

Tkivno inženjerstvo

Krstulović, Ema

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:311396>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za Biologiju

Ema Krstulović

TKIVNO INŽENJERSTVO

Završni rad

Split, 2022.

Temeljna dokumentacijska kartica

Završni rad

Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za BIOLOGIJU

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

TKIVNO INŽENJERSTVO

Ema Krstulović

SAŽETAK

Tkivno je inženjerstvo zajedno s regenerativnom medicinom (zajednički naziv TERM (eng. Tissue Engineering and Regenerative Medicine)) doživjelo veliki razvoj u prošlim desetljećima, potaknuto nedovoljnim brojem donora organa i imunološkim odbacivanjem transplantanata. Kombinacija koja donosi najveći uspjeh u inženjerstvu je usklađivanje tri elementa, a to su nosači, stanice i potrebni biosignali za razvoj tkiva u laboratoriju. Važno je koristiti dobru tehniku, a u ovom radu su opisane četiri često primjenjivane tehnike. Nakon uspješnog presađivanja kože, mnogi su mislili da će za nekoliko godina moći uzgajati organe u posudi, ali to se nije dogodilo. Susreli su se s brojnim problemima, od nedovoljnog razvoja nosača, malo izvora i teške kontrole diferencijacije matičnih stanica, nedovoljne prokrvljenosti tkiva, imunološkog odbacivanja transplantanata, nepoznavanja proteina, gena, polisaharida i tako dalje. Iako kliničke primjene nisu zasada bile toliko uspješne, znanstvenici se nadaju da će budućnost biti svjetlija istraživanjem novih tehnika i primjenjivanjem novih saznanja iz područja znanosti.

Ključne riječi: nosači, matične stanice, biosignali, regenerativna medicina, transplantacija organa

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Rad sadrži: 28 stranica, 2 grafičkih prikaza, 0 tablica i 103 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: **Dr. sc. Ivana Bočina**, *redoviti profesor Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*

Neposredni voditelj:

Dr. sc. Ivana Bočina, *redoviti profesor Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivana Bočina**, *redoviti profesor Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*

Dr. sc. Elma Vuko, *izvanredni profesor Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*

Dr. sc. Željana Fredotović, *izvanredni profesor Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*

Rad prihvaćen: **kolovoz 2022**

Basic documentation card

Thesis

University of Split

Faculty of Science

Department of BIOLOGY

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

TISSUE ENGINEERING

Ema Krstulović

ABSTRACT

Tissue engineering together with regenerative medicine (the joint name TERM) has experienced great development in the past decades, stimulated by the insufficient number of organ donors and immunological rejection of transplants. The combination that brings the greatest success in engineering is the alignment of three elements, namely scaffolds, cells and the necessary biosignals for tissue development in the laboratory. It is important to use a good technique, and this paper describes four frequently applied techniques. After the successful skin graft, many thought that in a few years they would be able to grow organs in a dish, but that did not happen. They encountered numerous problems, from insufficient development of scaffolds, few sources and difficult control of differentiation of stem cells, insufficient tissue blood supply, immune rejection of transplants, lack of knowledge of proteins, genes, polysaccharides and so on. Although clinical applications have not been so successful so far, scientists hope that the future will be brighter by researching new techniques and applying new knowledge from the field of science.

Key words: scaffolds, stem cells, biosignals, regenerative medicine, transplantation of organs

Thesis deposited in library of Faculty of science, University of Split

Thesis consists of: 28 pages, 2 figures, 0 tables and 103 references

Original language: Croatian

Mentor: **Ivana Bočina, Ph.D.** *Full Professor of Faculty of Science, University of Split*

Supervisor: **Ivana Bočina, Ph.D.** *Full Professor of Faculty of Science, University of Split*

Reviewers: **Ivana Bočina, Ph.D.** *Full Professor of Faculty of Science, University of Split*
Elma Vuko, Ph.D. *Associate Professor of Faculty of Science, University of Split*

Željana Fredotvić, Ph.D. *Associate Professor of Faculty of Science, University of Split*

Thesis accepted: **kolovoz 2022**

Ovaj rad, izrađen u sklopu studijskog programa Biologija, pod vodstvom prof.dr.sc. Ivane Bočine predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnice (*baccalaurea*) Biologije.

SADRŽAJ

1	UVOD	1
2	RAZRADA TEME	2
2.1	POVIJEST	2
2.2	REGENERATIVNA MEDICINA I TKIVNO INŽENJERSTVO	3
2.3	TRIJADA TKIVNOG INŽENJERSTVA	3
2.3.1	STANICE	4
2.3.2	NOSAČI	6
2.3.3	BIOSIGNALI	7
2.4	PRISTUPI TKIVNOM INŽENJERSTVU	9
2.5	KLINIČKA PRIMJENA	11
2.5.1	KOŽA	11
2.5.2	MOKRAĆNA CIJEV I MOKRAĆNI MJEHUR	12
2.5.3	KRVOŽILNI SUSTAV	12
2.5.4	KOSTI I ZGLOBNA HRSKAVICA	13
2.5.5	DUŠNIK	14
2.6	BUDUĆNOST	14
3	SAŽETAK	16
4	LITERATURA	17

1 UVOD

Tkivno inženjerstvo interdisciplinarno je područje koje primjenjuje načela inženjerstva i prirodnih znanosti na razvoj bioloških nadomjestaka koji obnavljaju, održavaju, poboljšavaju funkciju tkiva ili cijelih organa (Langer i Vacanti, 1993). Važno polje regenerativne medicine (Tonelli i sur., 2017). Tri su opće komponente uključene u tkivno inženjerstvo: (1) reparativne stanice koje mogu formirati funkcionalni matriks; (2) odgovarajući nosači (eng. *scaffolds*) (prirodni ili umjetni) za transplantaciju i potporu; i (3) biomolekule, kao što su citokini i faktori rasta koji će pomoći u formiranju željenog tkiva (slika 1). Ove tri komponente mogu se koristiti pojedinačno ili u kombinaciji za regeneraciju organa ili tkiva (de Isla, i dr., 2010). Primjeri tkivnog inženjerstva mogu se pronaći već 1933. godine kada je Bisceglie zatvorio stanice mišjeg tumora u polimernu membranu i umetnuo ih u trbušnu šupljinu svinje. Stanice su živjele dovoljno dugo da se pokaže da ih nije ubio imunološki sustav (Bisceglie, 1933). Termin „tkivno inženjerstvo“ uveden je 1987. (Akter, 2016). Veliki napredak došao je spoznajom da deblji trodimenzionalni sustavi mogu potaknuti implantirane stanice na stvaranje vaskularnog tkiva *in vivo*. Sintetski razgradivi polimeri korišteni su kao predlošci za stanice za stvaranje trajnih novih tkiva (Vacanti, i dr., 1988). Sustavi su dizajnirani s visoko poroznim strukturama kako bi zadovoljili potrebe za prijenosom mase velikog broja stanica. Angiogenezom (fiziološki proces kojim nastaju nove krvne žile iz već postojećih, nastalih u ranijoj fazi vaskulogeneze) nakon implantacije proizvelo se trajno provodno novo tkivo. Zbog fleksibilnosti sintetskih materijala, široke primjene te velikih uspjeha u daljnjim eksperimentima, inženjerstvo tkiva sada privlači veliku pozornost (Holloway, 1999). Potreba za proizvodnjom tkiva i organa *in vitro* potaknuta je primarno nedostatnim brojem donora organa i odbacivanjem presađivanih zbog lošeg imunološkog odgovora (Eberli i sur., 2009). U ovom radu opisan je razvoj tkivnog inženjerstva kroz povijest, njegova primjena, problemi s kojima se susreću znanstvenici, bitne komponente (vrste biomaterijala, nosača i stanica) te planovi za budućnost.

