

## ROLA STYMULACJI MECHANICZNEJ KOMÓREK KOSTNYCH W PROCESIE KOŚCIOTWORZENIA

### THE ROLE OF BONE CELL MECHANICAL STIMULATION IN THE PROCESS OF OSTEOGENESIS

Amadeusz BRYŁA\*, Joanna FILIPOWSKA\*, Anna M. OSYCZKA

Zakład Biologii i Obrazowania Komórki, Instytut Zoologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński

*Streszczenie:* Podstawową funkcją kości jest podtrzymywanie miękkich tkanek organizmu, a także, w przypadku człowieka, utrzymanie ciała w pionowej pozycji. Stąd też, tkanka kostna spełnia ważne dla organizmu funkcje mechaniczne i odbiera różnego rodzaju bodźce mechaniczne. Siły mechaniczne działające na kość regulują ich przebudowę, tzw. obrót kostny. Proces przebudowy kości przebiega zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w wyniku mikro- i makro- uszkodzeń kości, a zaburzenia równowagi pomiędzy kościotworzeniem a resorpcją kości wpływają na równowagę biologiczną całego organizmu. Leczenie dużych ubytków kostnych lub chorób zwyrodnieniowych kości wciąż stanowi wyzwanie dla współczesnej medycyny. Obok standardowych przeszczepów auto- lub allogenicznych, szereg nowatorskich rozwiązań oferuje obecnie inżynieria tkanki kostnej, w której m.in. uprzednio wyizolowane prekursory osteoblastów kierunkuje się do kościotworzenia poprzez stymulację wybranymi czynnikami wzrostowymi, hodowle w przestrzennych i kościopodobnych rusztowaniach oraz ekspozycję komórek na bodźce mechaniczne *in vitro*. W organizmie zarówno prekursory osteoblastów, dojrzałe osteoblasty oraz terminalnie zróżnicowane osteocyty są poddawane działaniu m.in. napięcia ścinającego, rozciągania, ściskania i/lub wibracji, które mogą stymulować przebudowę kości. Stymulowanie mechaniczne komórek poza organizmem umożliwiają różnego rodzaju bioreaktory. Prezentowana praca stanowi przegląd najnowszej literatury dotyczącej najczęściej stosowanych sił mechanicznych wykorzystywanych w hodowlach komórek kostnych i efektywnie stymulujących procesy kościotworzenia *in vitro*. Szczególną uwagę poświęcono perfuzyjnemu przepływowi płynów, rozciąganiu i wibracji, oraz roli jaką siły te spełniają w procesach kościotworzenia w hodowlach mezenchymalnych komórek macierzystych i prekursorów osteoblastów.

*Słowa kluczowe:* stymulacja mechaniczna, komórki kostne, inżynieria tkankowa, bioreaktory

*Summary:* The main function of bones is to support soft tissues of the organisms and maintain vertical posture of a human body. Thus, skeletal tissue provides an important mechanical function and senses different mechanical forces. Mechanical stimulation affects bone remodelling, i.e. bone turnover.

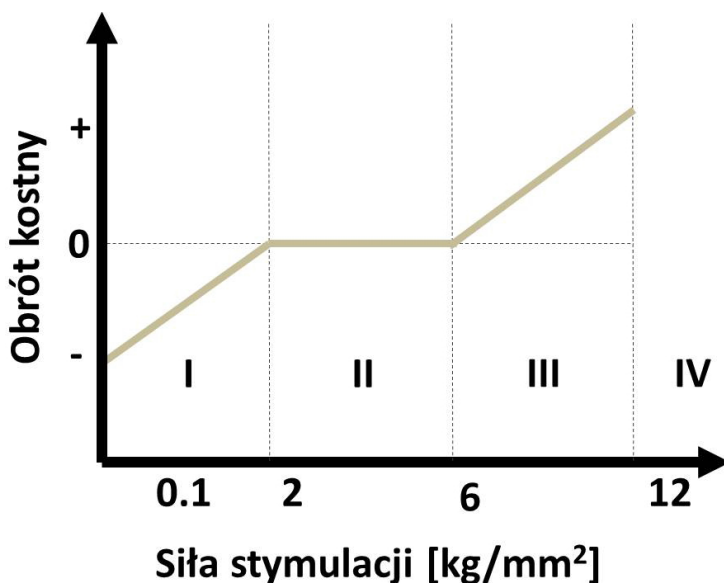
Bone remodeling takes place under physiological conditions and upon micro- and macro- bone injuries. Imbalance between bone formation and resorption affects the homeostasis of a whole organism. Treating large bone defects or bone degenerative diseases remains a challenging medical issue. Besides standard auto- or allogenic bone grafts, bone tissue engineering offers several innovating solutions by applying e.g. isolated osteoblast precursor cells that are stimulated to osteogenesis with selected growth factors, cultured in three-dimensional bone-like scaffolds and exposed to mechanical forces *in vitro*. In a body, bone precursors, osteoblasts and terminally differentiated osteocytes are exposed to e.g. shear stress, stretching, compression and vibrations, which may trigger bone remodelling. Different bioreactors facilitate mechanical stimulation of cells *in vitro*. In this manuscript we review the current literature dealing with the most common mechanical forces applied in bone cell cultures and effectively stimulating the osteogenesis *in vitro*. Particular attention was paid to flow perfusion, stretching and vibrations and the role these forces play in mesenchymal stem cell and bone precursor cell osteogenesis *in vitro*.

*Key words:* mechanical stimulation, bone cells, tissue engineering, bioreactors

*Wykaz stosowanych skrótów:* **ASC** – mezenchymalne komórki macierzyste pochodzenia tłuszczowego (ang. *Adipose derived Stem Cells*); **BMP** – białka morfogenetyczne kości (ang. *Bone Morphogenetic Proteins*); **BMP-2** – białko morfogenetyczne kości typu 2 (ang. *Bone morphogenetic protein 2*); **BMSC** – mezenchymalne komórki macierzyste pochodzenia szpikowego (ang. *Bone Marrow derived Stem Cells*); **DLX-5** – czynnik transkrypcyjny, aktywujący kościotworzenie (ang. *Distal-Less Homeobox 5*); **ERK** – kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. *Extracellular signal-Regulated Kinases*); **ERK 1** – kinaza typu 1 regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. *Extracellular signal-Regulated Kinase 1*); **ERK 2** – kinaza typu 2 regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. *Extracellular Signal-Regulated Kinase 2*); **GSK-3 $\beta$**  – kinaza syntazy glikogenu 3 $\beta$  (ang. *Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$* ); **HBDC** – komórki pochodzące z kości (ang. *Human Bone Derived Cells*); **HDF** – ludzkie fibroblasty wyizolowane ze skóry (ang. *Human Dermal Fibroblasts*); **hES-MP** – linia ludzkich prekursorów mezenchymalnych pozyskana z embrjonalnych komórek macierzystych (ang. *Human Embryonic Stem cell-derived Mesenchymal Progenitor cell line*); **ID-1** – czynnik transkrypcyjny, inhibitor różnicowania 1 (ang. *Inhibitor of Differentiation-1*); **LIPUS** – stymulacja pulsacyjnymi wibracjami o niskiej intensywności (ang. *Low Intensity Pulsed Ultrasound Stimulation*); **LMHF** – wibracje o niskiej amplitudzie i wysokiej częstotliwości (ang. *Low- Magnitude High Frequency*); **MSC** – mezenchymalne komórki macierzyste (ang. *Mesenchymal Stem Cells*); **OSX** – czynnik transkrypcyjny, aktywujący kościotworzenie (ang. *Osterix*); **PGF** – łożyskowy czynnik wzrostu (ang. *Placental Growth Factor*); **PKA** – białkowa kinaza A (ang. *Protein Kinase A*); **PLGA** – kopolimer kwasu glikolowego i mlekowego (ang. *Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)*); **PEMF** – pulsacyjne pole elektromagnetyczne (ang. *Pulsed Electromagnetic Field*); **RANK-L** – ligand receptora aktywującego jądrowy czynnik  $\kappa\beta$  (ang. *Receptor Activator Nuclear Factor  $\kappa\beta$ - Ligand*); **RGD-OSA/NSC** – kompozyt zawierający utleniony alginian sodu i N-bursztynian chitozanu, sprzężony z sekwencją Arg-Gly-Asp (ang. *RGD-grafted Oxidized Sodium Alginate/N-Succinyl Chitosan (RGD-OSA/NSC) hydrogel*); **RUNX-2** – czynnik transkrypcyjny, aktywujący kościotworzenie (ang. *Runt-Related Transcription Factor 2*); **SACC** – kanały wapniowe aktywowane rozciąganiem (ang. *Stretch-Activated Calcium Channels*); **SMAD** – (ang. *SMA – Small Body Size*, *MAD – Mothers Against Decapentaplegic*); **SMF** – statyczne pole magnetyczne (ang. *Static Magnetic Field*); **SRE** – element promotora danego genu, aktywowany przez przyłączenie białek SMAD (ang. *Smad Responsive Element*); **TGF- $\beta$**  – transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *Transforming Growth Factor- $\beta$* ); **TRPM7** – napięciowo zależny kanał jonowy typu 7 (ang. *Transient Receptor Potential cation channel 7*); **Wnt** – ścieżka sygnałowa z udziałem białek należących do rodziny Wnt (ang. *Wingless type signaling pathway*)

