za kiełkowanie komórek śródbłonka jest VEGF, który jest uwalniany przez niedotlenione tkanki i łączy się z VEGFR2 znajdującym się na komórkach śródbłonka. Aktywacja receptora powoduje uruchomienie kaskady sygnałowej prowadzącej do migracji, proliferacji i tworzenia się komórek wierzchołkowych. Komórki śródbłonka z wysokim sygnałem ze strony VEGFR2 stają się komórkami wierzchołkowymi i przekazują sygnał komórkom sąsiadującym do przystosowania się jako komórki pączkujące. Sygnał ten przekazywany jest przez deltapodobny ligand 4 (DLL4 – d*elta-like ligand 4*), który jest ligandem NOTCH, co prowadzi do aktywacji receptora NOTCH1 skutkując aktywacją komórek pączkujących. Efektem tego jest zahamowanie aktywności VEGFR2,

przy jednoczesnej aktywacji VEGFR1. Taka regulacja, zmniejszająca wrażliwość na VEGF, jest istotna do utrzymania stabilności wydłużającej się struktury kiełkującej złożonej z komórek pączkujących. Jednocześnie cały czas regulowany jest poziom aktywności receptorów VEGF, DLL4 i NOTCH1, gdy kolejne komórki śródbłonka przekazują sygnał kolejnym komórkom sąsiadującym. Konsekwencją takiej regulacji jest sytuacja, w której komórki pączkujące mogą przestać pełnić funkcję inhibitorów komórek wierzchołkowych i same przejąć rolę komórki prowadzącej, powodując dynamiczną zmianę pozycji w rozrastającej się strukturze (Eilken i Adams 2010, Blanco i Gerhardt 2013, Michaelis 2014, Vandekeere i wsp. 2015, Tsuji-Tamura i Ogawa 2018, Fonseca i wsp. 2020, Gonçalves i wsp. 2021). W wyniku oddziaływania sygnałów kiełkujące struktury tworzące kształty obwodu naczynia w końcu łączą się ze sobą formując złożoną sieć połączeń.

Tworzenie tubul to formowanie się struktur komórek śródbłonka w kształt naczynia. Komórki śródbłonka w wyniku działania stymulatora i uruchamiania szlaku sygnałowego łączą się ze sobą zagęszczając strukturę. Sygnałem to formowania tubul, oprócz tego pochodzącego z VEGF, może być również aktywacja szlaku czynnika indukowanego hipoksją (HIF-1 – *hypoxia-inducible factor 1*), co doprowadza do aktywacji ekspresji PDGF (Yadav i wsp. 2012, Herold i Kalucka 2021). Ekspresja galektyn w komórkach śródbłonka również może prowadzić do efektywnego sygnału do tworzenia się tubuli (Thijssen 2021).



1.3. Stan zapalny komórek kostnych i ich remodeling

Remodeling kości jest procesem, który odbywa się lokalnie oraz systemowo w sposób ciągły prowadząc do odnawiania się kośćca. Remodeling kości charakteryzuje się występowaniem dwóch okresowych zjawisk - resorpcji, trwającej 30-40 dni i formowania, trwającego około 150 dni (Eriksen 2010). Przebudowa kości rozpoczyna się od usunięcia błony kolagenowej, która wyściela kość i wypełnienia luki w kości świeżą warstwą macierzy kolagenowej. Odpowiedzialne są za to komórki wyściółki kości, które biorą udział w całym procesie remodelingu razem z osteoklastami, osteoblastami i osteocytami. Resorpcja, czyli rozkład tkanki kostnej zachodzi przy udziale osteoklastów. Komórki te są chemotaktycznie zwabiane do miejsca docelowego poprzez działanie m.in. TNF-a i prostaglandyny E2 (PGE2 – prostaglandin E2), które prowadzą do zwiekszenia ekspresji ligandu receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B (RANKL - receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand) wiażącego się z receptorem aktywującym czynnik jądrowy kappa B (RANK – receptor activator of nuclear factor-kappa B) na prekursorach osteoklastów, czego skutkiem jest ich dojrzewanie do osteoklastów. RANKL jest ligandem powiązanym z TNF-α, którego ekspresja zachodzi na błonie powierzchniowej osteoblastów, co pozwala na regulację ich funkcji, a więc syntezę kości. Osteocyty natomiast pochodzą od osteoblastów, osadzają się w zmineralizowanej kości i biorą udział w jej formowaniu (Epsley i wsp. 2021).

Osteoblasty są także odpowiedzialne za chemotaktyczne przyciąganie prekursorów osteoklastów poprzez wydzielanie czynnika stymulującego tworzenie się kolonii makrofagów (M-CSF – macrophage colony stimulating factor) i białka chemotaktycznego monocytów (MCP1 – monocyte chemoattractant protein 1) w odpowiedzi na działanie cytokin takich jak TNF- α czy IL-1 (Graves i wsp. 1999).

Innym białkiem regulującym przebieg kościotworzenia jest osteoprotegeryna (OPG – *osteoprotegerin*), które wiąże się z RANKL blokując jednocześnie możliwość jego wiązania się z RANK na prekursorach osteoklastów, czego konsekwencją jest zahamowanie dojrzewania osteoklastów. Ponadto, osteoklasty w czasie resorpcji uwalniają TGF-β, który jest chemoatraktantem dla osteoblastów i wzmacnia ich różnicowanie oraz proliferację. Prawidłowa proporcja między resorpcją, a formowaniem się kości jest warunkiem utrzymania homeostazy w procesie kościotworzenia (Loi i wsp. 2016, Epsley i wsp. 2021).

Stan zapalny tkanki kostnej może zostać wywołany przez wiele różnych czynników:

 działanie patogenów (zapalenie przyzębia, rozwój biofilmu bakteryjnego na wszczepionym implancie kostnym),

- choroby autoimmunologiczne (reumatoidalne zapalenie stawów),
- ubytki/uszkodzenia kości wywołane chorobami (osteoporoza),
- zaburzenia dopływu krwi do kości (osteonekroza),
- urazy mechaniczne/wypadki (złamanie kości) (Bastian i wsp. 2011, Thomas i Puleo 2011, Loi i wsp. 2016).

Uszkodzenie kości skutkuje dysfunkcją lokalnego układu naczyniowego (Ryc. 3). W wyniku aktywacji kaskady krzepnięcia i narażenia płytek krwi na działanie środowiska pozanaczyniowego powstaje krwiak. Wytwarzana jest sieć fibrynowa, która pełni rolę tymczasowej matrycy podczas gromadzenia się komórek o charakterze prozapalnym, które napływają w miejsce uszkodzenia w wyniku działania chemoatraktantów pod postacią PDGF, składowych komplementu czy czynników uwolnionych z martwych komórek (Loi i wsp. 2016). Kontrolowane uwalnianie sygnałów i czynników prozapalnych, takich jak TNF-α, IL-1 i IL-6 jest niezbędne do utrzymania optymalnego remodelingu kości (resorpcji, formowania, mineralizacji), natomiast zaburzenie tej homeostazy skutkuje zakłóceniem całego procesu remodelingu (Cavagis i wsp. 2014).

IL-6 jest kluczowym mediatorem regeneracji kości, a jej kontrolowane uwalnianie pozwala na promowanie angiogenezy, produkcję VEGF oraz różnicowanie się osteoklastów i osteoblastów. Obecność IL-6 jest wymagana na wczesnych stadiach gojenia się ubytku kości do prawidłowej mineralizacji kości oraz jej formowania (Bastian i wsp. 2011, Loi i wsp. 2016).

Oprócz wspomnianych wyżej czynników, innymi istotnymi mediatorami remodelingu kości w odpowiedzi na powstały stan zapalny są BMP, FGF czy VEGF. Dzięki ich działaniu krwiak, który powstał na skutek uszkodzenia kości i lokalnych naczyń może zostać zastąpiony tkanką bogatą w proliferujące komórki mezenchymalne i rozwijające się naczynia (Shindeler i wsp. 2008, Claes i wsp. 2012). Sugeruje się, że VEGF, biorąc udział w unaczynianiu tkanki kostnej przyczynia się również do regulacji wzrostu kości. VEGF, będąc mediatorem komórek śródbłonka, rekrutuje je do regenerowanego miejsca. Następnie w tych komórkach dochodzi do przełączenia genów, co umożliwia promowanie przebudowy kości. Same komórki śródbłonka mogą być także źródłem mitogenów dla osteoblastów (Pape i wsp. 2010).



Ryc. 3 Stan zapalny i regeneracja komórek śródbłonka i kostnych. Stan zapalny w śródbłonku rozwija się w wyniku uszkodzenia i dysfunkcji komórek, a w kości w wyniku uszkodzeń i ubytków. Zmiany zapalne są najczęściej konsekwencją chorób toczących się w organizmie, takich jak choroba niedokrwienna serca czy osteoporoza. Podczas regeneracji tkanki dochodzi do jej przebudowy pozwalającej osiągnąć stan homeostazy.

1.4. Kompozyty biologicznie aktywne do zastosowania w regeneracji

Technologia oraz metodyka stosowana w szeroko pojętej medycynie regeneracyjnej ma za zadanie doprowadzić do naprawy bądź wymiany tkanki czy organu, które zostały uszkodzone w wyniku działania chorób czy urazów. Ciągły rozwój tej gałęzi nauki prowadzi do odkrycia nowych metod leczenia przewlekłych czy nagłych przypadków, których skuteczność potwierdzana jest w badaniach przedklinicznych oraz klinicznych. W leczeniu regeneracyjnym zastosowanie znajdują polimerowe materiały, które mogą dodatkowo być opłaszczone substancją biologicznie aktywną, aby wzmocnić proces regeneracji w obrębie miejsca wszczepu i przywrócić prawidłowe funkcje oraz organizację uszkodzonej tkanki.

Różnego rodzaju polimerowe materiały do zastosowania regeneracyjnego mają za zadanie naśladować ECM w tkance i niejako kierować aktywnością komórek, aby odbudować uszkodzoną strukturę tkanki oraz przywrócić jej pełną funkcjonalność (Huebsch i Mooney 2009). Jednym z materiałów, które z powodzeniem stosuje się w regeneracji są polimerowe rusztowania – skafoldy, które są stosowane zarówno do wypełniania ubytków chrząstki, jak i w leczeniu owrzodzeń żylnych. Często do materiałów dołączane są czynniki wzrostu, które mają za zadanie wspomagać gojenie i regenerację uszkodzonej tkanki. Taki biomateriał jest w stanie zapewnić stały dostęp substancji aktywnej biologicznie w miejscu wszczepu (Mao i Mooney 2015).

Z powodzeniem wytwarza się i stosuje skafoldy składające się z materiałów pochodzenia naturalnego, np. komponentów ECM, alginianu z alg, kolagenu, bądź wywodzące

się z syntetycznych polimerów, jak kwas polikglikolowy (PGA – *polyglycolic acid*), PLA czy poli(laktydo-koglikolid) (PLGA – *poly(lactic-coglycolic acid*). Do wytwarzania skafoldów wykorzystuje się także hydrożele wodne, co pozwala na uzyskanie wysokiego podobieństwa takich struktur do tkanki (Mao i Mooney 2015). Różne materiały również łączy się ze sobą i osadza w odpowiedniej matrycy, aby uzyskać kompozyt. Taką matrycą może być materiał metalowy, ceramiczny bądź plastikowy. Matryca w kompozycie jest fazą ciągłą, natomiast faza nieciągła kompozytu to materiał wzmacniający. Taki kompozyt można jeszcze uzupełnić o dodatki lub wypełniacze. Ostatecznie kompozyt zawiera w sobie materiały, których funkcje mogą się uzupełniać, czyniąc jego działanie bardziej efektywnym (Hsissou i wsp. 2021).

Obecnie wiele substancji biologicznie aktywnych mających różne pochodzenie dołączanych jest do materiałów przeznaczonych do regeneracji uszkodzonej tkanki. W przypadku stosowania biomateriałów przeznaczonych do regeneracji ubytków kostnych zastosowanie znajdują m.in. białka macierzy zewnątrzkomórkowej kości, czynniki wzrostu, fitosterole czy oksysterole (Szwed-Georgiou i wsp. 2023). Działanie poszczególnych substancji biologicznie aktywnych przedstawiono w Tab. 1.

Tab. 1 Substancje aktywne biologicznie wykorzystywane przy tworzeniu biokompozytów przeznaczonych do regeneracji kostnej i ich działanie (na podstawie Szwed-Georgiou i wsp. 2023).

SUBSTANCJA	DZIAŁANIE	ŹRÓDŁA
AKTYWNA		LITERATUROWE
BIOLOGICZNIE		
Białka macierzy	Formowanie się kości	Roach 1994
zewnątrzkomórkowej kości:	Mineralizacja kości	Rammelt i wsp. 2005
• osteokalcyna (OCN –	Kalcyfikacja	Manolagas 2020
osteocalcin)		
• osteopontyna (OPN –		
osteopontin)		
Białka morfogenetyczne	Formowanie się kości	Reddi i Reddi 2009
kości (BMPs)	Przekazywanie sygnału	Zhou 2015
	chemotaktycznego dla	
	proliferacji i	
	różnicowania komórek	
----------------------------------	---	--------------------------
	progenitorowych kości	
	• Wzbudzanie aktywności	
	fosfatazy alkalicznej	
VEGF	• Regeneracja okolicznych	Ozturk i wsp. 2013
	naczyń	
	Sygnał do różnicowania	
	i proliferacji osteoblastów	
	• Stymulacja	
	do przekształcania się	
	tkanki chrzęstnej	
	do "naczyniowej tkanki	
	kostnej"	
	• Unaczynianie	
	zregenerowanego miejsca	
Fitosterole:	• Wzmocnienie przylegania	Parisuthiman i wsp. 2009
• Zawarte w ekstraktach	komórek do biomateriału	Soumya i wsp. 2012
z Cissus quadrangularis	i jego zasiedlania	Lee D.G. i wsp. 2014
Fukosterol pochodzący	• Stymulacja proliferacji	Suganya i wsp. 2014
z wodorostów	komórek	Hannan i wsp. 2020
 β-Ekdysteron 	 Mineralizacja kości 	Yan i wsp. 2022
pochodzący z Achyranthe	Wzrost aktywności	
bidentata	fosfatazy alkalicznej	
	Sygnał do wzmożonej	
	aktywność OPN	
	Zwiększanie gęstości	
	kości	
Oksysterole:	• Wpływ na różnicowanie	Aghaloo i wsp. 2007
• 20S-hydroksycholesterol	się komórek	Johnson i wsp. 2011
• 22S-hydroksycholesterol	osteogenicznych	Kwon i wsp. 2015
• Oxy4		Hokugo i wsp. 2016
• Oxy18		Cui i wsp. 2017

•	Oxy21	Wzrost aktywności	Lee S.J. i wsp. 2017
•	Oxy34	fosfatazy alkalicznej,	Cottrill i wsp. 2020
•	Oxy49	OCN, OPN	
		• Formowanie się kości	
		• Zwiększanie gęstości	
		kości	

1.5. Sterole jako potencjalne czynniki mające wpływ na regenerację

Obecnie wiele badań dotyczących medycyny regeneracyjnej skupia się na poszukiwaniu substancji o potencjale regeneracyjnym, aby wyłonić te najskuteczniejsze do efektywnego zastosowania u pacjentów. Badania nad regeneracją kości od kilku lat skupiają się między innymi na możliwości wykorzystania oksysteroli (Tab. 1). Oksysterole (zwane także hydroksycholesterolami) są cząsteczkami pochodzącymi od cholesterolu, które powstały w wyniku jego oksydacji i są obecne w organizmie ludzkim (Lee i wsp. 2017, Cottrill i wsp. 2020). O ich potencjalnym osteoindukcyjnym działaniu zaczęto mówić już około 20 lat temu (Kha i wsp. 2004). W kolejnych latach różne zespoły kontynuowały badania nad osteoindukcyjnymi właściwościami oksysteroli, wyróżniając najpierw takie cząsteczki jak 20(S)-hydroksycholesterol, 22(R)-hydroksycholesterol 22(S)-hydroksycholesterol czy (Aghaloo i wsp. 2007, Kim i wsp. 2007), później rozszerzając grupę analizowanych cząsteczek o Oxy34 i Oxy49 (Johnson i wsp. 2011), aż do stanu obecnego, gdzie poznano i opisano kolejne oksysterole i ich właściwości (Oxy4, Oxy18, Oxy21, Oxy133 czy 72-hydroksycholesterol) (Lee i wsp. 2017, Li i wsp. 2017, Cottrill i wsp. 2020, de Freitas i wsp. 2021, Szwed-Georgiou i wsp. 2023). Cząsteczki te, oprócz działania osteoindukcyjnego, wykazują również aktywność w procesie modulacji gojenia się uszkodzonego fragmentu kości poprzez wpływ na zwiększony potencjał osteogenny komórek (Johnson i wsp. 2011, Lee i wsp. 2017, Cottrill i wsp. 2020). Odbywa się to m.in. w wyniku zwiększonej ekspresji genów i białek biorących udział w osteogenezie, takich jak czynnik transkrypcyjny 2 związany z Runt (Runx2-Runt related transcription factor 2) czy OCN, a także zwiększonej aktywacji ścieżki sygnałowej Hedgehog, która jest niezbędna do prawidłowego rozwoju kości (Cottrill i wsp. 2020, Szwed-Georgiou i wsp. 2023).

Jednocześnie, niektóre badania potwierdzają destruktywny wpływ oksydowanych form cholesterolu na komórki śródbłonka, ale też na fibroblasty czy komórki nerwowe. Oksysterole są zaangażowane w regulację procesów o podłożu immunologicznym, agregację płytek krwi czy proliferację i apoptozę komórek. W badaniach wskazuje się, że oksysterole mogą przejawiać działanie cytotoksyczne na wymienione wcześniej grupy komórek (de Freitas i wsp. 2021). Wskazuje się, że oksysterole mogą również być zaangażowane w rozwój nowotworów, jak i wykazywać działanie przeciwnowotworowe (Centonze i wsp. 2022). Wpływ oksydowanej frakcji LDL cholesterolu został opisany we wcześniejszym podrozdziale. OxLDL może przyczyniać się do obniżenia ekspresji receptora dla VEGF2 na powierzchni komórek śródbłonka, niezbędnego komponentu dla prawidłowej angiogenezy, a także może wpływać na zwiększoną apoptozę oraz obniżenie żywotności komórek (Zhang and Jiang 2016). W ostatnich latach pojawiały się badania sugerujące, że podstawowa forma wspomnianych wcześniej substancji, cholesterol, może mieć wpływ na procesy regeneracji i remodelowania komórek (Lyu i wsp. 2019, Samson i wsp. 2020). Cholesterol jest związkiem tłuszczowym, stale obecnym w organizmie człowieka – pozyskiwany jest wraz z pożywieniem oraz syntetyzowany de novo. Jest niezbędny do prawidłowego zorganizowania i funkcjonowania błon komórkowych poprzez transdukcję sygnałów wewnątrzkomórkowych oraz do wspierania procesu mielinizacji, czyli otaczania aksonów tłuszczową osłoną zapewniającą ich izolację i regenerację. Ponadto, cholesterol jest również znanym prekursorem hormonów płciowych, witaminy D i kwasów żółciowych (Ryc. 4) (Klaassen i Aleksunes 2010, Zhang i wsp. 2019, Luo i wsp. 2020, Xu i wsp. 2020, Shabanzadeh i wsp. 2021, Centonze i wsp. 2022). Cholesterol jest również komponentem w szlaku sygnałowym Hedgehog, który odpowiada za utrzymanie prawidłowej biosyntezy białek tego szlaku oraz bierze udział w regulacji odbioru i transdukcji sygnału. Z kolei białka szlaku sygnałowego Hedgehog kontrolują wzrost, przeżywalność, różnicowanie, migrację i proliferację różnych komórek, w tym również komórek śródbłonka (Riobo 2012).



Ryc. 4 Schemat przedstawiający funkcje cholesterolu. Cholesterol jako prekursor syntezy witaminy D, hormonów steroidowych i kwasów żółciowych; substancja odpowiedzialna za prawidłowe funkcjonowanie i organizację błon komórkowych; substancja niezbędna do mielinizacji aksonów. Jego oksydowane formy mogą przyczyniać się do rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, ale również mogą brać udział w procesach regeneracji kości.

Cholesterol ma swój udział w angiogenezie - lipoproteina o wysokiej gestości (HDL-high density lipoprotein) wykazuje zarówno działanie pro- jak i antyangiogenne. Aktywny biologicznie lipid, sfingozyno-1-fosforan (S1P - sphingosine-1-phosphate), wiąże apolipoprotieine M (apoM – apolipoprotin M), która jest obecna w cząsteczce HDL i wykazuje aktywność w angiogenezie i integralności naczyń. W wyniku tego wiązania dochodzi do aktywacji szlaku sygnałowego PI3K/Akt/eNOS i aktywacji eNOS. eNOS jest kluczowym enzymem dla produkcji tlenku azotu przez komórki śródbłonka, a zahamowanie jego działania wpływa negatywnie na angiogenezę. Aktywacja eNOS przekłada się na wzrost ekspresji VEGF w naczyniach i progres angiogenezy (Zhu, Gu i Fang 2019). Ponadto, cholesterol jest istotnym składnikiem tratw lipidowych, bogatych w białka transportowe ABC, znajdujących się w błonach komórek (Centonze i wsp. 2022). Zmniejszona ilość cholesterolu w tratwach lipidowych zakłóca sygnalizację komórkowa związana z przeżyciem, adhezją, migracją i proliferacją komórek. Wypływ cholesterolu z komórek śródbłonka, który jest kluczowy dla prawidłowej angiogenezy, odbywa się poprzez działanie białko wiażące apoA-I (AIBP – apoA-I binding protein). AIBP wiąże się z HDL poprzez białko podrodziny G z kasetą wiążącą ATP (ABCG1 - ATP-binding cassette sub-family G member 1), które jest białkiem transportowym, co ułatwia odpływ cholesterolu z komórek do HDL. Nadekspresja AIPB

prowadzi do skurczenia się zasobów cholesterolu w komórkach śródbłonka i zmniejszenie ilości tratw lipidowych w błonie komórkowej, co z kolei zakłóca dimeryzację VEGFR2 znajdującego się na komórkach śródbłonka i hamuje sygnał do angiogenezy (Lyu i wsp. 2019, Vona i wsp. 2021). Receptory X watroby (LXR - liver X receptors) odpowiedzialne są za regulację poziomu cholesterolu w komórkach śródbłonka poprzez zmniejszanie wchłaniania cholesterolu i hamowanie jego biosyntezy (Vona i wsp. 2021). Obniżenie poziomu cholesterolu za pomocą agonistów LXR wpływa na zahamowanie proliferacji, migracji i tubulogenezy komórek śródbłonka, a także na blokowanie neoangiogenezy. Ponadto, obniżenie poziomu cholesterolu w wyniku działania agonistów LXR wpływa na zmniejszoną kompartmentację VEGFR2 w tratwach lipidowych, co skutkuje zahamowaniem sygnału do angiogenezy pochodzącego od tego receptora w komórkach śródbłonka (Lyu i wsp. 2019). W badaniach in vivo na modelu embrionu kurzego i udziału cholesterolu w angiogenezie wskazuje się, że może mieć on wpływ na rozwój nowych naczyń, zależnie od zastosowanej dawki lub od czasu hodowli. W pierwszym dniu po podaniu cholesterolu wykazano gwałtowny rozwój naczyń w embrionie, natomiast w dniu czwartym obserwowano spowolnienie tego procesu. Sugeruje to istotna role cholesterolu we wczesnym etapie angiogenezy (Samson i wsp. 2020).

2. Uzasadnienie podjęcia tematu

Medycynie regeneracyjnej, jako dynamicznie rozwijającej się dziedzinie nauki, nieustannie towarzyszy poszukiwanie nowych substancji i materiałów wspierających skuteczną regenerację uszkodzeń komórkowych. Efektywne procesy regeneracyjne są kluczowe dla przywracania funkcji śródbłonka, zwłaszcza w kontekście zmian miażdżycowych oraz odbudowy kości w przypadku ubytków kostnych. Statystyki epidemiologiczne podkreślają wagę tych problemów – choroby sercowo-naczyniowe odpowiadają za około 30% globalnych zgonów, a zaburzenia związane z ubytkami kostnymi dotykają aż 30% kobiet i 20% mężczyzn na świecie.

Pochodne cholesterolu, takie jak oksysterole, są już wykorzystywane w medycynie regeneracyjnej, chociaż z różnym skutkiem. Jednak wiedza na temat cholesterolu w regeneracji uszkodzonej tkanki jest niewystarczająca. W związku z powyższym celem pracy było przeprowadzenie badań eksperymentalnych na modelach *in vitro* i *in vivo* dostarczających nowej wiedzy na temat roli cholesterolu w procesie regeneracji śródbłonka naczyniowego i tkanki kostnej. Można oczekiwać, iż wiedza ta przyczyni się do rozwoju nowych strategii terapeutycznych.

3. Hipotezy badawcze:

H1: Sterole wykazują potencjał proregeneracyjny wobec komórek śródbłonka naczyniowego.

H2: Kompozyt polilaktydowy z dodatkiem włókien apatytowych jest odpowiedni do skutecznej modyfikacji wybranym sterolem spośród cholesterolu, 7-ketocholesterolu i kalcytriolu i wykazuje właściwości wspomagające proces regeneracji *in vitro*.

H3: Kompozyt polilaktydowy z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych wybranym sterolem spośród cholesterolu, 7-ketocholesterolu i kalcytriolu wspiera regenerację komórek kostnych i śródbłonkowych *in vivo*.

4. Cele pracy doktorskiej

- Wyselekcjonowanie substancji biologicznie aktywnej o charakterze sterolu spośród cholesterolu, 7-ketocholesterolu i kalcytriolu, wykazującej największy potencjał promujący proces regeneracji naczyniowej.
- Charakterystyka fizyko-chemiczna i biologiczna kompozytu polilaktydowego z dodatkiem włókien apatytowych jako potencjalnego nośnika do dalszych modyfikacji wyselekcjonowanym sterolem.
- Modyfikacja kompozytu polilaktydowego z dodatkiem włókien apatytowych wyselekcjonowanym sterolem w celu zwiększenia jego efektywności w procesach regeneracyjnych.
- 4. Ocena bezpieczeństwa stosowania kompozytu polilaktydowego z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych wyselekcjonowanym sterolem.
- 5. Ocena efektywności działania kompozytu polilaktydowego z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych wyselekcjonowanym sterolem.