2 RAZRADA TEME

2.1 POVIJEST

Ideje za obnovom i stvaranjem tkiva ili organa poznate su još iz daleke prošlosti. Stari Egipćani su vjerovali u obnavljanje tijela ponovnim spajanjem njihovih dijelova u zagrobnom životu, što je opisano u zapisima poznatim kao „Tekstovi piramida” (2375. pr. Kr.) (Finch, 2011). Vjeruje se da je prva zubna proteza napravljena od zlata u Egiptu oko 2500 godina prije Krista (Johnson W. , 1959), kao i prvi lažni nožni palac za koji se vjeruje da je najstarija proteza udova (950.-710. pr. Kr.) (Nerlich, 2000). Naravno, potrebna su živa tkiva da bi se postigao potpuni oporavak. U šesnaestom stoljeću, Gaspaire Tagliacozzi piše prvu knjigu o plastičnoj kirurgiji u kojoj je prvi je opisao rekonstrukciju nosa iz režnja podlaktice (Zimbler, 2001). Pojavom anestezije i sprječavanjem infekcija smanjuje se smrtnost pri kirurškim zahvatima u devetnaestom stoljeću (Vacanti, 2010). Prvi organ koji se presadio bila je koža, a dokumentacija datira čak iz 1869. (Nordham i Ninokawa, 2021). Ubrzo nakon toga uslijedila je prva uspješna potpuna transplantacija bubrega između jednojajčanih blizanaca (Harrison i sur., 1956). Zbog ograničene dostupnosti donatora i odbacivanja transplantata od strane imunološkog sustava nastao je koncept uzgoja tkiva *in vitro*, što je dovelo do razvoja znanstvenog područja inženjerstva tkiva (Eberli i sur., 2009). Uspjeh inženjeringa presađivanja kože znanstvenike je potaknuo na planove za uzgoj drugih tkiva i organa. Ipak, relativno jednostavna struktura, manji vaskularni zahtjevi kože i lakoća rasta keratinocita *in vitro* nisu uobičajeni za većinu tkiva (Jonathan, 2014). Tkivno inženjerstvo privlači veliku pozornost javnosti 1997. pokusom Vacantija u kojem je miš služio za razvoj uha čovjeka. Uho je raslo na leđima miša. Vacantijev pokus je važan za bolje shvaćanje razvoja tkiva problema pri provođenju sličnih eksperimenata u budućnosti. Za nosač se koristila poliglikolna kiselina, a stanice su bile goveđi hondrociti implementirani u miša s imunodeficijencijom. Jedan od problema koji je nastupio je jak imunološki odgovor pri presađivanju, ne samo zbog samog miša nego i zbog uzgojenih goveđih stanica pri presađivanju. Idealna zamjena za miša bio bi čovjek kako bi se potpuno smanjilo imunološko odbacivanje, a za stanice autologni hondrociti (ili neki drugi izvori). Osim toga postojali su i strukturni problemi kao primjerice slučaj gdje tkivo nije bilo prekriveno kožom. Također, teško je kontrolirati rast uha tijekom razdoblja uzgoja i nakon transplantacije (Cao i sur., 1997). Godine 1996. Joseph i Charles Vacanti službeno su osnovali *Tissue Engineering*

Society (TESi). Ubrzo nakon toga, Raymund E. Horch i G. Björn Stark iz Freiburga potaknuli su osnivanje europskog ogranka TESI-ja ETES, a 2001. bili su domaćini TESI skupa u Njemačkoj. Do prijelaza stoljeća bilo je više od 3000 ljudi koji su radili u području tkivnog inženjerstva, s financiranjem od preko 580 milijuna američkih dolara (Kemp, 2006; Lysaght i Hazelhurst, 2004).

2.2 REGENERATIVNA MEDICINA I TKIVNO INŽENJERSTVO

Tkivno inženjerstvo i regenerativna medicina često se koriste kao sinonimi. Međutim, inženjerstvo tkiva obično podrazumijeva uzgoj tkiva *in vitro*, dok se regenerativna medicina odnosi na alate za pomoć tijelu da popravi oštećeno tkivo *in vivo* (u pacijentu). Potreba za izvorima stanica u tkivnom inženjerstvu bila je glavni ograničavajući čimbenik u napretku ovog područja. Taj nedostatak izvora stanica potaknuo je upotrebu obnovljivih stanica poput matičnih stanica i progenitora, što dovodi do pojma „regenerativna medicina“. Regenerativna medicina se uglavnom temelji na razumijevanju morfogeneze i prirodnog, inherentnog mehanizmima samopopravljanja i, kao takva, regenerativna medicina obično uključuje korištenje matičnih stanica i progenitora. Inženjerstvo tkiva i regenerativna medicina, često skraćeno na engleskom jeziku kao „TERM“, danas su komplementarni. Raste interes za korištenjem različitih izvora matičnih stanica i potreba za smanjenjem vremena uzgoja tkiva, što rezultira kraćim razdobljem čekanja i niže cijene. Jača se veza između tkivnog inženjerstva i regenerativne medicine, koji će vjerojatno postati nerazdvojni (Rami & Anwarul, 2017).

2.3 TRIJADA TKIVNOG INŽENJERSTVA

Primjena inženjerstva tkiva obično uključuje kombinaciju triju stavki: stanica, biosignala i nosača (eng. *scaffolds*) koje predstavljaju „trijadu inženjerstva tkiva“ (slika 1). No, mnoge su od primjena inženjerstva tkiva bez jedne od ovih elemenata (de Isla i sur., 2010). Trenutačni napredak u inženjerstvu tkiva uključuje razvoj svih elemenata trijade. Nakon što se stanice (primarne ili matične) nanese na nosač, one zahtijevaju određene biosignale (kao što su faktori rasta) za daljnju kultivaciju. Nakon uzgoja tkiva/organa (npr. kože) slijedi implantacija. Nedavno se uvela šira primjena bioreaktora prije implantacije u pacijenta, jer održavaju idealne uvjete i reguliraju rast stanica *in vitro* te poboljšavaju kvalitetu samog tkiva (Rami & Anwarul, 2017). Nakon operacije potrebne su kontrole kako bi se osiguralo da tijelo nije odbacilo presadak ili slične komplikacije. U ovom dijelu opisane su sve stavke koje su bitne za razvoj tkiva/organa u laboratoriju.

2.3.1 STANICE

Proizvodnja tkiva *in vitro* zahtijeva upotrebu stanica za naseljavanje nosača i proizvodnju nosača koja nalikuje prirodnom tkivu. Glavni uspjesi u ovom polju postignuti su upotrebom primarnih stanica, uzetih od pacijenta, i korištenih zajedno s nosačima za proizvodnju tkiva za ponovnu implantaciju. Međutim, ova strategija ima ograničenja zbog invazivne prirode prikupljanja stanica i mogućnosti da stanice budu u lošem stanju. Stoga je pažnja usmjerena na upotrebu matičnih stanica, uključujući embrionalne matične stanice (eng. *embryonic stem cells*, ESC), mezenhimalne matične stanice koštane srži (eng. *bone marrow mesenchymal stem cells*, BM-MSC) i mezenhimalne matične stanice dobivene iz pupkovine (eng. *umbilical cord mesenchymal stem cells*, UC-MSC) (Howard i sur., 2008).

2.3.1.1 Embrionalne matične stanice

Embrionalne matične stanice mogle bi omogućiti proizvodnju tkiva podudarnog tipa za svakog pacijenta, bilo pohranjivanjem matičnih stanica ili korištenjem terapijskog kloniranja. Takve kulture mogu živjeti vrlo dugo (teoretski neodređeni broj godina), stoga potencijalno osiguravaju velike količine stanica za tkiva koja se ne mogu dobiti izravno iz izvora tkiva. Dokaz prave pluripotentne prirode embrionalnih matičnih stanica je stvaranje teratoma. Ovo svojstvo ukazuje na sposobnost matičnih stanica za tkivni inženjering više vrsta tkiva, ali također naglašava važnost korištenja terminalno diferenciranih stanica bez latentnih svojstava sličnih matičnim stanicama. Korištenje matičnih stanica će stoga zahtijevati metodu koja će osigurati diferencijaciju, jer su nediferencirane stanice tumorigenične (Hewitt i sur., 2007). Embrionalne matične stanice se, na primjer, mogu diferencirati u osteogene stanice koje osteoindukcijom prelaze u osteoblaste. Tako je uspješno stvoreno mineralizirano tkivo *in vivo* i *in vitro* pomoću embrionalnih matičnih stanica (Buttery i sur., 2001; Sottile i sur., 2003; Bielby i sur., 2004). Međutim, postoje nejasni koraci u korištenju i diferencijaciji embrionalnih matičnih stanica, posebice kod nastajanja embrionidnog tijela (sastoji se od tri zametne linije). Uloženi su napor da se ovaj proces razumije, ali i da se postupak kontrolira pomoću kemijske agregacije. Koristi se afinitet biotina prema avidinu za pružanje standardiziranog i obogaćenog sustava za diferencijaciju (de Bank i sur., 2007). Mnoge linije matičnih stanica uzgajaju se na hranidbenim stanicama kako bi se osigurali pogodni uvjeti za rast, ali se sumnja na prijenos ksenogenih materijala, pa se razvijaju drugačiji sustavi za uzgoj matičnih stanica (Denning i sur., 2006). Dobivanje ovakvih stanica podrazumijeva uništavanje ljudskih embrija. Politički je i etički kontroverzna tema koja često izaziva negodovanja javnosti (Lo i Parham, 2009). Veliki uspjeh postigao je Shinya Yamanka 2006. godine kada je ubacivanjem gena (nazvani

Yamanakini faktori) u mišju somatsku stanicu dobio pluripotentnu stanicu (eng. *induced pluripotent cell*) što se prije nije smatralo mogućim. Morfologija i genetička ekspresija takve dobivene stanice podudara se s embrionalnim matičnim stanicama (Takahashi i Yamanaka, 2006).

2.3.1.2 Mezenhimalne matične stanice dobivene iz koštane srži

Pokazalo se da se ovaj multipotentni tip matičnih stanica za popravak kostiju i hrskavice, može diferencirati od generičke populacije stanica koštane srži do osteogenih stanica i koristiti za povećanje popravka kosti (regeneraciju) (Bruder i sur., 1998; Yang i sur., 2001; Howard i sur., 2001). Mezenhimalna matična stanična populacija može se izolirati kao frakcija adherentnih jedinica od drugih stanica koštane srži i diferencirati se u fibroblaste, osteoblaste, hondroците, adipocite (Lee i sur., 2006). Stanice se uklanjaju iz koštane srži i koriste za poboljšanje materijala kao što je punilo umjetnih zglobova kuka ili za popunjavanje pukotina u kostima koje inače ne bi same zacijelile (Tilley i sur., 2006). Koštana srž zapravo sadrži malo mezenhimalnih matičnih stanica, samo 0.001-0.01% (Heringou i sur., 2005).