## WSTĘP

Podstawowym celem procesu przebudowy kości jest naprawa mikrouszkodzeń wynikających z naturalnego obciążenia układu szkieletowego, co w konsekwencji prowadzi do adaptacji tkanki kostnej do występujących obciążeń mechanicznych i wpływa na jej wytrzymałość mechaniczną [24]. Na proces przebudowy kości, lub inaczej obrotu kostnego, składają się dwa etapy: resorpcja kości i kościotworzenie. Zależność pomiędzy stymulacją mechaniczną a odpowiedzią tkanki kostnej opisują prawo Wolff'a i teoria mechanostatu. Zgodnie z prawem Wolff'a, w miejscach poddanych obciążeniu mechanicznemu zwiększa się wytrzymałość kości [16]. Efekt działania stymulacji mechanicznej jest jednak zależny od stopnia zmineralizowania tkanki kostnej, jej architektury i stanu obciążenia [60]. Parametry te decydują o podatności kości na złamania [2]. Teoria mechanostatu przedstawia natomiast zmiany przebiegu obrotu kostnego w zależności od wartości stosowanej siły mechanicznej [15] (ryc. 1). Powszechnie wiadomo, że brak stymulacji mechanicznej może prowadzić do niekorzystnych zmian w obrocie kostnym. Dla przykładu, osoby unieruchomione lub przebywające w stanie nieważkości (np. astronauty) tracą 0,5-2% masy kostnej miesięcznie [19, 54].



**RYCINA 1.** Ilustracja założeń teorii mechanostatu. I – spadek masy kostnej, II – równowaga pomiędzy resorpcją i kościotworzeniem, III – wzrost masy kostnej, IV – złamanie kości. Zmodyfikowane na podstawie [15]

**FIGURE 1.** Principles of mechanostat theory. I – bone mass decreases, II – equilibrium between bone resorption and formation, III – bone mass increases, IV – bone fractures; modified from [15]

Z drugiej strony, liczne dane literaturowe sugerują pozytywny wpływ aktywności fizycznej na wzrost wytrzymałości kości [4, 33]. Regularne ćwiczenia fizyczne mogą stymulować kościotworzenie [63] i chronić szkielet przed patologiczną resorpcją [38]. Falca i wsp. [13] wykazali jednak, że istotny jest rodzaj wykonywanych ćwiczeń. Według tych autorów np. pływanie i skakanie poprawia gęstość kości w większym stopniu, niż poddawanie pacjentów wibracjom. Badania Kontulainen i wsp. [29] wskazują też m.in., że stopień mineralizacji kości tenisistek zależy od wieku, w którym rozpoczęły treningi. U kobiet, które rozpoczęły treningi przed okresem dojrzewania, wzrost mineralizacji i masy kości ramieniowej i przedramieniowej ręki dominującej był 2-4-krotnie większy niż u kobiet, które rozpoczęły treningi po wejściu w okres dojrzewania. Wyniki opublikowane ostatnio przez Warden i wsp. [62] wskazują również, że wzmożona aktywność fizyczna u młodych osób przekłada się na wyższą wytrzymałość mechaniczną szkieletu w późniejszym okresie życia, co obniża ryzyko osteoporozy i złamań kości. Jest to istotne zwłaszcza dla kobiet, które po wejściu w okres menopauzy na ogół doświadczają znacznego spadku gęstości masy kostnej [38].

## STYMULACJA MECHANICZNA A ODPOWIEDŹ KOMÓREK KOSTNYCH

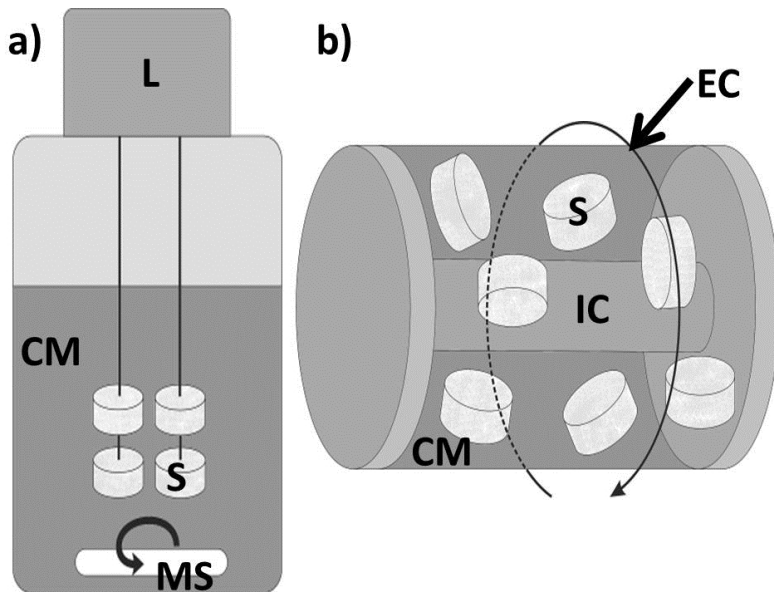
W odpowiedź tkanki kostnej na bodźce mechaniczne zaangażowane są m.in. osteoblasty – komórki kościotwórcze, jak również terminalnie zróżnicowane i zasiedlające zmineralizowaną macierz kostną osteocyty oraz resorbujące i modelujące kości osteoklasty. Powszechnie uważa się, że osteocyty wykazują największą wrażliwość na bodźce mechaniczne [8, 28], ale zdolność odbioru bodźców mechanicznych posiadają również osteoblasty i komórki prekursorowe kości, w tym mezenchymalne komórki macierzyste pochodzenia szpikowego (BMSC) [18]. Stymulacja komórek BMSC odpowiednio dobranymi siłami mechanicznymi *in vitro* może nakierowywać je na różnicowanie w osteoblasty [14]. Co ciekawe, w porównaniu do BMSC, mezenchymalne komórki macierzyste pochodzenia tłuszczowego, ASC wykazują słabszą odpowiedź kościotwórczą pod wpływem stymulacji mechanicznej [45]. Wysoki potencjał kościotwórczy BMSC *in vitro* i *in vivo* [42], a także wrażliwość tych komórek na bodźce mechaniczne [39] sprawiają, że są one najpowszechniej i najczęściej wykorzystywane do opracowania komórkowych terapii regeneracji tkanki kostnej, obejmujących stymulację mechaniczną BMSC w bioreaktorach *in vitro*.

Przekazanie sygnału mechanicznego do komórek i jego przekształcenie w sygnał biochemiczny, istotny dla uruchomienia określonej odpowiedzi komórkowej, określa się mianem mechanotransdukcji [21]. W przypadku komórek kost-

nych, rolę mechanosensorów spełniać mogą integryny, kanały jonowe, połączenia szczelinowe oraz tzw. rzęska pierwotna (ang. *primary cillium*), występujące na powierzchni błony komórkowej wszystkich rodzajów komórek budujących kości [20]. Publikacja Delaine-Smith i wsp. [10] wskazuje, że usunięcie rzęski pierwotnej z mysich osteoblastów linii MLO-A5 stymulowanych przepływem oscylacyjnym w hodowli 2D, hamuje w nich wyrzut mechanowrażliwej prostaglandyny E2 oraz mineralizację macierzy pozakomórkowej. Bodźce mechaniczne mogą aktywować wewnątrzkomórkowe ścieżki sygnałowe, z których najczęściej wskazywane w literaturze to ścieżka sygnałowa ERK, kanoniczna ścieżka sygnałowa Wnt lub szlaki sygnałowe inicjowane przez czynniki wzrostowe z nadrodziny TGF- $\beta$ , a w szczególności BMP. W przypadku sygnalizacji BMP, wewnątrzkomórkowe przekaźniki sygnału SMAD przyłączają się do sekwencji SRE w promotorach genów kluczowych dla procesów kościotworzenia, w tym RUNX-2, OSX, DLX-5 [40] czy ID-1 [41]. W ostatnich latach wykazano wzrost ekspresji genów RUNX-2 i ID-1 w ludzkich komórkach osteoblastycznych stymulowanych mechanicznie i równocześnie traktowanych egzogennym białkiem BMP-2 [30]. To z kolei może być istotne dla optymalizacji kościotwórczego działania BMP-2 *in vitro* i *in vivo*. Uważa się, że poznanie mechanizmów współdziałania BMP-2 i stymulacji mechanicznej w kościotworzeniu może przyczynić się do opracowania nowych strategii leczenia ubytków kostnych. Ogólnie przyjmuje się, że każde oddziaływanie mechaniczne na układ kostny powoduje jego odkształcenia, czyli zmiany strukturalne na poziomie makroskopowym. Ma to związek z działaniem sił powodujących kompresję, naprężenie lub skręcenie kości [53]. Stopień tych zmian zależy od rodzaju siły działającej na kość i budowy samej tkanki kostnej. W wyniku działania bodźca mechanicznego na kości następuje wytworzenie gradientu ciśnienia płynu wewnątrz systemu jamkowo-kanalikowego. Gradient związany z przepływem płynu prowadzi do powstania napięcia ścinającego [52], które jak wskazuje literatura ma szczególne znaczenie w procesach kościotworzenia [4].