5. Materiały i metody

5.1 Materialy

5.1.1 Materiały plastikowe, szklane i metalowe

- butelki hodowlane 25 i 75 cm³ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- butelki szklane (Chemland, Stargard, Polska)
- butelki szklane Pyrex® (INTER-CHEM POZNAŃ Sp. z o.o., Poznań, Polska)
- igły do strzykawek (KDM®, Berlin, Niemcy)
- końcówki do pipet automatycznych (Capp, AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, Niemcy)
- nożyczki chirurgiczne (Weldon Instruments, Raipur, Sialkot, Punjab, Pakistan)
- nici chirurgiczne (Atramat, Lerma, Meksyk)
- pipety typu Pasteura (F.L. Medical, Torreglia PD, Włochy)
- pipety serologiczne 5, 10, 25, 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy)
- plastikowe szalki Petriego (Falcon®, Corning INC., Corning, NY, Stany Zjednoczone)
- płytki plastikowe hodowlane, płaskodenne, przezroczyste (Greiner, Kremsmünster, Austria)
- płytki plastikowe hodowlane, płaskodenne, czarne (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- płytki szklane hodowlane, płaskodenne, czarne (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- płytki niehodowlane, płaskodenne, przezroczyste (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- probówki apirogenne, wolne od doeksyrybonukleaz (DNAz) i rybonukleaz (RNAz) typu Falcon 15 i 50 ml (Greiner, Kremsmünster, Austria)
- probówki niehodowlane 4 i 11 ml (Medlab Products, Raszyn, Polska)
- probówki typu eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- skalpele (Swann Morton, Sheffield, Wielka Brytania)
- strzykawki (KDM®, Berlin, Niemcy)
- szkiełka nakrywkowe (Pathosolutions, ELEKTRO MED, Zabierzów Bocheński, Polska)

 szkiełka podstawowe (Pathosolutions, ELEKTRO MED, Zabierzów Bocheński, Polska)

5.1.2 Odczynniki

- 1,4-dioksan (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Polska)
- 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna (TMB 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- 4',6-diamidyno-2-fenyloindol (DAPI) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone)
- 7-ketocholesterol (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, Stany Zjednoczone)
- Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Stany Zjednoczone)
- aldehyd glutarowy (Polysciences Inc., Warrington, PA, Stany Zjednoczone)
- blastocydyna (Invivogen, San Diego, CA, Stany Zjednoczone)
- błękit kalceiny (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone)
- błękit trypanu (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone)
- bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy (MTT 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone)
- bufor cytrynianowo-fosforanowy 0,1 M
- bufor kakodylowy (Polysciences Inc., Warrington, PA, Stany Zjednoczone)
- bufor węglanowy 0,05 M
- β-fosforan trójwapniowy (β-TCP β-tricalcium phosphate) (Fluka Chemie GmbH Buchs, Szwajcaria)
- cholesterol w proszku rozpuszczalny w wodzie, odpowiedni do hodowli komórkowej (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- cholesterol wysoko oczyszczony rozpuszczalny w etanolu (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- CyQuant® Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- czterotlenek osmu OsO4 (Polysciences Inc., Warrington, PA, Stany Zjednoczone)

- czynnik wzrostu fibroblastów (FGF) uzyskany z systemu rekombinacyjnego Escherichia coli BL21STAR
- dimetylosulfotlenek (DMSO *dimethyl sulfoxide*) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone)
- DNAza (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska)
- drugorzędowe przeciwciała kurze skierowane przeciwko króliczej IgG (H+L) skoniugowane z AFTM 488 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- drugorzedowe przeciwciała poliklonalne królicze skierowane przeciwko kolagenowi I skoniugowane z peroksydazą chrzanową (HRP – *horseradish peroxidase* (Bioss, Woburn, MA, Stany Zjednoczone)
- etanol (EtOH) (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Polska)
- Falloidyna Texas Red (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- formalina (Chempur, Piekary Śląskie, Polska)
- GeltrexTM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- genetycyna (Invivogen, San Diego, CA, Stany Zjednoczone)
- Human IL-6 ELISA Set BD OptEIA[™] (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, Stany Zjednoczone)
- hydrokortyzon (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone)
- izofluoran (Virbac, Carros, Francja)
- kalcytriol (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, Stany Zjednoczone)
- KAPA Hyper Prep Kit (KAPA BIOSYSTEMS, Roche, Bazylea, Szwajcaria)
- klej do preparatów tkankowych Shandon Consul-MountTM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- kolagen I (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone)
- ksylen (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Polska)
- kwas cytrynowy 0,5 M (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone)
- kwas siarkowy 2 M (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone)
- kwas polilaktydowy (PLA) RESOMER® LR 706 S (Evonik, Essen, Niemcy)
- L-glutamina (Biowest, Nuaillé, Francja)
- LPS *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone)

- LPS Helicobacter pylori CCUG 17874
- Morbital® (Biowet Puławy, Puławy, Polska)
- naczyniowy czynnik wzrostu (VEGF) uzyskany z systemu rekombinacyjnego Escherichia coli BL21STAR
- nadtlenek wodoru (H₂O₂ hydrogen peroxide) (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Polska)
- naskórkowy czynnik wzrostu (EGF) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone)
- normocyna (Invivogen, San Diego, CA, Stany Zjednoczone)
- o-fenylodiamina (OPD *o-phenylenediamine*) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone)
- oligonukleotydy dla GAPDH (G_RT_For i G_RT_Rev) (Genomed®, Warszawa, Polska)
- oligonukleotydy dla PEAK1 (P1_RT_For i P1_RT_Rev) (Genomed®, Warszawa, Polska)
- oligonukleotydy dla PLXND1 (PL_RT_For i PL_RT_Rev) (Genomed®, Warszawa, Polska)
- oligonukleotydy dla TNFRSF10B (T_RT_For i T_RT_Rev) (Genomed®, Warszawa, Polska)
- oranż ksylenolowy (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone)
- para-nitrofenulofosforan (p-NPP para-nitrophenylphosphate) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- PCR-cDNA Barcoding Kit (SQK-PCB109, Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Wielka Brytania)
- podłoże bazowe do komórek hFOB 1.19 DMEM/F12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- podłoże bazowe do komórek HMEC-1 MCDB-131 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- podłoże bazowe do komórek L929 i THP-Blue™ RPMI-1640 z 25 mM HEPES (Biowest, Nuaillé, Francja)
- PowerUp[™] SYBR[™] Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)

- przeciwciała skierowane przeciwko 4-hydroksynonenalowi (anty-4-HNE – 4-hydroxynonenal) AFTM 488 (Bioss, Woburn, MA, Stany Zjednoczone)
- przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko klastrowi różnicowania 31 (anty-CD31) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- przeciwciała skierowane przeciwko kolagenowi I (Bioss, Woburn, MA, Stany Zjednoczone)
- przeciwciała skierowane przeciwko receptorowi 2 VEGF (anty-VEGFR2) AFTM488 (R&D Systems, Minneapolis, MN, Stany Zjednoczone)
- Quanti-BlueTM (Invivogen, San Diego, CA, Stany Zjednoczone)
- SAv-HRP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- sól fizjologiczna buforowana fosforanami (PBS phosphate buffered saline) (Biowes, Nuaillé, Francja)
- SuperScript[™] III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- surowicza albumina bydlęca (BSA bovine serum albumin) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone)
- surowica płodów cielęcych (FBS *fetal bovine serum*) inaktywowana termicznie (PAN-Biotech, Aidenbach, Niemcy)
- Total RNA Zol-Out[™] D kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone)
- TRIzol LS Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- trypsyna (Biowest, Nuaillé, Francja)
- Tween 80 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone)
- węglan sodu 0,1 M (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone)
- wodorotlenek sodu 2 M (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone)
- zestaw antybiotyków do podłóż hodowlanych penicylina/streptomycyna (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone)

5.1.3 Linie komórkowe i zwierzęta

komórki fibroblastów myszy L929 CCl-1™ (ATCC, Manassas, VA, Stany Zjednoczone)

- komórki śródbłonka naczyniowego skóry człowieka HMEC-1 (human microvascular endothelial cells) CRL-3243™ (ATCC Manassas, VA, Stany Zjednoczone)
- osteoblasty człowieka hFOB (*human fetal osteoblastic cell line*) 1.19 CRL-11372™ (ATCC Manassas, VA, Stany Zjednoczone)
- monocyty reporterowe człowieka THP1-BlueTM NF-κB (Invivogen, San Diego, CA, Stany Zjednoczone)
- aorty szczura wędrownego *Rattus norvegicus* rasy Wistar (dorosłe samce)
- szczur wędrowny *Rattus norvegicus* rasy Wistar (dorosłe samice i samce, Zwierzętarnia Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska)

5.1.4 Kompozyty i wypełniacze

- kwas polilaktydowy (PLA)
- włókna apatytowe (W)
- kompozyt 5PLA10W
- biokompozyt 5PLA10WMCH(EtOH)0,15%
- biokompozyt 5PLA10WMCH(H₂O)0,15%

5.1.5 Sprzęty

- czytnik absorbancji (Multiscan®EX, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- czytnik fluorescencji (SpectraMax, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- liofilizator BETA 1-16 (Christ, Osterode am Harz, Niemcy)
- mikroskop elektronowy (PHENOM PRO X SEM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone)
- mikroskop fluorescencyjny (Zeiss, Axio Scope, A1, Jena, Germany)
- mikroskop konfokalny (Leica SP-8, Leica Microsystems, Frankfurt, Germany)
- mikroskop kontrastowo-fazowy z odwróconym polem widzenia (Motic AE 2000, Hong Kong, Chiny)
- MinION MK1B z kuwetą przepływową R9 (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Wielka Brytania)

- pipetor automatyczny (Capp, AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, Niemcy)
- pipety automatyczne (Capp, AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, Niemcy)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen, Hilden, Niemcy)
- suszarka laboratoryjna SML 32/250 (Zalmed, Skierniewice, Polska)
- suszarka próżniowa (Binder GmbH Tuttlingen, Niemcy)
- urządzenie do stereotaksji i podawania izofluoranu (SomnoSuite® System, Animalab, Poznań, Polska)
- wirówka MPW-350R (MPW Med. Instruments, Warszawa, Polska)
- wirówka MPW-352R (MPW Med. Instruments, Warszawa, Polska)

5.1.6 Oprogramowanie

- Agilent 2100 BioAnalyzer
- ClustVist
- CorelDRAW Home&Student X8
- Graphpad Prism 5
- LAS AF Leica
- MinKNOW
- Minimap2 (v.2.17-r941)
- Motic Image Plus 3.0
- MultiBamCov skrypt z Bedtools package (v.2.27.1)
- Rotor-Gene® Q series
- Statistica 13
- Zen 2012 Ziess

5.2 Metody

5.2.1 Hodowla linii komórkowych adherentnych HMEC-1, hFOB 1.19 i L929

Komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1, tak jak i osteoblasty człowieka hFOB 1.19 i fibroblasty myszy L929, rozmrażano w kąpieli wodnej, a następnie zawiesinę komórek każdej z linii dodawano kroplami do 10 ml suplementowanego podłoża hodowlanego (HMEC-1 – podłoże MCDB-131 z 10% FBS, 10 mM L-glutaminy, 1 µg/ml hydrokortyzonem, 10 ng/ml EGF, 100 U/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny; hFOB 1.19 – podłoże DMEM/F12 z 10% FBS i 0.3 mg/mL genetycyny; L929 – podłoże RPMI-1640 z 10% FBS, 100 U/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny) i odwirowywano przez 10 min

przy 1200 rpm w temperaturze pokojowej. Następnie, osad komórek zawieszano w 1 ml odpowiedniego suplementowanego podłoża hodowlanego, przenoszono do butelki hodowlanej o powierzchni 25 cm³ zawierającej 5 ml odpowiedniego suplementowanego podłoża hodowlanego i inkubowano przez 2-4 dni w 34°C (hFOB 1.19) bądź 37°C (HMEC-1, L929) przy 5% CO2, 95% wilgotności). Po uzyskaniu 90-100% konfluencji, którą oceniano przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego z odwróconym polem widzenia, komórki pasażowano. W tym celu z butelki hodowlanej usuwano podłoże hodowlane, przepłukiwano monowarstwę komórek PBS, a następnie dodawano 1 ml trypsyny i inkubowano 3 min w warunkach inkubatora (odpowiednich dla linii komórkowej). W celu inaktywacji trypsyny do zawiesiny komórek w trypsynie dodawano 10 ml podłoża RPMI-1640 z 5% FBS. Następnie komórki odwirowywano przez 10 min przy 1200 rpm w temperaturze pokojowej. Osad komórek zawieszano w 1 ml odpowiedniego suplementowanego podłoża hodowlanego, przenoszono do nowych butelek hodowlanych o powierzchni 25 cm³ (stosowany stosunek przesiewania zależy od tempa wzrostu komórek i wynosi 1:2 dla komórek śródbłonka naczyniowego HMEC-1 i osteoblastów hFOB 1,19 oraz 1:5 dla fibroblastów myszy L929. Przy każdym pasażu oceniano żywotność komórek i liczono ich gestość przy użyciu komory Bürkera i błękitu trypanu, który barwi martwe komórki.

5.2.2 Hodowla linii komórek nieadherentnych THP1-Blue™ NF-кВ

Monocyty człowieka THP1-Blue[™] rozmrażano w taki sam sposób, jak komórki adherentne, przy użyciu suplementowanego podłoża hodowlanego (podłoże RPMI-1640 suplementowane 10% FBS, 2 mM L-glutaminy, 25 mM HEPES, 100 U/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny). Hodowla komórek odbywa się w warunkach inkubatora (37°C, 5% CO2, 95% wilgotności). W ramach pasażowania zawiesinę komórek w podłożu hodowlanym przenoszono do probówki wirowniczej i odwirowywano przez 10 min przy 1400 rpm w temperaturze pokojowej. Następnie, osad komórek zawieszano w 1 ml odpowiedniego suplementowanego podłoża hodowlanego, a jedynie część zawiesiny komórek przenoszono do butelek hodowlanych o powierzchni 25 cm³, zawierających 10 ml odpowiedniego suplementowanego podłoża hodowlanego i inkubowano w warunkach inkubatora przez 3-4 dni. Po dwóch pasażach zmieniano podłoże hodowlane na podłoże suplementowane dodatkowo zawierające czynniki selekcyjne stosowane do utrzymania wstawki reporterowej w komórkach (podłoże RPMI-1640 suplementowane 10% FBS, 2 mM L-glutaminy, 25 mM HEPES, 100 U/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny, 10 µg/ml blastocydyny i 100 µg/ml normocyny). Przy każdym pasażu oceniano żywotność komórek i liczono ich gęstość przy użyciu komory Bürkera i błękitu trypanu, który barwi martwe komórki.

5.2.3 Ocena aktywności metabolicznej komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 w obecności steroli

Ocena aktywności metabolicznej komórek opiera się na badaniu zdolności żywych komórek do redukcji soli MTT do rozpuszczalnych kryształów formazanu. Komórki śródbłonka naczyniowego HMEC-1 o gęstości 1×10^5 komórek/ml w objętości 100 µl suplementowanego podłoża hodowlanego MCDB-131 nanoszono na płytki hodowlane 96-studzienkowe, a następnie inkubowano przez 24 godz. w 37°C, 5% CO2, 95% wilgotności. Następnie, po uzyskaniu 100% konfluencji komórek, wymieniano suplementowane podłoże hodowlane MCDB-131 na świeże i dodawano stymulatory:

- 10 µM cholesterolu (CH),
- 10 µM 7-ketocholesterolu (7-KCh),
- 10 µM kalcytriolu.

Kontrolę komórek wykazujących 100% aktywności metabolicznej stanowiły komórki niestymulowane, podczas gdy kontrolę komórek uszkodzonych stanowiły komórki inkubowane w podłożu zawierającym 1% H₂O₂. Komórki inkubowano przez 24 godz. w warunkach inkubatora, a następnie do studzienek dodawano 20 µl MTT w stężeniu 5 mg/ml i inkubowano przez 4 godz. Po tym czasie, płytki z komórkami odwirowywano przez 10 min przy 1200 rpm w temperaturze pokojowej, usuwano supernatant, a do studzienek dodawano 20 µl DMSO w celu rozpuszczenia kryształów formazanu. Absorbancję mierzono przy długości fali 570 nm. Doświadczenia wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

5.2.4 Ocena migracji komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 w teście gojenia się rany (ang. *wound healing assay*) w odpowiedzi na stymulację sterolami

Komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 o gęstości 1 x 10⁶ komórek/ml w objętości 500 µl suplementowanego podłoża hodowlanego MCDB-131 nanoszono na płytki hodowlane 12-studzienkowe i inkubowano przez 24 godz. w warunkach inkubatora. Następnie, po uzyskaniu 100% konfluencji komórek wymieniano podłoże na PBS i wykonywano pionową rysę w monowarstwie komórek. Następnie PBS usuwano, a do studzienek nanoszono 500 µl świeżego suplementowanego podłoża hodowlanego MCDB-131 z dodatkiem 2% FBS i umieszczano stymulatory:

- 10 µM CH,
- 10 µM 7-KCh,
- 10 µM kalcytriolu.

Jako kontrolę układu stosowano komórki niestymulowane oraz komórki stymulowane 20 ng/ml VEGF. Komórki inkubowano przez 24 godz. w warunkach inkubatora, a następnie obserwowano migrację komórek (zarastanie rysy) przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego z odwróconym polem widzenia. Zdjęcia uszkodzenia monowarstwy komórek wykonywano w czasie 0 oraz po 24 godz. inkubacji w powiększeniu 10x i analizowano przy użyciu oprogramowania Motic Image Plus 3.0. Doświadczenia wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

5.2.5 Ocena ekspresji receptorów typu 2 dla VEGF (VEGFR2) na powierzchni komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 w odpowiedzi na stymulację sterolami

Komórki śródbłonka naczyniowego HMEC-1 o gęstości 1×10^5 komórek/ml w objętości 100 µl suplementowanego podłoża hodowlanego MCDB-131 nanoszono do studzienek czarnych płytek hodowlanych 96-studzienkowych i inkubowano przez 24 godz. w warunkach inkubatora. Następnie, wymieniano suplementowane podłoże hodowlane MCDB-131 na świeże i dodawano stymulatory:

- 10 µM CH,
- 10 µM 7-KCh,
- 10 µM kalcytriolu.

Jako kontrolę układu używano komórek niestymulowanych. Komórki inkubowano przez 24 godz. w warunkach inkubatora, a następnie usuwano podłoże hodowlane, utrwalano komórki 10% formaliną w PBS przez 10 min, rozszczelniano błony komórkowe 0,2% roztworem Triton-X 100 przez 10 min i blokowano niespecyficzne wiązanie się przeciwciał do komórek i powierzchni płytki roztworem 3% BSA/PBS przez 1 godz. w temperaturze pokojowej. Następnie przeciwciała skierowane przeciwko receptorowi 2 VEGF, skonjugowane z Alexa Fluor[™] 488 i przygotowane w roztworze 1% BSA/PBS w rozcieńczeniu 1:250, nanoszono do studzienek płytki i inkubowano przez 3 godz. w temperaturze 37°C. Po każdym etapie studzienki płytek odpłukiwano PBS. Intensywność

fluorescencji mierzono przy długości fali 488 nm. Doświadczenia wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

5.2.6 Pomiar stężenia kolagenu I wydzielonego przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 w odpowiedzi na stymulację sterolami

Stężenie kolagenu I mierzono stosując test immunoenzymatyczny ELISA z wykorzystaniem płynów pohodowlanych, pochodzacych ze stymulacji komórek śródbłonka naczyniowego HMEC-1 10 µM CH, 10 µM 7-KCh i 10 µM kalcytriolu, w warunkach analogicznych do testu oceny aktywności metabolicznej komórek śródbłonka naczyniowego HMEC-1 w obecności steroli. W pierwszym etapie do studzienek na płytce niehodowlanej 96-studzienkowej nanoszono przeciwciała skierowane przeciwko kolagenowi Ι w rozcieńczeniu 1:4000 w buforze węglanowym i inkubowano przez noc w temperaturze 4°C. Następnie płytki odpłukiwano 5 razy PBS z dodatkiem Tween 80 i blokowano niespecyficzne wiązanie się przeciwciał do komórek i powierzchni płytki roztworem 3% BSA/PBS przez 2 godz. w temperaturze pokojowej. Po tym czasie płytki odpłukiwano 2 razy PBS z dodatkiem Tween 80, nanoszono płyny pohodowlane komórek HMEC-1 stymulowanych sterolami i inkubowano przez noc w 4°C. Następnie płytki odpłukiwano 5 razy PBS z dodatkiem Tween 80, nanoszono drugorzędowe przeciwciała poliklonalne królicze, skierowane przeciwko kolagenowi I, skoniugowane z peroksydazą chrzanową (HRP-horseradish peorxidase) w rozcieńczeniu 1:2000 w 1% roztworze BSA/PBS i inkubowano 3 godz. w temperaturze pokojowej. Następnie płytki odpłukiwano 5 razy PBS z dodatkiem Tween 80, nanoszono substrat dla HRP - OPD przygotowany w buforze cytrynianowo-fosforanowym w stężeniu 1 mg/ml, dodawano 0,5 µl 30% H₂O₂ i inkubowano 10 min w ciemności. Reakcję barwną hamowano poprzez dodanie 2 M kwasu cytrynowego, a absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm. Uzyskane wyniki odnoszono do krzywej wzorcowej dla kolagenu I w zakresie stężeń 100-1,56 µg/ml. Doświadczenia wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

5.2.7 Ocena stresu oksydacyjnego komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1

Komórki śródbłonka naczyniowego HMEC-1 o gęstości 1×10^5 komórek/ml w objętości 100 µl suplementowanego podłoża hodowlanego MCDB-131 nanoszono do studzienek na czarnej płytce hodowlanej 96-studzienkowej, a następnie inkubowano przez 24 godz. w 37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności. Następnie, wymieniano suplementowane podłoże hodowlane MCDB-131 na 100 µl świeżego i nanoszono stymulatory:

- 10 µM CH,
- 10 µM 7-KCh,
- 10 μM kalcytriolu.

Jako kontrolę układu używano komórek niestymulowanych. Komórki inkubowano przez 24 godz. w warunkach inkubatora, a następnie przeprowadzono barwienie fluorescencyjne w kierunku oceny markera peroksydacji lipidów – 4-HNE. Z płytek hodowlanych usuwano podłoże hodowlane, utrwalano komórki 10% formaliną w PBS przez 10 min, rozszczelniano błony komórkowe 0,2% roztworem Triton-X 100 przez 10 min i blokowano niespecyficzne wiązanie się przeciwciał do komórek i powierzchni płytki roztworem 3% BSA/PBS przez 1 godz. w 37°C. Następnie przeciwciała skierowane przeciwko 4-HNE, skoniugowane z FITC przygotowywano w roztworze 1% BSA/PBS w rozcieńczeniu 1:500, nanoszono na płytki i inkubowano przez 3 godz. w temperaturze 37°C. Po każdym etapie komórki płukano PBS. Intensywność fluorescencji mierzono przy długości fali 488 nm. Doświadczenia wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

5.2.8 Ocena tworzenia tubul przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 w obecności steroli lub włókien apatytowych (ang. *tube formation assay*)

Komórki śródbłonka do wytworzenia tubul potrzebują macierzy zewnątrzkomórkowej, o zredukowanej zawartości czynników wzrostu – Geltrex[™], który jest cieczą w temperaturze około 4°C, a w wyższej temperaturze ulega polimeryzacji. W pierwszym etapie przygotowywano zawiesiny zawierające 10 mg/ml Geltrex[™] w suplementowanym podłożu hodowlanym MCDB-131 oraz stymulatory:

- 10 µM CH,
- 10 µM 7-KCh,
- 10 µM kalcytrioli,
- 0,5 mg/250 µl włókien apatytowych.

Jako kontrole układu używano komórek niestymulowanych oraz komórek stymulowanych 20 ng/ml FGF (referencja wzrostu). Następnie, przygotowane zawiesiny nanoszono do studzienek na płytce hodowlanej 24-studzienkowej i inkubowano 30 min w warunkach inkubatora, aby Geltrex[™] spolimeryzował. W kolejnym etapie komórki śródbłonka naczyniowego HMEC-1 o gęstości 4,8 × 10⁵ komórek/ml w 250 µl suplementowanego podłoża hodowlanego MCDB-131 nanoszono na Geltrex[™] i inkubowano przez 24 godz. w warunkach

inkubatora. Po tym czasie mikroskopowo oceniano wytworzenie tubul i wykonywano zdjęcia w powiększeniu 20x przy użyciu mikroskopu konfokalnego Leica oraz w powiększeniu 40 i 100x przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego z odwróconym polem widzenia Motic AE 2000. Dodatkowo, na zdjęciach oceniano średnią długość oraz szerokość wytworzonych połączeń przy użyciu oprogramowania LAS AF Leica. Doświadczenia wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

W przypadku układu, w którym komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 hodowano w obecności włókien apatytowych wykonano barwienie fluorescencyjne przy użyciu Falloidyny Texas Red (barwienie aktyny) i DAPI (barwienie jąder komórkowych). W tym celu, z płytek hodowlanych usuwano podłoże hodowlane, utrwalano komórki 10% formaliną w PBS przez 10 min, rozszczelniano błony komórkowe 0,2% roztworem Triton-X 100 przez 10 min i blokowano niespecyficzne wiązanie się reagentów do komórek i powierzchni płytki roztworem 3% BSA/PBS przez 1 godz. w 37°C. Następnie wybarwiano włókna aktyny Falloidyną Texas Red w PBS (1:40) przez 30 min, odpłukiwano 5 razy PBS, a potem wykonywano barwienie jąder komórkowych DAPI (1:1000) przez 30 min. Wybarwione struktury komórkowe oglądano przy użyciu mikroskopu konfokalnego SP-8 Leica w powiększeniu 10x.

5.2.9 Ocena kiełkowania krążków aorty w odpowiedzi na stymulację cholesterolem (ang. aorta sprouting assay)

Zgoda na pracę z materiałem pochodzącym od zwierząt została wydana przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na zwierzętach z siedzibą przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi (nr zgody nr ŁB192/2021). W pierwszym etapie aortę piersiową izolowano z osobników męskich szczurów rasy Wistar, które poddawano eutanazji poprzez przedawkowanie pentobarbitalu sodu (Morbital), a dawkę obliczano na podstawie masy ciała zwierzęcia. Aortę odsłaniano poprzez rozcięcie jamy klatki piersiowej i usunięcie tkanki płucnej. Następnie odsłoniętą aortę wycinano i krojono na poprzeczne fragmenty o grubości około 1 mm (Iqbal i wsp. 2017). Krążki aorty nanoszono centralnie na przygotowaną wcześniej płytkę hodowlaną 12-studzienkową zawierającą w swoich studzienkach po 300 µl mieszaniny 10 mg/ml Geltrex™ w suplementowanym podłożu hodowlanym MCDB-131 i 10 µM CH lub 20 ng/ml VEGF (kontrola pozytywna) i inkubowano przez 30 min w warunkach inkubatora, aby Geltrex™ spolimeryzował. Po tym czasie do studzienek dodawano 300 µl suplementowanego podłoża hodowlanego MCDB-131 i hodowano przez 5 dni w 37°C, 5% CO2 i 95% wilgotności. Suplementowane podłoże hodowlane MCDB-131 wymieniano na świeże po 3 dniach. Kiełkowanie komórek śródbłonka i tworzenie sieci obserwowano codziennie przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego z odwróconym polem widzenia Motic AE 2000. Zdjęcia w powiększeniu 10x i 40x wykonywano każdego dnia od momentu rozpoczęcia doświadczenia (czas 0). W obszarach kiełkowania aorty wyodrębniano część nieustrukturyzowaną, wychodzącą bezpośrednio z krążka aorty oraz ustrukturyzowaną, powstałą za obszarem nieustrukturyzowanym, przy użyciu oprogramowania Motic Image Plus 3.0. Doświadczenia wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

5.2.10 Izolacja RNA z komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 po stymulacji cholesterolem

Komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 o gęstości 1 × 10⁶ komórek/ml nanoszono w objętości 1 ml suplementowanego podłoża hodowlanego MCDB-131 do studzienek płytki hodowlanej 6-studzienkowej i inkubowano przez 24 godz. w warunkach inkubatora. Kolejnego dnia, po uzyskaniu 100% konfluencji komórek, wymieniano suplementowane podłoże hodowlane MCDB-131 na świeże i dodawano stymulatory:

- 10 µM CH,
- 25 ng/ml lipopolisacharydu (LPS lipopolysaccharide) Helicobacter pylori (HP),
- 10 µM CH oraz 25 ng/ml LPS HP.

Stosowano stymulatory pojedynczo (CH lub LPS *HP*) lub łącznie (CH/LPS *HP*). Kontrolę w doświadczeniu stanowiły komórki niestymulowane. Komórki inkubowano przez 24 godz. w warunkach inkubatora. Następnie komórki śródbłonka naczyniowego HMEC-1 mieszano z trzema objętościami reagentu TRIzol LS oraz jedną objętością wody wolnej od RNAz, po czym RNA izolowano z użyciem zestawu Total RNA Zol-Out[™] D według instrukcji producenta. Trawienie DNA wykonywano na kolumnach przy użyciu DNAz według instrukcji producenta. Jakość i ilość RNA oceniano przy użyciu oprogramowania Agilent 2100 BioAnalyzer i zestawu do oceny Agilent RNA 6000 Nano według instrukcji producenta. Przed wygenerowaniem bibliotek próbki RNA poddawano wzbogacaniu poli(A) przy użyciu modułu wzbogacania mRNA z zestawu KAPA Hyper Prep. Biblioteki do sekwencjonowania generowano przy użyciu zestawu PCR-cDNA Barcoding zgodnie z instrukcją producenta, co umożliwiało identyfikację i ocenę ilościową transkryptów pełnej długości. Powstałe biblioteki sekwencjonowano przy użyciu urządzenia MinION MK1B wyposażonego w kuwetę przepływową serii R9 w celu uzyskania około miliona odczytów sekwencjonowania z kodem kreskowym na jednym końcu, odpowiadających transkryptom pełnej długości, ponieważ

do próbek nie zastosowano fragmentacji. Przeprowadzano trzy niezależne replikacje izolacji RNA, przygotowania biblioteki i sekwencjonowania RNA.

5.2.11 Analiza transkryptomiczna przygotowanych bibliotek po izolacji RNA z komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 po stymulacji cholesterolem

Analizę danych sekwencjonowania przeprowadzano automatycznie podczas sekwencjonowania na platformie sekwencjonowania MinKNOW, gdzie wykorzystano dane dla gupika pawie oczko (*Poecilia reticulata*) (wersja 5.1.13) do wykonania wywoływania bazowego i demultipleksowania danych z dużą dokładnością. Mapowanie do uwolnienia ludzkiego transkryptomu 42 (GRCh38.p13, użyte jako odniesienie do dopasowania) przeprowadzano za pomocą Minimap2 (wersja 2.17-r941). Do zliczenia dopasowań do transkryptów i wygenerowania macierzy do oceny ekspresji różnicowej stosowano skrypt MultiBamCov z pakietu Bedtools (v.2.27.1). Transkrypty ulegające różnej ekspresji szacowano za pomocą internetowej platformy analitycznej Degust RNA-Seq z domyślnymi parametrami (http://degust.erc.monash.edu, zaprojektowane przez D.R. Powella (2015)).

5.2.12 Ocena ekspresji wybranych genów w komórkach śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 po stymulacji cholesterolem

Do oceny ekspresji genów po stymulacji CH zastosowano ilościową metodę reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR - real time polymerase chain Geny kodujące atypową kinazę wzbogaconą w pseudopodium reaction). 1 (PEAK1 – pseudopodium-enriched atypical kinase 1) i pleksynę D1 (PLXND1 – plexin D1) wybrano na podstawie wyników sekwencjonowania. W pierwszym etapie rozmrażono 1 mg całkowitego RNA wyizolowanego do przygotowania bibliotek i przeprowadzono odwrotną transkrypcję do cDNA przy użyciu SuperScriptTM III Reverse Transcriptase, zgodnie z instrukcją producenta. Powstały cDNA używano w reakcji PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu Rotor-Gene® Q. Przeprowadzano 40 cykli reakcji; początkową denaturację ustawiano na 2 min w temperaturze 94°C, cykliczną denaturację na 15 s w temperaturze 94°C, a następnie etap przyłączania/wydłużania na 1 min w temperaturze 60°C. Doświadczenia z wykorzystaniem qRT-PCR przeprowadzano w trzech powtórzeniach, a uzyskane dane analizowano przy użyciu oprogramowania Rotor-Gene® Q Series. Stosując metodę delta (2-ΔΔCT), ilość badanych transkryptów standaryzowano w stosunku do genu metabolizmu dehydrogenazy gliceraldehydo-3-fosforanu (GAPDH – glyceraldehyde podstawowego,

3-phosphate dehydrogenase), i obliczano względną krotność zmian w ekspresji genów w porównaniu z komórkami niestymulowanymi.