2.3.1.2 Mezenhimalne matične stanice dobivene iz pupkovine

Ove stanice su također multipotentan tip matičnih stanica. Imaju tri do četiri puta veću stopu proliferacije od onih iz koštane srži (Amable i sur., 2014; Kim i sur., 2018). Mogu se diferencirati u koštano tkivo, masno tkivo, hrskavicu i druga tkiva, (Kfoury i Scadden, 2015; Richardson i sur., 2016; Liu i sur., 2018; Zhang i sur., 2018; Shen i sur., 2019; Yea i sur., 2020) stoga se mogu koristiti za popravak različitih tkiva i organa te su idealne stanice u području regenerativne medicine (Wang i sur., 2020). U *in vitro* kulturi, stanice se mogu „transdiferencirati“ pri određenim uvjetima kako bi postale mezodermalne stanice kao što su osteoblasti (Xue i sur., 2018) i kardiomiociti, (Wu i sur., 2018) endotelne stanice, (Motawea i sur., 2020) a također se mogu diferencirati u neurone, hepatocite, (Zhou i sur., 2017) stanice gušterače (Van Pham i sur., 2014).

2.3.1.3 Progenitorne stanice

Unipotentne (imaju mogućnost samopopravljanja) progenitorne stanice su također važne u tkivnom inženjerstvu. BOECs (eng. *blood outgrowth endothelial cells*) su stanice nalik endotelnim, kasnog rasta (Lin i sur., 2000; Yoder i sur., 2007). BOECs stimuliraju angiogenezu aktivno ugradnjom u žilu domaćina i pasivno izlučivanjem proangiogenih čimbenika rasta. BOEC se mogu izolirati iz krvi pupkovine, ali također i iz jednostavne intravenske donacije krvi odrasle osobe, pri čemu prva pokazuje veći potencijal proliferacije, ali i osjetljivost na kariotipske aberacije (Yoder i sur., 2007; Kalka i sur., 2000; Hendrickx i

sur., 2010). Kao rezultat toga, BOEC se mogu dobiti na autologan način (direktno iz pacijenta), što može pokazati njegovu korist u tkivnom inženjerstvu, u rekonstruktivnoj kirurgiji za povećavanje prokrvljenosti hipoksičnih tkiva ili izoliranih režnjeva (Hendrickx i sur., 2010; Kannan i sur., 2005).

2.3.2 NOSAČI

Nosači pružaju prikladnu trodimenzionalnu nišu za rast, proliferaciju i diferencijaciju stanica. Zbog različitog stupnja poroznosti, izvrsno su sredstvo za redovitu opskrbu stanica hranjivim tvarima i kisikom. Postoji nekoliko vrsta nosača. Neki od njih su: vlaknasti, hidrogelovi, kompozitni i porozni nosači. Napravljeni su od biometrijala. Prirodni biomaterijali poput kolagena, kitozana, celuloze su polisaharidi ili proteini i nalikuju prirodnom izvanstaničnom matriksu (ECM). Sintetski biomaterijali poput polikaprolaktona (PCL), polilaktične kiseline, polietilen glikola i polivinilpirolidona povećavaju čvrstoću nosača (Chaudhari i sur., 2016). Nosači mogu, dakle, biti bezstanični (acelularni) i oni koji sadrže stanice (stanični). Bezstanični služe kao obrazac za rekonstituciju, omogućujući migraciju stanica domaćina tijekom procesa zacjeljivanja. Stanični sadrže žive stanice (primjer su fibroblasti) (Vranckx i Hondt, 2017). Optimalni bioinženjerski konstrukt tkiva mora imati morfološku strukturu sličnu autentičnom tkivu koje zamjenjuje. Biokonstrukt bi trebao biti autologan za optimalnu integraciju bez imunološkog odbacivanja, trodimenzionalan za premošćivanje dubokih defekata, porozan za omogućavanje migracije stanica, bioinduktivan za proliferaciju stanica i izlučivanje komponenti izvanstaničnog matriksa i faktora rasta, pogodan za razvoj provodnog tkiva unutar konstrukta, stimulirati vaskulogenezu i optimizirati integraciju tkiva (Fisher i Mauck, 2013). Neki od većih izazova u području tkivnog inženjerstva su poboljšavanje interakcije između stanica i nosača, ubrzavanje stanične proliferacije i diferencijacije te posebno prokrvljenost tkiva (Chaudhari i sur., 2016). Najbolji nosač trebao bi biti izvanstanični matriks ciljnog tkiva u njegovom prirodnom stanju. Ipak, višestruke funkcije, složeni sastav i dinamička priroda izvanstaničnog matriksa u prirodnim tkivima otežavaju točno oponašanje. Stoga je suvremeni koncept nosača u inženjerstvu tkiva oponašanje funkcija nativnog izvanstaničnog matriksa, barem djelomično. Kao rezultat toga, važne uloge koje imaju nosači, analogne su funkcijama izvanstaničnog matriksa u prirodnim tkivima i povezane su s njihovom strukturom, biološkim i mehaničkim značajkama (Muschler i sur., 2004; Spector, 2006) koje su opisane:

Strukturni (građevni) (eng. *architecture*) nosači-trebali bi osigurati prostor za vaskularizaciju, stvaranje novog tkiva i remodeliranje kako bi se olakšala integracija tkiva nakon implantacije. Biomaterijale treba obraditi kako bi se dobila dovoljno porozna struktura za učinkovit transport

hranjivih tvari i metabolita bez značajnog ugrožavanja mehaničke stabilnosti. Neki biomaterijali su potpuno razgradivi nakon implantacije u tijelo.

Stanično-tkivno kompatibilan (eng. *cyto- and tissue compatibility*) nosač-trebao bi pružiti potporu za izvana nanese ili endogene stanice za pričvršćivanje, rast i diferencijaciju tijekom *in vitro* kulture i *in vivo* implantacije. Biomaterijali moraju biti kompatibilni sa staničnim komponentama uzgojenog tkiva i endogenim stanicama u tkivu domaćina.

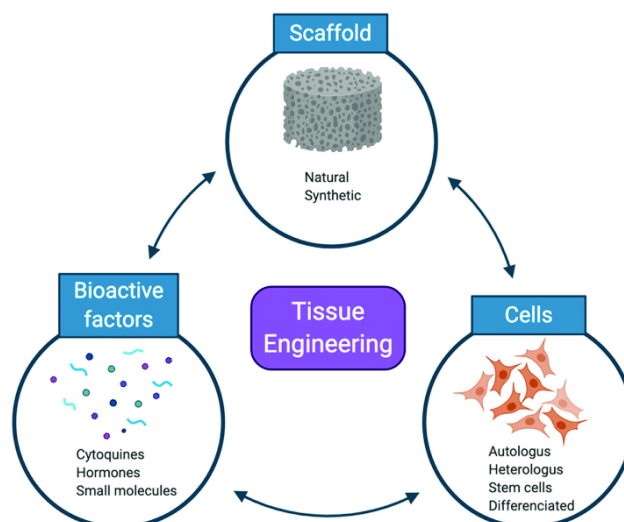
Bioaktivni (eng. *bioactivity*) nosači-mogu aktivno komunicirati sa staničnim komponentama tkiva kako bi olakšali i regulirali njihove aktivnosti. Biomaterijali mogu uključivati ​​ligande koji se vežu na stanicu za poboljšanje pričvršćivanja ili utječu na morfologiju i poravnanje stanice. Nosač također može poslužiti kao prijenosno sredstvo ili spremnik za egzogene signale koji stimuliraju rast kao što su faktori rasta za ubrzavanje regeneracije. U tom smislu, biomaterijali moraju biti kompatibilni s biomolekulama i podložni tehnici kapsuliranja za kontrolirano otpuštanje biomolekula sa zadržanom bioaktivnošću. Na primjer, hidrogelovi sintetizirani kovalentnim ili ionskim umrežavanjem mogu uhvatiti proteine ​​i otpustiti ih kada je potrebno (Berger i sur., 2004).

Mehanička svojstva-biomaterijali koji se koriste za nosače ili njihova svojstva nakon obrade trebaju odgovarati onima tkiva pacijenta kojemu se ugrađuje organ. Nedavne studije mehanobiologije istaknule su važnost mehaničkih svojstava nosača za nanese stanice. Vršanjem sile na podlogu, mnoge vrste zrelih stanica, kao što su epitelne stanice, fibroblasti, mišićne stanice i neuroni, osjećaju krutost podloge i pokazuju različitu morfologiju i adhezivna svojstva (Discher i sur., 2005). Ta je osjetljivost također dokazana u diferencijaciji mezenhimalnih matičnih stanica, gdje je krutost agaroznog gela odredila smjer diferencijacije (Engler i sur., 2006).