## **NAJPROSTSZE BIOREAKTORY WYKORZYSTYWANE W INŻYNIERII TKANKI KOSTNEJ**

Zastosowanie bodźców mechanicznych w hodowli komórek kostnych jest możliwe w oparciu o proste rozwiązania konstrukcyjne takie jak kolba obrotowa (ang. *spinner flask*) (ryc. 2a) [68] oraz bioreaktor z obracającą się ścianą zbiornika (ang. *rotating wall vessel*) (ryc. 2b) [68]. Okazuje się, że zastosowanie tego typu prostych systemów pozwala zwiększyć transport substancji odżywczych do komórek rosnących w porach trójwymiarowych rusztowań, a także zapewnić równomierny rozkład pH, temperatury i stężenia tlenu w obrębie porowatego rusztowania.



**RYCINA 2.** Kolba obrotowa a) i bioreaktor z obracającą się ścianą zbiornika b). Komórki poddawane stymulacji mechanicznej w kolbie obrotowej a) umieszcza się na odpowiednich rusztowaniach (S), przytwierdzonych za pomocą metalowego druta do wentylowanego wieczka (L) kolby. Na dnie kolby umieszczone jest mieszadło magnetyczne (MS), którego obroty wywołują ruch pożywki hodowlanej (CM) wokół rusztowań (S); b) W bioreaktorze z obracającą się ścianą zbiornika komórki zasiedlające rusztowania (S) podlegają swobodnemu spadkowi na skutek ruchu pożywki hodowlanej (CM) wywołanej obrotami zewnętrznego cylindra (EC) bioreaktora; (IC) wewnętrzny cylinder bioreaktora. Zmienione na podstawie [68]

**FIGURE 2.** Spinner flask a) and a rotating wall vessel b). In a spinner flask the cell-seeded scaffolds (S) are immobilized on a metal needle under a ventilated bioreactor lid (L); The magnetic stirrer (MS) at the flask bottom mixes the culture media (CM) around the scaffolds (S); b) In a rotating wall vessel, cell-seeded scaffolds (S) are exposed to a free-fall as a result of external cylinder turnovers (EC); (IC) internal cylinder; Modified from [68]

W ww. bioreaktorach komórki rosnące na odpowiednich rusztowaniach poddawane są działaniu napięcia ścinającego, a w przypadku bioreaktora z obracającą się ścianą zbiornika również siłom swobodnego spadania w cieczy. Uważa się, że oba urządzenia generują niskie wartości napięcia ścinającego, ponadto w tych systemach nie ma możliwości ścisłego kontrolowania wartości tego parametru [68]. Udokumentowano jednak korzystny wpływ zastosowania ww. bioreaktorów na procesy kościotworzenia w hodowlach 3D. Dla przykładu, Song i wsp. [55] wykazali, że osteoblasty, wyizolowane ze szczurzej czaszki, wysiane na rusztowania pozyskane z naturalnej ludzkiej kości i hodowane w bioreaktorze z obracającą się ścianą zbiornika, wykazywały wyższą aktywność zasadowej fosfatazy i zwiększoną mineralizację macierzy pozakomórkowej. Kontrolą w tych

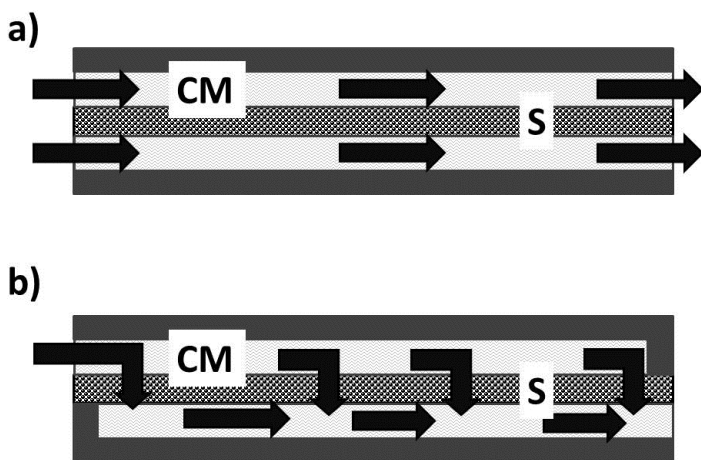
doświadczeniach były hodowle w warunkach statycznych i w kolbie obrotowej. Kim i wsp. [27] wykazali natomiast, że w porównaniu z kontrolą statyczną, ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste pochodzenia szpikowego, hodowane na rusztowaniach z jedwabiu w kolbie obrotowej, wykazywały podwyższoną aktywność zasadowej fosfatazy i mineralizację macierzy pozakomórkowej, oraz istotnie wyższą ekspresję mRNA dla składników tej macierzy, tj. kolagenu typu I, sjaloproteiny kostnej i osteopontyny. Geng i wsp. [17] wykorzystali bioreaktor z obracającą się ścianą zbiornika do 4-tygodniowej hodowli króliczych BMSC na rusztowaniach opartych o naturalny koral.

Rusztowania wszczepiono następnie do tzw. nagich myszy (ang. *Nude mice*). Dzięki hodowli 3D komórek BMSC w bioreaktorze z kolbą obrotową możliwe było otrzymanie bioimplantów tkanki kostnej, które charakteryzowały się właściwościami mechanicznymi zbliżonymi do naturalnej kości. Również polskie zespoły badawcze wykorzystują do badań proste systemy bioreaktorowe. Dla przykładu, Woźniak i wsp. [64] oraz Dulińska-Molak i wsp. [11] wykorzystali do hodowli 3D komórek HBDC bioreaktor *Spinner Basket*®, czyli zmodyfikowaną wersję bioreaktora z kolbą obrotową. We wspomnianych publikacjach komórki hodowano na rusztowaniach poliuretanowych lub kompozytach poliuretan-kalcyt. Woźniak i wsp. wykazali, że hodowanie komórek HBDC na rusztowaniach z czystego poliuretanu w bioreaktorze *Spinner Basket*® obniża żywotność komórek w porównaniu do hodowli statycznych w standardowych płytkach hodowlanych. Równocześnie, hodowla dynamiczna nie miała istotnego wpływu na poziom ekspresji mRNA wskaźników typowych dla tkanki kostnej, tj. kolagenu typu I, zasadowej fosfatazy i osteokalcyny. Z kolei Dulińska-Molak i wsp. zastosowali bioreaktor *Spinner Basket*® do hodowli komórek HBDC na rusztowaniach poliuretanowych lub kompozytach poliuretan-kalcyt. Okazało się, że rusztowania kompozytowe hodowane w sposób ciągły w bioreaktorze *Spinner Basket*® stymulują wzrost aktywności zasadowej fosfatazy w komórkach HBDC, w stosunku do czystych rusztowań poliuretanowych.

## **ODPOWIEDŹ KOMÓREK KOSTNYCH NA PERFUZyjNY PRZEPLYW PŁYNÓW HODOWLANYCH**

W warunkach fizjologicznych przepływ płynu tkankowego w obrębie systemu jamkowo-kanalikowego kości powoduje wytworzenie siły o wartości  $8-30 \times 10^{-5} \text{N}$ . W bioreaktorze perfuzyjnym odpowiednie rusztowanie zasiedlone komórkami umieszcza się w szczelnej komorze, a przepływ pożywki hodowlanej przez pory rusztowania następuje w wyniku działania pompy perystaltycznej [68]. Badania Yourek i wsp. [69], wykonane w kulturach 2D ludzkich MSC wskazują, że sama stymulacja komórek napięciem ścinającym, powstałym na skutek przepływu po-

żywki hodowlanej, pobudza ich różnicowanie w kierunku osteoblastów i proces ten nie wymaga dodatkowych czynników różnicujących. Kim i wsp. [27] użyli bioreaktora perfuzyjnego do stymulacji ludzkich BMSC wysianych na porowate rusztowania poli-tereftalano-etylenowe. Komórki były poddawane ciągłemu przepływowi równoległemu (przepływowi opływowemu, powierzchniowemu) lub poprzecznemu (przepływowi przez pory rusztowania) (ryc. 3). Wykazano m.in., że perfuzja poprzeczna stymuluje proliferację ludzkich BMSC lepiej, niż przepływ równoległy. W wyniku zastosowania przepływu poprzecznego, w hodowlach ludzkich BMSC zaobserwowano również wyższą ekspresję mRNA dla genów zaangażowanych w kościotworzenie, takich jak osteriks, osteopontyna, zasadowa fosfataza i BMP-2, oraz wyższą mineralizację macierzy pozakomórkowej w porównaniu z przepływem równoległym. Yu i wsp. [70] badali przepływ płynów hodowlanych przez rusztowania kompozytowe wykonane z polikaprolaktonu i hydrożelu kolagenowego, zasiedlone szczurzymi BMSC. Po 10 dniach ciągłego stosowania perfuzji autorzy zaobserwowali statystycznie istotny wzrost ekspresji mRNA i białka dla osteopontyny, osteokalcyny i sialoproteiny kości. Ponadto odnotowano znaczący wzrost żywotności komórek i mineralizacji macierzy po 21 i 28 dniach ciągłego stosowania perfuzji. Delaine-Smith i wsp. [9] wykazali, że napięcie ścinające można generować nie tylko w bioreaktorach wykorzystujących przepływ pożywki hodowlanej (*fluid flow* lub *flow perfusion*), ale też w prostym systemie opartym na wytrząsaniu komórek w płytkach hodowlanych (tzw. *rocker*).