5.2.13 Synteza hydroksyapatytowego wypełniacza w postaci wielofazowych włókien apatytowych i jego modyfikacja cholesterolem

Wszystkie kompozyty i wypełniacze wykorzystane w testach składających się na niniejszą rozprawę doktorską zostały zaprojektowane i wytworzone przez zespół dr inż. Moniki Biernat z Grupy Badawczej Biomateriały, Sieć Badawcza Łukasiewicz - Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie. Wielofazowe włókna apatytowe (W) przygotowywano według następującej metodologii – 4 g materiału wyjściowego w postaci proszku (96% β-TCP) umieszczano w szklanej butelce Pyrex® o pojemności 250 ml i dodawano 100 ml 30% roztworu H₂O₂. Butelkę zakręcano, wytrząsano przez 2 min i podgrzewano w cieplarce elektrycznej w temperaturze 95°C przez 48 godz. Uzyskany w procesie produkt w postaci włókien filtrowano, przemywano czterokrotnie 500 ml wody destylowanej i suszono przez noc w temperaturze 90°C.

Modyfikacja włókien apatytowych została przeprowadzona za pomocą dwóch rodzajów CH:

- CH wysoko oczyszczony rozpuszczalny w etanolu (EtOH),
- CH w proszku rozpuszczalny w wodzie (H₂O).

Do modyfikacji używano CH w ściśle zaplanowanej ilości, aby zawartość CH w kompozytach porowatych z 10% udziałem włókien apatytowych była równa 0,15% wag. W kulistej kolbie o pojemności 50 ml umieszczano 1 g włókien apatytowych, dodawano 0,01523 g CH i dodawano 30 ml wody dejonizowanej lub 96% etanolu. Reakcję prowadzono z użyciem mieszadła magnetycznego (ok. 230 obr./min) w temperaturze 40°C przez 3 godz. pod pokrywą. Następnie wyłączano ogrzewanie oraz mieszanie i pozostawiano roztwory na 1 godz. bez przykrycia. Po tym czasie próbki suszono w suszarce próżniowej (ok. 0,17 bar) przez 20 godz. w temperaturze 50°C. Otrzymywano włókna apatytowe modyfikowane CH rozpuszczalnym w etanolu (WMCHEtOH) oraz włókna apatytowe modyfikowane CH rozpuszczalnym w wodzie (WMCHH₂O), z wydajnością reakcji 100%. Następnie, oceniano skład fazowy i morfologię włókien apatytowych modyfikowanych przy użyciu elektronowej mikroskopii skaningowej (SEM – *scanning electron microscopy*) i metody dyfrakcji promieni rentgenowskich (XRD – *X-ray diffraction*) oraz potwierdzano skuteczność modyfikacji

przy użyciu spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR – *Fourier-transform infrared spectroscopy*) i analizy termicznej.

5.2.14 Otrzymywanie kompozytów polilaktydowych z dodatkiem włókien apatytowych niemodyfikowanych lub modyfikowanych cholesterolem w procesie liofilizacji

Roztwory 5% PLA przygotowywano przez rozpuszczenie polimeru w 1,4-dioksanie przy mieszaniu magnetycznym przez 72 godz. Następnie do roztworów PLA dodawano w odpowiedniej ilości włókna apatytowe (modyfikowane lub niemodyfikowane) w celu uzyskania kompozytów o składzie, w którym stosunek wagowy PLA/włókna apatytowe równy jest 90/10. W tym celu włókna apatytowe wprowadzano do roztworów polimerowych i przez 10 minut dyspergowano ultradźwiękowo, a następnie mieszano magnetycznie do uzyskania jednorodnych zawiesin. Otrzymane jednorodne zawiesiny zamrażano w temperaturze –20 °C, a następnie przenoszono do liofilizatora. Porowate kompozyty otrzymywano przez liofilizację zamrożonych zawiesin w temperaturze –35 °C i ciśnieniu 0,06 MPa w fazie głównej suszenia i 0,005 MPa w fazie końcowej, przez 48 godz. Otrzymane kompozyty następnie kilkakrotnie przemywano wodą dejonizowaną i ponownie suszono przez liofilizację zgodnie z powyższą procedurą suszenia liofilizacyjnego. Następnie oceniano mikrostrukturę otrzymanych kompozytów przy użyciu SEM. Skład kompozytów potwierdzano analizą termiczną. Kompozyty charakteryzowano pod kątem wytrzymałości mechanicznej na ściskanie.

5.2.15 Badanie cytobiozgodności kompozytów przy użyciu fibroblastów myszy L929 i osteoblastów człowieka hFOB 1.19

Do badań cytotoksyczności rekomendowanym standardem jest ocena aktywności metabolicznej linii komórkowej fibroblastów myszy L929 (ISO-10993-5-2009). W oparciu o ten standard badanie cytobiozgodności wykonano także używając osteoblastów człowieka hFOB 1.19. Komórki o gęstości 1×10^5 komórek/ml w objętości 100 µl odpowiedniego suplementowanego podłoża hodowlanego nanoszono do studzienek płytek hodowlanych 96-studzienkowych, a następnie inkubowano przez 24 godz. w odpowiednich warunkach inkubatora (hFOB 1.19 – 34°C, L929 – 37°C). Kolejnego dnia oceniano wytworzenie monowarstwy komórek, przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego z odwróconym polem widzenia, wymieniano odpowiednie podłoża hodowlane na świeże, a w studzienkach umieszczano kompozyty o wielkości 1/10 powierzchni studzienki, poddane wcześniej sterylizacji radiacyjnej. Jako kontrolę układu używano komórek niestymulowanych, komórek stymulowanych certyfikowanym materiałem referencyjnym (fragment kaniuli) oraz komórek

hodowanych w podłożu z dodatkiem 2% saponiny lub 1% H₂O₂. Komórki inkubowano przez 24 godz. w warunkach inkubatora. Następnego dnia usuwano ze studzienek kompozyty, aby nie zaburzały odczytu absorbancji, a do studzienek dodawano 20 μ MTT w stężeniu 5 mg/ml i inkubowano 4 godz. w warunkach inkubatora. Po tym czasie płytki z komórkami odwirowywano przez 10 min przy 1200 rpm w temperaturze pokojowej, usuwano supernatant i do studzienek dodawano 200 μ l DMSO, aby rozpuścić kryształy formazanu. Absorbancję mierzono przy długości fali 570 nm. Doświadczenia wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

5.2.16 Ocena aktywacji szlaku sygnałowego zależnego od NF-кВ w monocytach reporterowych człowieka THP1-Blue[™] NF-кВ eksponowanych na działanie badanych kompozytów

Monocyty reporterowe człowieka THP1-BlueTM NF-κB hodowane w obecności stymulatora reakcji zapalnej wydzielają embrionalną fosfatazę alkaliczną (SEAP – *secreted embtyonic alkaline phosphatase*), która świadczy o aktywacji nuklearnego czynnika NF-κB. Komórki o gęstości 5×10^5 komórek/ml w objętości 180 µl suplementowanego podłoża hodowlanego nanoszono na płytki hodowlane 96-studzienkowe, a następnie dodawano, poddane wcześniej sterylizacji radiacyjnej, kompozyty (5PLA i 5PLA10W) o wielkości 1/10 powierzchni studzienki. Jako kontrole układu używano komórek niestymulowanych, komórek stymulowanych certyfikowanym materiałem referencyjnym (fragment kaniuli) oraz komórek stymulowanych LPS *Escherichia coli* w stężeniu 5 ng/ml (stymulator aktywacji ścieżki sygnałowej NF-κB). Komórki inkubowano przez 24 godz. w 37°C, 5% CO₂ 95% wilgotności. Następnego dnia płytki hodowlane z komórkami odwirowywano przez 10 min przy 1400 rpm w temperaturze pokojowej, a 20 µl supernatantów pohodowlanych przenoszono do studzienek płytek, które zawierały 180 µl Quanti-BlueTM, reagent do wykrywania wydzielonej SEAP, i inkubowano przez 3 godz. w warunkach inkubatora. Absorbancję mierzono przy długości fali 650 nm. Doświadczenia wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

5.2.17 Ocena zasiedlania kompozytów przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 i osteoblasty człowieka hFOB 1.19

Kompozyty 5PLA10W, 5PLA10WMCH(EtOH)0,15% i 5PLA10WMCH(H₂O)0,15% zanurzano w 200 μ l odpowiedniego suplementowanego podłoża hodowlanego, MCDB-131 (HMEC-1) lub DMEM/F12 (hFOB 1.19), na czas 30 min w celu ich nawilżenia. Następnie komórki o gęstości 5 × 10⁷ komórek/ml (HMEC-1) i 2,5 × 10⁷ komórek/ml (hFOB 1.19) w objętości 20 µl dodawano na kompozyty i inkubowano przez 2 godz. w odpowiednich warunkach inkubatora. Po tym czasie uzupełniano zawartość odpowiedniego suplementowanego podłoża hodowlanego do całkowitej objętości 1 ml i hodowano przez 7 dni (HMEC-1) i 7, 14 i 21 dni (hFOB) w 37°C (HMEC-1) lub 34°C (hFOB1.19), w 5% CO₂, 95% wilgotności. Co 3-4 dni wymieniano suplementowane podłoże hodowlane na świeże. Po zakończonej hodowli utrwalano komórki znajdujące się na kompozytach mieszaniną 2% aldehydu glutarowego i 2% paraformaldehydu w 0,1 M buforze kakodylowym przez 2 godz. Następnie utrwalony materiał przepłukiwano PBS i barwiono 1% czterotlenkiem osmu (OsO4). Tak przygotowane kompozyty poddawano procedurze odwadniania w serii stężeń alkoholu etylowego (10; 30; 50; 70; 80; 96; 99,6%), każdy cykl trwał 45 min, a później odwodniony materiał suszono przez noc. Zasiedlanie kompozytów przez komórki oceniano i analizowano przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego przy powiększeniu około 990x.

Dodatkowo, w celu oceny proliferacji osteoblastów człowieka hFOB 1.19 zasiedlających badany biokompozyt 5PLA10WMCH(H₂O)0,15% przeprowadzano doświadczenie przy użyciu komercyjnego zestawu do oceny proliferacji komórek CyQuant® Cell Proliferation Assay Kit, zgodnie z instrukcją producenta. Zestaw pozwala na zmierzenie barwnika fluorescencyjnego związanego z kwasami nukleinowymi fluorescencji w komórkach. Komórki osteoblastów człowieka hFOB 1.19 o gęstości 0.5×10^6 komórek/ml nanoszono na badany biokompozyt (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%) i kompozyt referencyjny (5PLA10W) i hodowano przez 7, 14, 21 i 28 dni w 34°C, 5% CO₂, 95% wilgotności. Po zakończonym czasie hodowli komórki zmywano z kompozytów przy użyciu PBS i zamrażano w -80°C. W dniu doświadczenia komórki rozmrażano w kapieli wodnej, wirowano przy 1400 rpm, a supernatant usuwano. Następnie, według instrukcji producenta zestawu do komórek dodawano 200 μl mieszaniny komponentu A (barwnik CyQUANTTM GR) i komponentu B (bufor lizujący) i inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej. Intensywność fluorescencji mierzono przy długości fali 480 nm (wzbudzenie) i 520 nm (emisja). W celu wyliczenia ilości komórek uzyskane wyniki odnoszono do krzywej wzorcowej proliferacji.

5.2.18 Ocena stężenia alkalicznej fosfatazy i interleukiny 6 wyprodukowanej przez osteoblasty człowieka hFOB 1.19 hodowane w obecności kompozytów

W celu oceny poziomu produkcji fosfatazy alkalicznej (ALP – *alkaline phosphate*) komórki osteoblastów człowieka hFOB 1.19 o gęstości 0.5×10^6 komórek/ml nanoszono na badany biokompozyt (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%) i kompozyt referencyjny (5PLA10W) i hodowano przez 7, 14, 21 i 28 dni w warunkach inkubatora (procedura analogiczna do opisanej w punkcie 5.2.17). Po każdym punkcie czasowym hodowli komórki zmywano z kompozytu przy użyciu PBS i zamrażano w -80° C. W dniu doświadczenia komórki rozmrażano w kąpieli wodnej, wirowano przy 1400 rpm, a supernatanty usuwano. Następnie, na płytki niehodowlane 96-studzienkowe nanoszono po 100 µl zawiesiny komórek i dodawano do nich po 100 µl p-NPP w stężeniu 4 µg/µl i inkubowano przez 30 min w 37°C. Reakcję zatrzymywano 2 M wodorotlenkiem sodu. Absorbancję mierzono przy długości fali 405 nm. W celu określenia stężenia ALP uzyskane wyniki odnoszono do krzywej standardowej w zakresie stężeń 0-10 IU/ml.

Stężenie IL-6 wydzielonej przez osteoblasty człowieka hFOB 1.19 zasiedlające kompozyty, mierzono przy użyciu komercyjnego zestawu ELISA (Human IL-6 ELISA Set), zgodnie z instrukcją producenta. Komórki osteoblastów człowieka hFOB 1.19 o gęstości 0.5×10^6 komórek/ml nanoszono na badany biokompozyt (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%) i kompozyt referencyjny (5PLA10W) i hodowano przez 7, 14, 21 i 28 dni w warunkach inkubatora. Po zakończonym czasie hodowli zachowywano podłoża pohodowlane do dalszych etapów. W pierwszym etapie studzienki niehodowlanej płytki 96-studzienkowej pokrywano przeciwciałami skierowanymi przeciwko IL-6 przygotowanymi w 0,1 M weglanie sodu i inkubowano przez noc w 4°C. Następnie płytki odpłukiwano 5 razy PBS z dodatkiem Tween 80 i blokowano niespecyficzne wiązanie się przeciwciał do komórek i powierzchni płytki roztworem 10% BSA/PBS przez 1 godz. Następnie, płytki odpłukiwano 2 razy PBS z dodatkiem Tween 80, nanoszono płyny pohodowlane i inkubowano przez 2 godz. Potem płytki odpłukiwano 5 razy PBS z dodatkiem Tween 80, nanoszono biotynylowane monoklonalne przeciwciała w 10% FBS/PBS i inkubowano przez 1 godz. Następnie, płytki odpłukiwano 3 razy PBS z dodatkiem Tween 80, nanoszono roztwór strepawidyny skoniugowanej z HRP (SAv-HRP) w 10% FBS/PBS i inkubowano przez 30 min. Po tym czasie płytki odpłukiwano 3 razy PBS z dodatkiem Tween 80 i nanoszono mieszaninę substratu TMB i H₂O₂. Reakcję barwną zatrzymywano przez dodanie 2M kwasu siarkowego, a absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm (z korektą długości fali 570 nm). W celu określenia stężenia IL-6 uzyskane wyniki odnoszono do krzywej standardowej w zakresie stężeń 300-4,7 pg/ml.

5.2.19 Badanie bezpieczeństwa *in vivo* kompozytu polilaktydowego z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych cholesterolem

Badanie bezpieczeństwa stosowania biokompozytu in vivo 5PLA10WMCH(H2O)0,15% wykonano za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na zwierzętach z siedziba przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi (nr zgody ŁB192/2021), stosując test miejscowej odpowiedzi tkankowej i reakcji uogólnionej na wszczepiony kompozyt. Uczestniczenie w procedurze zapewniło mi posiadane wyznaczenie do pracy na zwierzętach (nr 268W/2021), udzielone mi po odbyciu szkolenia prowadzonego przez kierownika zwierzętarni Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego (posiada uprawnienia do nadawania wyznaczeń do pracy na zwierzętach). Procedurę wykonała dr hab. Agnieszka Krupa, prof. UŁ, dr hab. Przemysław Płociński, prof. UŁ, dr Marcin Włodarczyk i dr Aleksandra Szwed-Georgiou. Wybór testu do badania in vivo bezpieczeństwa kompozytu został podyktowanym normą EN ISO 10993-1:2009 "Biologiczna ocena wyrobów medycznych/Ocena i badanie w procesie zarządzania ryzykiem/Klasyfikacja wyrobów medycznych/Klasyfikacja według rodzaju kontaktu z organizmem/Wyroby implantowane", PN-EN ISO 10993-6:2017 "Biologiczna ocena wyrobów medycznych/Badania miejscowej reakcji po implantacji". Model in vivo stanowiły szczury rasy Wistar – dorosłe osobniki, samice i samce, o średniej wadze 250-350 g, pochodzące z wewnętrznej hodowli Zwierzętarni Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ.

Przed rozpoczęciem procedury szczury depilowano na grzbiecie, po czym znieczulano wziewnie przy użyciu 5% izofluranu w dawce dobranej do wagi zwierzęcia i utrzymywano ciągłe dawkowanie przez cały czas zabiegu (zestaw do anestezji małych zwierząt laboratoryjnych jest na wyposażeniu Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego). Następnie zwierzęta pozycjonowano na brzuchu, skórę i tkankę podskórną przecinano w linii środkowej grzbietu, a po prawej i lewej stronie wykonywano kieszonki, w których umieszczano po jednym fragmencie tego samego kompozytu, nasączonego uprzednio sterylną solą fizjologiczną. Po umieszczeniu kompozytów pole operacyjne zamykano stosując nici chirurgiczne niewchłanialne 4/0. Kompozyty użyte w doświadczeniach poddawano wcześniejszej sterylizacji radiacyjnej. Po zabiegu zwierzęta umieszczano pojedynczo w klatkach, a w celu zapewnienia osłony przeciwbólowej zwierzętom podawano lek przeciwbólowy - Butorfanol (2mg/kg masy ciała, iniekcja podskórna). Następnie obserwowano ruchliwość zwierząt, pobieranie wody i pokarmu, a także poszukiwano oznak miejscowego stanu zapalnego (obrzęk, zaczerwienienie, opuchnięcie rany pooperacyjnej). Po 7, 30 i 90 dniach zwierzęta poddawano eutanazji poprzez przedawkowanie pentobarbitalu sodu (Morbital, 100 mg/kg masy ciała, iniekcja dootrzewnowa). Po eutanazji od zwierząt pobierano krew, wybrane narządy (śledziona, nerki, wątrobą) oraz wszczepione kompozyty wraz z otaczającą tkanką. Podczas sekcji obserwowano miejsca wszczepu kompozytów i dokumentowano obserwacje wykonując zdjęcia, a pobrane materiały zabezpieczano do dalszej analizy. Liczba zwierząt na grupę to 3 osobniki.

5.2.20 Badanie bioefektywności zarastania ubytków w kościach czaszki po wszczepieniu kompozytów polilaktydowych z dodatkiem włókien apatytowych niemodyfikowanych lub modyfikowanych cholesterolem

Badanie bioefektywności *in vivo* biokompozytu 5PLA10WMCH(H2O)0,15% i kompozytu referencyjnego 5PLA10W wykonano za zgodą wydaną przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na zwierzętach z siedzibą przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi (nr zgody ŁB240/2022), stosując test zarastania ubytku kości czaszki szczura. Uczestniczenie w procedurze zapewniło mi posiadane wyznaczenie do pracy na zwierzętach (nr 268W/2021). Procedurę wykonała dr hab. Agnieszka Krupa, prof. UŁ, dr hab. Przemysław Płociński, prof. UŁ, dr Marcin Włodarczyk i dr Aleksandra Szwed-Georgiou. Model *in vivo* stanowiły szczury rasy Wistar (dorosłe osobniki, samice i samce, o średniej wadze 200-250 g). Zwierzęta pochodziły z wewnętrznej hodowli Zwierzętarni Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ.

W doświadczeniu szczury znieczulano wziewnie przy użyciu 5% izofluranu w dawce dobranej do wagi zwierzęcia, a znieczulenie utrzymywano przez cały czas zabiegu. Uśpione szczury pozycjonowano na grzbiecie i utrzymywano w bezruchu przy pomocy stolika stereotaktycznego. Przed zabiegiem depilowano skórę czaszki i wykonywano nacięcie skóry czaszki o długości 10-15 mm w linii pośrodkowej. Następnie odsłaniano czaszkę w taki sposób, żeby widoczne były szwy czaszkowe bregma/lambda. Przy pomocy przystawki do stolika stereotaktycznego wyznaczano koordynaty i precyzyjne miejsca do nawiercania otworów w czaszce. Dwa otwory w kości czaszki wykonywano używając wiertła, ale w taki sposób, żeby ich średnica nie przekraczała 3 mm. Jeden z otworów w kości czaszki szczura wypełniano fragmentami kompozytu referencyjnego (5PLA10W) lub badanego biokompozytu (5PLA10WMCH(H2O)0,15%), uprzednio wysterylizowanych radiacyjnie i nasączonych solą fizjologiczną, podczas gdy drugi zostawiano do samoistnego zarośnięcia. Po zabiegu skórę zwierzęcia zszywano stosując nici chirurgiczne niewchłanialne 4/0, a w celu zapewnienia osłony przeciwbólowej podawano lek przeciwbólowy - Butorfanol (2mg/kg masy ciała, iniekcja podskórna). Po zabiegu zwierzęta umieszczano pojedynczo w klatkach. Po 4, 8 i 12 tygodniach zwierzęta poddawano eutanazji poprzez przedawkowanie pentobarbitalu sodu (Morbitalu, 100 mg / kg masy ciała, iniekcja dootrzewnowa) i przeprowadzano resekcje

66

czaszek, które umieszczano w 10% roztworze formaliny w celu zabezpieczenia do dalszej analizy patomorfologicznej.

Dodatkowo, oddzielnej grupie zwierząt, którym wszczepiono kompozyt referencyjny (5PLA10W) lub badany biokompozyt (5PLA10WMCH(H2O)0,15%) na czas 8 tygodni, podawano dwa barwniki fluorescencyjne: błękit kalceiny i oranż ksylenolowy w stężeniu 25mg/kg masy ciała w iniekcji podskórnej, na 72 godz. przed eutanazją. Oba barwniki mają właściwości fluorescencyjne i są stosowane w wizualizacji obszarów mineralizacji kości. Liczba zwierząt na grupę to 3-6 osobników na każdy punkt czasowy.

5.2.21 Analiza histopatologiczna kompozytów po implantacjach do szczurów (modele *in vivo*)

Preparatyka histologiczna, obejmująca przygotowanie bloczków parafinowych i wykonanie cienkowarstwowych skrawów (3 µm) wyizolowanych od zwierząt kompozytów, wszczepionych podskórnie lub doczaszkowo, została wykonana przez akredytowane laboratorium diagnostyki histologicznej i cytologicznej Cytopath w Łodzi. Obrazowanie cienkowarstwowych preparatów przekrojów poprzecznych kompozytów, barwionych hematoksyliną i eozyną, wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego, a zdjęcia obrazów mikroskopowych analizowano w asyście certyfikowanego histopatologa, dra Jarosława Szwalskiego, kierownika laboratorium Cytopath w Łodzi.

5.2.22 Ekspresja cząsteczek CD31 na komórkach zasiedlających kompozyty polilaktydowe z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych cholesterolem, wszczepione podskórnie szczurom

Preparaty cienkowarstwowe (3µm) przekrojów poprzecznych biokompozytu 5PLA10WMCH(H₂O)0,15% po 7, 30 i 90 dniach od implantacji, odparafinowano w 60°C przez 1 godz. przy użyciu piecyka histologicznego, a następnie płukano w roztworach alkoholu etylowego o rosnącej zawartości procentowej alkoholu od 70 do 100% i ksylenu (100%), gdzie każde płukanie w roztworze trwało 3 min. Następnie, odparafinowane preparaty inkubowano z 3% roztworem BSA/PBS przez 1 godz. w celu zablokowania niespecyficznych wiązań, z pierwszorzędowymi przeciwciałami królika skierowanymi przeciwko CD31 szczura (rozcieńczenie 1:100 w 1% roztworze BSA/PBS, inkubacja 3 godz. w temp. 37°C) i z drugorzędowymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko IgG (łańcuchy ciężkie i lekkie – H+L) królika, skoniugowanymi z Alexa Fluor™ 488 (rozcieńczenie 1:2000 w 1% roztworze BSA/PBS, inkubacja 1 godz. w temp. pokojowej). Jądra komórkowe barwiono

DAPI w rozcieńczeniu 1:1000 (inkubacja 30 min w temp pokojowej). Po każdym etapie barwienia preparaty płukano PBS. Po barwieniu preparaty suszono i zamykano szkiełkami nakrywkowymi za pomocą kleju histologicznego. Obrazowanie mikroskopowe wykonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Zeiss w powiększeniu 4x i 10x.

5.2.23 Ocena mineralizacji obszarów kostnych czaszek szczurów po implantacji kompozytów polilaktydowych z dodatkiem włókien apatytowych niemodyfikowanych lub modyfikowanych cholesterolem

Fragmenty czaszek zawierające wszczepione kompozyty (8 tygodni po implatacji) i pochodzące od zwierząt nastrzykiwanych barwnikami fluorescencyjnymi (błękit kalceiny i oranż ksylenolowy) na 72 godz. przed eutanazją, oglądano z użyciem makroskopu konfokalnego wyposażonego w lasery wzbudzające emisję błękitu kalceiny w zakresie długości fali 322-445 nm i oranżu ksylenolowego w zakresie długości fali 440/570-610 nm. Dodatkowo, cienkowarstwowe preparaty (3 μm) przekrojów poprzecznych tych kompozytów odparafinowane (metoda opisana w podrozdziale 5.2.22) i niebarwione oglądano przy użyciu mikroskopu konfokalnego wyposażonego w lasery wzbudzające emisję barwników fluorescencyjnych (długości fal jak wyżej): błękit kalceiny (pseudokolor niebieski) i oranż ksylenolowy (pseudokolor zielony) w powiększeniu 10x.

5.2.24 Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki badań analizowano pod kątem istotności statystycznej przy użyciu programu Statistica 13. Wyniki przedstawiano jako średnia arytmetyczna \pm odchylenie standardowe. Dla wszystkich eksperymentów przyjmowano poziom istotności statystycznej p<0,05.

6. Wyniki

6.1 Badanie działania proregeneracyjnego steroli z wyłonieniem kandydata o najsilniejszym potencjale promującym

6.1.1 Cholesterol jako czynnik modulujący migrację i proliferację komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1

W ramach oceny zdolności wybranych związków sterolowych do modulowania komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 do migracji, proliferacji i tworzenia tubul w pierwszym etapie należało wykluczyć potencjalne działanie cytotoksyczne testowanych związków wobec komórek. W tym celu komórki eksponowano na działanie CH,

7-KCh, który jest oksydowaną formą cholesterolu, oraz kalcytriolu, czyli hormonu kontrolującego gospodarkę wapniowo-fosforanową (Donati i wsp. 2022). Stymulację wykonano wzorując się na testach do oceny bezpieczeństwa związków do potencjalnego wykorzystania biomedycznego zgodnie z normą ISO-10993-5-2009 Międzynarodowej Organizacji Normalizacyjnej. Żaden ze stymulatorów nie powodował istotnej statystycznie zmiany aktywności metabolicznej komórek śródbłonka naczyniowego HMEC-1 w porównaniu do kontroli, którą stanowiły komórki niestymulowane (p>0,05) (Ryc. 5). Uzyskane wyniki wskazują, że aktywność metaboliczna komórek stymulowanych nieistotnie przekraczała poziom aktywności komórek niestymulowanych (Ryc. 5), co świadczy o pełnej cytobiozgodności wybranych steroli wobec komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1.



Ryc. 5 Aktywność metaboliczna komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 po 24 godz. stymulacji sterolami przedstawiona jako procent [%] aktywności kontroli. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu jednoczynnikowej ANOVY z testem posthoc Tuckey'a dla różnych N (p>0,05). Dane przedstawiono jako średnie \pm odchylenie standardowe. K – kontrola komórek niestymulowanych, 7-KCh – 7-ketocholesterol, CH – cholesterol.

Migracja i proliferacja komórek śródbłonka są niezbędnymi etapami, dzięki którym zachodzi proces regeneracji. Wśród zastosowanych w doświadczeniu steroli (CH, 7-KCh oraz kalcytriolu) poszukiwano czynnika, który najsilniej promuje migrację i proliferację komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1. Do oceny wpływu wybranych steroli na migrację komórek śródbłonka człowieka HMEC-1 oraz wyłonienia sterolu o najsilniejszym potencjalne proregeneracyjnym przeprowadzony został test gojenia się rany (ang. *wound*

healing assay), opierający się na ocenie migracji stymulowanych komórek w miejsce uszkodzenia monowarstwy komórek. Obserwacja mikroskopowa wykazała, że intensywność zarastania uszkodzenia w monowarstwie komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 stymulowanych CH była wyższa niż migracja samoistna i zbliżona do tej indukowanej przez VEGF. Stymulacja komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 przez 7-KCh skutkowała zarastaniem uszkodzenia porównywalnym do migracji samoistnej komórek niestymulowanych (Ryc. 6).



Ryc. 6 Migracja komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 w teście gojenia się rany (ang. *wound healing assay*) **po 24 godz. stymulacji sterolami.** Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające migrację komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 po ekspozycji na działanie CH, 7-KCh i kalcytriolu w porównaniu do migracji samoistnej po 24 godz. hodowli. K – kontrola, komórki niestymulowane, CH – cholesterol, 7-KCh – 7-ketocholesterol, VEGF – czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego z odwróconym polem widzenia (pow. 40x). Czerwoną ramką zaznaczono obszar uszkodzenia mechanicznego. Skala umieszczona na zdjęciach odpowiada długości 100 μm.