2.3.3 BIOSIGNALI

Nakon što se stanice nanese na nosač, one zahtijevaju određene signale za preživljavanje i sintetiziranje vlastitog matriksa koja će na kraju zamijeniti nosače. Signale obično stvara okolno stanično mikrokruženje, osjete ih receptori na staničnoj membrani ili izravno unutar stanice i prevode u različite stanične odgovore uključujući proliferaciju, apoptozu, migraciju, diferencijaciju, sintezu matriksa,... Najvažniji signali koje stanice osjete uključuju razine kisika, mehaničku stimulaciju, faktore rasta, molekule izvanstaničnog matriksa i druge male molekule. Različita tkiva zahtijevaju različite kombinacije signala, čak isto tkivo može zahtijevati različite signale na različitim dubinama ili u različitim fazama rasta. Na primjer,

stanice za izgradnju zglobne hrskavice, za koju se zna da je relativno jednostavno tkivo, zahtijevaju relativno niske razine kisika (ispod 5%) za sintezu kolagen tipa II, koji se inače sintetizira u velikim količinama u dubljim slojevima hrskavice. Međutim, za stvaranje površinskog sloja tkiva stanicama je potrebna visoka razina kisika, koja pogoduje sintezi proteina površinskog dijela (proteini se uglavnom sintetiziraju hondrocitima površinskog dijela) (Mhanna i sur., 2013). Zbog tako složenih uvjeta rasta, koriste se bioreaktori. Korištenje bioreaktora za tkivno inženjerstvo eksponencijalno je poraslo u proteklom desetljeću. Rezultat je shvaćanja da tkiva moraju biti podvrgnuta određenim silama kako bi usvojila prirodni fenotip, održala fiziološki sastav matriksa te mehanički integritet. Bioreaktori poboljšavaju transport mase, što je preduvjet za inženjerstvo složenih tkiva i organa. Njihova uloga je standardizacija, kontrola i automatizacija uvjeta kulture za postizanje ponovljivih rezultata (Rami i Anwarul, 2017). Čimbenici rasta, citokini, molekule izvanstaničnog matriksa i druge male molekule utječu na ponašanje stanica. Dok neki čimbenici rasta, poput osnovnog faktora rasta fibroblasta (FGF-2), održavaju multipotentnost mezenhimalnih matičnih stanica (Tsutsumi i sur., 2001), transformirajući faktor rasta beta (eng. *transforming growth factor* β , TGF- β) inducira hondrogenezu (Awad i sur., 2003), koštani morfogeni protein (eng. *bone morphogenetic protein*, BMP) neophodan je za formiranje kosti (Sumanasinghe i sur., 2006; Groeneveld i Burger, 2000), a faktor rasta živaca (eng. *nerve growth factor*, NGF) ključan je za neuralnu diferencijaciju (Wobus i sur., 1987; Matsuda i sur., 1988). U morfogenezi tkiva, proizvodnja molekula izvanstaničnog matriksa kao što su fibronektin i kolagen varira ovisno o stupnju razvoja. Promjene u obrascima ekspresije tih molekula su povezane s različitim procesima kao što su kondenzacija matičnih stanica, migracija stanica i diferencijacija stanica (Singh i Schwarzbauer, 2012). Prošla i sadašnja istraživanja su otkrila mnogo o funkciji i ulogama proteina i gena, ali i polisaharida. Polisaharidi (npr. hijaluronska kiselina, hondroitin sulfat, heparin i heparan sulfat,) igraju ključnu ulogu u mnoštvu fizioloških i bioloških procesa (Rodgers i sur., 2008; Plaas i sur., 1998).

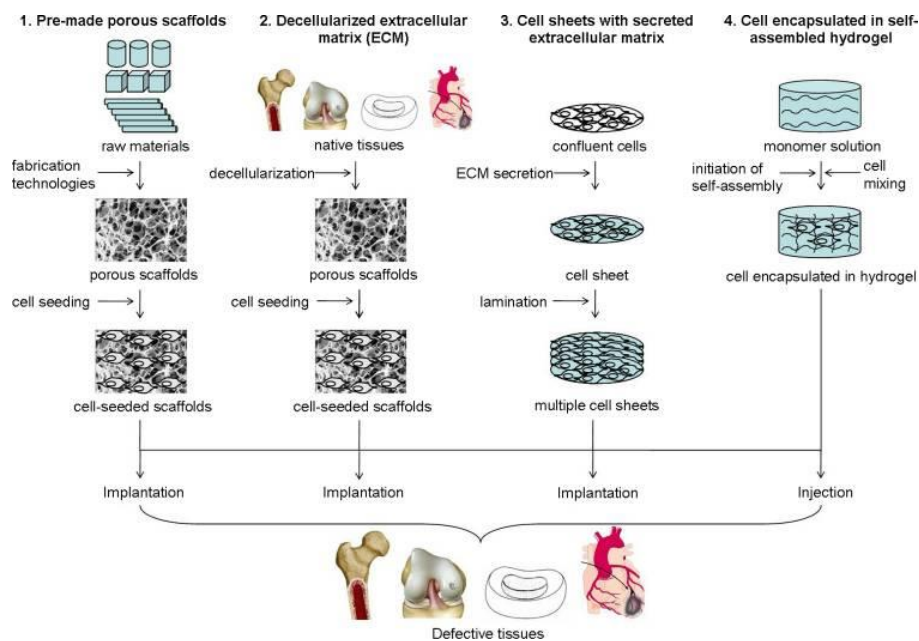


Slika 1. Trijada tkivnog inženjerstva (izvor: Rodríguez i sur., 2021)

2.4 PRISTUPI TKIVNOM INŽENJERSTVU

Trijada tkivnog inženjerstva zahtijeva dobru tehniku konstruiranja nosača. Tijekom godina, nastoji se izraditi najbolji nosač za održavanje stanica i njihov rast nakon implantacije. Razrađena su četiri različita pristupa (slika 2). Najčešći pristup je korištenje unaprijed izrađenog poroznog nosača. Koriste se sirovine koje mogu biti prirodne ili sintetičke-porozni nosač stvara se pomoću jedne od trenutno dostupnih različitih tehnologija izrade. Raznolike mogućnosti korištenja biomaterijala i sposobnost dizajniranja nosača s kontrolom njihovih fizikalno-kemijskih svojstava čini ovu metodu posebno povoljnom. Primjeri tehnika proizvodnje koje se koriste uključuju porogene i tehnike bazirane na vlaknima. Kada je nosač spreman, stanice se mogu nanijeti unutar ili na površinu. Mana ove metode je da je nanošenje stanica nakon proizvodnje dugotrajno i ne baš učinkovito (Chan i Leong, 2008). Umjesto nanošenja stanica na nosač nakon što je proizveden, druga strategija je inkapsulacija stanica tijekom formiranja nosača. Dok je broj biomaterijala koji se mogu koristiti za izradu ove vrste nosača manji, prednost je mogućnost dostave stanica u tekućem prekursoru *in vivo*. Hidrogelovi (prirodni ili sintetski) obično se koriste kao materijali za nosače i pogodni su za inkapsuliranje stanica s obzirom na njihovu biokompatibilnost (Nicodemus i Bryant, 2008; Berger i sur., 2004). Međutim, s obzirom na loša mehanička svojstva hidrogelova, ovaj pristup se rijetko koristi za tkiva koja imaju nosive funkcije (Chan i Leong, 2008). Druga metoda koja se može koristiti je decelularizacija izvanstaničnog matriksa (ECM) iz alogenih ili ksenogenih tkiva. Izvanstanični matriks je prirodni nosač koji omogućuje pričvršćivanje stanica, proliferaciju i diferencijaciju.

Kada se dodaju odgovarajuće stanice, može proizvesti autologni konstrukt bez potrebe za vađenjem tkiva od samog pacijenta (Cheng i Solorio, 2014). Prednosti ove metode su biokompatibilnost i svojstvo da ima najbliža prirodna mehanička i biološka svojstva potrebna tijelu. Glavni nedostatak ovih sustava je ograničena opskrba autolognih tkiva i imunološki odgovori na neautologna tkiva. Dodatno, još uvijek postoje neki manji problemi kao što je nehomogena distribucija nasađenih stanica i poteškoće u uklanjanju cjelokupnog materijala koji izaziva imunološki odgovor (Chan i Leong, 2008). Ova tehnika je najbolja pri popravljanju kože, mjehura i srčanih zalistaka (Cheng i Solorio, 2014). Konačni pristup je korištenje staničnih listića (slojevi stanica) pripremljenih pomoću posuda za kulturu osjetljivih na temperaturu, u tehnici poznatoj kao inženjerstvo staničnih listova (eng. *cell sheet engineering*). Ovom se metodom izbjegavaju problemi uzrokovani transplantacijom nosača u tijelo. Nakon što se nosač razgradi u tijelu, često se zamjenjuje autolognim izvanstaničnim matriksom, koji može uzrokovati fibrozu. Osim toga, neka svojstva nosača bi mogla biti nepoželjna za određene primjene. S razvojem regenerativne medicine, usađivanje jednostaničnih suspenzija pokazala je dobar rezultat zamjenjujući nosače, ali za veću rekonstrukciju tkiva postoji potreba za više stanica, što je bila motivacija za ovakvo inženjerstvo (Yamato i Okano, 2004).