**RYCINA 3.** Schemat obrazujący porowate rusztowanie (S) zasiedlone komórkami i stymulowane przepływem równoległym a) lub poprzecznym (b) pożywki hodowlanej (CM). Kierunek przepływu zaznaczono czarnymi strzałkami. Zmienione na podstawie [27]

**FIGURE 3.** The illustration of cell seeded scaffolds (S) stimulated with a) parallel flow, or b) transverse flow. Flow direction has been marked with black arrows. Modified from [27]



Autorzy wykorzystali napięcie ścinające powstałe w wyniku wytrząsania płytek hodowlanych do stymulacji trzech populacji komórek o potencjale kościotwórczym: MLO-A5, HDF oraz hES-MP. Wyniki tych badań dowodzą, że napięcie ścinające powstałe w wyniku wytrząsania komórek efektywniej stymuluje komórki do różnicowania w tkankę kostną, niż hodowle statyczne. Zaobserwowano to m.in. na poziomie aktywności zasadowej fosfatazy, mineralizacji macierzy pozakomórkowej i produkcji kolagenu. Wyniki badań naszego zespołu wskazują, że nawet krótka, 2-godzinna i jednorazowa stymulacja przestrzennych hodowli ludzkich BMSC jednokierunkowym przepływem płynów hodowlanych może pozytywnie wpływać na odpowiedź kościotwórczą tych komórek, ale jakościowe i ilościowe efekty takiej stymulacji zależą m.in. od rodzaju rusztowania 3D, składu pożywki hodowlanej, a także stopnia zróżnicowania komórek i zmineralizowania macierzy pozakomórkowej (dane niepublikowane).

Bieżąca literatura podaje trzy podstawowe sposoby stymulacji komórek stałym, oscylacyjnym i/lub pulsacyjnym przepływem płynów hodowlanych [5, 25, 35]. Przepływ stały ma stałą wartość i kierunek. Może być on stosowany w sposób ciągły (przez cały okres hodowli) lub przerywany (okresy krótkiej, dynamicznej stymulacji hodowli i powrót do hodowli statycznej). Liu i wsp. [35] porównywali efekty ciągłego i przerywanego przepływu płynu hodowlanego w hodowlach ludzkich BMSC. Wykazali oni, że w porównaniu do efektów ciągłej stymulacji ludzkich BMSC, przepływ przerywany prowadzi w tych komórkach do wzrostu ekspresji mRNA dla kolagenu 1 $\alpha$ , osteokalcyny, RUNX-2 i zasadowej fosfatazy. Wymienione czynniki są istotne w różnicowaniu macierzystych komórek mezenchymalnych w osteoblasty. Wykazano też m.in. znacznie wyższą aktywację kinaz ERK 1 i ERK 2 w komórkach poddawanych przerywanej stymulacji, w porównaniu do tych poddawanych stymulacji ciągłej.

Z przepływem pulsacyjnym mamy do czynienia wtedy, gdy do hodowli wprowadzane są synchroniczne i o wysokiej częstotliwości zmiany wartości stosowanego przepływu, przy zachowaniu jego stałego kierunku. Sharp i wsp. [50] wykazali, że stymulacja szczurzych BMSC przepływem pulsacyjnym korzystnie wpływa na ich różnicowanie w osteoblasty. W pracy tej stosowano przepływy o trzech częstotliwościach: 0,015Hz, 0,044Hz, 0,074Hz przy napięciu ścinającym rzędu  $2,3\text{--}4,3 \times 10^{-5}$  N/cm<sup>2</sup>. Autorzy postulują, że przepływy o częstotliwości 0,044Hz są najbardziej efektywne w stymulowaniu kościotworzenia szczurzych BMSC hodowanych na podłożach pokrytych fibronektyną. Wykazano m.in. istotnie wyższą aktywność zasadowej fosfatazy w tych komórkach oraz statystycznie wyższą ekspresję mRNA dla osteokalcyny i siałoproteiny kości, w porównaniu do innych zastosowanych częstotliwości stymulacji oraz kontroli statycznej.

Wprowadzenie do hodowli komórek przepływu oscylacyjnego pożywki hodowlanej ma naśladować przepływ płynów w systemie jamkowo-kanalikowym kości. W wyniku takiej stymulacji następuje zmiana wartości przepływu i jego kie-

runku. Roy i wsp. [49] powiązali występowanie punktowych wzrostów stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w obrębie cytoplazmy z odpowiedzią komórek linii ludzkiego kostniakomiesaka MG-63 na stymulację oscylacyjnym przepływem płynu hodowlanego. Wykazano, że wzrost stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  wewnątrz komórek związany jest z aktywacją kanałów TRPM7. Xiao i wsp. [67] sugerują, że kanały TRPM7 mogą być mechanoreceptorami indukującymi kościotworzenie mezenchymalnych komórek macierzystych pod wpływem ściskania. Kanały te należą do grupy tzw. kanałów SACC. Inne publikacje wskazują, że punktowe wzrosty stężenia jonów wapnia wewnątrz komórek są sygnałem do przebudowy cytoszkieletu komórek kostnych i aktywacji takich szlaków sygnalizacyjnych jak np. PKA [34]. Kinaza PKA hamuje aktywację kinazy GSK-3 $\beta$  [57] oraz aktywuje kinazy ERK 1 i ERK 2. Zahamowanie kinazy GSK-3 $\beta$  ma zasadnicze znaczenie w przekazie sygnału wewnątrzkomórkowego kanoniczną ścieżką Wnt. Ścieżka sygnałowa Wnt natomiast jest istotna dla proliferacji i różnicowania osteoblastów [20]. Publikacja Case i wsp. [5] przedstawia wyniki stymulacji komórek linii CIMC-4 (tj. prekursorzy mysich osteoblastów), wysianych na podłoża kolagenowe, przepływem oscylacyjnym o częstotliwości 1Hz i napięciu ścinającym o wartości  $10 \cdot 10^{-5}$  N/cm<sup>2</sup>. Autorzy wykazali m.in., że stymulacja przepływem oscylacyjnym powodowała w komórkach CIMC-4 aktywację ścieżek sygnałowych zależnych od kinaz ERK 1 i ERK 2, oraz wzrost ekspresji mRNA dla RUNX-2, osteriks i osteopontyny. Równocześnie, przepływ oscylacyjny obniżał w prekursorach osteoblastów ekspresję mRNA dla RANK-L, czynnika zaangażowanego w aktywację i różnicowanie osteoklastów. Sugeruje to, że przepływ oscylacyjny może stymulować komórki do formowania kości, ale hamować w nich procesy regulujące resorpcję kości.

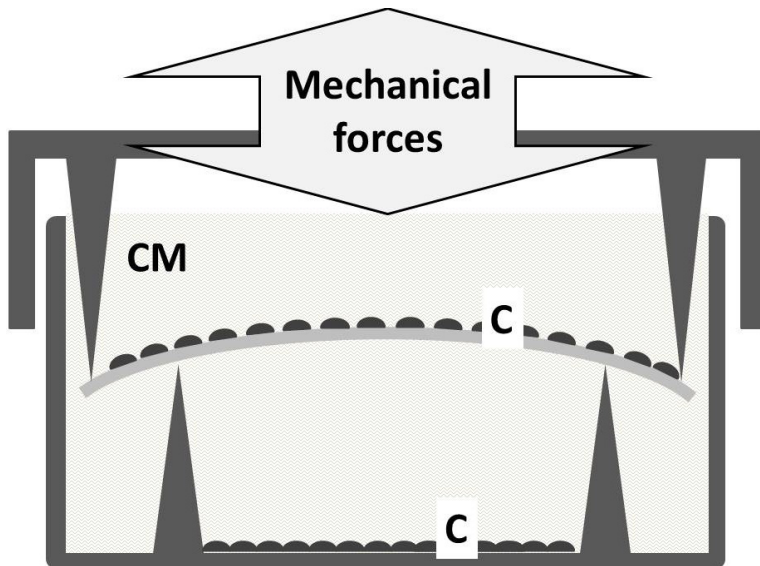
Mimo doniesień na temat stymulacji procesów kościotworzenia w wyniku poddawania trójwymiarowych hodowli mezenchymalnych komórek macierzystych perfuzyjnemu przepływowi pożywki hodowlanej [31, 44] molekularne mechanizmy odpowiedzi tych komórek na perfuzyjny przepływ płynów wciąż są słabo poznane. McCoy i wsp. [37] zidentyfikowali łożyskowy czynnik wzrostu PGF jako czynnik mechanowrażliwy, którego transkrypcja mRNA jest uruchamiana w wyniku działania perfuzyjnego przepływu pożywki hodowlanej w kulturach 3D szczurzych i ludzkich MSC. W doświadczeniach tych komórki hodowano na rusztowaniach z siarczanu chondroityny. Autorzy wykazali, że poziom ekspresji PGF jest ściśle związany z wartością przepływu i czasem jego trwania. Ponadto, podanie rekombinowanego PGF w dawce 10ng/ml wywoływało istotny wzrost mineralizacji macierzy międzykomórkowej w hodowlach komórek w warunkach 2D (plastik hodowlany) i 3D (rusztowania glikozaminoglikanowe z siarczanu chondroityny), w porównaniu do hodowli niestymulowanych lub traktowanych wyższymi stężeniami PGF. Praca McCoya pozwoliła zatem nie tylko odkryć nowy czynnik mechanowrażliwy, ale jednocześnie wskazuje jego potencjalne zastosowanie w inżynierii tkanki kostnej *in vitro*. Badania naszej grupy wskazują, że odpowiedź ludzkich komórek BMSC na perfuzyjny