Na podstawie zdjęć oceniono średnią liczbę komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 znajdujących się w miejscu uszkodzenia mechanicznego po stymulacji badanymi sterolami. Spośród użytych stymulatorów to CH istotnie nasilał migrację komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 w miejsce uszkodzenia w porównaniu

do migracji samoistnej (p<0,01). Ponadto, migracja pod wpływem CH była istotnie silniejsza niż migracja w obecności 7-KCh lub kalcytriolu (p<0,001, Ryc. 7). Natomiast stymulacja komórek 7-KCh spowodowała istotne zahamowanie migracji w porównaniu do migracji samoistnej (p<0,01), jak i migracji komórek stymulowanych CH lub VEGF (p<0,001), wskazując negatywny wpływ 7-KCh na migrację komórek śródbłonka naczyniowego HMEC-1, pomimo braku efektu cytotoksycznego na wcześniejszym etapie badań (Ryc. 7).



Ryc. 7 Średnia liczba komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 w miejscu uszkodzenia monowarstwy po 24 godz. stymulacji sterolami. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu jednoczynnikowej ANOVY z testem posthoc Tuckey'a dla różnych N (p<0,05). Dane przedstawiono jako średnie \pm odchylenie standardowe. Różne oznaczenia literowe wskazują na istotne statystycznie różnice między analizowanymi grupami. Grupy z tym samym oznaczeniem literowym nie różnią się istotnie. K – kontrola, komórki niestymulowane, 7-KCh – 7-ketocholesterol, CH – cholesterol, VEGF – czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego.

VEGF i jego receptor, VEGFR2, odgrywają istotną rolę w migracji i proliferacji komórek śródbłonka podczas regeneracji (Wang i wsp. 2020b). Dlatego też oceniono ekspresję VEGFR2 na komórkach śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 w odpowiedzi na stymulację CH, 7-KCh i kalcytriolem. Ocenę ekspresji przeprowadzano za pomocą immunofluorescencji (Ryc. 8).



Ryc. 8 Ekspresja VEGFR2 na komórkach śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 po 24 godz. stymulacji sterolami. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu jednoczynnikowej ANOVY z testem posthoc Tuckey'a (p<0,05). Dane przedstawiono jako średnie \pm odchylenie standardowe. Różne oznaczenia literowe wskazują na istotne statystycznie różnice między analizowanymi grupami. Grupy z tym samym oznaczeniem literowym nie różnią się istotnie. K – kontrola, komórki niestymulowane, 7-KCh – 7-ketocholesterol, CH – cholesterol.

Spośród związków użytych do stymulacji komórek to CH spowodował największy wzrost ekspresji VEGFR2 na komórkach śródbłonka naczyniowego HMEC-1, a ekspresja VEGFR2 była istotnie większa w porównaniu do kontroli, którą stanowiły komórki niestymulowane (p<0,01) oraz komórek stymulowanych 7-KCh (p<0,01) lub kalcytriolem (p<0,001) (Ryc. 8).

W kolejnym etapie pracy oceniono, czy w wyniku ekspozycji komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 na działanie CH, 7-KCh i kalcytriolu zachodzą zmiany w wydzielaniu przez komórki kolagenu typu I. Istotne zwiększenie produkcji kolagenu przez komórki może skutkować bliznowaceniem i rozwojem stanu zapalnego o podłożu patologicznym (Krupa i wsp. 2021).


Ryc. 9 Stężenie kolagenu typu I wydzielonego przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 po 24 godz. stymulacji sterolami. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu jednoczynnikowej ANOVY z testem posthoc Tuckey'a (p>0,05). Dane przedstawiono jako średnie \pm odchylenie standardowe. K – kontrola, komórki niestymulowane, 7-KCh – 7-ketocholesterol, CH –cholesterol.

Uzyskane wyniki wskazują, że żaden z użytych steroli nie indukował istotnych zmian w produkcji i wydzielaniu kolagenu typu I przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 w porównaniu do kontroli, którą stanowiły komórki niestymulowane (Ryc. 9).

Pod wpływem wielu czynników obecnych w otoczeniu komórek wzrasta poziom stresu oksydacyjnego. Czynnik stresujący, który obecny jest w środowisku w nadmiarze może prowadzić do reakcji patologicznej i rozwoju stanu zapalnego, podczas którego komórki uruchamiają swoje mechanizmy obronne, aby zwalczyć powstały stan zapalny. Jednakże same komórki w wyniku aktywacji mogą stres oksydacyjny nasilać. Stres oksydacyjny może być również korzystny, jeśli działanie czynnika stresującego nie jest nadmierne. W takiej sytuacji w komórkach nasilane są mechanizmy związane z przeżyciem i podziałami (Jîtcă i wsp. 2022). W celu oceny działania wybranych steroli jako potencjalnych stresorów na komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 przeprowadzono stymulację komórek przy użyciu CH, 7-KCh i kalcytriolu, a następnie sprawdzono poziom 4-HNE, który jest produktem oksydacji lipidów w komórce.



Ryc. 10 Poziom stresu oksydacyjnego w komórkach śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 po 24 godz. stymulacji sterolami. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu jednoczynnikowej ANOVY z testem posthoc Tuckey'a (p<0,05). Dane przedstawiono jako średnie \pm odchylenie standardowe. Różne oznaczenia literowe wskazują na istotne statystycznie różnice między analizowanymi grupami. Grupy z tym samym oznaczeniem literowym nie różnią się istotnie. 4-HNE – 4-hydroksynonenal, K – kontrola, komórki niestymulowane, 7-KCh – 7-ketocholesterol, CH – cholesterol.

Spośród steroli użytych do stymulacji komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 to 7-KCh spowodował istotny wzrost stresu oksydacyjnego w komórkach w porównaniu do kontroli, którą stanowiły komórki niestymulowane (p<0,05) (Ryc. 10). Natomiast działanie CH i kalcytriolu nie spowodowało istotnych zmian w poziomie stresu oksydacyjnego w komórkach śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 w porównaniu do komórek niestymulowanych (p>0,05) (Ryc. 10).

6.1.2 Cholesterol jako czynnik promujący tworzenie tubul przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1

Wytwarzanie tubul przez komórki śródbłonka to jeden z fundamentalnych etapów regeneracji śródbłonka (Atat i wsp. 2019). Wpływ CH na powstawanie tubul oceniono za pomocą testu formowania się tubul (ang. *tube formation assay*). W teście komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 nanoszono na trójwymiarową strukturę imitującą macierz zewnątrzkomórkową ECM, w której znajdowały się testowane stymulatory. Komórki śródbłonka mają zdolność do spontanicznego tworzenia trójwymiarowej sieci przypominającej kapilary na podłożu ECM, jednak wprowadzając do układu doświadczalnego

stymulatory potencjalnie można wpływać na intensywność wytwarzania połączeń oraz ich jakość (długość i szerokość). Komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 poddano stymulacji CH, 7-KCh lub kalcytriolu, a następnie obserwowano i oceniano wytwarzanie tubul przez komórki. Kontrolę spontaniczną w ocenie tworzenia tubul stanowiły komórki niestymulowane, natomiast komórki eksponowane na działanie FGF stanowiły kontrolę pozytywną tworzenia naczyń (Ryc. 11). Obserwacje mikroskopowe wskazały, że ekspozycja komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 na działanie CH skutkowała wytwarzaniem tubul przez komórki na poziomie kontroli pozytywnej. 7-KCh oraz kalcytriol nie nasilały tworzenia tubul na podłożu ECM przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 (Ryc. 11).



Ryc. 11 Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające tworzenie tubul przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 po 24 godz. stymulacji. a – Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu konfokalnego SP-8 Leica (pow. 20x). K – kontrola, komórki niestymulowane, CH – cholesterol, 7-KCh – 7-ketocholesterol, FGF – czynnik wzrostu fibroblastów. **b** – przykładowe zdjęcie przedstawiające tubule - czerwona strzałka

wskazuje na długość połączenia, niebieska na szerokość. Skala umieszczona na zdjęciach odpowiada 1 mm.

Przeprowadzona analiza średniej długości i szerokości tubul w każdym wariancie stymulacji komórek pomogła wskazać najbardziej efektywny sterol, który istotnie wpływa na tworzenie się tubul z komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 (Ryc. 12). Ocena struktury wytworzonych tubul pozwoliła wykazać, że to CH istotnie nasilał ich formowanie przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 w porównaniu do kontroli spontanicznej, którą stanowiły niestymulowane komórki oraz w porównaniu do komórek stymulowanych 7-KCh lub kalcytriolem (Ryc. 12).



Ryc. 12 Analiza cech tubul wytworzonych przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 po 24 godz. stymulacji. a – Średnia długość tubul [mm] b – Średnia szerokość tubul [mm]. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu jednoczynnikowej ANOVY z testem posthoc Tuckey'a dla różnych N (p<0,05). Dane przedstawiono jako średnie \pm odchylenie standardowe. Różne oznaczenia literowe wskazują na istotne statystycznie różnice między analizowanymi grupami. Grupy z tym samym oznaczeniem literowym nie różnią się istotnie. K – kontrola, komórki niestymulowane, 7-KCh – 7-ketocholesterol, CH – cholesterol, FGF – czynnik wzrostu fibroblastów.

Analiza cech wytworzonej siatki tubul wykazała, że wskutek stymulacji komórek CH formowane są istotnie dłuższe połączenia niż w środowisku innych stymulatorów (p<0,001) i komórek niestymulowanych (p<0,001; Ryc. 12a). Natomiast długość połączeń po stymulacji komórek 7-KCh była istotnie mniejsza w porównaniu do kontroli spontanicznej (p<0,05; Ryc. 12a). Stymulacja CH spowodowała wytwarzanie istotnie szerszych połączeń w porównaniu do kontroli spontanicznej (p<0,001) i pozostałych stymulatorów (p<0,001; Ryc.

12b). Nie wykazano różnic w szerokości tubul w przypadku pozostałych stymulatorów (Ryc. 12b).

Oceniane powyżej cechy – długość i szerokość tubul (Ryc. 12) oraz zdolność do wytwarzania sieci tubul przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 (Ryc. 11) przedstawiono według opracowanej skali punktowej w Tab. 2.

Tab. 2 Ocena ilościowa i jakościowa połączeń wytworzonych przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 po 24 godz. stymulacji w skali 1-3. Dla długości połączeń zastosowano skalę: 3 punkty – \geq 0,4 mm, 2 punkty – \geq 0,3 mm, 1 punkt – \geq 0,2 mm; dla szerokości: 3 punkty – \geq 0,03 mm, 2 punkty – \geq 0,02 mm, 1 punkt – \geq 0,01 mm, a dla wielkości wytworzonych sieci: 3 punkty – duże, 2 punkty – średnie, 1 punkt – małe/brak. CH – cholesterol, 7-KCh – 7-ketocholesterol, FGF – czynnik wzrostu fibroblastów.

STYMULATOR		WVNIK		
	Długość	Szerokość	Sieci	
niestymulowane	2	1	1	4
СН	3	2	2	7
7-KCh	1	1	1	3
kalcytriol	2	1	1	4
FGF	2	1	3	6

Na podstawie wyników przedstawionych w powyższej części rozprawy można wskazać CH jako czynnik promujący tworzenie tubul przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1. Na tym etapie badań zdecydowano o wyborze CH jako czynnika promującego proces regeneracji komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 do zastosowania w dalszych doświadczeniach.

Zdolność do kiełkowania komórek śródbłonka naczyniowego pod wypływem CH badano na modelu *ex vivo* przy użyciu testu kiełkowania aorty (ang. *aorta sprouting assay*) z wykorzystaniem krążków aorty szczura. Krążki osadzano w trójwymiarowej strukturze imitującej ECM, w której znajdowały się stymulatory, CH lub VEGF, który stanowił kontrolę pozytywną kiełkowania, a następnie prowadzono hodowlę przez 5 dni w celu wytworzenia sieci tubul, wzorując się na metodzie opisanej przez Iqbal i wsp. (2017). Zdolność komórek śródbłonka pochodzących z aorty szczura do tworzenia połączeń sieciowych oceniano przy użyciu mikroskopu świetlnego. Badanie obejmowało obserwację rozrostu śródbłonka, z podziałem na obszar nieustrukturyzowany lub ustrukturyzowany (Ryc. 13a).



Ryc. 13 Test kielkowania aorty. a – Reprezentatywne zdjęcia kiełkowania komórek aorty wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego (dzień 5 hodowli, pow. 40x). Wytworzoną sieć komórek (kiełkująca aorta) podzielono na dwa obszary: nieustrukturyzowany (czarna strzałka), wychodzący bezpośrednio z krążka aorty, i ustrukturyzowany (czerwona strzałka), powstały za obszarem nieustrukturyzowanym. Skala umieszczona na zdjęciach odpowiada długości 200 μ m. **b** – na wykresie przedstawiono uśrednione wartości z pomiaru promieni sieci komórek w obszarze ustrukturyzowanym [μ m]. Pomiary wykonane zostały z 3 niezależnych zdjęć dla każdego wariantu stymulacji. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu jednoczynnikowej ANOVY z testem posthoc Tuckey'a (p<0,05). Dane przedstawiono jako średnie ± odchylenie standardowe. Różne oznaczenia literowe wskazują na istotne statystycznie różnice między analizowanymi grupami. Grupy z tym samym oznaczeniem literowym nie różnią się istotnie. K – kontrola, komórki niestymulowane, CH – cholesterol, VEGF – czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego.

Następnie w programie Motic Images Advanced 3.2 obliczono średni promień sieci ustrukturyzowanej i promień odległości obszaru nieustrukturyzowanego wychodzącego z krążka aorty. Analiza ilościowa promieni wytworzonych sieci, z podziałem na obszar ustrukturyzowany oraz nieustrukturyzowany, wykazała, że sieć strukturalna wytworzona przez komórki aorty po stymulacji CH rozwinęła się intensywniej w porównaniu do sieci powstałej po stymulacji VEGF, który stanowił kontrolę pozytywną w badaniu (Ryc. 13a). Efekt ten obserwowano zwłaszcza w obszarze ustrukturyzowanym, gdzie widoczne były charakterystyczne połączenia między komórkami przypominające wyglądem unaczynienie. Ocena pomiaru obszaru ustrukturyzowanego wytworzonego w wyniku stymulacji krążków aorty CH wykazała, że CH najintensywniej stymulował wytwarzanie sieci śródbłonka w porównaniu do kontroli spontanicznej, którą stanowiły niestymulowane komórki (p<0,001), oraz do kontroli pozytywnej, którą stanowiły komórki stymulowane VEGF (p<0,01; Ryc. 13a i 13b).

6.1.3 Wpływ cholesterolu na zmiany w komórkach śródbłonka naczyniowego HMEC-1 zachodzące na poziomie transkrypcji genów

W celu wyjaśnienia mechanizmów zachodzących w komórkach śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 w czasie ekspozycji na CH wykonano analizę transkryptomiczną. Transkryptomika zajmuje się określeniem miejsca i czasu aktywności genów poprzez badanie transkryptomu, czyli zestawu cząsteczek mRNA obecnych w określonym momencie w komórce, grupie komórek lub organizmie. Transkryptom w przeciwieństwie do genomu jest bardzo dynamiczny, a komórki w odpowiedzi na działające na nie czynniki włączają bądź wyłączają transkrypcję genów, zmieniając w ten sposób swój transkryptom. Często już kilka minut po zadziałaniu jakiegoś czynnika można zaobserwować zmiany transkyptomiczne powstałe w wyniku reakcji na ten czynnik. Stosując tę metodę można jednocześnie analizować tysiące cząsteczek w każdej próbce (Allison 2019).

Wykonana analiza RNA Seq wykazała ponad 200 istotnych zmian w transkryptomie komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HEMC-1 eksponowanych na działanie CH. Spośród wszystkich zmian zachodzących w komórkach na poziomie transkryptomu wybrano te, które są najbardziej związane z mechanizmami regeneracji śródbłonka naczyniowego (Ryc. 14). W wyniku ekspozycji komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 na CH zaobserwowano istotnie zwiększoną ekspresję genów kodujących białka związane z migracją, proliferacją czy angiogenezą oraz istotnie obniżoną ekspresję niektórych genów związanych z rozwojem stanu zapalnego i zmienność genów związanych z apoptozą.

79



Ryc. 14 Zmiany transkryptomiczne w komórkach śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1. Opis genów uzupełniono przy użyciu bazy Genecards® (https://www.genecards.org/, dostęp w dniu 2.12.2022 r.). Analiza transkryptomiczna została przeprowadzona z użyciem platformy internetowej Degust (https://degust.erc.monash.edu/) przy użyciu standardowych parametrów analizy danych, przyjmując za istotne zmiany na poziomie Log2FC |2| przy współczynniku fałszywych odkryć FDR <0,05.

Szczegółowa analiza danych pozwoliła na wyłonienie genów, których ekspresja nasilała się co najmniej czterokrotnie i przyporządkowanie ich do procesów związanych z regeneracją komórek (Ryc. 15, Tab. 3).

Tab. 3. Poziom ekspresji wybranych genów kodujących białka uczestniczące w procesach regeneracji komórek po 24 godz. stymulacji CH komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1. \uparrow – zwiększenie ekspresji genu w wyniku odpowiedzi na działający czynnik; \downarrow – obniżenie ekspresji genu w wyniku odpowiedzi na działający czynnik. *ADA2* (adenosine deaminase 2 – gen kodujący deaminazę adenozyny 2), *ADAM9* (disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9 – gen kodujący białko 9 zawierające domenę dezintegryny i metaloproteinazy), CIB1 (calcium and integrin binding 1 – gen kodujący białko 1 wiążące wapń i integrynę), FGFR1 (fibroblast growth factor receptor

l – gen kodujący receptor 1 czynnika wzrostu fibroblastów), *KCTD10 (potassium channel tetramerisation domain containing 10* – gen kodujący białko 10 zawierające domenę tetrameryzacji kanału potasowego), *LYRM1 (LYR motif containing 1* – gen kodujący białko 1 zawierające motyw LYR), *MARVELD1 (MARVEL domain containing 1* – gen kodujący białko 1 zawierające domenę MARVEL), *PA2G4 (proliferation-associated 2G4* – gen kodujący białko 2G4 związane z proliferacją), *PAFAH1B1 (platelet-activationg factor acetylhydrolase 1b* – gen kodujący czynnik aktywacji płytek krwi, acetylohydrolaza 1b), *PEAK1 (pseudopodium-enriched atypical kinase 1* – gen kodujący atypową kinazę 1 wzbogaconą w pseudopodium), *PLXND1 (plexin D1* – gen kodujący pleksynę D1), *TGFβ1 (transforming growth factor β 1* – gen kodujący transformujący czynnik wzrostu β 1).

SYMBOL GENU	PRODUKT	RELATYWNY POZIOM EKSPRESJI (Log2FC)
ADA2	deaminaza adenozyny 2	↑ 2,3
ADAM9	białko 9 zawierające domenę dezintegryny i metaloproteinazy	↑ 2,0
CIB1	białko 1 wiążące wapń i integrynę	↑ 2,5
FGFR1	receptor 1 czynnika wzrostu fibroblastów	↑ 2,3
KCTD10	białko 10 zawierające domenę tetrameryzacji kanału potasowego	↑ 2,8
LYRM1	białko 1 zawierające motyw LYR	↑ 2,2
MARVELD1	białko 1 zawierające domenę MARVEL	↑ 2,2
PA2G4	białko 2G4 związane z proliferacją	↑ 2,3
PAFAH1B1	czynnik aktywacji płytek krwi, acetylohydrolaza 1b	↑ 2,0
PEAK1	kinaza atypowa 1 wzbogacona w pseudopodium	↑ 2,2
PLXND1	pleksyna D1	↑ 2,0
TGFβ1	transformujący czynnik wzrostu β 1	↑ 2,4



Ryc. 15 Diagram przedstawiający wybrane geny kodujące białka zaangażowane w procesy związane z migracją, proliferacją, apoptozą i angiogenezą komórek.

Wśród genów ulegających zwiększonej ekspresji w komórkach śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 poddanych działaniu CH szczególnie interesujące w kontekście regeneracji były *PEAK1* i *PLXND1*. Są one związane z migracją komórek oraz szlakami sygnałowymi dla VEGF (Wang i wsp. 2018, Zhang i wsp. 2021). Białko PEAK1 jest kinazą tyrozynową, która wiąże się z cytoszkieletem aktyny i ma wpływ na powstawanie, dojrzewanie i rozdzielanie zrostów adhezyjnych zależnych od integryny, które pełnią rolę w migracji komórek. PEAK1 może promować przerzuty i ulegać ekspresji na wysokim poziomie w przebiegu raka trzustki i jelita grubego u ludzi, a migrację komórek intensyfikuje poprzez szlak sygnałowy zależny od aktywności kinazy Src (Bristow i wsp. 2013).

Dla potwierdzenia obserwacji z RNA-Seq, została wykonana analiza qRT-PCR (Ryc. 16), która wykazała wzrost ekspresji genu *PEAK1* (p<0,05) w komórkach śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 po stymulacji CH, w porównaniu z komórkami niestymulowanymi (Ryc. 16). Natomiast ekspresja *PLXND1* w komórkach śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 stymulowanych CH wykazywała tendencję wzrostową w porównaniu do komórek niestymulowanych, ale nie była istotna statystycznie (Ryc. 16).



Ryc. 16 Nasilenie ekspresji genów *PEAK1* i *PLXND1* po 24 godz. stymulacji CH. Komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 niestymulowane (HMEC-1) lub stymulowane CH (HMEC-1/CH). Analiza qRT-PCR wykonano przy użyciu metody delta ($2-\Delta\Delta$ CT). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu t-Studenta (p<0,05). Dane przedstawiono jako średnie ± odchylenie standardowe.

Wyniki uzyskane w tej części badań przyczyniają się do częściowego potwierdzenia H1 niniejszej rozprawy.

6.1.3.1 Odpowiedź komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 na cholesterol na poziomie transkryptomu w obecności czynnika zakaźnego

Biorąc pod uwagę wysoką częstość występowania zakażeń *Helicobacter pylori (HP)* w populacji ludzkiej i ogólnoustrojowe skutki działania LPS w organizmie w kontekście nieszczelności bariery jelitowej (Moludi i wsp. 2020), a także udział rozpuszczalnych komponentów bakteryjnych w rozwoju miażdżycy, jako przykładu choroby, której towarzyszy utrata homeostazy śródbłonka naczyniowego, ważne jest, aby wziąć pod uwagę czynniki zakaźne w odpowiedzi komórek śródbłonka na poziomie ich transkryptomu (Rosenfeld i Campbell 2011, Chmiela i wsp. 2015). Chociaż LPS *HP* jest słabszą endotoksyną niż LPS *Escherichia coli*, badania na modelu *in vivo Cavia porcellus* pokazują, że połączenie przewlekłej infekcji *HP* i diety bogatej w lipidy pogarsza stan zapalny śródbłonka naczyniowego i jego dysfunkcję, co prowadzi do tworzenia się wysoce aterogennego środowiska sprzyjającego rozwojowi miażdżycy (Chmiela i wsp. 2015, Krupa i wsp. 2021, Tomaszewska i wsp. 2024).

Aby zbadać wpływ komponentu czynnika zakaźnego, jakim jest LPS *HP*, na funkcjonalną odpowiedź eksponowanych na działanie CH komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 na poziomie transkryptomu przeprowadzono analizę transkryptomiczną komórek stymulowanych CH w obecności LPS *HP* (CH+LPS *HP*). Wyniki

w postaci heatmapy przedstawiono na Ryc. 17, a w Tab. 4 przedstawiono ekspresję genów związanych z procesem regeneracji komórek.



Ryc. 17 Zmiany transkryptomiczne w komórkach śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 po 24 godz. stymulacji. Na heatmapie przedstawione zostały transkrypty, które uległy istotnym zmianom w czasie stymulacji komórek śródbłonka naczyniowego HMEC-1 przy użyciu CH, LPS *HP* i CH/LPS *HP*. Tanskrypty zostały sklasyfikowane przy użyciu narzędzia ClustVist (Metsalu i Vilo 2015), za pomocą którego można dokonać analizy klastrowania hierarchicznego HCA. (* istotna zmiana w analizowanym układzie (≥2 lub ≤–2), ↑ – zwiększenie ekspresji genu w wyniku odpowiedzi na działający czynnik; ↓ – obniżenie ekspresji genu w wyniku odpowiedzi na działający czynnik). Opis genów uzupełniono

przy użyciu bazy Genecards[®]. CH – cholesterol, LPS *HP* – lipopolisacharyd *Helicobacter pylori*.

Tab. 4. Poziom ekspresji wybranych genów kodujących białka uczestniczące w procesach regeneracji komórek śródbłonka po 24 godz. stymulacji CH, LPS HP lub CH w obecności LPS HP. ADA2 (adenosine deaminase 2 - gen kodujący deaminazę adenozyny 2), ADAM9 (disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9 - gen kodujący białko 9 zawierające domenę dezintegryny i metaloproteinazy), CASP10 (caspase 10 - gen kodujący kaspaze 10), CIB1 (calcium and integrin binding 1 – gen kodujący białko 1 wiążące wapń i integryne), FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1 – gen kodujacy receptor 1 czynnika wzrostu fibroblastów), ICAM2 (intercellular adhesion molecule 2 - gen kodujący międzykomórkową cząsteczkę adhezyjną 2), KCTD10 (potassium channel tetramerisation domain containing 10 - gen kodujący białko 10 zawierające domenę tetrameryzacji kanału potasowego), LYRM1 (LYR motif containing 1 - gen kodujący białko 1 zawierające motyw LYR), MARVELD1 (MARVEL domain containing 1 – gen kodujący białko 1 zawierające domenę MARVEL), PA2G4 (proliferation-associated 2G4 - gen kodujący białko 2G4 związane z proliferacją), PAFAH1B1 (platelet-activationg factor acetylhydrolase 1b – gen kodujący czynnik aktywacji płytek krwi, acetylohydrolaza 1b), PEAK1 (pseudopodium-enriched atypical kinase 1 - gen kodujący atypową kinazę 1 wzbogaconąw pseudopodium), *PLXND1* (plexin D1 – gen kodujący pleksynę D1), *TGFβ1* (transforming growth factor β 1 – gen kodujący transformujący czynnik wzrostu β 1). \uparrow – zwiększenie ekspresji genu w wyniku odpowiedzi na działający czynnik; ↓ – obniżenie ekspresji genu w wyniku odpowiedzi na działający czynnik.

	STYMULACJA				
SYMBOL GENU	СН	LPS HP	CH+LPS HP		
	POZIOM EKSPRESJI				
ADA2	1	\downarrow	1		
ADAM9	↑	\downarrow	\downarrow		
CASP10	\downarrow	↑	1		
CIB1	Ť	↑	1		
FGFR1	↑	\downarrow	1		
ICAM2	1	\downarrow	\downarrow		
KCTD10	Ť	\downarrow	\downarrow		
LYRM1	1	\downarrow	\downarrow		
MARVELD1	1	\downarrow	\downarrow		
PA2G4	1	\downarrow	1		
PAFAH1B1	1	\downarrow	\downarrow		
PEAK1	1	\downarrow	1		
PLXND1	1	Ļ	Ļ		

Dane wskazują, że ekspresja genów kodujących białka LYRM1, KCTD10, MARVELD1, PLXND1, PAFAH1B1 i ICAM2, które są zaangażowane w procesy angiogenezy, była znacząco obniżona po stymulacji LPS *HP*. Sugeruje to zmniejszenie zdolności komórek śródbłonka do migracji i proliferacji w obecności LPS *HP*. Z drugiej strony, obecność LPS *HP* w układzie z CH nie obniżała ekspresji genów kodujących białka PEAK1, FGFR1, ADA2, CIB1 i PA2G4 w komórkach śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1. Natomiast ekspresja genu kodującego białko ADAM9 znacząco obniżyła się w komórkach śródbłonka stymulowanych CH z powodu obecności w próbie LPS *HP*. Literatura naukowa wskazuje, że białko ADAM9 jest zaangażowane w fizjologiczną angiogenezę, np. podczas rozwoju embrionalnego serca, ale także w angiogenezę związaną z rozwojem nowotworów (Chou i wsp. 2020).

- 6.2 Przygotowanie i charakterystyka kompozytów polilaktydowych wykazujących potencjał proregeneracyjny względem komórek śródbłonkowych i kostnych
- 6.2.1 Charakterystyka właściwości fizyko-chemicznych i biologicznych włókien apatytowych przeznaczonych do modyfikacji cholesterolem stanowiących wypełniacz kompozytów polilaktydowych

Włókna apatytowe niemodyfikowane oraz modyfikowane CH zostały przygotowane przez zespół dr inż. Moniki Biernat z Grupy Badawczej Biomateriały, Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie. W metodzie półhydrotermalnego strącania w środowisku H₂O₂ uzyskano trójfazowy produkt w postaci włókien apatytowych o długości 18,84 ± 4,06 µm, które składają się w 71,08±0,17% z hydroksyapatytu (PDF 01-073-2656), w 13,43±0,15% z pirofosforanu wapnia (PDF 00-009-0346) oraz w 15,49±0,14% z β-TCP (PDF 00-055-0898). Skład fazowy uzyskanego produktu określano za pomocą metody XRD, która pozwala na analizę właściwości fizycznych proszków czy próbek stałych (Ryc. 18).



Ryc. 18 Widmo dyfrakcji promieni rentgenowskich otrzymanych włókien apatytowych. W skład włókien apatytowych wchodzi hydroksyapatyt, pirofosforan wapnia i trójfosforan wapnia. Cps (*counts per second* – liczba zliczeń na sekundę).