Slika 2. Pristupi tkivnom inženjerstvu (izvor: Rami i Anwarul, 2017)

2.5 KLINIČKA PRIMJENA

Napredovanje u protokolima tkivnog inženjerstva ometaju mnoge poteškoće, uglavnom povezane s nedostatkom prokrvljenosti, gubitkom snage i koherencije tkiva. Problem u primjeni kod pacijenta je i popratni klinički morbiditet-poput kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa i radioterapije ili izloženost lijekovima-citostaticima, kortikosteroidima i imunosupresivima koji mogu snažno utjecati na bilo koju od kaskada prethodno ispitanih u kontroliranim laboratorijskim uvjetima. Naposljetku, konstrukcije stvorene tkivnim inženjerstvom trebale bi biti primjenjive upravo u onim „neprijateljskim“ tkivnim uvjetima gdje često zacjeljivanje rana i procesi regeneracije tkiva ne uspijevaju. Većina kliničkih primjena tkivnog inženjeringa odnosi se na kožu, mokraćnu cijev i mokraćni mjehur, kardiovaskularni sustav, kosti i dušnik (Vranckx i Hondt, 2017).

2.5.1 KOŽA

Koža je prvi organ koji se presadio, još davne 1869. (Nordham i Ninokawa, 2021). Nadomjestci za kožu razvijeni su za kliničku upotrebu, posebno za liječenje velikih rana kao što su opekline trećeg stupnja (Markeson i sur., 2015; Burke i sur., 1981). Rekonstitucija kožnih rana dubljih od *lamina basalis* zahtijevaju obnovu svih komponenti bazalne membrane kako bi se vratila debljina, tekstura i elastičnost, dok se istovremeno pruža biomehanička otpornost. Koža nije samo najveći organ, već i vrlo specijalizirano i složeno tkivo s intrinzičnim biomehaničkim, neurosenzibilnim, proprioceptivnim, termoregulacijskim i imunoregulacijskim značajkama. Različite značajke kategoriziraju nadomjestke kože ili ekvivalente kože. Prirodni polimeri koji se koriste u inženjerstvu kožnog tkiva uključuju kitozan, fibrin, želatinu i hijaluronsku kiselinu. Nedostaci prirodnih polimera uključuju nisku mehaničku čvrstoću, skupljanje i kontrakciju, brzu biorazgradljivost i rizik od imunološkog odbacivanja. Sintetski materijali uključuju najlon i polilaktičnu kiselinu. Zbog jednostavnosti izrade, sintetski polimeri su jeftiniji. Sintetski materijali imaju ograničenu kompatibilnost s tkivom, ograničeno prepoznavanje stanica i ugradnju. Oni pokazuju svoju važnost uglavnom u kombinaciji s prirodnim polimerima (Mansbridge, 2002; Rosso i sur., 2005; Sheridan i Tompkins, 1999; Naughton i Mansbridge, 1999). Za kožu su važni bezstanični (acelularni) i oni koji sadrže stanice (stanični) nosači. Bezstanični služe kao obrazac za kožnu rekonstituciju, omogućujući migraciju stanica

domaćina tijekom procesa zacjeljivanja rana. Stanični sadrže žive stanice kao što su keratinociti i/ili fibroblasti (Vranckx i Hondt, 2017). Porozni nosači naširoko se koriste za inženjerstvo kožnog tkiva zbog svojih jedinstvenih karakteristika, kao što su dobra mehanička svojstva i trodimenzionalna porozna struktura koja pomaže u penetraciji stanica peptidima (Johnson i Wang, 2015). Kožni nosač trebao bi biti biokompatibilan i omogućiti dermalnim stanicama da se pričvrste, proliferiraju i diferenciraju kako bi obnovile strukturu i funkcije kože (Agarwal i sur., 2016). Također bi trebao predstavljati barijeru protiv infekcija i vanjskih oštećenja te imati odgovarajuća mehanička svojstva i brzinu razgradnje (Agarwal i sur., 2016; Huang i Fu, 2010).

2.5.2 MOKRAĆNA CIJEV I MOKRAĆNI MJEHUR

Znanstvenici su, zbog potreba sedam pacijenata, za izradu mokraćnog mjehura *in vitro* koristili autologne urotelne i mišićne stanice uzgojene u kulturi (Atala i sur., 2006). Ove su stanice nanesene na biorazgradivi nosač u obliku mjehura napravljen od kolagena ili spoja kolagena i poliglikolne kiseline (PGA). Oko sedam tjedana nakon biopsije, mokraćni mjehur korišten je za rekonstrukciju i implantiran sa ili bez omentalnog omotača. Izvijestili su o izvrsnim rezultatima u razdoblju praćenja od 22 do 61 mjeseca (Burke i sur., 1981). Postoperativno, srednji tlak točke propuštanja mjehura smanjio se u kapacitetu, a povećanje volumena bilo je najveće u uzgojenim mjehurima s omentalnim omotačem. Unatoč tome, pravljenje novog mjehura za pacijente s mišićno-invazivnim rakom mokraćnog mjehura mnogo je izazovnije zbog nemogućnosti korištenja autoloških matičnih stanica dobivenih iz urinarnog trakta (Adamowicz i sur., 2013). Druga skupina znanstvenika je kultivirala glatke mišićne stanice i epitelne stanice dobivene iz biopsija mokraćnog mjehura. Ove su stanice uzgajane jedan tjedan kako bi se osigurala migracija, proliferacija i proizvodnja matriksa, a zatim su nasađene na tubularne poliglikolične i poli-L-laktične nosače. Analizirali su biopsije pet pacijenata i potvrdili organizaciju tkiva sličnu prirodnom tkivu. Izvijestili su o izvrsnim urinarnim protocima u razdoblju od 36 do 72 mjeseca (Raya-Rivera i sur., 2011).

2.5.3 KRVOŽILNI SUSTAV

Godine 1919. Guthrie je izjavio da za popravak krvne žile ugrađenom segmentu treba samo privremeno vratiti mehanički kontinuitet, i on će služiti kao nosač za urastanje tkiva iz domaćina (Guthrie, 1919). Karakteristike krvožilnih implantata nisu odstupile od te izjave, već su otišle korak dalje: implantat izrađen tkivnim inženjerstvom ne samo da vraća kontinuitet i služi za migraciju tkiva, nego također ima sposobnost razgradnje, ostavljajući preostale stanice da se integriraju u domaćina (Lee i sur., 2014).

2.5.3.1 Vaskularni presadci

U izvješću iz 2001. opisan je pristup tkivnog inženjerstva za liječenje atrezije desne plućne arterije u četverogodišnjeg pacijenta (Shin'oka i sur., 2001). Koristili su autologne odrasle stanice koje su nanosene na cijev od poliglikolne i polilaktične kiseline (nosač). Izvijestili su o izvrsnom ishodu nakon devet godina praćenja. U drugoj studiji, skupina znanstvenika izvijestila je o uporabi tkivnog inženjerstva za stvaranje arteriovenske (AV) fistule, ali bez odgovarajućih vena. Uzgojili su listove autolognih odraslih fibroblasta i njihove izvanstanične matrikse, te ih nanijeli oko igle od nehrđajućeg čelika. Stopa prohodnosti bila je 60% nakon šest mjeseci, što je jednako stopi prohodnosti prirodne arteriovenske fistule (McAllister i sur., 2009). Jedna skupina znanstvenika upotrijebila je postupak decelularizacije na ilijačnoj veni donora i nanijela endotelne i glatke mišićne stanice dobivene iz koštane srži primatelja. Ovaj je postupak primijenjen kod desetogodišnjeg bolesnika s trombozom portalne vene. Prva konstrukcija nije uspjela nakon jedne godine, međutim, sličan drugi postupak doveo je do normalnog portalnog protoka krvi (Olausson i sur., 2012).

2.5.3.2 Srčani zalisci

Mehanički zalisci nude iznimnu izdržljivost, ali i značajni rizik od trombogeneze. Biološki zalisci imaju ograničen vijek trajanja. Skupina znanstvenika liječila je 38 pacijenata s decelulariziranim plućnim homograftom i pokazala da za razliku od konvencionalnih homografta i ksenografta, decelularizirani svježiji alograftski zalisci pokazuju adaptivni rast. Isti autori izvijestili su o implantaciji decelulariziranog ljudskog plućnog alogenog srčanog zaliska s nanesenim autolognim endotelnim progenitornim stanicama. Izvijestili su o tri i pol godišnjem praćenju dva pacijenta u dobi od trinaest i jedanaest godina. Postoperativno je u oba djeteta dokumentirana blaga plućna regurgitacija. Nisu primijećeni znakovi degeneracije zalistaka. Zalisci stvoreni tkivnim inženjerstvom imaju potencijal preoblikovanja i rasta u skladu s tjelesnim rastom djeteta (Cebotari i sur., 2011).