przepływ pożywki hodowlanej jest powiązana z chemizmem podłoża i rusztowań wykorzystywanych do hodowli ludzkich BMSC. Konkretnie, komórki hodowane na kompozycie opartym o strukturę kopolimeru kwasu glikolowego i mlekowego (PLGA) oraz bioaktywnego szkła bogatego w krzemionkę są bardziej mechanowrażliwe i podlegają szybszemu różnicowaniu w tkankę kostną, niż na samym kopolimerze lub kompozycie wzbogaconym o bioaktywne szkło o wysokiej zawartości wapnia (dane niepublikowane).

## ROZCIĄGANIE W REGENERACJI TKANKI KOSTNEJ I INŻYNIERII TKANKOWEJ *IN VITRO*

Rozciąganie podłoża hodowlanych porośniętych mezenchymalnymi komórkami macierzystymi wydaje się efektywnie stymulować proliferację tych komórek i procesy kościotworzenia [7]. Thomas i wsp. [58] poddawali cyklicznemu naprężaniu szczurze BMSC wysiane na silikonowe membrany, co prowadziło do wzrostu aktywności zasadowej fosfatazy w tych komórkach w stosunku do kontroli statycznej. W badaniach tych odkształcenie membran o 0,39mm z częstotliwością 1Hz uzyskano poprzez wprowadzanie cyklicznych zmian wartości ciśnienia powietrza. Stanford i wsp. [56] wykazali obniżenie aktywności zasadowej fosfatazy w komórkach mysiej linii MC3T3 wysianych na podłoża silikonowe i poddanych rozciąganiu. W tej pracy podłoża komórkowe naprężano czterokrotnie w ciągu każdego dnia dwutygodniowej hodowli przy użyciu pompy próżniowej, która wytwarzała ciśnienie o wartości 1kPa. Ponadto stwierdzono, że zwiększenie liczby stymulacji na każdy dzień hodowli nie ma wpływu na aktywność zasadowej fosfatazy w komórkach, nie wpływa też na ekspresję mRNA dla osteokalcyny.

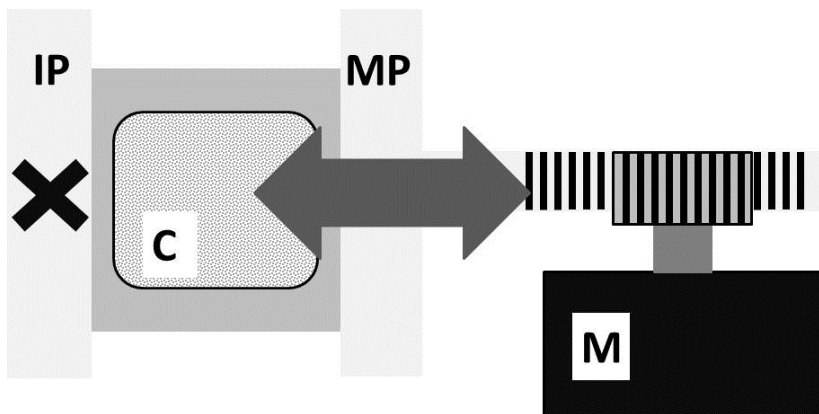
Natomiast Qi i wsp. [48] wykazali, że po zastosowaniu czteropunktowego wyginania podłoża hodowlanego o 0,2% (ryc. 4) liczba szczurzych BMSC w początkowych dniach hodowli była istotnie wyższa w porównaniu do liczby komórek w kontroli statycznej. Wreszcie Kearney i wsp. [23] wykazali, że rozciąganie silikonowego podłoża o 2,5% skutkowało zmniejszeniem tempa proliferacji szczurzych BMSC (ryc. 5). Wydaje się więc, że nawet stosunkowo niewielkie zmiany warunków stymulacji mechanicznej mogą istotnie zmieniać biologiczne efekty stymulacji. Niesłuchanie ważnym staje się również problem jakościowego i ilościowego zdefiniowania wszystkich sił mechanicznych wprowadzanych w danym modelu badawczym. Najnowsze badania Lohberger i wsp. [36] wskazują, że rozciąganie podłoża porośniętych komórkami istotnie wpływa nie tylko na proliferację tych komórek, ale również stymuluje ich różnicowanie w kierunku tkanki kostnej. Autorzy użyli do badań ludzkie BMSC oraz prekursorzy osteoblastów pozyskane z zuchwy i szczęki pacjentów. Wykazali oni, że 10%-we, cykliczne rozciąganie podłoża silikonowych prowadziło w prekursorach osteoblastów do



**RYCINA 4.** Schemat komory do wyginania czteropunktowego. Szara strzałka przedstawia kierunek działania siły nacisku na komorę (Mechanical forces). Komórki (C) wysiane na elastyczne podłoże są wyginane przez układ elementów konstrukcyjnych bioreaktora. Komórki wysiane na dnie komory stanowią kontrolę. (CM) – pożywka hodowlana. Zmienione na podstawie [48]

**FIGURE 4.** The scheme of a bending bioreactor. Grey arrow shows a direction of mechanical forces applied to the chamber. Cells (C) seeded on an elastic surface are bent by the elements of bioreactor. Cells seeded at the bottom of a chamber serve as a control. (CM) – culture medium. Modified from [48]

znacznego wzrostu ekspresji mRNA dla kolagenu  $1\alpha$ , białka morfogenetycznego kości 2, osteonektyny, osteopontyny i osteokalcyny, tj białek istotnych dla procesu kościotworzenia. Zaobserwowano również wyższą mineralizację macierzy pozakomórkowej. Natomiast, Li i wsp. [32] badali zdolność ludzkich embrionalnych komórek macierzystych do różnicowania w kierunku osteoblastów. Komórki hodowano na podłożach kolagenowych i stymulowano poprzez rozciąganie podłoża o 2% z częstotliwości 0,2 Hz przez 1 godzinę. Wyniki tych badań wskazują, że zastosowanie rozciągania wraz z osteogennymi suplementami pożywki hodowlanej wzmacnia, w porównaniu do kontroli statycznej, różnicowanie ludzkich komórek embrionalnych w osteoblasty, co wykazano na poziomie aktywności zasadowej fosfatazy i ekspresji mRNA dla czynnika RUNX-2. Zauważono ponadto istotny wzrost liczebności komórek w grupie poddanej rozciąganiu i wyższą depozycję kolagenu  $1\alpha$ . Badania te wskazują więc nie tylko mechanowrażliwość mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego, lecz również embrionalnych komórek macierzystych.



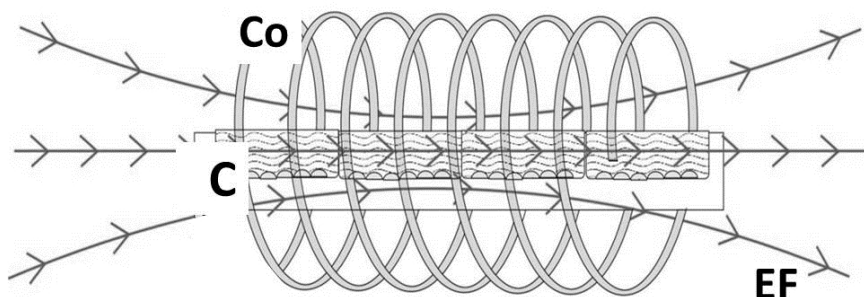
**RYCINA 5.** Schemat bioreaktora służącego do rozciągania. Silnik (M) porusza ruchomym uchwytem (MP) do którego przymocowane jest elastyczne podłoże porośnięte komórkami (C) i w ten sposób podłoże ulega rozciągnięciu. (IP) – nieruchomy uchwyt – miejsce przyczepu elastycznego podłoża (C). Szara strzałka pokazuje kierunek poruszania ruchomym uchwytem (MP). Zmienione na podstawie [23]

**FIGURE 5.** The scheme of a stretching bioreactor. Motor (M) moves a moving part of a bioreactor (MP), attached to the elastic surface seeded with cells (C) and the surface is stretched. (IP) – immobilized part of a bioreactor – site for attachment of elastic surface. Grey arrow shows a direction of mechanical forces. Modified from [23]

## ROLA POLA MAGNETYCZNEGO I WIBRACJI W KOŚCIOTWORZENIU *IN VITRO*

### POLE ELEKTROMAGNETYCZNE

Stymulacja pulsacyjnym polem elektromagnetycznym, PEMF jest wykorzystywana w praktyce klinicznej m.in. do leczenia trudno gojących się złamań, stawów rzekomych [51], a nawet osteoporozy [6]. Poza pulsacyjnym polem magnetycznym, także statyczne pole elektromagnetyczne SMF może znaleźć zastosowanie w inżynierii tkanki kostnej. Doniesienie konferencyjne Woźniaka i wsp. [65] wskazuje, że statyczne pole magnetyczne może mieć korzystny wpływ na proliferację ludzkich komórek BMSC. Autorzy doniesienia sugerują, że stymulacja SMF może znaleźć szerokie zastosowanie w inżynierii tkanki kostnej, szczególnie w przypadkach gdy pozyskanie dużej liczby komórek własnych pacjenta jest ograniczone. Tsai i wsp. [59] wykazali pozytywny wpływ PEMF na proliferację szczurzych osteoblastów. Komórki hodowano na rusztowaniach 3D wykonanych z PLGA. Stymulację PEMF stosowano przez 2 lub 8 godzin w różnych punktach czasowych hodowli.