Morfologię włókien oraz ich długość oceniano przy pomocy SEM, według metody opisanej przez Biernat i wsp. 2022 (Ryc. 19).



Ryc. 19 Reprezentatywne zdjęcie włókien apatytowych. Średnia długość włókien wynosi 18,84±4,06 μm, a średnica 1,13±0,24 μm. Skala umieszczona na zdjęciach odpowiada 100 μm (pow. 2000x).

W celu oceny właściwości biologicznych włókien apatytowych, czyli ich zdolności do promowania wytwarzania tubul przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 wykonano test formowania tubul na trójwymiarowej strukturze ECM (ang. *tube formation assay*). Komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 inkubowano na ECM w obecności włókien apatytowych, a formujące się tubule wizualizowano z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego i konfokalnego. Kontrolę w badaniu stanowiły komórki niestymulowane hodowane na macierzy zewnątrzkomórkowej ECM. Wizualizacja przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego z odwróconym polem widzenia wykazała, że komórki w obecności włókien apatytowych utworzyły tubule na ECM, podczas gdy nie zaobserwowano tego zjawiska w układzie kontrolnym (Ryc. 20a). Wyniki potwierdzono także w czasie obserwacji z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego, po uprzednim wybarwieniu komórek (Ryc. 20b).



Ryc. 20 Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające strukturę tubul wytworzonych przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1. a –Zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego (pow. 4x). **b** – Zdjęcia wykonane z obrazów uzyskanych przy użyciu mikroskopu konfokalnego (pow. 100x). K – kontrola, komórki niestymulowane, Aktyna – Falloidyna Texas Red (czerwona fluorescencja), DNA – DAPI (niebieska fluorescencja). Skala umieszczona na zdjęciach odpowiada 250 μm.

W następnym etapie badań przystąpiono do modyfikacji włókien apatytowych CH. Modyfikacje przeprowadzano dwoma sposobami, z wykorzystaniem metody opartej na roztworze wodnym lub etanolowym. Włókna apatytowe w wyniku modyfikacji CH nieznacznie zmieniły swoje wymiary. Wpływ na to miało mieszanie magnetyczne prowadzone w celu adsorpcji CH na powierzchni cząstek włókien apatytowych. Modyfikowane CH włókna apatytowe oceniano przy użyciu SEM (Ryc. 21).



Ryc. 21 Reprezentatywne zdjęcia włókien apatytowych modyfikowanych CH. a – Włókna apatytowe modyfikowane CH rozpuszczonym w etanolu – W MCH EtOH. Średnia długość włókien wynosi 17,33±4,11 µm. b – Włókna apatytowe modyfikowane CH rozpuszczonym w wodzie – W MCH H₂O. Średnia długość włókien wynosi 16,36±3,40 µm. Skala umieszczona na zdjęciach odpowiada 50 µm (pow. 2500x).

Strukturę chemiczną uzyskanych cząstek modyfikowanych CH potwierdzano z zastosowaniem spektroskopii FTIR. Na widmach włókien (Ryc. 22a i 22b) modyfikowanych CH rozpuszczonym w etanolu lub wodzie widoczne są pasma absorpcji pochodzące od CH przy:

- ok. 3400 cm⁻¹ (drgania rozciągające grupy OH),
- 2800-3000 cm⁻¹ (asymetryczne i symetryczne drgania rozciągające grup CH₂ i CH₃)

oraz nakładające się z pasmami pochodzącymi od PO4³⁻ w hydroksyapatycie:

- 1055 cm⁻¹ (ostry pik pochodzący od deformacji pierścienia cholesterolowego),
- 840 cm⁻¹ (pasmo przypisane drganiom rozciągającym C-C-C w cholesterolu),
- 900-675 cm⁻¹ (pasmo przypisywane drganiom zginającym C-H poza płaszczyzną charakterystyczne dla podstawienia aromatycznego).

Co ciekawe, w widmie cząstek modyfikowanych CH rozpuszczonym w wodzie (Ryc. 22b) widoczne są dodatkowe pasma absorpcji przy:

- 1464 cm⁻¹ (przypisane asymetrycznym drganiom rozciągającym grup CH₂ i CH₃)
- 1378 cm⁻¹ (związane z drganiami zginającymi grup CH₂ i CH₃ w cząsteczce cholesterolu).

Otrzymane widma pozwalają na potwierdzenie skuteczności modyfikacji włókien apatytowych CH.



Ryc. 22 Widma włókien apatytowych modyfikowanych CH analizowane metodą FTIR. a – Widmo FTIR dla modyfikacji CH rozpuszczonym w etanolu. **b** – Widmo FTIR dla modyfikacji CH rozpuszczonym w wodzie.

Dodatkowo, skuteczność modyfikacji włókien apatytowych potwierdzono stosując analizę termiczną (Ryc. 23). W pomiarach wykonanych podczas analizy termograwimetrycznej/różnicowej analizy termicznej (TG – *thermogravimetric/*DTA – *differential thermal analysis*) zaobserwowano dodatkowy ubytek masy włókien w czasie

ogrzewania w przedziale temperaturowym 200-350°C dla cząstek apatytowych modyfikowanych CH w porównaniu do niemodyfikowanych włókien. Wyniki wskazują na rozkład dodatkowych substancji, które są mniej odporne termicznie niż sam hydroksyapatyt (w tym przypadku jest to zastosowany modyfikator, czyli CH). Ubytek masy w przedziale 200-350°C wynosi ok. 1,4%, co jest w przybliżeniu zgodne z ilością dodanego w czasie modyfikacji CH (1,5% w stosunku do ilości cząstek apatytowych). Uzyskane wyniki badań wskazują na skuteczną modyfikację włókien apatytowych CH.



Ryc. 23 Analiza termiczna włókien apatytowych niemodyfikowanych i modyfikowanych CH.

6.2.2 Charakterystyka fizyko-chemiczna i biologiczna kompozytów polilaktydowych z dodatkiem włókien apatytowych niemodyfikowanych i modyfikowanych cholesterolem

Porowate kompozyty PLA zostały otrzymane na drodze liofilizacji PLA z włóknami apatytowymi niemodyfikowanymi lub modyfikowanymi CH przez zespół dr inż. Moniki Biernat z Grupy Badawczej Biomateriały, Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie. Ich mikrostruktura została scharakteryzowana przy użyciu techniki SEM (Ryc. 24a).



Ryc. 24 Mikrostruktura i rozkład wielkości porów kompozytów PLA z dodatkiem włókien apatytowych niemodyfikowanych lub modyfikowanych CH. a – Wielkość porów uwidoczniona przy użyciu SEM. Skala umieszczona na zdjęciach odpowiada 500 i 50 μm (pow. 250x i 2000x). **b** – Rozkład ilości [%] i wielkości [μm] porów kompozytów. Wielkość porów oszacowano na podstawie pomiaru średnicy ekwiwalentnej stosowanej w przypadku porów o nieregularnym kształcie.

Na zdjęciach zaobserwowano wyraźnie porowatą strukturę w całej objętości kompozytu, niezależnie od tego czy kompozyt zawierał włókna apatytowe niemodyfikowane, czy modyfikowane CH (Ryc. 24a, pow. 250x). Obserwacja mikrostruktury kompozytów wykonana w powiększeniu 2000x pokazała, że włókna apatytowe umieszczone są głównie w ścianach porów i są wbudowane w matrycę polimerową, co mogłoby wskazywać, że będą pełnić w kompozycie dodatkową funkcję wzmacniającą porowate rusztowania (Ryc. 24a). Na podstawie obrazowania SEM oraz pomiarów wielkości porów kompozytowych sporządzono wykresy rozkładu wielkości porów. Wykazano, że w przypadku kompozytu z włóknami apatytowymi niemodyfikowanymi oraz modyfikowanymi CH, rozpuszczonym

w wodzie, największy udział w kompozycie mają pory o wielkości 100-150 μm (Ryc. 24b). W przypadku kompozytów z udziałem włókien apatytowych modyfikowanych CH rozpuszczonym w etanolu nieco więcej jest porów większych, w przedziale 150-200 μm (Ryc. 24b). Kompozyty zostały zaprojektowane w taki sposób, aby zawierały zarówno materiał apatytowy (trójfazowy fosforan wapnia) jak i substancję aktywną (CH). Zawartość CH w gotowych kompozytach była ustalana na poziomie 0,15%, dlatego modyfikowane włókna apatytowe o zawartości 1,5% cholesterolu były dodawane w ilości 10% w stosunku do matrycy polimerowej (PLA). Skład kompozytów potwierdzano poprzez badania wytrzymałości termicznej (Ryc. 25), w której określano ubytek masy, a zatem zawartości stałej pozostałości po wygrzewaniu, która wynosi ok. 10% i odpowiada w dużej mierze zawartości dodanego fosforanu wapnia (włókna apatytowe).



Ryc. 25 Analiza termiczna kompozytu PLA z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH.

Wytworzone kompozyty PLA scharakteryzowano również pod kątem wytrzymałości mechanicznej, gdzie określano ich wytrzymałość na ściskanie. Wykazano, że ani modyfikacja włókien apatytowych CH ani sposób rozpuszczania CH nie miały wpływu na wytrzymałość uzyskanych kompozytów na ściskanie, która dochodziła do 0,6 MPa przy odkształceniu równym 50% (Ryc. 26).



Ryc. 26 Wytrzymałość na ściskanie kompozytów PLA z dodatkiem włókien apatytowych niemodyfikowanych lub modyfikowanych CH.

PLA jest bezpiecznym i biokompatybilnym materiałem wchodzącym w skład wielu różnych kompozytów stosowanych w medycynie regeneracyjnej. PLA znalazł swoje zastosowanie w inżynierii tkankowej, stomatologii, okulistyce czy w leczeniu złamań kości. Używa się go również do produkcji szwów rozpuszczalnych czy jako nośnik leków (Ramot i wsp. 2016).

Cytobiozgodność PLA jako matrycy samego kompozytu, jak i matrycy PLA wraz z dodatkiem włókien apatytowych została potwierdzona testem redukcji MTT, w którym oceniano aktywność metaboliczną komórek. Wyniki tych badań zostały przedstawione w publikacji, której jestem współautorką (Biernat i wsp. 2022). Komórki referencyjnej linii fibroblastów myszy L929 (zgodnie z normą ISO-10993-5-2009) i osteoblasty człowieka hFOB 1.19 hodowano w obecności kompozytu PLA (5PLA) oraz kompozytu PLA z dodatkiem włókien apatytowych (5PLA10W). Wyniki pokazane na Ryc. 27 wskazują, że zarówno kompozyty 5PLA, jak i 5PLA10W są cytobiozgodne wobec obu linii komórkowych (Ryc. 27). Komórki hodowane w obecności obu kompozytów wykazały aktywność metaboliczną na poziomie komórek niestymulowanych, czyli 100% aktywności, co dało podstawę, aby uznać oba kompozyty za bezpieczne dla komórek i gotowe do użycia w dalszych badaniach.



Ryc. 27 Aktywność metaboliczna fibroblastów myszy L929 (a) i osteoblastów człowieka hFOB 1.19 (b) hodowanych w obecności kompozytów PLA niezawierających włókien apatytowych (5PLA) lub zawierających włókna apatytowe niemodyfikowane (5PLA_10W). Czerwona ramka wskazuje na wyniki uzyskane dla kompozytów testowanych w pracy doktorskiej. R – certyfikowany materiał referencyjny (fragment kaniuli); NC – kontrola negatywna (komórki traktowane 2% saponiną); PC – kontrola pozytywna (komórki niestymulowane). Ryciny pochodzą z publikacji Biernat i wsp. 2022.

Oprócz oceny cytobiozgodności kompozytów oznaczano także ich potencjalne działanie stymulacyjne wobec komórek immunokompetentnych, które są wyznacznikiem w ocenie właściwości prozapalnych badanych substancji. W publikacji, której jestem współautorką (Biernat i wsp. 2022), przedstawiono wyniki testu aktywacji monocytów reporterowych człowieka THP1-BlueTM NF-κB w odpowiedzi na ich ekspozycję na kompozyty 5PLA oraz 5PLA_10W. Zarówno kompozyty 5PLA, jak i 5PLA_10W nie aktywowały monocytów, a więc nie pobudzały w komórkach ścieżki sygnałowej NF-κB, typowej dla wzbudzenia stanu zapalnego (Ryc. 28, Biernat i wsp. 2022).



Ryc. 28 Aktywacja monocytów reporterowych człowieka THP1-BlueTM hodowanych w obecności kompozytów PLA niezawierających włókien apatytowych (5PLA) lub zawierających włókna apatytowe niemodyfikowane (5PLA_10W). Czerwona ramka wskazuje na wyniki uzyskane dla kompozytów testowanych w pracy doktorskiej. MCCB – certyfikowany materiał referencyjny (fragment kaniuli); NC – kontrola negatywna (komórki niestymulowane); PC – kontrola pozytywna (komórki stymulowane LPS *Escherichia coli*). Rycina pochodzi z publikacji Biernat i wsp. 2022.

Wyniki przedstawione na Ryc. 27 i Ryc. 28 wskazują, że kompozyt PLA niezawierający wypełniacza w postaci włókien apatytowych (5PLA), stanowiący matrycę całego kompozytu oraz kompozyt PLA zawierający wypełniacz z włókien apatytowych (5PLA_10W), będący w układzie doświadczalnym kompozytem referencyjnym, są biozgodne i mogą być zastosowane w dalszych badaniach *in vitro* i *in vivo*.

W kolejnym etapie badań oceniano aktywność metaboliczną komórek referencyjnej linii fibroblastów myszy L929 hodowanych w obecności kompozytów PLA z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH rozpuszczonym w wodzie (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%) lub w etanolu (5PLA10WMCH(EtOH)0,15%) (Ryc. 29).

96



Ryc. 29 Ocena cytobiozgodności badanych kompozytów PLA z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH wobec fibroblastów myszy L929 po 24 godz. stymulacji. KT – kontrola negatywna (komórki stymulowane 1% H_2O_2); KNT – kontrola pozytywna (komórki niestymulowane); R – certyfikowany materiał referencyjny (fragment kaniuli).

Fibroblasty myszy L929 po ekspozycji na kompozyty PLA z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH rozpuszczonym w wodzie lub etanolu wykazywały aktywność metaboliczną na poziomie komórek stymulowanych materiałem referencyjnym (R) lub komórek niestymulowanych, hodowanych w samym podłożu (KNT) (Ryc. 29). Na podstawie uzyskanych wyników można uznać, że kompozyty PLA z dodatkiem wypełniacza w postaci włókien apatytowych modyfikowanych CH (5PLA10WMCH(EtOH)0,15% i 5PLA10WMCH(H₂O)0,15%) są cytobiozgodne i mogą być zastosowane w dalszych badaniach *in vitro* i *in vivo*.

6.2.2.1 Badanie właściwości kompozytów polilaktydowych z dodatkiem włókien apatytowych niemodyfikowanych i modyfikowanych cholesterolem do promowania zasiedlania komórek kostnych i śródbłonkowych

Kompozyty PLA z wypełniaczem w postaci włókien apatytowych mają strukturę porowatą o średniej wielkości porów w zakresie 50-250 µm, przy czym najczęściej występujące otwory w strukturze kompozytów mają wielkość od 100 do 150 µm (Ryc. 24). W celu oceny właściwości adhezyjnych badanych kompozytów w stosunku do komórek kostnych, osteoblasty człowieka hFOB.1.19 hodowano na powierzchni kompozytu PLA z niemodyfikowanymi włóknami apatytowymi (5PLA10W) oraz zawierających włókna apatytowe modyfikowane CH rozpuszczonym w wodzie (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%) lub w etanolu (5PLA10WMCH(EtOH)0,15%). Hodowala komórek w obecności

97

biokompozytów prowadzona była przez 7, 14 i 21 dni, a po każdym punkcie czasowym komórki utrwalano i obserwowano przy użyciu SEM. Kontrolą układu doświadczalnego były kompozyty, na których nie hodowano komórek kostnych. (Ryc. 30).



Ryc. 30 Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające wzrost osteoblastów człowieka hFOB 1.19 na kompozytach PLA z dodatkiem włókien apatytowych niemodyfikowanych (5PLA10W) lub modyfikowanych CH (5PLA10WMCH(H2O)0,15% i 5PLA10WMCH(EtOH)0,15%) po 7, 14 i 21 dniach hodowli. Zdjęcia wykonano przy użyciu SEM (pow. ok. 900x).

Na postawie obserwacji mikroskopowej hodowli osteoblastów człowieka hFOB 1.19 na kompozytach PLA z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH można wnioskować, że badane kompozyty wykazują właściwości promujące wzrost komórek kostnych i to już od wczesnego etapu hodowli (7 dni), a wzrost komórek był coraz bardziej intensywny wraz z wydłużonym czasem hodowli (14 i 21 dni) (Ryc. 30). Modyfikacja włókien apatytowych CH, bez względu na sposób jego rozpuszczenia (woda/etanol), widocznie nasilała zasiedlanie kompozytów przez komórki osteoblastów człowieka hFOB 1.19 (Ryc. 30), jednakże do kolejnych doświadczeń wybrano kompozyt PLA zawierający włókna apatytowe modyfikowane CH rozpuszczonym w wodzie (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%). Wybór biokompozytu był powodowany tym, że wykazywał podobny do kompozytu referencyjnego (5PLA10W) układ porów, z przewagą porów o wielkości 100-150 μm (Ryc. 24).

W celu przeprowadzenia ilościowej oceny komórek kostnych zasiedlających kompozyty 5PLA10W oraz 5PLA10WMCH(H₂O)0,15% oznaczono liczbę komórek w poszczególnych punktach czasowych hodowli (7-28 dni) (Ryc. 31).



Ryc. 31 Liczba osteoblastów człowieka hFOB 1.19 zasiedlających kompozyty po 7, 14, 21 i 28 dniach hodowli. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej ANOVY z testem posthoc Tuckey'a (p<0,05). Dane przedstawiono jako średnie \pm odchylenie standardowe. Różne oznaczenia literowe wskazują na istotne statystycznie różnice między analizowanymi grupami. K – kompozyt referencyjny (5PLA10W), 5PLA10WMCH(H₂O)0,15% – badany biokompozyt z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH rozpuszczonym w wodzie.

W dniu rozpoczęcia hodowli (czas 0) na każdy badany kompozyt nanoszono 0,5x10⁶ osteoblastów człowieka hFOB 1.19, jednakże po 7 dniach hodowli, bez względu na typ testowanego kompozytu, wykazano blisko 10-krotnie mniejszą liczbę komórek. Może się to wiązać z mechanicznym ich uszkodzeniem w momencie nanoszenia na powierzchnię kompozytów. Na dalszych etapach hodowli (14, 21 i 28 dni) liczba osteoblastów człowieka hFOB 1.19 nadal spadała w porównaniu do 7-dniowej hodowli (p<0,05) i nie obserwowano różnic pomiędzy kompozytem referencyjnym (5PLA10W), a biokompozytem badanym (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%) (p>0,05, Ryc. 31). Ostatecznie, w dniu 21 i 28 hodowli, liczba komórek nie ulegała zmianie, w stosunku do 14 dnia hodowli, a to może świadczyć o zasiedlaniu kompozytów przez komórki kostne. Uzyskane wyniki wskazują, że w hodowli

komórek kostnych na kompozycie referencyjnym (5PLA10W) i biokompozycie badanym (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%), nie dochodzi do namnażania się komórek.

Następnie oceniano stężenie IL-6 (Ryc. 32) oraz ALP (Ryc. 33), markerów osteogenezy, w płynach pohodowlanych osteoblastów człowieka hFOB1.19 po 7, 14, 21 i 28 dniach hodowli w obecności kompozytów.



Ryc. 32 Stężenie IL-6 w płynach pohodowlanych osteoblastów człowieka hFOB 1.19 po 7, 14, 21 i 28 dniach hodowli na kompozytach. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej ANOVY z testem posthoc Tuckey'a (p<0,05). Dane przedstawiono jako średnie \pm odchylenie standardowe. Różne oznaczenia literowe wskazują na istotne statystycznie różnice między analizowanymi grupami. K – kompozyt referencyjny (5PLA10W), 5PLA10WMCH(H₂O)0,15% – badany biokompozyt z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH rozpuszczonym w wodzie.

IL-6 jest cytokiną warunkującą utrzymanie homeostazy komórek kostnych (Loi i wsp. 2016). Wykazano, że stężenie IL-6 w dniu 7 hodowli jest najniższe i ma tendencję wzrostową osiągając swoje maksimum w dniu 21 trwania hodowli (p<0,001). Uzyskany wynik odpowiada pomiarom liczby komórek osteoblastów człowieka hFOB 1.19 (Ryc. 31). Komórki nanoszone na kompozyty w dniu 0 ulegały uszkodzeniu w pierwszych godzinach hodowli, a ich liczba spadała 10-krotnie (pomiar liczby komórek w dniu 7). Utrzymanie się komórek na kompozytach i różnicowanie wymagało intensywniejszego wydzielania IL-6 (Ryc. 32). Takiej obserwacji dokonano wobec kompozytu referencyjnego (5PLA10W) oraz biokompozytu badanego (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%).

ALP jest markerem kościotworzenia, a jej stężenie w hodowli osteoblastów człowieka hFOB 1.19 w obecności kompozytów PLA pozostawało na podobnym poziomie w czasie 7-28

dni. W układzie badanym stężenie ALP jest jednak istotnie niższe w porównaniu do układu kontrolnego przez cały czas trwania hodowli (p<0,001), z wyłączeniem pomiaru w 14 dniu (p>0,05). W przypadku hodowli komórek w obecności biokompozytu 5PLA10WMCH(H₂O)0,15% stężenie ALP jest istotnie wyższe w 14 dniu hodowli w porównaniu do dnia 7 (p<0,001), 21 (p<0,01) i 28 (p<0,001).



Ryc. 33 Stężenie ALP w płynach pohodowlanych osteoblastów człowieka hFOB 1.19 po 7, 14, 21 i 28 dniach hodowli na kompozytach. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu testu dwuczynnikowej ANOVY z testem posthoc Tuckey'a (p<0,05). Dane przedstawiono jako średnie ± odchylenie standardowe. Różne oznaczenia literowe wskazują na istotne statystycznie różnice między analizowanymi grupami. K – kompozyt referencyjny (5PLA10W), 5PLA10WMCH(H₂O)0,15% – badany biokompozyt z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH rozpuszczonym w wodzie.

Uzyskane wyniki potwierdzają obserwacje dotyczące pomiaru liczby osteoblastów człowieka hFOB 1.19 w czasie oraz stężenia wydzielonej IL-6. Komórki po 7 dniach hodowli w obecności kompozytów zasiedlają je, ale nie namnażają się, a ich wygląd morfologiczny (Ryc. 30) wskazuje na proregeneracyjny/prokościotwórczy potencjał badanego biokompozytu.

Wyniki uzyskane w tej części badań przyczyniają się do potwierdzenia H2 niniejszej rozprawy.

Prowadzono także hodowle komórek śródbłonka naczyniowego HMEC-1 w obecności kompozytów PLA z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH rozpuszczonym w wodzie (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%) lub etanolu (5PLA10WMCH(EtOH)0,15%). Po 7 dniach hodowli nie zaobserwowano zasiedlania kompozytów przez komórki śródbłonka

HMEC-1 (brak komórek w obrazach mikroskopowych uzyskanych przy użyciu SEM), co może wskazywać na ich obumieranie.



Ryc. 34 Zasiedlanie kompozytów polilaktydowych z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 po 7 dniach hodowli. Reprezentatywne zdjęcia wykonano przy użyciu SEM (pow. ok. 900x). Nie zaobserwowano zasiedlania żadnego z kompozytów przez komórki śródbłonka naczyniowego HMEC-1.

Dodatkowo wykonano doświadczenie, w którym komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 hodowano w obecności kompozytów opłaszczonych uprzednio kolagenem. Obserwacje wykonane przy użyciem SEM wskazują, że komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 nie zasiedlały badanych kompozytów, pomimo obecności warstwy opłaszczającej w postaci kolagenu. Obecność CH w kompozycie PLA z dodatkiem włókien apatytowych nie zmieniała jego właściwości biologicznych względem komórek. Komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 nie zasiedlały kompozytów, zarówno referencyjnego (5PLA10W), jak i modyfikowanych (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%).

6.2.2.2 Badanie biozgodności kompozytu polilaktydowego z dodatkiem włókien apatytowych niemodyfikowanych i modyfikowanych cholesterolem na modelu *in vivo*

Biozgodność wyselekcjonowanego kompozytu PLA z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH rozpuszczonym w wodzie (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%) wykonano z wykorzystaniem modelu szczurzego stosując badanie miejscowej odpowiedzi tkankowej oraz reakcji uogólnionej na wszczepienie kompozytu. Wybierając model badawczy *in vivo*

wzięto pod uwagę typ kontaktu kompozytu z tkanką (kontakt z tkanką miękką) oraz czas ekspozycji (dłuższa niż 30 dni) i zaplanowano go w oparciu o normę PN-EN ISO 10993-6:2017 "Biologiczna ocena wyrobów medycznych/Badania miejscowej reakcji po implantacji". W doświadczeniu zwierzętom wszczepiano podskórnie biokompozyt 5PLA10WMCH(H₂O)0,15%, a następnie obserwowano oznaki miejscowej reakcji zapalnej po 7, 30 i 90 dniach (zaczerwienienie skóry, obrzęk w miejscu wszczepienia, podwyższona temperatura ciała) od wszczepienia. Po każdym punkcie czasowym zwierzęta poddawano eutanazji, a wyizolowane biokompozyty oceniano w badaniu histologicznym we współpracy z drem Jarosławem Szwalskim z akredytowanego laboratorium patologicznego Cytopath w Łodzi.



Ryc. 35 Badanie biozgodności biokompozytu 5PLA10WMCH(H2O)0,15% w układzie *in vivo* w ocenie miejscowej odpowiedzi tkankowej po 7, 30 i 90 dniach od wszczepienia. Reprezentatywne zdjęcie fragmentów kompozytów barwionych hematoksyliną i eozyną (pow. 400x).

Obserwacja mikroskopowa cienkowarstwowych preparatów przekrojów poprzecznych biokompozytów wyizolowanych po 7, 30 i 90 dniach od wszczepienia pokazała typowy obraz histologiczny prezentujący odpowiedź zapalną generowaną w organizmie po ingerencji chirurgicznej. Po 7 dniach od wszczepienia biokompozytu widoczne były nacieki makrofagów, które pełnią rolę komórek oczyszczających obszar pooperacyjny (Ryc. 35). Następnie, w czasie 30, a potem 90 dni od wszczepienia biokompozytu w preparatach histopatologicznych obserwowano formowanie się tkanki łącznej wraz z towarzyszącym jej ukrwieniem, natomiast nie zaobserwowano oznak reakcji zapalnej o charakterze patologicznym.

Dodatkowo, w preparatach cienkowarstwowych przekrojów poprzecznych biokompozytów oceniano ekspresję markera komórek śródbłonka naczyniowego CD31, który pełni ważną rolę w utrzymaniu homeostazy komórek śródbłonka w miejscach ich stymulacji (Caligiuri 2020). Analiza ta była następstwem obserwacji unaczynienia obszarów tkanki łącznej po 7, 30 i 90 dniach od wszczepienia biokompozytu 5PLA10WMCH(H₂O)0,15%.



Ryc. 36 Ocena ekspresji CD31 w obszarze kompozytu 5PLA10WMCH(H₂O)0,15% po 7, 30 i 90 dniach od wszczepienia podskórnego w badaniu miejscowej odpowiedzi tkankowej. Reprezentatywne zdjęcia wykonane z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego Leica (pow. 100x). CD31 – (zielona fluorescencja), DNA – (niebieska fluorescencja).

Analiza mikroskopowa przekrojów poprzecznych badanego biokompozytu 5PLA10WMCH(H₂O)0,15%, po 7 dniach od wszczepienia pokazała, że w jego obszarze występuje słaba ekspresja markera komórek śródbłonkowych CD31, co potwierdza obraz uzyskany w badaniu histologicznym (po 7 dniach widoczne były głównie nacieki makrofagów, Ryc. 35). W czasie 30, a następnie 90 dni od wszczepienia kompozytu w preparatach histologicznych zaobserwowano formowanie się unaczynionej tkanki łącznej, co potwierdzono w mikroskopii fluorescencyjnej. Zarówno w obszarze kompozytu badanego, jak i na jego obrzeżu widoczna była silna ekspresja CD31 (Ryc. 36).

6.3 Badanie bioefektywności kompozytu polilaktydowego z dodatkiem włókien apatytowych niemodyfikowanych i modyfikowanych cholesterolem na modelu *in vivo*

Bioefektywność kompozytu PLA z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%) badano w układzie *in vivo* w teście zarastania ubytków kości czaszki (Samsonraj i wsp. 2017, Zeng i wsp. 2019), a uzyskane wyniki porównywano z wynikami otrzymanymi dla kompozytu referencyjnego (5PLA10W). W czaszkach dorosłych szczurów rasy Wistar nawiercano dwa otwory w obszarze wyznaczonym przez szwy czaszkowe bregma/lambda (Ryc. 38). Następnie w jeden z ubytków implantowano kompozyt,

podczas gdy drugi pozostawiano do samoistnego zarośnięcia. Po 4, 8 i 12 tygodniach od implantacji, po eutanazji zwierząt, izolowano kompozyty i przeprowadzano analizę histopatologiczną w oparciu o ekspertyzę dra Jarosława Szwalskiego – kierownika akredytowanego laboratorium patologicznego Cytopath w Łodzi.