2.5.4 KOSTI I ZGLOBNA HRSKAVICA

Isprva se koristila strategija bazirana na stanicama za liječenje defekata donje čeljusti nakon onkološke resekcije. Znanstvenici su koristili kavez od titanijske mreže ispunjen mineralnim segmentima kosti. Dodali su koštane morfogene proteine i koštanu srž. Konstrukt je sazrijevao u mišiću *latissimus dorsi* sedam tjedana. Međutim, usprkos izvješću o izvrsnom ishodu, postupak je proveden kod samo još jednog pacijenta, a praćenje je bilo ograničeno na četiri tjedna (Warnke i sur., 2004). Druga skupina znanstvenika izolirala je autologne nosne hondrocite i uzgojila hrskavicu za implantaciju za liječenje deset pacijenata sa simptomatskim

posttraumatskim defektima hrskavice pune debljine uz 24-mjesečno kliničko praćenje. Radiološke procjene ukazale su na različite stupnjeve popunjavanja defekata i razvoja tkiva koji se približava sastavu prirodne hrskavice nalik hijalinoj hrskavici (Mumme i sur., 2016).

2.5.5 DUŠNIK

Možda je lako stvoriti šuplju cijev koja oponaša dušnik, međutim, vrlo je složeno stvoriti dugu kružnu fleksibilnu prokrvljenu cijev koja ima mukoznu podlogu s trepetljivim epitelom i koja podnosi velike pritiske tijekom disanja. Važno je imati dobru prokrvljenost nakon transplantacije, i ako je moguće smanjiti imunološki odgovor koristeći stanice donora (Delaere i sur., 2014). Znanstvenici su 2002. pokušali strategijom formiranja cijevi s poliglikolnom kiselinom (nosač) i nanesenim fibroblastima i hondrocitima iz nosne pregrade ovaca napraviti dušnik (Kojima i Vacanti, 2004). Taj je konstrukt zatim implantiran u mišić kako bi se omogućila vanjska vaskularizacija. Koncept je bio inovativan, ali nažalost je degenerirao i propao. Skupina znanstvenika je 2005. htjela djelomično obnoviti krikoidnu hrskavicu i vratni dio dušnika. Koristili su acelularnu biosintetiziranu mrežicu ojačanu polipropilenom, obloženu kolagenom i prethodno zgrušanu autolognom krvlju u osam ljudskih slučajeva uz četverogodišnje praćenje (Omori i sur., 2005). Dodali su fibroblaste i stanice koštane srži i obložili lumen konstrukta poli-L-mliječnom kiselinom-ko-kaprolaktonom kako bi odgodili razgradnju kolagena. Bili su skeptični u vidu trajnosti regeneracije hrskavice od implantiranih hondrocita. Na početku se mislilo da je eksperiment uspio, međutim, pokazalo se da je bronh kolabirao i postavljen je stent. Izvanstanični matriks (ECM) iz dušnika korišten je kao nosač za dobivanje cijevi dušnika. Kratkotrajna inkubacija provedena je s autognim matičnim stanicama iz koštane srži. Osam mjeseci nakon implantacije došlo je do kolapsa konstrukta i morao je biti postavljen stent (Vogel, 2013).

2.6 BUDUĆNOST

Zbog velikog interesa znanstvenika, ali i zanimanja javnosti došlo je do napredovanja u području znanosti, posebno regenerativne medicine i tkivnog inženjerstva. Produljenjem životnog vijeka ljudi porasla je potreba za novim lijekovima i zamjenjivanjem tkiva i organa. Konačni cilj tkivnog inženjerstva je premostiti stalno rastući jaz između potražnje za organima i dostupnosti proizvedenih cjelovitih organa (Orlando i sur., 2011). Očekuje se da će se ovo područje sve više primjenjivati kao valjano kliničko rješenje. Matične stanice nastavit će se

istraživati zbog njihovog potencijala diferencijacije, a u budućnosti će se razvijati još primjena. Glavni izazov vezan uz matične stanice, bilo da su inducirane, embrionalne ili odrasle, da postignu željenu diferencijaciju. Očekuje se da će biti više primjena matičnih stanica u kliničkom ispitivanju u bliskoj budućnosti. Nadalje, genska terapija (utišavanje i aktivacija ciljnih gena) i lijekovi koristit će se za pomoć u održavanju željenog fenotipa stanice. Konačni cilj bio bi stvaranje imunološki transparentne matične stanice s kojom bi se s lakoćom manipuliralo za diferencijaciju. Razvoj temeljne i primijenjene znanosti povezan s proizvodnjom nosača tkivnog inženjerstva je veliki cilj u budućnosti. Također se očekuje da će decelularizirana tkiva ostati važan izvor nosača zbog njihove velike zastupljenost kao i njihov željeni kemijski i strukturni sastav. Potencijalna ograničenja takvih nosača uvijek će biti nedostatak zaliha (nosači iz alogenih izvora), potencijalne imunološke reakcije i etička pitanja (nosači ksenogenog podrijetla). U budućnosti se očekuje da će se razviti biomaterijali koji će uključivati odabrane molekule za ciljana tkiva. Štoviše, mnoge znanstvene studije bit će provedene kako bi se identificirali učinci molekula na stanice i odredile prave brzine razgradnje i svojstva materijala (poroznost, mehanička svojstva i strukturna svojstva) prikladni za svaku primjenu u inženjerstvu tkiva. Konačni cilj bio bi kombinirati nosače i stanice za inženjerstvo tkiva *in vitro*, koja se mogu decelularizirati za proizvodnju prilagodljivih gotovih izvora tkiva za različite inženjerske primjene. Buduća istraživanja nastavit će otkrivati uloge molekula izvanstaničnog matriksa i definirati idealne recepte za pravljenje nosača koji su najbliži prirodnim tkivima (Rami i Anwarul, 2017). Mehanizmi putem kojih stanice percipiraju opterećenje i reagiraju na okolinu tek se počinju otkrivati i uključuju istežanje ionskih kanala i integrina (Ramage i sur., 2009; Iqbal i Zaidi, 2005). Razumijevanje ovih mehanizama pružit će osnovu za razvoj novih alata za inženjerstvo tkiva i bioreaktora, i moguće otkrivanje novih korisnih molekula za liječenje bolesnih organa i tkiva. Budući bioreaktori moći će obavljati složene kombinatorne zadatke kako bi se projektirali puni organi. Na primjer, bioreaktori mogu biti dizajnirani da dostave različite razine kisika u različite dijelove modificiranog tkiva, različite mehaničke stimulacije ili dostaviti čimbenike rasta i molekule u unaprijed određeno vrijeme tijekom kulture. Konačno, bioreaktori se mogu napraviti takvima da se koriste na licu mjesta (npr. u bolnici) kako bi se smanjio rizik od kontaminacije i smanjilo vrijeme operacije (Rami i Anwarul, 2017).

3 SAŽETAK

Tkivno je inženjerstvo zajedno s regenerativnom medicinom (zajednički naziv TERM (eng. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*)) doživjelo veliki razvoj u prošlim desetljećima, potaknuto nedovoljnim brojem donora organa i imunološkim odbacivanjem transplantanata. Kombinacija koja donosi najveći uspjeh u inženjerstvu je usklađivanje tri elementa, a to su nosači, stanice i potrebni biosignali za razvoj tkiva u laboratoriju. Važno je koristiti dobru tehniku, a u ovom radu su opisane četiri često primjenjivane tehnike. Nakon uspješnog presađivanja kože, mnogi su mislili da će za nekoliko godina moći uzgajati organe u posudi, ali to se nije dogodilo. Susreli su se s brojnim problemima, od nedovoljnog razvoja nosača, malo izvora i teške kontrole diferencijacije matičnih stanica, nedovoljne prokrvljenosti tkiva, imunološkog odbacivanja transplantanata, nepoznavanja proteina, gena, polisaharida i tako dalje. Iako kliničke primjene nisu zasada bile toliko uspješne, znanstvenici se nadaju da će budućnost biti svjetlija istraživanjem novih tehnika i primjenjivanjem novih saznanja iz područja znanosti.

4 LITERATURA

- Adamowicz, J., Kowalczyk, T., & Drewa, T. (2013). Tissue engineering of urinary bladder-current state of art and future perspectives. *Central European journal of urology*, 66, str. 202-206.
- Agarwal, T., Narayan, R., Maji, S., Behera, S., Kulanthavel, S., Maiti, T., . . . Giri, S. (2016). Gelatin/Carboxymethyl chitosan based scaffolds for dermal tissue engineering applications. *International journal of biological macromolecules*, 93, str. 1499–1506.
- Akter, F. (2016). Chapter 1: What is tissue engineering. U F. Akter, *Tissue engineering made easy* (str. 1-2). Academic Press.
- Amable, P., Teixeira, M., Carias, R., Granjeiro, J., & Borojevic, R. (2014). Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem cell research & therapy*, 5, str. 53.
- Atala, A., Bauer, S., Soker, S., Yoo, J., & Retik, A. (2006). Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet (London, England)*, 367, str. 1241-1246.
- Awad, H., Halvorsen, Y., Gimble, J., & Guilak, F. (2003). Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *Tissue Engineering*, 9, str. 1301-1312.
- Berger, J., Reist, M., M., Felt, O., Peppas, N., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 57, str. 19-34.
- Bielby, R., Polak, J., & Buttery, L. (. (2004). In vitro differentiation and in vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells. *Tissue engineering*, 10, str. 1518-1525.
- Bisceglie, V. (1933). Uber die antineoplastische immunitat; heterologe Einpflanzung von Tumoren in Huhner-embryonen. *Ztschr f Krebsforsch.*, 40, str. 122-140.
- Bruder, S., Kurth, A., Shea, M., Hayes, W., Jaiswal, N., & Kadiyala, S. (1998). Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 16, str. 155-162.