**RYCINA 6.** Płytką hodowlaną z komórkami (C) umieszczoną wewnątrz cewki (Co) wzbudzającej pulsacyjne pole elektromagnetyczne. Szare linie ze strzałkami wyznaczają kierunek działania pola elektromagnetycznego na komórki (EF). Zmienione na podstawie [59]

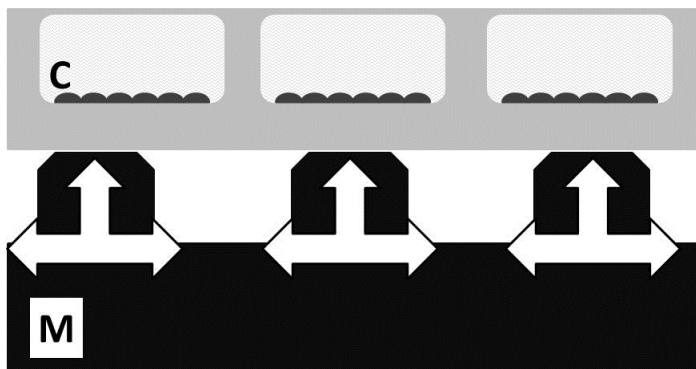
**FIGURE 6.** Cells (C) seeded on a culture plate, placed inside a solenoid coil (Co). Direction of electromagnetic field (EF) affecting the cells is marked with grey lines with arrows. Modified from [59]

PEMF wytwarzane było przez generator fali w cewkach (fala prostokątna,  $300\mu\text{s}$ , częstotliwość powtarzania  $7,5\text{Hz}$ ) (ryc. 6). Rusztowania zasiedlone komórkami poddawano indukcji elektromagnetycznej pola o wartościach  $0,13\text{mT}$ ,  $0,24\text{mT}$  lub  $0,32\text{mT}$ . Wykazano m.in. że dwugodzinna stymulacja polem o indukcji elektromagnetycznej  $0,13\text{mT}$  jest najefektywniejsza w promowaniu proliferacji i wyższej aktywności zasadowej fosfatazy w osteoblastach, w porównaniu do kontroli niestymulowanej. Przy zastosowaniu wyższych wartości stymulacji zaobserwowano spadek proliferacji osteoblastów przy równoczesnym wzroście aktywności zasadowej fosfatazy komórek. Autorzy sugerują, że stymulacja komórek polem elektromagnetycznym o indukcji  $0,13\text{mT}$  może być użyteczna w różnicowaniu komórek mezenchymalnych w osteoblasty.

## WIBRACJE

W ostatnich latach wykazano, że wibracje stymulują w hodowlach komórek kostnych produkcję białek typowych dla tkanki kostnej. Aby zbadać wpływ wibracji, komórki wysiane na typowe podłoża hodowlane umieszcza się na specjalnych platformach poruszających się w określony sposób (ryc. 7). Wykazano korzystne efekty wibracji o niskiej amplitudzie i wysokiej częstotliwości (LMHF) na procesy kościotworzenia. Patel i wsp. [43] badali wpływ LMHF na prekursorzy osteoblastów linii 2T3. Komórki hodowane na plastiku hodowlanym traktowano tak, by wykazywały fenotyp osteoporotyczny, a następnie poddawano je wibracjom o wartościach rzędu  $0,1-0,4\text{g}$  przy częstotliwości  $30\text{Hz}$  przez  $10-60$  minut

dziennie. Wykazano, że taka stymulacja komórek prowadzi do podwyższenia aktywności zasadowej fosfatazy komórek, wyższej mineralizacji macierzy pozakomórkowej oraz wyższej ekspresji genów istotnych dla procesu kościotworzenia, takich jak receptor typu 1 dla parathormonu i RUNX-2.



**RYCINA 7.** Schemat przedstawiający płytkę hodowlaną porośniętą komórkami (C), umieszczoną w urządzeniu do stymulacji ultradźwiękami (M). Białymi strzałkami zaznaczono kierunki działania ultradźwięków. Zmienione na podstawie [1]

**FIGURE 7.** The scheme of cell-seeded culture plates (C) placed on an ultrasound generating device (M). The ultrasound directions are shown by white arrows. Modified from [1]

Pre i wsp. [46] stymulowali komórki mezenchymalne pochodzenia tłuszczowego codziennymi, 45-minutowymi wibracjami o częstotliwości 30Hz. W hodowlach poddanych wibracjom i stymulowanych czynnikami osteogennymi odnotowano istotne, korzystne różnice w mineralizacji macierzy pozakomórkowej w porównaniu do kontroli statycznej. Dumas i wsp. [12] zastosowali stymulację podłoża zasiedlonych przez mysie osteoblastyczne komórki MC3T3-E1, wibracjami o częstotliwości 400Hz i niskiej wartości odkształcenia (tj. 15-40 $\mu\epsilon$ ). Wykazano, że stymulacja wibracjami już w pierwszym dniu eksperymentu powodowała statystycznie istotne wzrosty ekspresji mRNA dla osteopontyny i sjaloproteiny kości. Natomiast Wu i wsp. [66] stymulowali mysie osteoklastyczne komórki linii RAW264,7 wibracjami o częstotliwości 45Hz i wartości 0,3g. Komórki osteoklastyczne były stymulowane 15 min dziennie przez 4 dni hodowli. Zastosowanie wibracji prowadziło w tych komórkach do obniżonej ekspresji czynników istotnych dla aktywności osteoklastów, takich jak katepsyna K i metaloproteinaza 9.

Ultradźwięki, czyli wibracje o wysokiej częstotliwości LIMPUS, mają również potencjalne zastosowanie w regeneracji tkanki kostnej. Dla przykładu, Wang i wsp. [61] hodowali ludzkie BMSC na hydrożelu RGD-OSA/NSC przez 28 dni i stymulowali je ultradźwiękami o intensywności 200 mW $\cdot$ cm $^{-2}$ , 1Mhz przez 10 minut dziennie. Ultradźwięki stymulowały proliferację komórek, zwiększały w nich aktywność

zasadowej fosfatazy i mineralizację macierzy pozakomórkowej, a także poziom czynników CD31 i CD34, typowych dla śródbłonna naczyniowego [47]. Mechanizmy odpowiedzi komórek na wibracje wciąż są jednak słabo poznane. Uważa się, że ten rodzaj stymulacji wprowadza w drgania otaczającą komórki macierz pozakomórkową, a tak powstałe wibracje mogą oddziaływać na komórki kostne [1].

## PODSUMOWANIE

W trakcie naszego życia kości są ekspozowane na liczne bodźce mechaniczne i ciągle przebudowywane w wyniku adaptacji szkieletu do nowych obciążeń. Bodźce mechaniczne są istotne dla utrzymania równowagi pomiędzy procesami kościotworzenia i resorpcji tkanki kostnej, o czym świadczą m.in. zwiększona resorpcja kości u osób unieruchomionych lub przebywających w stanie nieważkości. Zmiana architektury kości w wyniku chorób zwyrodnieniowych układu szkieletowego, np. osteoporozy, zależy m.in. od początkowej masy kostnej nabytej w trakcie rozwoju osobniczego. Okazuje się, że regularne uprawianie sportu w dzieciństwie i okresie dojrzewania, jak również regularna aktywność fizyczna po osiągnięciu dojrzałości, może skutecznie zabezpieczać nasz szkielet przed patologiczną resorpcją kości, prowadzącą w konsekwencji do złamań kości. Leczenie dużych ubytków kostnych lub chorób zwyrodnieniowych kości wciąż stanowi wyzwanie dla współczesnej medycyny. Okazuje się, że odpowiednio dobrane bodźce mechaniczne w hodowlach komórek kostnych mogą skutecznie stymulować procesy przebudowy tkanki kostnej. Poddawanie komórek stymulacji mechanicznej poza organizmem jest możliwe dzięki różnego typu bioreaktorom. Stosowanie stymulacji mechanicznej *in vitro* wydaje się obecnie kluczowe w opracowywaniu nowych komórkowych terapii czy inżynierii tkanki kostnej. Niemniej jednak, mechanizmy poprzez które siły mechaniczne wpływają na procesy przebudowy kości są wciąż słabo poznane, a korzystne wyniki stymulacji mechanicznej zależą w dużym stopniu od fenotypu stymulowanych komórek oraz protokołu stymulacji. Dlatego konieczne są dalsze badania mające na celu dogłębne zrozumienie molekularnych mechanizmów uruchamianych w komórkach kostnych w odpowiedzi na siły mechaniczne oraz standaryzację protokołów prowadzących do korzystnych efektów stymulacji mechanicznej *in vitro* i *in vivo*.