Ryc. 37 Procedura implantacji doczaszkowej kompozytów PLA z dodatkiem włókien apatytowych niemodyfikowanych lub modyfikowanych CH. Procedurę wykonano w następujących etapach: \mathbf{a} – odsłonięcie czaszki, \mathbf{b} – wykonanie otworów w czaszce, \mathbf{c} – umieszczenie kompozytów w ubytkach kostnych i zamknięcie pola operacyjnego poprzez założenie szwów chirurgicznych.

Analiza histologiczna cienkowarstwowych preparatów przekrojów poprzecznych biokompozytów wraz z otaczającą kością (barwienie hematoksyliną i eozyną) opierała się na obserwacji miejsca powstawania "nowej kości" na styku ubytków kostnych i badanych kompozytów. Po 4 tygodniach od implantacji kompozytów w ubytki kostne czaszki w preparatach histologicznych zaobserwowano przede wszystkim histiocyty, odgrywające główną rolę w przebudowie tkanek i gojeniu ran (Ryc. 38).



Ryc. 38 Reprezentatywne zdjęcia przekrojów poprzecznych ubytków kości czaszki wypełnionych kompozytem referencyjnym (5PLA10W) lub kompozytem PLA z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%). Ocenę histopatologiczną wykonano po 4, 8 i 12 tygodniach od implantacji kompozytów. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego (pow. 400x).

W obszarach bezpośredniego kontaktu kompozytu z kością czaszki obserwowano początki procesu mineralizacji, a także pojawianie się pierwszych osteoblastów. Na szczególną uwagę dodatkiem zasługuje kompozyt z włókien apatytowych modyfikowany CH (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%), ponieważ po 8 tygodniach od implantacji w ubytek kości czaszki stał się szkieletem do wytworzenia gęstej sieci dobrze unaczynionych komórek, a w obszarach bezpośredniego kontaktu kompozytu z kością obserwowano odtwarzanie się kości (Ryc. 38). Na podstawie obserwacji mikroskopowej cienkowarstwowych preparatów fragmentów czaszek zwierząt z ubytkami kostnymi wypełnionymi kompozytami można sugerować, że czas 8 tygodni od implantacji może być czasem najbardziej optymalnym do oceny bioefektywności ich działania proregeneracyjnego. Po 4 tygodniach od doczaszkowej implantacji działanie biokompozytu badanego lub kompozytu referencyjnego było porównywalne (Ryc. 38) a obraz histologiczny wskazywał na wczesny etap regeneracji kostnej. Z kolei po 12 tygodniach efekt regeneracji tkanki kostnej oraz jej unaczynienie w obszarach implantowanych kompozytów był na zbyt zaawansowanym etapie, żeby możliwe było określenie roli CH w tym procesie (Ryc. 38). Wykazano także, że 4, 8 i 12 tygodni po implantacji doczaszkowej kompozytów nie obserwowano żadnych oznak stanu zapalnego miejscowego oraz uogólnionego.

W kolejnym etapie pracy podjęto się wizualizacji obszarów mineralizacji kości czaszki zwierząt w miejscu powstałego ubytku. W tym celu zwierzętom z implantowanym referencyjnym (5PLA10W) lub kompozytem biokompozytem badanym (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%) po 8 tygodniach od implantacji, a na 72 godz. przed eutanazją, wprowadzono drogą podskórną dwa barwniki fluorescencyjne (błękit kalceiny oraz oranż ksylenolowy). Błękit kalceiny jest stosowany do znakowania nowo utworzonej kości z powodu wiązanie się go ze złogami wapnia, podczas gdy oranż ksylenolowy ma powinowactwo do jonów wapnia, może więc oznaczać obszary bogate w wapń, pomagając w badaniach identyfikujących wzrost i zwapnienie kości (Wier i Xu 2010). Następnie fragmenty czaszek zawierające implantowane kompozyty poddawane były obrazowaniu z użyciem makroskopu konfokalnego. Obserwacje wskazują, że badany kompozyt PLA z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%) przyczynił się do znacznej regeneracji tkanki kostnej po 8 tygodniach od implantacji w porównaniu do kompozytu referencyjnego (5PLA10W) (Ryc. 39).



brak wszczepu



5PLA10WMCH(H2O)0,15%

Ryc. 39 Reprezentatywne zdjęcia obrazujące proces kostnienia zachodzący w ubytkach kości czaszek 8 tygodni po implantacji. a – ubytek kości i brak wszczepu, b – ubytek kości wypełniony kompozytem referencyjnym PLA (5PLA10W), c – ubytek kości wypełniony kompozytem badanym (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%). Błekit kalceinowy – pseudokolor niebieski, oranż ksylenowy – psedokolor zielony.

Interesujące jest, że błękit kalceiny wbudował się najsilniej w obszar ubytku niewypełniony kompozytem (Ryc. 39a, kolor niebieski) co może świadczyć o silnej samoistnej tendencji do regeneracji tkanki, widocznej szczególnie na obrzeżach ubytku kości czaszki. Najsilniejsza fluorescencja pochodząca od oranżu ksylenowego jest widoczna w obszarze

wypełnionym kompozytem badanym (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%), co może świadczyć o dużym potencjale biokompozytu do promowania regeneracji tkanki kostnej (Ryc. 39c).

Przeprowadzono także obrazowanie obszarów kostnienia stosując niebarwione preparaty cienkowarstwowe przekrojów poprzecznych fragmentów kości wypełnionych kompozytami, pochodzących od zwierząt nastrzykiwanych barwnikami fluorescencyjnymi (Ryc. 40).



Ryc. 40 Reprezentatywne zdjęcia preparatów cienkowarstwowych obrazujące miejsca implantacji kompozytów po 8 tygodniach od implantacji. a – kompozyt referencyjny – 5PLA10W (PLA), **b** – badany biokompozyt (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%). Błękit kalceinowy – pseudokolor niebieski, oranż ksylenowy – pseudokolor zielony.

Na podstawie obserwacji zdjęć można wnioskować, że modyfikacja włókien apatytowych CH promuje mineralizację obszarów kości bezpośrednio stykających się z wszczepionym materiałem (Ryc. 40).

Wyniki uzyskane w tej części badań przyczyniają się do potwierdzenia H3 niniejszej rozprawy.

7. Dyskusja

Medycyna regeneracyjna jest obecnie jedną z najintensywniej rozwijających się gałęzi nauki, a technologie wdrażane przez ostatnie 20 lat pozwalają na proponowanie pacjentom coraz bardziej nowoczesnych rozwiązań terapeutycznych (Edgar i wsp. 2020, Santana i Huber 2023). Poszukiwane są zarówno nowe kompozyty, jak i substancje aktywne biologicznie, które mają zdolność do modulowania procesu regeneracji i wpływania na kinetykę procesów naprawczych uszkodzonej tkanki. Badania składające się na niniejszą rozprawę skupiają się
na określeniu roli CH w procesie regeneracji uszkodzonego śródbłonka i tkanki kostnej, mając na uwadze zaproponowanie go jako substancję aktywną biologicznie do przeprowadzenia modyfikacji wybranego kompozytu.

CH posiada wielofunkcyjne właściwości biologiczne i pełni ważną rolę w kluczowych procesach fizjologicznych. Jest prekursorem w syntezie witaminy D, hormonów steroidowych oraz kwasów żółciowych, co podkreśla jego znaczenie w regulacji funkcji metabolicznych i endokrynologicznych, a jako integralny składnik błon komórkowych, CH odgrywa kluczową rolę w ich organizacji i funkcjonowaniu. Rola CH w regeneracji śródbłonka i angiogenezie wzbudza zainteresowanie badaczy. CH wydaje się być istotnym czynnikiem promującym tworzenie naczyń już na wczesnych etapach angiogenezy, co wykazał Samson i wsp. 2020. Autorzy w swoich badaniach eksponowali model *in vivo* kurzych embrionów na działanie CH i zaobserwowali nasilony rozwój naczyń w embrionach już po kilku godzinach od ekspozycji (Samson i wsp. 2020).

W badaniach dotyczących regeneracji komórek śródbłonka naczyniowego do złotego standardu należy ocena poszczególnych etapów tego procesu – przeżywalności komórek, ich migracji i proliferacji, a także zdolności do tworzenia struktur naczyniowych nazywanych tubulami. W przypadku badań nad regeneracją komórek kostnych zwraca się szczególną uwagę na ocenę zasiedlania przez nie testowanych biokompozytów.

W pierwszej części przeprowadzonych przeze mnie badań *in vitro* wykazałam, że CH ma potencjał proregeneracyjny względem komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1, a siła jego działania może być porównana do uznanych stymulatorów wzrostu tych komórek, takich jak VEGF czy FGF (Michaelis 2014). Z przeprowadzonych badań wynika, że CH promuje migrację i proliferację komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1, a także formowanie się tubul oraz sieci tych komórek odwzorowujących naczynia. Do efektywnej regeneracji śródbłonka niezbędna jest migracja komórek w miejsce uszkodzenia, a następnie ich proliferacja. Oba procesy są kluczowe w skutecznej odbudowie struktury naczyń (Potente i Carmeliet 2017). W teście gojenia się rany (ang. *wound healing assay*) wykazałam, że CH stymuluje komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 do wzmożonej migracji, co pozostaje w związku z nasiloną ekspresją receptorów VEGFR2 dla VEGF, który jest istotnym czynnikiem wzrostu śródbłonka działającym przez te receptory, inicjujące szlaki sygnałowe związane z migracją komórek śródbłonkowych (Wang i wsp. 2020b). Otrzymane wyniki znajdują potwierdzenie w badaniach Cui i wsp. (2020), z których wynika, że inne sterole, np. β-sitosterole i ich pochodne obecne w wielu roślinach, mają zdolność do promowania migracji i proliferacji fibroblastów myszy L929, silniej niż FGF (Cui i wsp. 2020).

Pozostałe sterole użyte w moich badaniach, czyli kalcytriol i 7-KCh, nie promowały migracji komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1, a w przypadku 7-KCh zaobserwowano hamowanie tego procesu. Uzyskane wyniki są zgodne z badaniami, w których wykazano hamowanie przez 7-KCh migracji komórek nabłonkowych raka żołądka (AGS – *gastric adenocarcinoma epithelial cells*) (Gajewski i wsp 2022).

Utleniona forma frakcji CH o niskiej gęstości, ox-LDL, również działa hamująco na migrację komórek śródbłonka aorty człowieka (HAEC – *human aortic endothelial cells*) (Wei i wsp. 2020), a także na komórkach śródbłonka naczyniowego żyły płodowej (HUVEC – *human umbilical vein endothelial cells*), gdzie efekt hamowania migracji był dodatkowo zależny od dawki ox-LDL (Zhang i Jiang 2016).

Wykazałam także, że CH istotne nasilał ekspresję receptora VEGFR2 na powierzchni komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1, co może w świadczyć o jego potencjale do promowania przeżywalności, migracji oraz proliferacji komórek śródbłonka, jako że receptor ten jest zaangażowany w szlaki sygnałowe dla wspomnianych mechanizmów komórkowych (Eichmann i Simons 2012, Karali i wsp. 2014, Lee i wsp. 2014, Simons i wsp. 2016, Wang i wsp. 2020b). Natomiast pozostałe sterole, kalcytriol i 7-KCh, nie wywierały wpływu na ekspresję VEGFR2 na powierzchni komórek śródbłonka naczyniowego HMEC-1 (Ryc. 8). Dane literaturowe nie są jednoznaczne. Niektórzy autorzy wskazują, że wysokie stężenie frakcji LDL cholesterolu może istotnie zmniejszać ekspresję receptorów VEGFR2 oraz wydzielanie czynnika VEGF w komórkach śródbłonka aorty człowieka HAEC, natomiast oxLDL nie wykazuje takiego działania (Bogachkow i wsp. 2020). Również Zhang i wsp. (2016) wykazali, że ekspresja mRNA dla VEGFR2 w komórkach śródbłonka naczyniowego żyły płodowej HUVEC w wyniku ekspozycji na oxLDL nie zmieniała się, choć w zależności od metody obserwowano nieistotny statystycznie wzrost ekspresji mRNA dla VEGFR2 (RT-PCR) lub obniżenie ekspresji tego białka w komórkach śródbłonka naczyniowego żyły płodowej HUVEC (Western Blot) (Zhang i JIang 2016). Ponadto Bogachkow i wsp. (2020) nie wykazali zmian w przeżywalności komórek śródbłonka aorty człowieka HAEC po stymulacji oxLDL lub LDL (Bogachkow i wsp. 2020).

Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że ekspozycja komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 na CH, ale także na 7-KCh i kalcytriol, nie wpływała istotnie na przeżywalność komórek. Jest to szczególnie ciekawe z uwagi na fakt, że 7-KCh to znany czynnik obniżający przeżywalność różnych typów komórek. Gajewski i wsp. (2022)

wykazali negatywny wpływ 7-KCh na przeżywalność komórek AGS i komórkach śródbłonka naczyniowego żyły płodowej HUVEC, natomiast Luthra i wsp. (2008) wykazali wpływ tego czynnika na obniżenie przeżywalność komórek śródbłonka płuc człowieka HMVEC-L (human lung microvascular endothelial cells). W niektórych badaniach wykazano, że obniżenie żywotności różnych komórek przez wpływ 7-KCh może być zależne od zastosowanej dawki (Fernandes i wsp. 2017). Wykazano również, że oxLDL wywiera wpływ na przeżywalność komórek śródbłonka naczyniowego żyły płodowej HUVEC w zależności od stężenia (Zhang i Jiang 2016). W badaniach poświęconych działaniu 7-KCh na komórki K562 (linia komórkowa białaczki szpikowej) oraz komórki przewlekłej białaczki szpikowej (CML - chronic myeloid leukemia) wykazano, że 7-KCh dopiero w stężeniu wyższym niż 60 µM działa cytotoksycznie na testowane komórki. Tłumaczono to zjawisko zwiększoną ekspresją białka anty-apoptotycznego API5 (API5 - apoptosis inhibitor 5) występującego w wielu typach komórek nowotworowych (Fernandes i wsp. 2017). Być może komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 również wykazują ekspresję czynnika ochronnego, który sprawia, że 7-KCh może działać na nie cytotoksycznie dopiero zależnie od wysokości dawki. Różne typy komórek śródbłonka działaja w odmienny sposób, ponieważ różnią się pochodzeniem, profilem genetycznym i stąd innym rodzajem odpowiedzi komórkowej na zastosowany czynnik cytotoksyczny (Hauser i wsp. 2017).

Stres oksydacyjny może pełnić niekorzystną rolę w komórce, a w otoczeniu tkanek ROS mogą przyczyniać się do uszkodzenia komórek i do rozwoju zmian zapalnych (Breitzig i wsp. 2016). Jednakże, jeśli nasilenie stresu oksydacyjnego w mikrośrodowisku komórek śródbłonka nie jest krytyczne, to komórki uruchamiają procesy regeneracyjne pozwalające na odbudowę komórek (Jîtcă i wsp. 2022). Fizjologicznie ROS są wytwarzane przez mitochondria, błony plazmatyczne i peroksysomy, a niski poziom markerów stresu oksydacyjnego jest niezbędny do zachowania równowagi redoks, różnicowania się komórek, ich migracji i proliferacji. Dopiero gwałtowny wzrost ilości wolnych rodników powoduje zachwianie równowagi redoks, o czym może świadczyć peroksydacja białek i lipidów (Breitzig i wsp. 2016, Łuczaj i wsp. 2017). W warunkach fizjologicznych 4-HNE bierze udział w reakcji addycji Michaela, która skutkuje powstawaniem nietoksycznych związków - cysteiny i glutationu. Poziom 4-HNE wzrasta w przypadku występowania chorób związanych ze stresem oksydacyjnym, takich jak miażdżyca bądź cukrzyca. Podwyższony poziom 4-HNE występuje również w komórkach naczyń eksponowanych na ROS, które w takim środowisku ulegają apoptozie (Chapple i wsp. 2013). Spośród badanych steroli to 7-KCh, ale nie CH lub kalcytriol, istotnie nasilał stres oksydacyjny w komórkach śródbłonka naczyniowego

człowieka HMEC-1, o czym świadczył podwyższony poziom 4-HNE. Uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z wynikami innych zespołów badawczych stosujących różne typy komórek śródbłonka (Pedruzzi i wsp. 2004, Chang i wsp. 2016, Gajewski i wsp. 2022). Wykazano, że oxLDL powoduje zwiększoną produkcję ROS, a tym nasila stres oksydacyjny w komórkach śródbłonka naczyniowego żyły płodowej HUVEC, niezależnie od zastosowanej dawki tego stymulatora (Zhang i Jiang 2016).

Uzyskane wyniki w tej części pracy wskazują na potencjał CH do stymulacji migracji komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 i tendencję do nasilania aktywności metabolicznej, nasilania ekspresji VEGFR2, przy braku generowania nadmiernego stresu oksydacyjnego. Na podstawie wyników świadczących o promowaniu przez CH migracji komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 oraz zwiększeniu ekspresji kluczowego dla procesów regeneracji śródbłonka receptora VEGFR2, oceniłam zdolność CH do indukowania formowania się tubul (ang. tube formation assay) – struktur przypominających naczynia. Jest to komórkowy model angiogenezy in vitro pozwalający na ocenę potencjału angiogennego badanej substancji. Uzyskane wyniki wskazują, że CH stymuluje komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 do intensywnego formowania tubul na podłożu macierzy zewnątrzkomórkowej. Powstałe tubule są wydłużone i szerokie, a ich tworzenie zachodzi z intensywnością porównywalną do tej indukowanej przez FGF. Jest to czynnik wzrostu znany ze stymulacji komórek tworzących nowe struktury naczyniowe, promuje przyjmowanie przez komórki funkcji prowadzących, przekazywanie sygnałów związanych z migracją, a także powstawanie komórek pączkujących i wierzchołkowych odpowiedzialnych za tworzenie nowych połączeń naczyniowych (Michaelis 2014). Natomiast pozostałe sterole użyte w tym doświadczeniu, kalcytriol i 7-KCh, wykazały odmienne wzorce działania na proces formowania tubul i tworzenia sieci komórkowych. Kalcytriol ani nie promował, ani nie hamował wytwarzania tubul, natomiast 7-KCh znacząco hamował ten proces prowadząc do powstawania tubul krótkich i cienkich. Z literatury wiadomo, że oxLDL hamuje formowanie tubul przez komórkach śródbłonka naczyniowego żyły płodowej HUVEC w sposób zależny od dawki (Zhang i Jiang 2016). OxLDL hamuje również tworzenie tubul w komórkach śródbłonka aorty człowieka HAEC, jednak efekt ten jest ograniczony i zależny od obecności kolistego RNA (circRSF1) wywodzącego się z czynnika przebudowy i odstępu 1 (RSF1 – remodeling and spacing factor 1) (Wei i wsp. 2020).

Na tworzenie tubul przez komórki śródbłonka wpływa także IL-6 – cytokina o działaniu zarówno prozapalnym, jak i przeciwzapalnym, wydzielana przez różne typy komórek (Zegeye i wsp. 2020). W wyniku rozwoju stanu zapalnego komórki śródbłonka wydzielają IL-6 w odpowiedzi na stres oksydacyjny (Bai i wsp. 2020, Scioli i wsp. 2020). Okazuje się, że sygnalizacja międzykomórkowa za pośrednictwem IL-6 hamuje zdolność komórkach śródbłonka naczyniowego żyły płodowej HUVEC do tworzenia tubul. Jednocześnie autokrynna sygnalizacja IL-6 stanowi istotny element prawidłowego wytwarzania tubul przez komórki śródbłonka. Sugeruje się, że molekularny mechanizm hamującego działania międzykomórkowego IL-6 na tworzenie tubul przez komórki śródbłonka naczyniowego żyły płodowej HUVEC opiera się o działanie chemokin, takich jak chemokinowe białko indukowane interferonem-γ o masie 10 kDa (CXCL10 – C-X-C motif chemokine ligand 10), które jest czynnikiem antyangiogennym oraz obniżenie regulacji proangiogennego czynnika CXCL8, jakim jest IL-8 (Zegeye i wsp. 2020). W prezentowanych obecnie badaniach in vitro poświęconych tworzeniu tubul przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 w środowisku badanych steroli nie oceniano stężenia IL-6. Jakkolwiek nie można wykluczyć, że IL-6, zwłaszcza w hodowli eksponowanej na CH, może mieć związek z autokrynnym działaniem tej cytokiny na komórki. Dalsze badania są niezbędne w celu oceny ekspresji receptora dla IL-6 na komórkach śródbłonka oraz wytwarzaniu tej cytokiny w środowisku hodowlanym.

Obiecujące wyniki badań *in vitro*, wskazujące na wspomagającą rolę CH w procesach dotyczących komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1, skłoniły mnie do rozszerzenia badań o model *ex vivo* z wykorzystaniem krążków aorty szczura. W teście kiełkowania aorty (ang. *aorta sprouting assay*), CH stymulował migrację i proliferację komórek śródbłonka, co doprowadziło do formowania tubul i sieci komórkowych. Intensywność działania CH przewyższała efekt VEGF, uznanego czynnika promującego angiogenezę (Haiko i wsp. 2007, Shibuya i wsp. 2013, Simons i wsp. 2016, Wang i wsp. 2020b, Gonçalves i wsp. 2021). CH wykazuje również wpływ na tworzenie naczyń w modelu embrionu kurzego, przy czym intensywność angiogenezy w tym modelu była zależna od zastosowanej dawki CH oraz czasu hodowli embrionów. Wyższa dawka CH sprzyjała formowaniu dłuższych naczyń, a w pierwszym dniu po jego dodaniu do hodowli zaobserwowano gwałtowny rozwój naczyń, który ulegał spowolnieniu w kolejnych dniach hodowli (Samson i wsp. 2020). Mechanizm działania CH w opisanym modelu nie jest jednak znany.

Uzyskany w pracy wynik wskazujący na rolę CH we wspomaganiu procesu kiełkowania komórek śródbłonka naczyniowego stanowił przesłankę do dalszych badań w celu wyjaśnienia potencjalnych mechanizmów. W pracy podjęłam się próby wyjaśnienia mechanizmów molekularnych stojących za potencjalnym proregeneracyjnym działaniem CH wobec komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 wykonując badania

transkryptomiczne. Analizy wykonywane na poziomie transkryptomu komórek generalnie są obarczone ryzykiem wynikającym ze zmienności ze względu na czynniki biologiczne, takie jak heterogeniczność komórek oraz techniczne, takie jak jakość próbek czy warunki eksperymentalne. Różnice mogą również wynikać z metod bioinformatycznych i są spowodowane wieloma etapami analizy danych, od wstępnego przetwarzania i mapowania, przez statystyczną ocenę ekspresji, po interpretację biologiczną. Istnieje wiele różnych programów i algorytmów stosowanych do analiz danych (mapowanie sekwencji RNA czy analiza różnic w ekspresji genów), a uzyskane wyniki mogą się różnić w zależności od tego jakie bazy referencyjne zostały użyte do mapowania odczytów RNA. Wszystko to może wpłynąć na to, które geny zostaną zidentyfikowane i w jaki sposób sklasyfikowane.

Uzyskane wyniki wskazują, że ekspozycja komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 na działanie CH doprowadziła do wzmożonej ekspresji genów związanych z proliferacją, migracją, apoptozą i angiogenezą. Szczególną uwagę zwróciły dwa geny, *PEAK1* oraz *PLXND1*, które odpowiadają za ekspresję białek zaangażowanych w proces migracji komórek, zależny od szlaku sygnałowego czynnika VEGF. Analiza qRT-PCR przeprowadzona z użyciem RNA wyizolowanego z komórek HMEC-1 eksponowanych na CH wykazała blisko sześciokrotny wzrost ekspresji genu dla białka PEAK1 i tendencję wzrostową ekspresji genu dla białka PLXND1.

Białko PEAK1 to niereceptorowa kinaza tyrozynowa występująca we wszystkich tkankach (Kelber i Klemke 2010, Agajanian i wsp. 2015). Wykazano, że PEAK1 stymuluje angiogenezę poprzez modulację transkrypcji VEGFR2, z udziałem czynnika transkrypcyjnego wiążącego fragment GATA (GATA-2 - GATA-binding factor 2). Na modelu in vivo z zastosowaniem danio pręgowanego Danio rerio udowodniono, że embriony z delecją genu peakl po dwóch dniach od zapłodnienia wykazały charakterystyczne defekty naczyniowe, takie jak obrzęk osierdzia i nagromadzenie krwi we wstępnej części aorty. Ponadto, zaobserwowano, że komórki wierzchołkowe i pączkujące śródbłonka, które wyrastały z aorty lub żyły głównej, były widocznie karłowate, posiadały zdezorganizowane wypustki, które nie łączyły się ze sobą i nie tworzyły siatki naczyniowej. Efekt niedoboru genu peakl był podobny do efektu wywołanego przez zaburzony szlak sygnałowy VEGF/VEGFR2 (Wang i wsp. 2018). Należy podkreślić, że identyczność sekwencji białka PEAK1 dla gatunków Homo sapiens, Mus musculus i Danio rerio wynosi 44,5%, a domeny interakcji białka PEAK1 i miejsca jego fosforylacji są wysoce konserwatywne u kręgowców. Ponadto, na modelu in vitro z wykorzystaniem komórek śródbłonka naczyniowego żyły płodowej HUVEC wykazano, że brak białka PEAK1 wpływał na zahamowanie migracji, proliferacji oraz kiełkowania komórek i tworzenia tubul, a także powodował obniżenie ekspresji receptorów VEGFR2 (Wang i wsp. 2018). Biorąc pod uwagę badania wykonane przez Wang i wsp. (2018), sugerujące rolę białka PEAK1 w nasilaniu angiogenezy, a także uzyskane w mojej pracy obserwacje, wskazujące na zwiększenie ekspresji genu kodującego białko PEAK1 w komórkach śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 eksponowanych na CH, można wnioskować o potencjalnej proregeneracyjnej roli CH względem komórek śródbłonkowych za pośrednictwem białka PEAK1.

Uszkodzenie śródbłonka naczyniowego czy utrata jego homeostazy mogą być wynikiem działania różnych czynników, w tym przewlekłego zakażenia Helicobacter pylori (HP), podczas którego uwalniany jest LPS tych bakterii. Z uwagi na wysoką częstość zakażeń wywołanych przez HP (ponad 50% populacji), w powiązaniu z zaburzeniem funkcji bariery nabłonkowej żołądka i komórek śródbłonka naczyniowego, a także ze względu na możliwe rozszczelnienie bariery jelitowej i związane z tym zjawiskiem konsekwencje (Moludi i wsp. 2020; Gajewski i wsp. 2022), zakażenie pałeczkami HP jest brane pod uwagę jako potencjalny czynnik egzogenny w rozwoju choroby niedokrwiennej serca (Chmiela i wsp 2015). Wiele badań dotyczących roli czynników zakaźnych w rozwoju tej choroby, z uwzględnieniem mechanizmów komórkowych, prowadzonych jest na poziomie transkryptomu (Rosenfeld iwsp. 2011, Chmiela i wsp. 2015). LPS HP wykazuje słabsze działanie endotoksyczne niż LPS Escherichia coli, ale przewlekła infekcja HP w połączeniu z dietą bogatą w lipidy nasila stan zapalny i dysfunkcję śródbłonka sprzyjając rozwojowi miażdżycy (Chmiela i wsp. 2015, Krupa i wsp. 2021, Tomaszewska i wsp. 2024). Analiza danych uzyskanych w prezentowanych badaniach transkryptomu komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1, eksponowanych równocześnie na CH i LPS HP wykazała, że ekspresja genów kodujących białka: LYRM1, KCTD10, MARVELD1, PLXND1, PAFAH1B1 i ICAM2, stymulujące procesy angiogenezy, była w takim środowisku istotnie obniżona. Wyniki te sugerują, że obecność LPS HP może ograniczać zdolność komórek śródbłonka do migracji i proliferacji, które są kluczowe dla odnowy komórek. Jednoczesna stymulacja komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 CH i LPS HP wykazała, że obecność LPS HP w układzie hamuje ekspresję genów kodujących białka: PEAK1, FGFR1, ADA2, CIB1 i PA2G4. Białka te odgrywają istotną rolę w procesach regeneracji komórek śródbłonka i z obserwacji wynika, że mogą ulegać nadekspresji w obecności CH (Tab. 3). Co ciekawe, w komórkach śródbłonka naczyniowego HMEC-1 stymulowanych LPS HP w porównaniu do hodowli z samym CH zaobserwowano znaczący spadek ekspresji genu kodującego białko ADAM9. Jak wskazuje literatura, białko ADAM9 odgrywa kluczową rolę w rozwoju embrionalnym serca, ale też

w procesie neowaskularyzacji i angiogenezy związanej z rozwojem nowotworów (Chou i wsp. 2020). Zatem działanie LPS *HP*, polegające na hamowaniu syntezy tego białka może ograniczać angiogenezę. Dalsza analiza danych uzyskanych w badaniach tranksryptomu komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1, jednocześnie eksponowanych na CH i LPS *HP*, wykazała obniżoną ekspresję genu *KDR*, który odgrywa kluczową rolę w promowaniu proliferacji i migracji komórek śródbłonka za pośrednictwem VEGF (Ryc. 17). Wykazano, że zablokowanie ścieżki sygnałowej VEGF przy użyciu przeciwciał przeciwko białku KDR w modelu osteogenezy myszy prowadzi do zmniejszenia tworzenia się kości, prawdopodobnie w powiązaniu z ograniczonym rozwojem naczyń (Hyzy i wsp. 2017).