- Burke, J., Yannas, I., Quinby, W., Bondoc, C., & Jung, W. (1981). Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Annals of surgery*, 194, str. 413-428.
- Buttery, L., Bourne, S., Xynos, J., Wood, H., Hughes, F. J., Hughes, S., & Episkopou, V. (2001). Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Engineering*, 7, str. 89-99.
- Cao, Y., Vacanti, J., Paige, K., Uton, J., & Vacanti, C. (1997). Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 100, str. 297-302.
- Cebotari, S., Tudorache, I., Ciubotaru, A., Boethig, D., Sarikouch, S., Goerler, A., . . . Haverich, A. (2011). Use of fresh decellularized allografts for pulmonary valve replacement may reduce the reoperation rate in children and young adults: early report. *Circulation*, 124, str. 115-123.
- Chan, B., & Leong, K. (2008). Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*, 17, str. 467-479.
- Chaudhari, A., Vig, K., Baganizi, D., Sahu, R., Dixit, S., Dennis, V., & Singh, S. (2016). Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. *International journal of molecular sciences*, 17.
- Cheng, C., & Solorio, L. (2014). Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering. *Biotechnology Advances*, 32, str. 462-484.
- De Bank, P., Hou, Q., Warner, R., Wood, I., Ali, B., S., M., . . . Buttery, L. (2007). Accelerated formation of multicellular 3-D structures by cell-to-cell cross-linking. *Biotechnology and bioengineering*, 97, str. 1617-1625.
- de Isla, N., Huseltein, C., Jessel, N., Pinzano, A., Decot, V., Magdalou, J., . . . J.F., S. (2010). Introduction to tissue engineering and application for cartilage engineering. *Bio-medical materials and engineering*, 20, str. 127-133.
- Delaere, P., Vranckx, J., Den Hondt, M., & Group, L. T. (2014). Tracheal Transplant Group (2014). Tracheal allograft after withdrawal of immunosuppressive therapy. *The New England journal of medicine*, 370, str. 1568-1570.
- Denning, C., Allegrucci, C., Priddle, H., Barbadillo-Muñoz, M., Anderson, D., Self, T., . . . Young, L. (2006). Common culture conditions for maintenance and cardiomyocyte differentiation of the human embryonic stem cell lines, BG01 and HUES-7. *The International journal of developmental biology*, 50, str. 27-37.

- Discher, D., Janmey, P., & Wang, Y. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, str. 1139-1143.
- Eberli, D., Freitas Filho, L., Atala, A., & Yoo, J. (2009). Composite scaffolds for the engineering of hollow organs and tissues. *Methods*, 47, str. 109-115.
- Engler, A., Sen, S., Sweeney, H., & Discher, D. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126, str. 677-689.
- Finch, J. (2011). The ancient origins of prosthetic medicine. *Lancet*, 377, str. 548-549.
- Fisher, M., & Mauck, R. (2013). Tissue engineering and regenerative medicine: recent innovations and the transition to translation. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 13, str. 1-13.
- Groeneveld, E., & Burger, E. (2000). Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *European Journal of Endocrinology*, 142, str. 9-21.
- Guthrie, C. (1919). End-results of arterial restitution with devitalized tissue. *Journal of the American Medical Association*, 73, str. 186-187.
- Harrison, J., Merrill, J., & Murray, J. (1956). Renal homotransplantation in identical twins. *Surgical Forum*, 6, str. 432-436.
- Hendrickx, B., Verdonck, K., Van den Berge, S., Dickens, S., Eriksson, E., Vranckx, J., & Lutun, A. (2010). Integration of blood outgrowth endothelial cells in dermal fibroblast sheets promotes full thickness wound healing. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 28, str. 1165-1177.
- Hernigou, P., Poignard, A., Beaujean, F., & Rouard, H. (2005). Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions: influence of the number and concentration of progenitor cells. *The Journal of bone and joint surgery*, 87, str. 1430-1437.
- Hewitt, Z., Priddle, H., Thomson, A., Wojtacha, D., & McWhir, J. (2007). Ablation of undifferentiated human embryonic stem cells, exploiting innate immunity against the Gal alpha1-3Galbeta1-4GlcNAc-R (alpha-Gal) epitope. *Stem Cells*, 25, str. 10-18.
- Holloway, M. (March 1999). Oil in water. *Scientific American*, 280, str. 38.
- Howard, D., Buttery, L., Shakesheff, K., & Roberts, S. (July 2008). Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *Journal of Anatomy*, 213, str. 66-72.
- Howard, D., Partridge, K., Yang, X., Clarke, N., Okubo, Y., Bessho, K., . . . Oreffo, R. (2002). Immunoselection and adenoviral genetic modulation of human osteoprogenitors: in vivo bone formation on PLA scaffold. *Biochemical and biophysical research communications*, 299, str. 208-215.

- Huang, S., & Fu, X. (2010). Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 142, str. 149-159.
- Iqbal, J., & Zaidi, M. (2005). Molecular regulation of mechanotransduction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328, str. 751-755.
- Johnson, N., & Wang, Y. (2015). Drug delivery systems for wound healing. *Current pharmaceutical biotechnology*, 16, str. 621-629.
- Johnson, W. (1959). The history of prosthetic dentistry. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 9.
- Jonathan, M. (2014). Chapter 81 - Tissue-Engineered Skin Products., U M. Jonathan, *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)* (str. 1697-1715). Academic Press.
- Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka-Moll, W., Silver, M., Kearney, M., . . . Asahara, T. (2000). Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, str. 3422-3427.
- Kannan, R., Salacinski, H., Sales, K., Butler, P., & Seifalian, A. (2005). The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: a review. *Biomaterials*, 26, str. 1857-1875.
- Kemp, P. (2006). History of regenerative medicine: looking backwards to move forwards. *Regenerative Medicine*, 1, str. 653-669.
- Kfoury, Y., & Scadden, D. T. (2015). Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell stem cell*, 16, str. 239-253.
- Kim, J., Jo, C., Kim, H., & Hwang, Y. (2018). Comparison of Immunological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells from the Periodontal Ligament, Umbilical Cord, and Adipose Tissue. *Stem cells international*.
- Kojima, K., & Vacanti, C. (2004). Generation of a tissue-engineered tracheal equivalent. *Biotechnology and applied biochemistry*, 39, str. 257-262.
- Langer, R., & Vacanti, J. (14. May 1993). Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*, 260, str. 920-926.
- Lee, A., Mahler, N., Best, C., Lee, Y., & Breuer, C. (2014). Regenerative implants for cardiovascular tissue engineering. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 163, str. 321-341.

- Lee, C., Muioli, E., & Mao, J. (2006). Fibroblastic differentiation of human mesenchymal stem cells using connective tissue growth factor. *2006 International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, str. 775-778.
- Lin, Y., Weisdorf, D., Solovey, A., & Heibel, R. (2000). Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *The Journal of clinical investigation*, *105*, str. 71-77.
- Liu, C., Zhang, H., Tang, X., Feng, R., Yao, G., Chen, W., . . . Sun, L. (2018). Mesenchymal stem cells promote the osteogenesis in collagen-induced arthritic mice through the inhibition of TNF-alpha. *Stem Cells International*.
- Lo, B., & Parham, L. (May 2009). Ethical Issues in Stem Cell Research. *Endocrine reviews*, *30*, str. 204-213.
- Lysaght, M., & Hazlehurst, A. (2004). Tissue engineering: the end of the beginning. *Tissue Engineering*, *10*, str. 309-320.
- Mansbridge, J. (2002). Tissue-engineered skin substitutes. *Expert opinion on biological therapy*, *2*, str. 25-34.
- Markeson, D., Pleat, J., Sharpe, J., Harris, A., Seifalian, A., & Watt, S. (2015). Scarring, stem cells, scaffolds and skin repair. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, *9*, str. 649-668.
- Matsuda, H., Coughlin, M., Bienenstock, J., & Denburg, J. (1988). Nerve growth factor promotes human hemopoietic colony growth and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*, str. 6508–6512.
- McAllister, T., Maruszewski, M., Garrido, S., Wystrychowski, W., Dusserre, N., Marini, A., . . . L'heureux, N. (2009). Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *Lancet (London, England)*, *373*, str. 1440-1446.
- Mhanna, R., Öztürk, E., Schlink, P., & Zenobi-Wong, M. (2013). Probing the microenvironmental conditions for induction of superficial zone protein expression. *Osteoarthritis Cartilage*, *21*, str. 1924-1932.
- Motawea, S., Noreldin, R., & Naguib, Y. (2020). Potential therapeutic effects of endothelial cells trans-differentiated from Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells on altered vascular functions in aged diabetic rat model. *Diabetology & metabolic syndrome*, *12*, str. 40.