## PODZIĘKOWANIA

Autorzy pragną podziękować Panu mgr. Dariuszowi Lachowskiemu za stworzenie pierwotnych szkiców rycin. Praca sfinansowana w ramach projektu NCN B/NZ4/00664 (AMO) oraz stypendium Doctus ZS.4112-194/12 (JF)



## LITERATURA

- [1] ANGLE SR, SENA K, SUMNER DR, VIRDI AS. Osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells by various intensities of low-intensity pulsed ultrasound. *Ultrasonics* 2011; **51**: 281-288
- [2] BARKAOUI A, HAMBELI R, TAVARES JMRS. Effect of material and structural factors on fracture behaviour of mineralised collagen microfibril using finite element simulation. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 2014; 1-10
- [3] BERGMANN P, BODY JJ, BOONEN S, BOUTSEN Y, DEVOGELAER JP, GOEMAERE S, KAUFMAN J, REGINSTER JY, ROZENBERG S. Loading and skeletal development and maintenance. *J Osteoporos* 2011; **2011**: 786752
- [4] BURGER EH, KLEIN-NULEND J. Mechanotransduction in bone- role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J* 1991; **13**: 101-112
- [5] CASE N, SEN B, THOMAS JA, STYNER M, XIE Z, JACOBS CR, RUBIN J. Steady and oscillatory fluid flows produce a similar osteogenic phenotype. *Calcif Tissue Int* 2011; **88**: 189-97
- [6] CHANG K, CHANG WH-S, WU M-L, SHIH C. Effects of different intensities of extremely low frequency pulsed electromagnetic fields on formation of osteoclast-like cells. *Bioelectromagnetics* 2003; **24**: 431-439
- [7] CHAROENPANICH A, WALL ME, TUCKER CJ, ANDREWS DM, LALUSH DS, DIRSCHL DR, LOBOA EG. Cyclic tensile strain enhances osteogenesis and angiogenesis in mesenchymal stem cells from osteoporotic donors. *Tissue Eng Part A* 2013; **20**: 67-78
- [8] COWIN SC. The significance of bone microstructure in mechanotransduction. *J Biomech* 2007; **40**: 105-109
- [9] DELAINE-SMITH RM, MACNEIL S, REILLY GC. Matrix production and collagen structure are enhanced in two types of osteogenic progenitor cells by a simple fluid shear stress stimulus. *Eur Cell Mater* 2012; **3**: 162-74
- [10] DELAINE-SMITH RM, SITTICHOKECHAIWUT A, REILLY GC. Primary cilia respond to fluid shear stress and mediate flow-induced calcium deposition in osteoblasts. *FASEB J*. 2014 Jan; **28**:430-9.
- [11] DULINSKA-MOLAK I, JAROSZEWICZ J, KURZYDŁOWSKI KJ. Architecture and properties of PUR/ calcite composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Bioprocess Biotechniq* 2014; **4**: 3
- [12] DUMAS V, DUCHARNE B, PERRIER A, FOURNIER C, GUIGNANDON A, THOMAS M, PEYROCHE S, GUYOMAR D, VICO L, RATTNER A. Extracellular matrix produced by osteoblasts cultured under low-magnitude, high-frequency stimulation is favourable to osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Calcif Tissue Int* 2010; **87**: 351-364
- [13] FALCAI MJ, ZAMARIOLI A, OKUBO R, DE PAULA FJ, VOLPON JB. The osteogenic effects of swimming, jumping, and vibration on the protection of bone quality from disuse bone loss. *Scand J Med Sci Sports* 2014; DOI: 10.1111/sms12240
- [14] FRIEDL G, SCHMIDT H, REHAK I, KOSTNER G, SCHAUENSTEIN K, WINDHAGER R. Undifferentiated human mesenchymal stem cells (hMSCs) are highly sensitive to mechanical strain:transcriptionally controlled early osteo-chondrogenic response in vitro. *Osteoarthr Cartil* 2007; **15**: 1293-1300
- [15] FROST HM. Bone's mechanostat: a 2003 update. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003; **275**: 1081-101
- [16] FROST HM. Wolff's Law and bone's structural adaptations to mechanical usage: an overview for clinicians. *Angle Orthod* 1994; **64**: 175-188
- [17] GENG W, MA D, YAN X, LIU L, CUI J, XIE X, LI H CHEN F. Engineering tubular bone using mesenchymal stem cell sheets and coral particles. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; **433**: 595-601
- [18] GOVEY PM, LOISELLE AE, DONAHUE HJ. Biophysical regulation of stem cell differentiation. *Curr Osteoporos Rep* 2013; **11**: 83-91
- [19] HEER M, BAECKER N, MIKA C, BOESE A, GERZER R. Immobilization induces a very rapid increase in osteoclast activity. *Acta Astronaut* 2005; **57**: 31-36
- [20] HOEY DA, DOWNS ME, JACOBS CR. The mechanics of the primary cilium: an intricate structure with complex function. *J Biomech* 2012; **45**: 17-26

- [21] HUANG C, OGAWA R. Mechanotransduction in bone repair and regeneration. *FASEB J* 2010; **24**: 3625-363
- [22] ISSACK PS, HELFET DL, LANE JM. Role of WNT signalling in bone remodelling and repair. *HSSJ* 2008; **4**: 66-70
- [23] KAERNEY EM, FARRELL E, PRENDERGAST PJ, CAMPVELL VA. Tensile strain as a regulator of mesenchymal stem cell osteogenesis. *Ann Biomed Eng* 2010; **38**: 1767-1779
- [24] KAMEO Y, ADACHI T, HOJO M. Effects of loading frequency on the functional adaptation of trabeculae predicted by bone remodeling simulation. *J Mech Behav Biomed Mater* 2011; **4**: 900-908
- [25] KAVLOCK KD, GOLDSTEIN AS. Effect of pulse frequency on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a pulsatile perfusion bioreactor. *J Biomech Eng* 2011; **133**: 091005
- [26] KIM HJ, KIM UJ, LEISK GG, BAYAN C, GEORGAKOUDI I, KAPLAN DL. Bone regeneration on macroporous aqueous-derived silk 3-D scaffolds. *Macromol Biosci* 2007; **10**: 643- 655
- [27] KIM J, MA T. Bioreactor strategy in bone tissue engineering: pre-culture and osteogenic differentiation under twoflow configurations. *Tissue Eng Part A* 18: 2354-2364, 2012.
- [28] KLEIN-NULEND J, BACABAC RG MULLENDER MG. Mechanobiology of bone tissue. *Pathol biol* 2005; **53**: 576-580
- [29] KONTULAINEN S, SIEVANEN H, KANNUS P, PASANEN M, VUORI I. Effect of long-term impact-loading on mass, size, and estimated strength of humerus and radius of female racquet-sports players: a peripheral quantitative computed tomography study between young and old starters and controls. *J Bone Miner Res* 2003; **18**: 352-359
- [30] KOPF J, PETERSEN A, DUDA GN, KNAUS P. BMP2 and mechanical loading cooperatively regulate immediate early signalling events in the BMP pathway. *BMC Biology* 2012; **10**(37)
- [31] KREKE MR, SHARP LA, LEE YW, GOLDSTEIN AS. Effect of intermittent shear stress on mechanotransductive signaling and osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A* 2008; **14**: 529-537
- [32] LI M, LI X, MEIKLE MC, ISLAM I, CAO T. Short periods of cyclic mechanical strain enhance triple-supplement directed osteogenesis and bone nodule formation by human embryonic stem cells in vitro. *Tissue Eng Part A* 2013; **19-20**: 2130-7
- [33] LIBERATO SC, BRESSAN J, HILLS AP. The role of physical activity and diet on bone mineral indices in young men: a cross-sectional study. *J Int Soc Sports* 2013; **10**: 43
- [34] LIU D, YI C, WANG K, FONG CC, WANG Z, LO PK, SUN D, YANG M. Reorganization of cytoskeleton and transient activation of Ca<sup>2+</sup> channels in mesenchymal stem cells cultured on silicon nanowire arrays. *ASC Appl Mater Interfaces* 2013; **5**: 13295-304
- [35] LIU L, YU B, CHEN J, TANG Z, ZONG C, SHEN D, ZHENG Q, TONG X, GAO C, WANG J. Different effects of intermittent and continuous fluid shear stresses on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Biomech Model Mechanobiol* 2012; **11**: 391-401
- [36] LOHBERGER B, KALTENEGGER H, STUENDL N, PAYER M, RINNER B, LEITHNER A. Effect of Cyclic mechanical stimulation on the expression of osteogenesis genes in human intraoral mesenchymal stromal and progenitor cells. *BioMed Research International* 2014; **2014**: 1-10
- [37] MCCOY RJ, WIDAA A, WATTERS KM, WUERSTLE M, STALLINGS RL, DUFFY GP, O'BRIEN FJ. Orchestrating osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells--identification of placental growth factor as a mechanosensitive gene with a pro-osteogenic role. *Stem Cells* 2013; **31**: 2420-2431
- [38] MECZEKALSKI B, KATULSKI K, CZYZYK A, PODFIGURNA-STOPA A. Health in older women athletes. *Maturitas* 2014; doi: 10.1016.
- [39] METZGER TA, KREIPKE TC, VAUGHAN TJ, MCNAMARA LM, NIEBUR GL. The in situ mechanics of trabecular bone marrow: the potential for mechanobiological response. *J Biomech Eng* 2015; **1**: 137(1)
- [40] NAGI R, DEVI BKY, RAKESH N, REDDY SS, SANTANA N, SHETTY N. Relationship between femur bone mineral density, body mass index and dental panoramic mandibular cortical width in diagnosis of elderly postmenopausal women with osteoporosis. *J Clin Diagn Res* 2014; **8**: 36-40
- [41] NAKASHIMA A, KATAGIRI T, TAMURA M. Cross-talk between Wnt and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) signaling differentiation pathway of C2C12 myoblasts. *J Biol Chem* 2005; **280**(45): 37660- 37668