Podsumowując, wyniki uzyskane w analizach transkryptomicznych wskazują, że CH może być induktorem zmian w komórkach śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 związanych z mechanizmami przeżycia, migracji, proliferacji i angiogenezy, zaangażowanymi w procesy regeneracyjne. Wyniki uzyskane w badaniach transkryptomicznych sugerują także, że CH może inicjować w komórkach śródbłonka mechanizmy proregeneracyjne, a także pełnić funkcję ochronną wobec komórek eksponowanych na działanie czynników zakaźnych, co wykazano w badaniach z użyciem LPS *HP*.

Podsumowując badania *in vitro* dotyczące oceny wpływu steroli (CH, 7-KCh i kalcytriolu) na zdolność migracji komórek śródbłonka naczyniowego, ich żywotność oraz tworzenie tubul należy podkreślić, że to CH okazał się najlepszym stymulatorem migracji i angiogenezy, nasilając ekspresję VEGFR2 i białek promujących te procesy w komórkach oraz nie indukując w nich stresu oksydacyjnego. Mając na uwadze wyniki badań *in vitro* oraz mając świadomość roli śródbłonka naczyniowego w regeneracji różnych tkanek, w tym tkanki kostnej, dalsza część pracy została poświęcona opracowaniu biokompozytu modyfikowanego CH do potencjalnego zastosowania w medycynie regeneracyjnej kości.

Biokompozyt został zaprojektowany i wytworzony we współpracy z zespołem dr inż. Moniki Biernat z Grupy Badawczej Biomateriały, Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie. Wybór substancji aktywnej do modyfikacji włókien apatytowych oparto na wynikach badań przeprowadzonych w pierwszej części mojej pracy doktorskiej. PLA jest odnawialnym, biodegradowalnym i biokompatybilnym polimerem wykorzystywanym jako matryca do dostarczania substancji biologicznie aktywnych czy leków. Zaletą PLA jako materiału jest m.in. jego elastyczność, rozmiar, kształt i właściwości chemiczne, co pozwala na uzyskanie pożądanej farmakokinetyki dołączonej substancji biologicznie aktywnej. PLA jest wrażliwy na temperaturę i hydrolizę dzięki czemu jest stabilny w stanie stopionym przy zachowaniu odpowiednich warunków suszenia. PLA w połączeniu z hydroksyapatytem cieszy się szczególnym zainteresowaniem w biomedycynie ze względu na osteokonduktywność i zdolność spajania kości przez hydroksyapatyt oraz wchłanialność jaką posiada PLA. Poza tym, sam hydroksyapatyt jest chętnie wykorzystywany do modyfikacji implantów kostnych ze względu na swoje podobieństwo do głównego składnika nieorganicznego kości, przyspieszanie gojenia się kości we wczesnym czasie implantacji oraz dzięki jego łatwości do inkorporacji jonów. Wzmacnianie PLA stanowiącego matrycę kompozytu włóknami pochodzenia naturalnego bądź syntetycznego z dołączoną substancja biologicznie aktywną jest uważane za bardzo dobrą metodę otrzymywania biokompozytów o ukierunkowanych właściwościach (Lee i wsp. 2016, Murariu i Dubois 2016, Arcos i Vallet-Regi 2020).

Aby zakwalifikować kompozyt PLA z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH do dalszych badań, włączając w to badania z użyciem modelu zwierzęcego, przeprowadziłam ocenę profilu bezpieczeństwa na modelu komórkowym. Wyniki wykazały, że kompozyt jest nie tylko cytobiozgodny względem komórek referencyjnych fibroblastów myszy L929, ale nie posiada właściwości prozapalnych, co określono w teście aktywacji szlaku sygnałowego NF-κB w komórkach o profilu monocytarno-makrofagowym. Wyniki zostały opublikowane w ramach pracy Biernat i wsp. (2022), której jestem współautorką.

W kolejnym etapie pracy sprawdziłam czy modyfikacja kompozytu, polegająca na dodaniu CH do włókien apatytowych, stanowiących jego wypełniacz, wpływa komórki osteoblastów człowieka hFOB 1.19 na zasiedlanie przez oraz śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1. Obserwacje zasiedlania badanych kompozytów przez komórki wykonano z użyciem techniki SEM, a hodowle komórek w obecności kompozytów prowadzono do 28 dni. Uzyskane wyniki wskazują, że osteoblasty człowieka hFOB 1.19 z różną intensywnością zasiedlały badane kompozyty, a obecność CH w kompozycie wyraźnie nasilała ten proces. W hodowlach osteoblastów hFOB 1.19, z kompozytami PLA z dodatkiem włókien apatytowych, zarówno niemodyfikowanych lub modyfikowanych CH, przeprowadziłam pomiar stężenia IL-6 oraz ALP. IL-6 odgrywa kluczową rolę w regeneracji kości na wczesnych etapach mineralizacji oraz w procesie tworzenia się kości, m.in. poprzez regulację angiogenezy i produkcję VEGF (Bastian i wsp. 2011, Loi i wsp. 2016). Podczas hodowli osteoblastów hFOB 1.19, które kolonizowały PLA z dodatkiem włókien powierzchnię porowatego kompozytu apatytowych modyfikowanych CH, zaobserwowano stały wzrost produkcji IL-6 w trakcie trwania doświadczenia. Stężenie IL-6 było najniższe w 7 dniu hodowli, a następnie wzrastało osiągając

117

maksimum w 21 dniu hodowli. Uzyskane wyniki odpowiadają pomiarom liczby komórek kostnych, które wskazują, że część komórek nanoszonych na kompozyty w dniu 0 obumiera lub ulega uszkodzeniu w pierwszych godzinach hodowli, co skutkowało 10-krotnym spadkiem ich liczby w 7 dniu hodowli. Utrzymanie się komórek na powierzchni porowatego materiału wymagało intensywniejszego wydzielania IL-6 (Ryc. 32). Taka obserwacja dotyczyła zarówno kompozytu referencyjnego (5PLA10W), iak i badanego biokompozytu (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%). Pomimo tego, że poziom IL-6 wzrastał w czasie hodowli, nie przekraczał on wartości zaobserwowanych w układzie kontrolnym. Najprawdopodobniej wynika to z faktu, że osteoblasty hFOB 1.19 jedynie kolonizowały powierzchnię biokompozytu, ale się na niej nie namnażały, ponieważ były hodowane w warunkach osteoindukcyjnych i tym samym kierowane w stronę różnicowania się, a nie proliferacji. Proces obumierania osteoblastów podczas ich różnicowania w kierunku osteocytów też jest zupełnie naturalny i fizjologiczny.

IL-6, jako kluczowa cytokiną prozapalna, pełni istotną rolę w regulacji reakcji zapalnej w organizmie. W przypadku pacjentów z zapaleniem tętnic wytwarzanie cytokin prozapalnych, takich jak IL-6, wzrasta proporcjonalnie do nasilenia stanu zapalnego. Jest to wynikiem intensywniejszego działania i zwiększonej liczby komórek zaangażowanych w produkcję cytokin, które regulują przebieg procesu zapalnego (Hernández-Rodríguez i wsp. 2004). Z kolei podwyższony poziom IL-6 w chorobach reumatycznych, może prowadzić do zaburzenia równowagi między osteoblastami i osteoklastami, sprzyjając resorpcji kości (Epsley i wsp. 2021). Jak wykazano w kontekście mineralizacji tkanki kostnej, zmniejszona proliferacja komórek zrębowych szpiku kostnego w zdemineralizowanej macierzy zębiny prowadzi do wzrostu ekspresji IL-6, co sygnalizuje początek procesu dojrzewania komórek i ich mineralizacji (Munir i wsp. 2019). IL-6 oprócz udziału w mediowaniu odpowiedzi zapalnej, bierze udział w regulacji procesów przebudowy kości. W procesie kościotworzenia IL-6 wpływa na różnicowanie komórek progenitorowych, aktywację osteoblastów oraz ich interakcje z osteoklastami. IL-6 wspiera również dojrzewanie preosteoblastów do osteoblastów. Przyspiesza proliferację preosteoblastów i ich zdolność do produkcji macierzy kostnej. Aktywacja genów związanych z dojrzewaniem osteoblastów, takich jak Runx2 i Osterix. Wzmacnia zdolność preosteoblastów do mineralizacji macierzy poprzez zwiększenie ekspresji kolagenu typu I i innych składników macierzy pozakomórkowej (Loi i wsp. 2016).

Z kolei ALP jest enzymem, który pełni istotną rolę w mineralizacji kości, ponieważ odpowiada za inicjację depozycji wapnia w komórkach kości oraz powoduje wzrost stężenia

nieorganicznego fosforu. Ponadto, wpływa na zmniejszenie stężenia zewnątrzkomórkowego pirofosforanu, który może spowalniać proces mineralizacji (Vimalraj 2020). W końcowej fazie remodelingu kości osteoblasty ulegają apoptozie albo włączają się do macierzy kostnej jako osteocyty podczas kalcyfikacji za pośrednictwem ALP (Loi i wsp. 2016).

Podczas hodowli osteoblastów hFOB 1.19 na kompozycie PLA z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH, zaobserwowano początkowy wzrost poziomu ALP (po 14 dniach hodowli), przy czym w dalszych etapach hodowli komórek stężenie ALP zaczęło się obniżać, osiągając poziom wyjściowy, ale stężenie ALP nie przekraczało wartości mierzonych w układzie kontrolnym. Uzyskane wyniki sugerują, że podobnie jak w przypadku IL-6, osteoblasty człowieka hFOB 1.19 jedynie zasiedlają biokompozyt, nie namnażając się na nim, a stopniowo osiągając dojrzałość poprzez mineralizację.

W pracy wykazano, że komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 nie wykazują zdolności do zasiedlania kompozytów PLA, zarówno referencyjnego (5PLA10W), jak i badanego biokompozytu (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%). Może to wynikać z faktu, że komórki śródbłonka wymagają obecności macierzy zewnątrzkomórkowej oraz struktury przypominającej szkielet komórek kostnych. W przyszłości warto rozważyć przeprowadzenie badań z hodowlą mieszaną, obejmującą zarówno komórki śródbłonkowe, jak i komórki osteoblastów, co mogłoby lepiej odzwierciedlać warunki fizjologiczne i sprzyjać zasiedlaniu kompozytów.

Biozgodność biokompozytu 5PLA10WMCH(H₂O)0,15% potwierdzono *in vivo* stosując model szczurzy, na którym przeprowadzono badanie miejscowej odpowiedzi tkankowej oraz reakcji uogólnionej po wszczepieniu biokompozytu, a następnie po 7, 30 i 90 dniach od wszczepienia podskórnego wykonano ocenę histopatologiczną w poszukiwaniu komórkowych markerów stanu zapalnego (komórki immunokompetentne i erytrocyty). W miejscu wszczepienia zaobserwowano rozwój bogato ukrwionej tkanki łącznej, a komórki śródbłonka naczyniowego oznaczono poprzez barwienie w kierunku cząsteczek CD31, uznanego markera śródbłonka naczyń (Caligiuri 2020). CD31 jest cząsteczką adhezyjną oraz sygnałową w błonie komórkowej komórek śródbłonka, ale także leukocytów i płytek krwi. Jako receptor transhomofilny, nie jest przypisany do konkretnego typu komórek ani do konkretnej ścieżki sygnałowej, może być więc angażowany przez różne stymulatory, zapewniając komórkom z ekspresją CD31 przeżycie i odpowiedź na działanie różnych czynników stresogennych, immunologicznych czy metabolicznych. U myszy pozbawionych apolipoproteiny E nadekspresja cząsteczek CD31 w formie rozpuszczalnej prowadzi do zmniejszenia odpowiedzi immunologicznej poprzez zwiększoną populację limfocytów T

119

regulatorowych i redukcję stopnia aterogenezy. Okazuje się również, że wadliwa ekspresja cząsteczek CD31 na makrofagach, które naciekają uszkodzony śródbłonek naczyniowy w miażdżycy jest powiązana z opóźnionym gojeniem się naczyń (Liu i Shi 2012, Caligiuri 2020).

Do prawidłowej regeneracji tkanki kostnej kluczowa jest obecność komórek śródbłonka, które dostarczają tlen i składniki odżywcze do rozwijającej się tkanki, umożliwiając tym samym prawidłową przebudowę kości (Hauser i wsp. 2017). Badania na myszach, którym wszczepiono hydrożel zawierający związki antyangiogenne, takie jak przeciwciało przeciwko VEGFA oraz topotekan (inhibitor HIF1-a stosowany w leczeniu nowotworów), wykazały zahamowanie angiogenezy, co skutkowało spowolnieniem i opóźnieniem procesu regeneracji kości. Oba związki antyangiogenne ograniczyły formowanie naczyń krwionośnych prowadząc do zmniejszenia objętości kości w trakcie regeneracji (Hyzy i wsp. 2017). Wyniki badań na modelu szczurzym przedstawione w niniejszej rozprawie wskazują dobre unaczynienie tkanki łącznej w miejscu wszczepienia biokompozytu 5PLA10WMCH(H₂O)0,15%, co pozwala sądzić, że stworzone zostały warunki do regeneracji tkanki kostnej poprzez obecność komórek śródbłonka naczyniowego.

Bioefektywność kompozytu PLA dodatkiem włókien Z apatytowych niemodyfikowanych (5PLA10W) oraz modyfikowanych CH (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%) została oceniona in vivo w modelu regeneracji ubytków kości czaszki. Mikroskopowa ocena preparatów sugeruje, że 8 tygodni to optymalny czas do oceny bioefektywności proregeneracyjnej kompozytów. W obszarach kontaktu biokompozytu z kością czaszki zaobserwowano początki mineralizacji i pojawianie się osteoblastów. Biokompozyt 5PLA10WMCH(H₂O)0,15% po 8 tygodniach od implantacji stał się rusztowaniem dla gęstej sieci dobrze unaczynionych komórek oraz formowania się nowej tkanki kostnej. Po 4 tygodniach regeneracja była na wczesnym etapie i porównywalna dla obu kompozytów (badanego i referencyjnego), natomiast po 12 tygodniach proces był zbyt zaawansowany, aby określić rolę CH. Na żadnym etapie (4, 8 i 12 tygodni) nie odnotowano objawów stanu zapalenego miejscowego ani ogólnoustrojowego.

Mineralizacja uszkodzonych obszarów kości jest kluczowym wyznacznikiem postępującej regeneracji tkanki. Najczęściej stosowanymi barwnikami do oznaczania mineralizacji *in vivo* są kalceina, czerwień alizarynowa i jony srebra w barwieniu von Kossa (Parisuthiman i wsp. 2005, Lee i wsp. 2017, White i wsp. 2021, Nakajima i wsp. 2022, Bernar i wsp. 2023). Kalceina, w odróżnieniu od pozostałych barwników, jest fluorochromem, co umożliwia jej zastosowanie w badaniach *in vivo* bez konieczności dodatkowego barwienia

komórek. Stopień mineralizacji ocenia się na podstawie wiązania barwnika z wapniem, co odzwierciedla rosnącą zawartość kryształów fosforanu i węglanu wapnia w regenerującej się kości (White i wsp. 2021). W przeprowadzonych badaniach wykazano wbudowanie się błękitu kalceiny w obrzeża ubytku niewypełnionego kompozytem, co może wskazywać na naturalną tendencję do regeneracji kości (Ryc. 39). Można zaobserwować, że modyfikacja włókien apatytowych CH dodatkowo wspomagała mineralizację obszarów bezpośrednio stykających się z implantowanym biokompozytem, co jest wyraźnie zauważalne w preparatach cienkowarstwowych pochodzących od zwierząt z implantowanym biokompozytem 5PLA10WMCH(H₂O)0,15% w porównaniu do kompozytu referencyjnego (Ryc. 40).

Uzyskane wyniki wskazują, że kompozyt PLA z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH (5PLA10WMCH(H₂O)0,15%) wykazuje silny potencjał proregeneracyjny wobec tkanki kostnej i śródbłonkowej. Modyfikacja kompozytu CH przyczynia się do zwiększenia tempa regeneracji uszkodzeń w tkance kostnej i śródbłonkowej potwierdzając jego potencjał terapeutyczny w leczeniu urazów tych tkanek.

W literaturze nie znajduje się przykładów zastosowania CH do modyfikacji kompozytów w celu modulowania procesów regeneracji tkanki kostnej, podobnie jak zastosowania CH w procesach regeneracji. Modyfikowanie kompozytów lipidami w celu zwiększenia ich potencjału regeneracyjnego jest punktem zainteresowań naukowców od wielu lat, a związkami, które wzbudzają największe zainteresowanie są utlenione formy steroli (oksysterole). Wśród steroli badanych w regeneracji tkanki kostnej i śródbłonka in vivo Oxy34, Oxy49, Oxy133, 20(S)-hydroksycholesterolu, oceniano działanie m.in. 22(S)-hydroksycholesterolu, β-ekdysteronu, mirystynianu cholesterolu w połączeniu z berberyną czy pochodne β-sitosteroli (Johnson i wsp. 2011, Hokugo i wsp. 2013, Buser i wsp. 2017, Cui i wsp. 2017, Lee i wsp. 2021, Yan i wsp. 2022, Ciu i wsp. 2020, Li i wsp. 2024). Chociaż oksysterole należą do grupy związków o wysokiej reaktywności przekłada się to na ich udział zarówno w fizjologicznych, jak i patologicznych procesach zachodzących w organizmie. Odgrywają rolę w regulowaniu procesów o podłożu immunologicznym, agregacji płytek krwi, różnicowaniu komórek oraz ich proliferacji i apoptozie, a prowadzone badania wykazują cytotoksyczne działanie oksysteroli w stosunku do wielu populacji komórek, w tym komórek śródbłonkowych, mięśni gładkich, fibroblastów czy komórek nerwowych (de Freitas i wsp. 2021). Tak więc wybór stymulatora komórek musi być poprzedzony badaniami biobezpieczeństwa in vitro oraz in vivo i badaniem mechanizmów jakim ma być przeznaczony.

Podsumowując, badania *in vitro* i *in vivo* wykonane w niniejszej rozprawie doktorskiej pozwalają wskazać CH jako potencjalny, biozgodny stymulator procesu angiogenezy i kościotworzenia, który może być wykorzystany do modyfikacji biokompozytów przeznaczonych do regeneracji tkanki kostnej.

8. Podsumowanie wyników

- CH promuje regenerację komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 zależną od interakcji VEGF/VEGFR.
- CH promuje tworzenie tubul przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1.
- Aktywność proregeneracyjna komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 i zdolność aniogenezy w środowisku CH pozostają w związku z nasileniem ekspresji genów kodujących białka, które stymulują te procesy, co wykazano w analizie trankryptomicznej.
- CH może chronić komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 przed ograniczeniem ekspresji białek zaangażowanych w regenerację i angiogenezę w odpowiedzi na LPS *Helicobacter pylori*.
- Włókna apatytowe stymulują wytwarzanie tubul przez komórki śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1, więc mogą być dobrym kandydatem jako nośnik substancji aktywnej biologicznie w biokompozycie.
- Modyfikacja włókien apatytowych CH jest skuteczna.
- Kompozyty PLA z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH spełniają warunek biozgodności *in vitro* i *in vivo*.
- Kompozyty PLA z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH mogą być zasiedlane przez osteoblasty człowieka hFOB.1.19 i promują wzrost tych komórek we wczesnym etapie hodowli oraz ich dojrzewanie.
- W obszarze implantowanego kompozytu PLA z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH na modelu *in vivo* dochodzi do indukcji korzystnej reakcji zapalnej zależnej od infiltracji makrofagów.
- W środowisku implantacji kompozytu PLA z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH w modelu *in vivo* zachodzi ekspresja markera komórek śródbłonka naczyniowego CD31, formowanie się tkanki łącznej oraz inicjacja procesu mineralizacji i tworzenie "nowej kości".
- Po 8 tygodniach od implantacji kompozytu PLA z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych CH następuje znaczna regeneracja tkanki kostnej w badanym modelu *in vivo*.

9. Wnioski

- Cholesterol wykazuje potencjał proregeneracyjny względem komórek śródbłonka naczyniowego człowieka HMEC-1 promując ich migrację i zdolność do tworzenia tubul w układzie *in vitro* w powiązaniu z nasileniem ekspresji VEGFR2.
- Cholesterol zastosowany do modyfikacji włókien apatytowych, stanowiących wypełniacz dla kompozytu PLA, nasila procesy regeneracji tkanki kostnej na modelu *in vivo* ubytku kości czaszki szczura.
- Kompozyt PLA z dodatkiem włókien apatytowych modyfikowanych cholesterolem może być innowacyjnym biokompozytem do zastosowania w medycynie regeneracyjnej do leczenia uszkodzeń tkanki kostnej w powiązaniu z regeneracją śródbłonka naczyniowego.

Przeprowadzone przeze mnie badania doprowadziły do realizacji założonych celów oraz częściowego potwierdzenia H1 i całkowitego potwierdzenia H2 i H3.

10. Literatura

- 1. Abdel Rahman D.E., Fouad M.A., Mohammed E.R. i wsp. 2023. Novel VEGFR-2 inhibitors as antiangiogenic and apoptotic agents via paracrine and autocrine cascades: design, synthesis, and biological evaluation. Bioorganic Chemistry, 139, 106678. DOI: 10.1016/j.bioorg.2023.106678.
- 2. Agajanian M., Campeau A., Hoover M. i wsp. 2015. PEAK1 acts as a molecular switch to regulate context-dependent TGF β responses in breast cancer. PLoS ONE, 10, 8, e0135748. DOI: 10.1371/journal.pone.0135748.
- 3. Aghaloo T.L., Amantea C.M., Cowan C.M. i wsp. 2007. Oxysterols enhance osteoblast differentiation *in vitro* and bone healing *in vivo*. Journal of Orthopaedic Research, 25, 11, 1488-1497. DOI: 10.1002/jor.20437.
- 4. Allison L.A. 2019. Podstawy biologii molekularnej. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa. ISBN 98-83-235-0527-3.
- 5. Arcos D. i Vallet-Regí M. 2020. Substituted hydroxyapatite coatings of bone implants. Journal of Materials Chemistry B, 9. DOI: 10.1039/C9TB02710F.
- 6. Atat O.E., Fakih A. i El-Sibai M. 2019. RHOG activates RAC1 through CDC42 leading to tube formation in vascular endothelial cells. Cells, 8, 171. DOI: 10.3390/cells8020171.
- 7. Bai B., Yang Y., Wang Q. i wsp. 2020. NLRP3 inflammasome in endothelial dysfunction. Cell Death and Disease, 11, 776. DOI: 1038/s41419-020-02985-x.
- 8. Bastian O., Pillay J., Alblas J. i wsp. 2011. Systemic inflammation and fracture healing. Journal of Leukocyte Biology, 89, 669-673. DOI: 0.1189/jlb.0810446.
- 9. Bautch V.L. 2011. Stem cells and the vasculature. Nature Medicine, 17, 1437-1443. DOI: 10.1038/nm.2539.
- 10. Bergmann A. i Steller H. 2010. Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. Science Signaling, 3, 145, re8. DOI: 10.1126/scisignal.3145re8.
- Bernar A., Gebetsberger J.V., Bauer M. i wsp. 2023. Optimization of the Alizarin Red S assay by enhancing mineralization of osteoblasts. International Journal of Molecular Sciences, 24, 723. DOI: 10.3390/ijms24010723.
- 12. Biernat M., Szwed-Georgiou A., Rudnicka K. i wsp. 2022. Dual modification of porous Ca-P/PLA composites with APTES and alendronate improves their mechanical strength and cytobiocompatibility towards human osteoblasts. International Journal of Molecular Sciences, 23, 22. DOI: 10.3390/ijms232214315.
- Blanco R. i Gerhardt H. 2013. VEGF and Notch in Tip and Stalk Cell Selection. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 3, a006569. DOI: 10.1101/cshperspect.a006569.
- Bogachkov Y.Y., Chen L., Le Master E. i wsp. 2020. LDL induces cholesterol loading and inhibits endothelial proliferation and angiogenesis in Matrigels: correlation with impaired angiogenesis during wound healing. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 318, C762–C776. DOI: 10.1152/ajpcell.00495.2018.
- 15. Breitzig M., Bhimineni C., Lockey R. i wsp. 2016. 4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress? American Journal of Physiology-Cell Physiology, 311, C537–C543. DOI: 10.1152/ajpcell.00101.2016.
- 16. Bristow J.M., Reno T.A., Jo M. 2013. Dynamic phosphorylation of tyrosine 665 in pseudopodium-enriched atypical kinase 1 (PEAK1) is essential for the regulation

of cell migration and focal adhesion turnover. Journal of Biological Chemistry, 288, 1, 123-131. DOI: 10.1074/jbc.M112.410910.

- Buser Z., Drapeau S., Stappenbeck F. i wsp. 2017. Effect of Oxy133, an osteogenic oxysterol, on new bone formation in rat two-level posterolateral fusion model. European Spine Journal, 26, 2763-2772. DOI: 10.1007/s00586-017-5149-9.
- 18. Caligiuri G. 2020. CD31 as a therapeutic target in atherosclerosis. Circulation Research, 123, 1178-1189. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.315935.
- Cavagis A.D.M., Takamori E.R., Granjeiro J.M. i wsp. 2014. TNFα contributes for attenuating both Y₃₉₇FAK and Y₄₁₆Src phosphorylations in osteoblasts. Oral Diseases, 20, 8, 780-786. DOI: 10.1111/odi.12202.
- Centonze G., Natalini D., Piccolantonio A. i wsp. 2022. Cholesterol and its derivatives: multifaceted players in breast cancer progression. Frontiers in Oncology, 12, 906670. DOI: 10.3389/fonc.2022.906670.
- 21. Chang M.C., Chen Y.J., Jein-Wein Liou E. i wsp. 2016. 7-Ketocholesterol induces ATM/ATR, Chk1/Chk2, PI3K/Akt signalings, cytotoxicity and IL-8 production in endothelial cells. Oncotarget, 11, 7, 74473-74483. DOI: 10.18632/oncotarget.12578.
- 22. Chapple S.J., Cheng X. i Mann G.E. 2013. Effects of 4-hydroxynonenal on vascular endothelial and smooth muscle cell redox signaling and function in health and disease. Redox Biology, 1, 319-331. DOI: 10.1016/j.redox.2013.04.001.
- Chipurupalli S., Samavedam U. i Robinson N. 2021. Crosstalk between ER stress, autophagy and inflammation. Frontiers in Medicine, 8:758311. DOI: 10.3389/fmed.2021.758311.
- 24. Chmiela M., Gajewski A. i Rudnicka K. 2015. *Helicobacter pylori* vs coronary heart disease searching for connections. World Journal of Cardiology, 26, 7, 187-203. DOI: 10.4330/wjc.v7.i4.187.
- Choi S., Chen Z., Tang L.H. i wsp. 2016. Bcl-xL promotes metastasis independent of its anti-apoptotic activity. Nature Communications, 7, 10384. DOI: 10.1038/ncomms10384.
- 26. Chou C.W., Huang Y.K., Kuo T.T. i wsp. 2020. An overview of ADAM9: structure, activation, and regulation in human diseases. International Journal of Molecular Sciences, 21, 20, 7790. DOI: 10.3390/ijms21207790.
- Cichocki T., Litwin J.A. i Mirecka J. 2009. Kompendium histologii. Wydanie IV poprawione i uzupełnione. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków. ISBN 978-83-233-2752-3.
- 28. Claes L., Recknagel S. i Ignatius A. 2012. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. Nature Reviews Rheumatology, 8, 133-143. DOI: 10.1038/nrrheum.2012.1.
- 29. Cottrill E., Lazzari J., Pennington Z. i wsp. 2020. Oxysterols as promising small molecules for bone tissue engineering: systematic review. World Journal of Orthopedics, 11, 7, 328-344. DOI: 10.5312/wjo.v11.i7.328.
- Corti F. i Simons M. 2017. Modulation of VEGF receptor 2 signaling by protein phosphatases. Pharmacological Research, 115, 107-123. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.11.022.
- Ciu S., Jiang H., Chen L. i wsp. 2020. Design, synthesis and evaluation of wound healing activity for β-sitosterols derivatives as potent Na+/K+-ATPase inhibitors. Bioorganic Chemistry, 98, 103150. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103150.