- Mumme, M., Barbero, A., Miot, S., Wixmerten, A., Feliciano, S., Wolf, F., . . . Jakob, M. (2016). Nasal chondrocyte-based engineered autologous cartilage tissue for repair of articular cartilage defects: an observational first-in-human trial. *Lancet (London, England)*, 388, str. 1985–1994.
- Muschler, G., Nakamoto, C., & Griffith, L. (2004). Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *The Journal of bone and joint surgery.*, 86, str. 1541-1558.
- Naughton, G., & Mansbridge, J. (1999). Human-based tissue-engineered implants for plastic and reconstructive surgery. *Clinics in plastic surgery*, 26, str. 579-580.
- Nerlich, A. Z. (2000). Ancient Egyptian prosthesis of the big toe. *Lancet*, 356, str. 2176-2179.
- Nicodemus, G., & Bryant, S. (2008). Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Engineering, Part B*, 14, str. 149-165.
- Nordham, K., & Ninokawa, S. (19. October 2021). The history of organ transplantation. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 35, str. 124-128.
- Olausson, M., Patil, P., Kuna, V., Chougule, P., Hernandez, N., Methe, K., . . . Sumitran-Holgersson, S. (2012). Transplantation of an allogeneic vein bioengineered with autologous stem cells: a proof-of-concept study. *Lancet (London, England)*, 380, str. 230-237.
- Omori, K., Nakamura, T., Kanemaru, S., Asato, R., Yamashita, M., Tanaka, S., . . . Shimizu, Y. (2005). Regenerative medicine of the trachea: the first human case. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 114, str. 429-433.
- Orlando, G., Baptista, P., Birchall, M., De Coppi, P., Farney, A., Guimaraes-Souza, N., . . . Soker, S. (2011). Regenerative medicine as applied to solid organ transplantation: Current status and future challenges. *Transplant International*, 24, str. 223-232.
- Plaas, A., West, L., Wong-Palms, S., & Nelson, F. (1998). Glycosaminoglycan sulfation in human osteoarthritis: Disease-related alteration at the non-reducing termini of chondroitin and dermatan sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, 273, str. 12642–12649.
- Ramage, L., Nuki, G., & Salter, D. (2009). Signalling cascades in mechanotransduction: Cell–matrix interactions and mechanical loading. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 19, str. 457-469.
- Rami, M., & Anwarul, H. (17. April 2017). Introduction to Tissue Engineering. U M. Rami, & H. Anwarul, *Tissue Engineering for Artificial Organs: Regenerative Medicine, Smart Diagnostics and Personalized Medicine* (Svez. 2, str. 1-34).

- Raya-Rivera, A., Esquiliano, D., Yoo, J., Lopez-Bayghen, E., Soker, S., & Atala, A. (2011). Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. *Lancet(London,England)*, 377, str. 1175-1182.
- Richardson, S., Kalamegam, G., Pushparaj, P., Matta, C., Memic, A., Khademhosseini, A., . . . Mobasheri, A. (2016). Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. *Methods (San Diego Calif.)*, 99, str. 69-80.
- Rodgers, K., San Antonio, J., & Jacenko, O. (2008). Heparan sulfate proteoglycans: A GAGgle of skeletal-hematopoietic regulators. *Developmental Dynamics*, 237, str. 622–2642.
- Rodríguez, L., Martínez Ramos, C., & Pradas, M. (26. April 2021). Biomaterials for Neural Tissue Engineering. *Frontiers in Nanotechnology*, 3, str. 7.
- Rosso, F., Marino, G., Giordano, A., Barbarisi, M., Parmeggiani, D., & Barbarisi, A. (2005). Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *Journal of cellular physiology*, 203, str. 465-470.
- Shen, C., Yang, C., Xu, S., & Zhao, H. (2019). Comparison of osteogenic differentiation capacity in mesenchymal stem cells derived from human amniotic membrane (AM), umbilical cord (UC), chorionic membrane (CM), and decidua (DC). *Cell & bioscience*, 9.
- Sheridan, R., & Tompkins, R. (1999). Skin substitutes in burns. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*, 25, str. 97-103.
- Shin'oka, T., Imai, Y., & Ikada, Y. (2001). Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *The New England journal of medicine*, 344, str. 532-533.
- Singh, P., & Schwarzbauer, J. (2012). Fibronectin and stem cell differentiation—Lessons from chondrogenesis. *Journal of Cell Science*, 125, str. 3703–3712.
- Sottile, V., Thomson, A., & McWhir, J. (2003). In vitro osteogenic differentiation of human ES cells. *Cloning and Stem cells*, 5, str. 149-155.
- Spector, M. (2006). Biomaterials-based tissue engineering and regenerative medicine solutions to musculoskeletal problems. *Swiss medical weekly*, 136, str. 293-301.
- Sumanasinghe, R., Bernacki, S., & Loba, E. (2006). Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen matrices: Effect of uniaxial cyclic tensile strain on bone morphogenetic protein (BMP-2) mRNA expression. *Tissue Engineering*, 12, str. 3459-3465.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (25. August 2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, str. 663-676.

- Tilley, S., Bolland, B., Partridge, K., New, A., Latham, J., Dunlop, D., & Oreffo, R. (2006). Taking tissue-engineering principles into theater: augmentation of impacted allograft with human bone marrow stromal cells. *Regenerative medicine*, 1, str. 685-692.
- Tonelli, F., de Cássia Oliveira Paiva, N., de Medeiros, R., Pinto, M., Tonelli, F., & Resende, R. (2017). 12 - Tissue Engineering: The Use of Stem Cells in Regenerative Medicine. U F. Tonelli, N. de Cássia Oliveira Paiva, R. de Medeiros, M. Pinto, F. Tonelli, & R. Resende, *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (str. 315-324).
- Tsutsumi, S., Shimazu, A., Miyazaki, K., Pan, H., Koike, C., Yoshida, E., . . . Kato, Y. (2001). Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288, str. 413-419.
- Vacanti, J. (2010). Tissue engineering and regenerative medicine: From first principles to state of the art. *The Journal of Pediatrics*, 45, str. 291-294.
- Vacanti, J., Morse, M., Saltzman, W., Domb, A., Perez-Atayde, A., & Langer, R. (1988). Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *Journal of pediatric surgery*, 23, str. 3-9.
- Van Pham, P., Thi-My Nguyen, P., Thai-Quynh Nguyen, A., Minh Pham, V., Nguyen-Tu Bui, A., Thi-Tung Dang, L., . . . Kim Phan, N. (June 2014). Improved differentiation of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into insulin-producing cells by PDX-1 mRNA transfection. *Differentiation; research in biological diversity*, 87, str. 200-208.
- Vogel, G. (2013). Trachea transplants test the limits. *Science (New York,N.Y.)*, 340, str. 266-268.
- Vranckx, J., & Hondt, M. (24. June 2017). Tissue engineering and surgery: from translational studies to human trials. *Innovative Surgical Sciences*, 2, str. 189-202.
- Wang, Z., He, Z., Liang, S., Yang, Q., Cheng, P., & Chen, A. (2020). Comprehensive proteomic analysis of exosomes derived from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy*, 11, str. 511.
- Warnke, P., Springer, I., Wiltfang, J., Acil, Y., Eufinger, H., Wehmöller, M., . . . Behrens, E. (2004). Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet (London, England)*, 364, str. 766-770.
- Wobus, A., Grosse, R., & Schöneich, J. (1987). Specific effects of nerve growth factor on the differentiation pattern of mouse embryonic stem cells in vitro. *Biomedica Biochimica Acta*, 47, str. 465-473.

- Wu, K., Wang, S., Xiao, Q., Yang, Y., Huang, N., Mo, X. M., & Sun, J. (2018). Efficient generation of functional cardiomyocytes from human umbilical cord-derived virus-free induced pluripotent stem cells. *Cell and tissue research*, 374, str. 275-283.
- Xue, Z., Meng, Y., & Ge, J. (2018). Upregulation of miR-132 attenuates osteoblast differentiation of UC-MSCs. *European review for medical and pharmacological sciences*, 22, str. 1580-1587.
- Yamato, M., & Okano, T. (2004). Cell sheet engineering. *Materials today*, 7, str. 42-47.
- Yang, X., Roach, H., Clarke, N., Howdle, S., Quirk, R., Shakesheff, K., & Oreffo, R. (2001). Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification. *Bone*, 29, str. 523-531.
- Yea, J., Bae, T., Kim, B., Cho, Y., & Jo, C. (2020). Regeneration of the rotator cuff tendon-to-bone interface using umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and gradient extracellular matrix scaffolds from adipose tissue in a rat model. *Acta biomaterialia*, 114, str. 104-116.
- Yoder, M., Mead, L., Prater, D., Krier, T., Mroueh, K., Li, F., . . . Ingram, D. (2007). Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*, 109, str. 1801-1809.
- Zhang, Y., Zhu, Z., Hua, K., Yao, L., Liu, Y., & Ding, J. (2018). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transplantation in vaginal replacement in vitro and in a rat model. *American journal of translational research*, 10.
- Zhou, X., Cui, L., Zhou, X., Yang, Q., Wang, L., Guo, G., . . . Han, Y. (2017). Induction of hepatocyte-like cells from human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells by defined microRNAs. *Journal of cellular and molecular medicine*, 21, str. 881-893.
- Zimble, M. (2001). Gaspare Tagliacozzi (1545–1599): Renaissance surgeon. *Archives of Facial Plastic Surgery*, 3, str. 283-284.