- [42] OWEN M, FRIEDENSTEIN AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 1988; **136**: 42-60
- [43] PATEL MJ, CHANG KH, SYKES MC, TALISH R, RUBIN CJH. Low magnitude and high frequency mechanical loading prevents decreased bone formation responses of 2T3 preosteoblasts. *J Cell Biochem* 2009; **106**: 306-316
- [44] PAPADIMITROPOULOS A, PICCININI E, BRACHAT S, BRACCINI A, WENDT D, BARBERO A, JACOBI C, MARTIN I. Expansion of human mesenchymal stromal cells from fresh bone marrow in a 3D scaffold-based system under direct perfusion. *PLoS One* 2014; **14**: 9(7)
- [45] PARK SH, SIM WY, MIN BH, YANG SS, KHADEMOSSEINI A, KAPLAN DL. Chip-based comparison of the osteogenesis of human bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells under mechanical stimulation. *PLoS One* 2012; **7**: 9
- [46] PRÉ D, CECCARELLI G, GASTALDI G, ASTI A, SAINO E, VISAI L, BENAZZO F, CUSELLA DE ANGELIS MG, MAGENES G. The differentiation of human adipose-derived stem cells (hASCs) into osteoblasts is promoted by low amplitude, high frequency vibration treatment. *Bone* 2011; **49**: 295-303
- [47] PUSZTASZERI MP, WALTER SEELENTAG AND FTB. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochemistry Cytochem* 2005; **54**: 385-95
- [48] QI MC, HU J, ZOU SJ, CHEN HQ, ZHOU HX, HAN LC. Mechanical strain induces osteogenic differentiation: Cbfa1 and Ets-1 expression in stretched rat mesenchymal stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008; **37**: 453-458
- [49] ROY B, DAS T, MISHRA D, MAITI TK, CHAKRABORTY S. Oscillatory shear stress induced calcium flickers in osteoblast cells. *Integr Biol (Camb)* 2014; **6**: 289-99
- [50] SHARP LA, LEE YW, GOLDSTEIN AS. Effect of low-frequency pulsatile flow on expression of osteoblastic genes by bone marrow stromal cells. *Ann Biomed Eng* 2009; **37**: 445-453
- [51] SHI HF, XIONG J, CHEN YX, WANG JF, QIU XS, WANG YH, QIU Y. Early application of pulsed electromagnetic field in the treatment of postoperative delayed union of long-bone fractures: a prospective randomized controlled study. *BMC Musculoskeletal Disord* 2013; **14**: 35
- [52] SIKAVITSAS VI, TEMENOFF JS, MIKOS AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials* 2001; **22**: 2581-2593
- [53] SKERRY TM. Mechanical loading and bone what sort of exercise is beneficial to the skeleton. *Bone* 1997; **20**: 179-181
- [54] SMITH SM, ZWART SR, HEER M, HUDSON EK, SHACKELFORD L, MORGAN JL. Men and women in space: bone loss and kidney stone risk after long-duration spaceflight. *J Bone Miner Res* 2014; **7**: 1639-45
- [55] SONG K, LIU T, CUI Z, LI X, MA X. Three-dimensional fabrication of engineered bone with human bio-derived bone scaffolds in a rotating wall vesselbioreactor. *J Biomed Mater Res A* 2008; **86**: 323-232
- [56] STANFORD CM, MORCUENDE JA, BRAND RA. Proliferative and phenotypic response of bone-like cells to mechanical deformation. *J Orthop Res* 1995; **13**: 664-670
- [57] SUZUKI A, OZONO K, KUBOTA T, KONDOU H, TACHIKAWA K, MICHIGAMI T. PTH/cAMP/PKA signaling facilitates canonical Wnt signaling via inactivation of glycogen synthase kinase-3beta in osteoblastic Saos-2 cells. *J Cell Biochem* 2008; **104**: 304-17
- [58] THOMAS GP, EL HAJ JE. Bone marrow stromal cells are load responsive in vitro. *Calcif Tissue Int* 1996; **58**: 101- 108
- [59] TSAI M-T, LI W-J, TUAN RS, CHANG WH. Modulation of osteogenesis in human mesenchymal stem cells by specific pulsed electromagnetic field stimulation. *Calcif Tissue Int* 2008; **27**: 1169-1174
- [60] VENÄLÄINEN MS, MONONEN ME, JURVELIN JS, TÖYRÄS J, VIRÉN T, KORHONEN RK. Importance of material properties and porosity of bone on mechanical response of articular cartilage in human knee joint-a two-dimensional finite element study. *J Biomech Eng* 2014; **1**: 136
- [61] WANG Y, PENG W, LIU X, ZHU M, SUN T, PENG Q, ZENG Y, FENG B, ZHI W, WENG J, WANG J. Study of bilineage differentiation of human-bone-marrow-derived mesenchymal stem cells in oxidized sodium

- alginate/N-succinyl chitosan hydrogels and synergistic effects of RGD modification and low-intensity pulsed ultrasound. *Acta biomater* 2014; **10**: 2518-2528
- [62] WARDEN SJ, MANTILA ROOSA SM, KERSH ME, HURD AL, FLEISIG GS, PANDY MG, FUCHS RK. Physical activity when young provides lifelong benefits to cortical bone size and strength in men. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; **111**: 5337-5342
- [63] WEEKS BK, YOUNG CM, BECK BR. Eight months of regular in-school jumping improves indices of bone strength in adolescent boys and Girls: the POWER PE study. *J Bone Miner Res* 2008; **23**: 1002-1011
- [64] WOZNIAK P, BIL M, RYSZKOWSKA J, WYCHOWANSKI P, WROBEL E, RATAJSKA A, HOSER G, PRZYBYLSKI J, KURZYDŁOWSKI KJ, LEWANDOWSKA-SZUMIEL M. Candidate bone- tissue- engineered product based on human- bone- derived cells and polyurethane scaffold. *Acta Biomaterialia* 2010; **6**: 2484-2493
- [65] WOŹNIAK, P, JELEŃ, P, PRZYBYLSKI, J, LEWANDOWSKA-SZUMIEL M. Magnetic field affects proliferation of human cells in vitro. *Tissue Engineering Part A* 2008; **14**: 875
- [66] WU SH, ZHONG ZM, CHEN J. Low-magnitude high-frequency vibration inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells. *Int J Med Sci* 2012; **9**: 801-807
- [67] XIAO E, YANG HQ, GAN YH, DUAN DH, HE LH, GUO Y, WANG SQ, ZHANG Y. Brief reports: TRPM7 Sens mechanical stimulation inducing osteogenesis in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cells* 2015; **33**: 615-621.
- [68] YEATTS AB, FISHER JP. Bone tissue engineering bioreactors: dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone* 2011; **48**: 171-81
- [69] YOUREK G, MCCORMICK SM, MAO JJ, REILLY GC. Shear stress induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Regen Med*. 2010; **5**: 713-24.
- [70] YU HS, WON JE, JIN GZ, KIM H. Construction of mesenchymal stem cell-containing collagen gel with a macrochanneled polycaprolactone scaffold and the flow perfusion culturing for bone tissue engineering. *Biores Open Access* 2012; **1**: 124-136

*Redakto prowadzący – Barbara Płytycz*

*Otrzymano: 20.06.2015*

*Przyjęto: 29.07.2015*

*Anna M. Osyczka*

*ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków*

*e-mail: a.m.osyczka@uj.edu.pl*

*tel.: 12-664 53 42*