- 32. Cui Z.K., Ki, S., Baljon J.J. i wsp. 2017. Design and characterization of a therapeutic non-phospholipid liposomal nanocarrier with osteoinductive characteristics to promote bone formation. ACS Nano, 11, 8, 8055–8063. DOI: 10.1021/acsnano.7b02702.
- 33. Czuba E., Steliga A., Leitzau G. i wsp. 2017. Cholesterol as a modifying agent of the neurovascular unit structure and function under physiological and pathological conditions. Metabolic Brain Disease, 32, 935-948. DOI: 10.1007/s11011-017-0015-3.
- de Freitas F.A., Levy D., Zarrouk A. i wsp. 2021. Impact of oxysterols on cell death, proliferation, and differentiation induction: current status. Cells, 10, 2301. DOI: 10.3390/cells10092301.
- 35. De Pascalis C. i Etienne-Manneville S. 2017. Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions. Molecular Biology of the Cell, 28, 14. DOI: 10.1091/mbc.e17-03-0134.
- 36. Donati S., Palmini G., Aurilia C. i wsp. 2022. Rapid nontranscriptional effects of calcifediol and calcitriol. Nutrients, 14, 1291. DOI: 10.3390/nu14061291.
- Downward J. 2004. PI 3-kinase, Akt and cell survival. Seminars in Cell & Developmental Biology, 15, 2, 177-182. DOI: 10.1016/j.semcdb.2004.01.002.
- 38. Edgar L., Pu T., Porter B. i wsp. 2020. Regenerative medicine, organ bioengineering and transplantation. British Journal of Surgery, 107, 793-800. DOI: 10.1002/bjs.11686.
- Eichmann A. i Simons M. 2012. VEGF signaling inside vascular endothelial cells and beyond. Current Opinion in Cell Biology, 24, 188-193. DOI: 10.1016/j.ceb.2012.02.002.
- 40. Eilken H.M. i Adams R.H. 2010. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. Current Opinion in Cell Biology, 22, 617-625. DOI: 10.1016/j.ceb.2010.08.010.
- 41. Elosegui-Artola A., Trepat X. i Roca-Cusachs P. 2018. Control of mechanotransduction by molecular clutch dynamics. Trends in Cell Biology, 28, 5, p356-367. DOI: 10.1016/j.tcb.2018.01.008.
- 42. Epsley S., Tadros S., Farid A. i wsp. 2021. The effect of inflammation on bone. Frontiers in Physiology, 11, 511799. DOI: 10.3389/fphys.2020.511799.
- Erdei J., Tóth A., Balogh E. i wsp. 2018. Induction of NLRP3 inflammasome activation by heme in human endothelial cells. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 4310816. DOI: 10.1155/2018/4310816.
- 44. Eriksen E.F. 2010. Cellular mechanisms of bone remodeling. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 11, 219-227. DOI: 10.1007/s11154-010-9153-1.
- 45. Evans C.E., Iruela-Arispe M.L. i Zhao Y.Y. 2021. Mechanisms of endothelial regeneration and vascular repair and their application to regenerative medicine. American Journal of Pathology, 191, 1. DOI: 10.1016/j.ajpath.2020.10.001.
- 46. Fernandes L.R., Stern A.C.B., de Cássia Cavaglieri R. 2017. 7-Ketocholesterol overcomes drug resistance in chronic myeloid leukemia cell lines beyond MDR1 mechanism. Journal of Proteomics, 151, 12-23. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.06.011.
- Fonseca C.G., Barbacena P. i Franco C.A. 2020. Endothelial cells on the move: dynamics in vascular morphogenesis and disease. Vascular Biology, 2, 1, H29-H43. DOI: 10.1530/VB-20-0007.
- 48. Gajewski A., Gawrysiak M., Krupa A. i wsp. 2022. Accumulation of deleterious effects in gastric epithelial cells and vascular endothelial cells *in vitro* in the milieu of *Helicobacter pylori* components, 7-ketocholesterol and acetylsalicylic acid. International Journal of Molecular Sciences, 23, 6355. DOI: 10.3390/ijms23116355.

- 49. Ghavami S., Shojaei S., Yeganeh B i wsp. 2014. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. Progress in Neurobiology, 112, 24-49. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2013.10.004.
- 50. Gołąb J., Jakóbisiak M., Lasek W. i wsp. 2017. Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa. ISBN 978-83-01-19450-5.
- 51. Gomez-Salinero J.M. i Raffi S. 2018. Endothelial cell adaptation in regeneration. Science, 362, 6419, 1116-1117. DOI: 10.1126/science.aar4800.
- 52. Gonçalves R.C., Banfi A., Oliveira M.B. i wsp. 2021. Strategies for re-vascularization and promotion of angiogenesis in trauma and disease. Biomaterials 269, 120628, 0142-6912. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120628.
- 53. Greves D.T. 1999. The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression. Clinical Infectious Diseases, 28, 3, 482–490. DOI: 10.1086/515178.
- Gross A. 2016. BCL-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1857, 8, 1243-1246. DOI: 10.1016/j.bbabio.2016.01.017.
- 55. Haiko P.I., Karkkainen M.J., Achen M.G. i wsp. 2007. Chapter Three. Growth factors and lymphangiogenesis w Angiogenesis. From basic science to clinical applications. Taylor & Francis, Boca Raton. ISBN 978-0-8493-2844-2.
- Hannan M.A., Sohag A.A.M., Dash R. i wsp. 2020. Phytosterols of marine algae: Insights into the potential health benefits and molecular pharmacology. Phytomedicine, 69, 153201. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153201.
- 57. Hauser S., Jung F. i Pietzsch J. 2017. Human endothelial cell models in biomaterial research. Trends in Biotechnology, 35, 3, 265-277. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.09.007.
- 58. He Y.E., Qiu H.X., Wu R.Z. i wsp. 2020. Oxidised low-density lipoprotein and its receptor-mediated endothelial dysfunction are associated with coronary artery lesions in Kawasaki disease. Journal of Cardiovascular Translational Research, 13, 204-204. DOI: 10.1007/s12265-019-09908-y.
- 59. Hernández-Rodríguez J., Segarra M., Vilardell C. i wsp. 2004. Tissue production of pro-inflammatory cytokines (IL-1β, TNFα and IL-6) correlates with the intesity of the systemic inflammatory response and with corticosteroid requirements in giant-cell arteritis. Rheumatology, 43, 294-301. DOI: 10.1093/rheumatology/keh058.
- 60. Herold J. i Kalucka J. 2021. Angiogenesis in adipose tissue: the interplay between adipose and endothelial cells. Frontiers in Physiology, 11, 624903. DOI: 10.3389/fphys.2020.624903.
- 61. Hokugo A., Sorice S., Parhami F. i wsp. 2013. A novel oxysterol promotes bone regeneration in rabbit cranial bone defects. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 10, 7, 591–599. DOI: 10.1002/term.1799.
- 62. Holmqvist K. 2004. The role of Shb in angiogenesis, FGF and VEGF signaling in endothelial cells. Acta Universitatis Upsaliensis, Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine, rozprawa doktorska, https://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:uu:diva-3943.
- 63. Hsissou R., Seghiri R., Benzekri Z. i wsp. 2021. Polymer composite materials: a comprehensive review. Composite Structures, 262, 113640. DOI: 10.1016/j.compstruct.2021.113640.

- 64. Huang Y., Song C., He J. i wsp. 2022. Research progress in endothelial cell injury and repair. Frontiers in Pharmacology, 13, 997272. DOI: 10.3389/fphar.2022.997272.
- 65. Huebsch N. i Mooney D.J. 2009. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. Nature, 462, 426-432. DOI: 10.1038/nature08601.
- 66. Hyzy S.L., Kajan I., Wilson D.S. i wsp. 2017. Inhibition of angiogenesis impairs bone healing in an in vivo murine rapid resynostosis model. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 150, 10, 2742-2749. DOI: 10.1002/jbm.a.36137.
- 67. Incalza M., D'Oria R, Natalicchio A. i wsp. 2018. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. Vascular Pharmacology, 100, 1537-1891. DOI: 10.1016/j.vph.2017.05.005.
- 68. Iqbal F., Szaraz P., Librach M. i wsp. 2017. Angiogenic potency evaluation of cell therapy candidates by a novel application of the *in vitro* aortic ring assay. Stem cell research & therapy, 8, 184. DOI: 10.1186/s13287-017-0631-1.
- Jarad M., Kuczynski E.A., Morrison J. i wsp. 2017. Release of endothelial cell associated VEGFR2 during TGF-β modulated angiogenesis in vitro. BMC Cell Biology, 18, 10. DOI: 10.1186/s12860-017-0127-y.
- 70. Jîtcă G., Ősz B.E., Tero-Vescan A. i wsp. 2022. Positive aspects of oxidative stress at different levels of the human body: a review. Antioxidants, 11, 572. DOI: 10.3390/antiox11030572.
- Johnson J.S., Meliton V., Kim W.K. i wsp. 2011. Novel oxysterols have pro-osteogenic and anti-adipogenic effects *in vitro* and induce spinal fusion *in vivo*. Journal of Cellular Biochemistry, 112, 6, 1673-1684. DOI: 10.1002/jcb.23082.
- 72. Joyce N.C. 2012. Proliferative capacity of corneal endothelial cells. Experimental Eye Research, 95, 16-23. DOI: 10.1016/j.exer.2011.08.014.
- 73. Karali E., Bellou S., Stellas D. i wsp. 2014. VEGF signals through ATF6 and PERK to promote endothelial cell survival and angiogenesis in the absence of ER stress. Molecular Cell, 54, 559-572. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.03.022.
- 74. Kelber J.A. i Klemke R.L. 2010. PEAK1, a novel kinase target in the fight against cancer. Oncotarget, 1, 3, 219-223. DOI: 10.18632/oncotarget.128.
- 75. Kha H.T., Basseri B., Shouhed D. i wsp. 2004. Oxysterols regulate differentiation of mesenchymal stem cells: pro-bone and anti-fat. Journal of Bone and Mineral Research, 19, 5. DOI: 10.1359/JBMR.040115.
- 76. Khalil A.A. I Friedl P. 2010. Determinants of leader cells in collective cell migration. Integrative Biology, 2, 568-574. DOI: 10.1039/c0ib00052c.
- 77. Kim W.K., Meliton V., Amantea C.M. i wsp. 2007. 20(S)-hydroxycholesterol inhibits PPARγ expression and adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells through a hedgehog-dependent mechanism. Journal of Bone and Mineral Research, 22, 11, 1711-1719. DOI: 10.1359/jbmr.070710.
- Klaassen C.D. i Aleksunes L.M. 2010. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. Pharmacological Reviews, 62, 1-96. DOI: 10.1124/pr.109.002014.
- 79. Koivunen J., Aaltonen V. i Peltonen J. 2006. Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. Cancer Letters, 235(1), 1–10. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.03.033.
- 80. Krupa A., Gonciarz W., Rusek-Wala P. i wsp. 2021. *Helicobacter pylori* infection acts synergistically with a high-fat diet in the development of a proinflammatory and potentially proatherogenic endothelial cell environment in an experimental model. International Journal of Molecular Sciences, 22, 3394. DOI: 10.3390/ijms22073394.

- Kwon I.K., Lee S.C., Hwang Y.S. i wsp. 2015. Mitochondrial function contributes to oxysterol-induced osteogenic differentiation in mouse embryonic stem cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 1853, 3, 561–572. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.12.011.
- 82. Lee B.K., Yun Y. i Park K. 2016. PLA micro- and nano-particles. Advanced Drug Delivery Reviews, 107, 176-191. DOI: 10.1016/j.addr.2016.05.020.
- Lee C.S., Hsu G.C.Y., Sono T. i wsp. 2021. Development of a biomaterial scaffold integrated with osteoinductive oxysterol liposomes to enhance hedgehog signaling and bone repair. Molecular Pharmaceutics, 18, 1677-1689. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c01136.
- 84. Lee D.G., Park S.Y., Chung W.S. i wsp. 2014. The bone regenerative effects of fucosterol in *in vitro* and *in vivo* models of postmenopausal osteoporosis. Molecular Nutrition and Food Research, 58, 1249-1257. DOI: 10.1002/mnfr.201300319.
- 85. Lee S.J., Kim E.J., Han S. i wsp. 2017. Evaluating the oxysterol combination of 22(S)-hydroxycholesterol and 20(S)-hydroxycholesterol in periodontal regeneration using periodontal ligament stem cells and alveolar bone healing models. Stem Cell Research and Therapy,
- Li A., Hokugo A., Segovia L.A. i wsp. 2017. Oxy133, a novel osteogenic agent, promotes bone regeneration in an intramembranous bone-healing model. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 11, 5, 1490-1499. DOI: 10.1002/term.2047.
- Li G., Gao J., Ding P. i wsp. 2024. The role of endothelial cell-pericyte interactions in vascularization and diseases. Journal of Advanced Research, 67, 269-288. DOI: 10.1016/j.jare.2024.01.016.
- Liu L. i Shi G.P. 2012. CD31: beyond a marker for endothelial cells. Cardiovascular Research, 94, 3–5. DOI: 10.1093/cvr/cvs108.
- 89. Loi F., Córdova L.A., Pajarinen J. i wsp. 2016. Inflammation, fracture and bone repair. Bone, 86, 119-130. DOI: 10.1016/j.bone.2016.02.020.
- Lubrano V. i Balzan S. 2014. LOX-1 and ROS, inseparable factors in the process of endothelial damage. Free Radical Research, 48, 8, 841-848. DOI: 10.3109/10715762.2014.929122.
- Luo J., Yang H. i Song B.L. 2020. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 21, 225-245. DOI: 10.1038/s41580-019-0190-7.
- Luthra S., Dong J., Gramajo A.L. i wsp. 2008. 7-Ketocholesterol activates caspases-3/7, -8, and -12 in human microvascular endothelial cells *in vitro*. Microvascular Research, 75, 343-350. DOI: 10.1016/j.mvr.2007.10.003.
- 93. Lyu J., Yang E.J. i Shim J.S. 2019. Cholesterol trafficking: an emerging therapeutic target for angiogenesis and cancer. Cells, 8, 389. DOI: 10.3390/cells8050389.
- Łuczaj W., Gęgotek A. i Skrzydlewska E. 2017. Antioxidants and HNE in redox homeostasis. Free Radical Biology and Medicine, 111, 87-101. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.033.
- 95. Manolagas S. C. 2020. Osteocalcin promotes bone mineralization but is not a hormone. PLoS Genetics, 16, 6, e1008714. DOI: 10.1371/journal.pgen.1008714.
- Mao A.S. i Mooney D.J. 2015. Regenerative medicine: current therapies and future directions. The Proceedings of the National Academy of Sciences, 112, 47, 14452-14459. DOI: 10.1073/pnas.1508520112.

- 97. Mayor R. i Etienne-Manneville S. 2016. The front and rear of collective cell migration. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 17, 97-109. DOI: 10.1038/nrm.2015.14.
- McDonald A.I., Shirali A.S., Aragón R. i wsp. 2018. Endothelial regeneration of large vessels is a biphasic process driven by local cells with distinct proliferative capacities. Cell Stem Cell, 23, 201-225. DOI: 10.1016/j.stem.2018.07.011.
- Medina R.J., Barber C.L., Sabatier F. i wsp. 2017. Endothelial progenitors: a consensus statement on nomenclature. Stem Cells Translational Medicine, 6, 5, 1316-1320. DOI: 10.1002/sctm.16-0360.
- Metsalu, T., Vilo, J., 2015. ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. Nucleic Acids Research, 43, W566–W570. DOI: 10.1093/nar/gkv468.
- 101. Michaelis U.R. 2014. Mechanisms of endothelial cell migration. Cellular and Molecular Life Sciences, 71, 4131–4148. DOI: 10.1007/s00018-014-1678-0.
- 102. Moludi J., Maleki V., Jafari-Vayghyan H. i wsp. 2020. Metabolic endotoxemia and cardiovascular disease: a systematic review about potential roles of prebiotics and probiotics. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 47, 6, 927-939. DOI: 10.1111/1440-1681.13250.
- 103. Munir A., Døskeland A., Avery S.J. i wsp. 2019. Efficacy of copolymer scaffolds delivering human demineralised dentine matrix for bone regeneration. Journal of Tissue Engineering, 10, 1-16. DOI: 10.1177/2041731419852703.
- 104. Murariu M. i Dubois P. 2016. PLA composites: from production to properties. Advanced Drug Delivery Reviews, 107, 17-46. DOI: 10.1016/j.addr.2016.04.003.
- 105. Nakajima K., Yabumoto S., Tazawa I. i wsp. 2022. Intravital staining to detect mineralization in *Xenopus tropicalis* during and after metamorphosis. Development, Growth and Differentiation, 64, 7, 368-378. DOI: 10.1111/dgd.12804.
- 106. Neal A., Nornes S., Payne S. i wsp. 2019. Venous identity requires BMP signalling through ALK3. Nature Communications, 10, 453. DOI: 10.1038/s41467-019-08315-w.
- 107. Ola M.S., Nawaz M. i Ahsan H. 2011. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. Molecular and Cellular Biochemistry, 351, 41–58. DOI: 10.1007/s11010-010-0709-x.
- 108. Ozturk B.Y., Inci I., Egri S. i wsp. 2013. The treatment of segmental bone defects in rabbit tibiae with vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded gelatin/hydroxyapatite "cryogel" scaffold. European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology, 23, 7, 767–774. DOI: 10.1007/s00590-012-1070-4.
- 109. Pape H.C., Marcucio R., Humphrey C. i wsp. Trauma-induced inflammation and fracture healing. Journal of Orthopaedic Trauma, 24, 9. DOI: 10.1097/BOT.0b013e3181ed1361.
- 110. Parisuthiman D., Singhatanadgit W., Dechatiwongse T. i wsp. 2009. Cissus extract enhances biomineralization through quadrangularis up-regulation of MAPK-dependent alkaline phosphatase activity in osteoblasts. In Vitro Cellular & Developmental Animal, Biology _ 45. 3-4, 194-200. DOI: 10.1007/s11626-008-9158-1.
- Patan S. 2004. Vasculogenesis and angiogenesis w Angiogenesis in brain tumors. Cancer Treatment and Research, vol 117, Springer, Boston. DOI: 10.1007/978-1-4419-8871-3_1.
- 112. Pedruzzi E., Guichard C., Ollivier V. i wsp. 2004. NAD(P)H oxidase nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic

smooth muscle cells. Molecular and Cellular Biology, 24, 24, 10703-10717. DOI: 10.1128/MCB.24.24.10703-10717.2004.

- 113. Potente M.i Carmeliet P. 2017. The Link between Angiogenesis and Endothelial Metabolism. Annual Review of Physiology, 25, 25.1–25.24. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021115-105134.
- 114. Powell D.R. 2013. Degust: interactive RNA-seq analysis. DOI: 10.5281/zenodo.3258932.
- 115. Rammelt S., Neumann M., Hanisch U. i wsp. 2005. Osteocalcin enhances bone remodeling around hydroxyapatite/collagen composites. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 73A, 3, 284–294. DOI: 10.1002/jbm.a.30263.
- 116. Ramot Y., Haim-Zada M., Domb A.J. i wsp. 2016. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. Advanced Drug Delivery Reviews, 107, 153-162. DOI: 10.1016/j.addr.2016.03.012.
- 117. Reddi A.H. i Reddi A. 2009. Bone morphogenetic proteins (BMPs): from morphogens to metabologens. Cytokine & Growth Factor Reviews, 20, 5-6, 341–342. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.015.
- 118. Riobo N. 2012. Cholesterol and its derivatives in sonic hedgehog signaling and cancer. Current Opinion in Pharmacology, 12, 736-741. DOI: 10.1016/j.coph.2012.07.002.
- Roach H. 1994. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption. Cell Biology International, 18, 6, 617–628. DOI: 10.1006/cbir.1994.1088.
- Rosenfeld M.E. I Campbell L.A. 2011. Pathogens and atherosclerosis: update on the potential contribution of multiple infectious organisms to the pathogenesis of atherosclerosis. Thrombosis and Haemostasis, 106, 05, 858-867. DOI: 10.1160/TH11-06-0392.
- 121. Rotty J.D., Wu C. i Bear J.E. 2013. New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 14, 7-12. DOI: 10.1038/nrm3492.
- 122. Samson F.P., Patrick A.T., Fabunmi T.E. i wsp. 2020. Oleic acid, cholesterol, and linoleic acid as angiogenesis initiators. ACS Omega, 5, 20575–20585. DOI: 10.1021/acsomega.0c02850.
- Samsonraj R.M., Dudakovic A., Zan P. i wsp. 2017. A versatile protocol for studying calvarial bone defect healing in a mouse model. Tissue Engineering Part C: Methods, 23, 11. DOI: 10.1089/ten.tec.2017.0205.
- 124. Santana M.H.A. i Huber S.C. 2023. Chapter 2 History and evolution of regenerative medicine. Nanotechnology and Regenerative Medicine, 23-44. DOI: 10.1016/B978-0-323-90471-1.00011-6.
- 125. Sánchez-León M.E., Loaeza-Reyes K.J., Matias-Cervantes C.A. i wsp. 2024. LOX-1 in cardiovascular disease: a comprehensive molecular and clinical review. International Journal of Molecular Sciences, 25, 5276. DOI: 10.3390/ijms25105276.
- 126. Sawicki W. i Malejczyk J. 2012. Histologia. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa. ISBN 978-83-200-4349-5.
- 127. Scheiblich H., Bousset L., Schwartz S. i wsp. 2021. Microglial NLRP3 inflammasome activation upon TLR2 and TLR5 ligation by distinct α-synuclein assemblies. The Journal of Immunology, 207, 8, 2143-2154. DOI: 10.4049/jimmunol.2100035.

- 128. Schindeler A., McDonald M.M., Bokko P. i wsp. 2008. Bone remodeling during fracture repair: the cellular picture. Seminars in Cell & Developmental Biology, 19, 5, 459-466. DOI: 10.1016/j.semcdb.2008.07.004.
- 129. Scioli M.G., Storti G., D'amico F. i wsp. 2020. Oxidative stress and new pathogenetic mechanisms endothelial dysfunction: Potential diagnostic in biomarkers Journal of Clinical Medicine, 9. 1995. and therapeutic targets. DOI: 10.3390/jcm9061995.
- 130. Shabanzadeh A.P., Charish J., Tassew N.G. i wsp. 2021. Cholesterol synthesis inhibition promotes axonal regeneration in the injured central nervous system. Neurobiology of Disease, 150, 105259. DOI: 10.1016/j.nbd.2021.105259.
- 131. Shalini S., Dorstyn L., Dawar S. i wsp. 2015. Old, new and emerging functions of caspases. Cell Death & Differentiation, 22, 526–539. DOI: 10.1038/cdd.2014.216.
- 132. Shao Y., Saredy J., Yang W.Y. i wsp. 2020. Vascular endothelial cells and innate immunity. Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 40, e138–e152. DOI: 10.1161/ATVBAHA.120.314330.
- 133. Shawber C.J. i Kitajewski J. 2007. Chapter four. Notch and vascular development w Angiogenesis. From basic science to clinical applications. Taylor & Francis, Boca Raton. ISBN 978-0-8493-2844-2.
- 134. Schibuya M. 2013. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: Physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. Journal of Biochemistry, 153 (1), 13-19. DOI: 0.1093/jb/mvs136.
- 135. Simons M., Gordon E. i Claesson-Welsh L. 2016. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signaling. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 17, 611-625. DOI: 10.1038/nrm.2016.87.
- 136. Soumya S., Sajesh K.M., Jayakumar R. i wsp. 2012. Development of a phytochemical scaffold for bone tissue engineering using *Cissus quadrangularis* extract. Carbohydrate Polymers, 87, 2, 1787–1795. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.09.094.
- Suganya S., Venugopal J., Ramakrishna S. i wsp. 2014. Herbally derived polymeric nanofibrous scaffolds for bone tissue regeneration. Journal of Applied Polymer Science, 131, 3, 39835. DOI: 10.1002/app.39835.
- 138. Sweeney M. i Foldes G. 2018. It Takes Two: Endothelial-Perivascular Cell Cross-Talk in Vascular Development and Disease. Frontiers in Cardiovascular Medicine, 5, 154. DOI: 10.3389/fcvm.2018.00154.
- 139. Szwed-Georgiou A., Płociński P., Kupikowska-Stobba B. i wsp. 2023. Bioactive materials for bone regeneration: biomolecules and delivery systems. ACS Biomaterials Science and Engineering, 9, 9, 5222-5254. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.3c00609.
- Thijssen V.L. 2021. Galectins in endothelial cell biology and angiogenesis: the basics. Biomolecules, 17, 1386. DOI: 10.3390/biom11091386.
- 141. Thomas M.V. i Puleo D.A. 2011. Infection, inflammation, and bone regeneration: A paradoxical relationship. Journal of Dental Research, 90, 9, 1052-1061. DOI: 10.1177/0022034510393967.
- 142. Tomaszewska A., Gonciarz W., Rechciński T. i wsp. 2024. *Helicobacter pylori* components increase the severity of metabolic syndrome and its hepatic manifestations induced by a high fat diet. Scientific Reports, 14, 5764. DOI: 10.1038/s41598-024-56308-7.
- 143. Trimm E. i Red-Horse K. 2023. Vascular endothelial cell development and diversity. Nature Reviews Cardiology, 20, 197-210. DOI: 10.1038/s41569-022-00770-1.

- 144. Tsuji-Tamura K. i Ogawa M. 2018. Morphology regulation in vascular endothelial cells. Inflammation and Regeneration, 38:25. DOI: 10.1186/s41232-018-0083-8.
- 145. Vandekeere S., Dewerchin M. i Carmeliet P. 2015. Angiogenesis Revisited: An Overlooked Role of Endothelial Cell Metabolism in Vessel Sprouting. Microcirculation, 22, 509-507. DOI: 10.1111/micc.12229.
- 146. Vicente-Manzanares M., Ma X., Adelstein R.S. i wsp. 2009. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 10, 778-790. DOI: 10.1038/nrm2786.
- 147. Vimalraj S. 2020. Alkaline phosphatase: structure, expression and its function in bone mineralization. Gene, 754, 144855. DOI: 10.1016/j.gene.2020.144855.
- 148. Vona R., Iessi E. i Matarrese P. 2021. Role of cholesterol and lipid rafts in cancer signaling: a promising therapeutic opportunity? Frontiers in Cell and Developmental Biology, 9, 622908. DOI: 10.3389/fcell.2021.622908.
- Wang H., Lapek J., Fujimura K. i wsp. 2018. Pseudopodium-enriched atypical kinase 1 mediates angiogenesis by modulating GATA2-dependent VEGFR2 transcription. Cell Discovery, 4, 26. DOI: 10.1038/s41421-018-0024-3.
- 150. Wang W.Y., Lin D., Jarman E.H. i wsp. 2020. Functional angiogenesis requires microenvironmental cues balancing endothelial cell migration and proliferation. Lab on a Chip, 6. DOI: 10.1039/c9lc01170f.
- 151. Wang X., Bove A.M., Simone G. i wsp. 2020. Molecular bases of VEGFR-2-mediated physiological function and pathological role. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 8, 599281. DOI: 10.3389/fcell.2020.599281.
- 152. Wei Z., Ran H. i Yang C. 2020. CircRSF1 contributes to endothelial cell growth, migration and tube formation under ox-LDL stress through regulating miR-758/CCND2 axis. Life Sciences, 259, 118241. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118241.
- 153. Weir M.D. i Xu H.H.K. 2010. Human bone marrow stem cell-encapsulating calcium phosphate scaffolds for bone repair. Acta Biomaterialia, 6, 4118-4126. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.04.029
- 154. White K., Chalaby R., Lowe G. i wsp. 2021. Calcein binding to assess mineralization in hydrogel microspheres. Polymers, 13, 2274. DOI: 10.3390/polym13142274.
- 155. Xu H., Zhou S., Tang Q. i wsp. 2020. Cholesterol metabolism: new functions and therapeutic approaches in cancer. Biochimica et Biophysica Acta Reviews on Cancer, 1874, 188394. DOI: 10.1016/j.bbcan.2020.188394.
- 156. Yadav U.C.S., Srivastava S.K. i Ramana K.V. 2012. Prevention of VEGF-induced growth and tube formation in human retinal endothelial cells by aldose reductase inhibition. Journal of Diabetes and its Complications, 26, 369-377. DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2012.04.017.
- 157. Yamada K.M. i Sixt M. 2019. Mechanisms of 3D cell migration. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 20, 738-752. DOI: 10.1038/s41580-019-0172-9.
- 158. Yan C.P., Wang X.K., Jiang K. i wsp. 2022. β-Ecdysterone enhanced bone regeneration through the BMP-2/SMAD/RUNX2/osterix signaling pathway. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 10, 883228. DOI: 10.3389/fcell.2022.883228.
- 159. Yang V.W. 2018. Chapter 8. The Cell Cycle w Physiology of the Gastrointestinal Tract, Sixth Edition, Elsevier, Amsterdam.
- 160. Zegeye M.M., Andersson B., Sirsjö A. i wsp. 2020. IL-6 trans-signaling impairs sprouting angiogenesis by inhibiting migration, proliferation and tube formation of human endothelial cells. Cells, 9, 1414. DOI: 10.3390/cells9061414.

- 161. Zeng J.M., Qiu P., Xiong L. i wsp. 2019. Bone repair scaffold coated with bone morphogenetic protein-2 for bone regeneration in murine calvarial defect model: systematic review and quality evaluation. The International Journal of Artificial Organs, 42, 7. DOI: 10.1177/0391398819834.
- 162. Zhang M. i Jiang L. 2016. Oxidized low-density lipoprotein decreases VEGFR2 expression in HUVECs and impairs angiogenesis. Experimental and Therapeutic Medicine, 12, 3742-3748. DOI: 10.3892/etm.2016.3823.
- 163. Zhang T., Yuan D., Xie J. i wsp. 2019. Evolution of the cholesterol biosynthesis pathway in animals. Molecular Biology and Evolution, 36, 11, 2548-2556. DOI: 10.1093/molbev/msz167.
- 164. Zhang Y.F., Zhang Y., Jia D.D. i wsp. 2021. Insights into the regulatory role of Plexin D1 signalling in cardiovascular development and diseases. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 25, 4183-4194. DOI: 10.1111/jcmm.16509.
- Zhaolin Z., Guohua L., Shiyuan W. i wsp. 2018. Role of pyroptosis in cardiovascular disease. Cell Proliferation, 52, e12563. DOI: 10.1111/cpr.12563.
- 166. Zhou X., Feng W., Qiu K. i wsp. 2015. BMP-2 derived peptide and dexamethasone incorporated mesoporous silica nanoparticles for enhanced osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells. ACS Applied Materials & Interfaces, 7, 29, 15777-15789. DOI: 10.1021/acsami.5b02636.
- 167. Zhu L., Gu Q. i Fang L. 2019. Cholesterol-mediated regulation of angiogenesis: an emerging paradigm. Cardiology Plus, 4, 1-9. DOI: 10.4103/cp.cp_5_19.