

mr Ljubiša B. Đorđević

Induktivni potencijali implantirane demineralizovane kosti u lokalnom reparativnom rastu kosti na eksperimentalnom modelu

doktorska disertacija

Niš, 2011. godine



**UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
ODSEK ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU**

mr Ljubiša B. Đorđević

***Induktivni potencijali implantirane
demineralizovane kosti u lokalnom reparativnom
rastu kosti na eksperimentalnom modelu***

-doktorska disertacija-

Niš, 2011. godine

Ovaj rad posvećujem,

Senima moje majke, jer nije izdržala borbu sa tumorom temporalne kosti;

Pokojnom prof. dr Radoslavu Žikiću, koji me kao studenta uveo u naučno-istraživački rad;

Moem ocu, Budimiru, koji me naučio radu i poštenu prema ljudima;

Mojim antelima, sinovima Risti i Milutinu, koji sa svojom generacijom preziru školovanje, ali zbog kojih sve ima smisla:

Jer, čovek ne može biti čovek ako se ne okrene ka svetlosti, unutrašnjoj svetlosti svoje svesti, odblesku večne svetlosti; svetlosti znanja i ljubavi, koja simboliše znanje o ljubavi i ljubav prema znanju; mudrosti ili težnju ka mudrosti (jer čovek je samo čovek, elan, težnja i ljubav prema mudrosti). Pomoću svetlosti čovek postaje slobodni zidar i slobodni zidar postaje istinski čovek, odnosno, čovek uređen duhom ili čovek-Duh.“

Gete (Faust)

Ova disertacija je realizovana u okviru projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije br. 145072.

Eksperimentalni deo ovog rada urađen je u:

Laboratoriji za eksperimentalnu hirurgiju Instituta za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu,

Laboratoriji za elektronsku mikroskopiju Instituta za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu,

Laboratoriji za izradu mikroskopskih preparata i analizu slike Odseka za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu.

Prilikom izbora teme i planiranja eksperimentnata veliku pomoć pružio mi je mentor prof. dr Stevo Najman, kome se srdačno zahvaljujem na stručnoj pomoći u analizi i obradi dobijenih rezultata i konačnom uobičavanju teksta. Takođe, prof. dr Stevi Najmanu neizmerno dugujem zahvalnost za strpljenje, iskreno prijateljstvo i nesebičnu podršku u toku rada.

Za ustupanje laboratorija i omogućavanje eksperimentalnog rada zahvaljujem ljubaznosti prof. dr Vojina Savića.

Dr Aci Petroviću sa Instituta za histologiju Medicinskog fakulteta u Nišu posebno se zahvaljujem na velikoj pomoći i savetima u obradi i tumačenju histoloških preparata.

Prof. dr Jeleni Živanov-Čurlis zahvaljujem za nesebičnu podršku i pomoć od početka rada.

Za neograničeno poverenje, za prijateljstvo, za spremnost da u svakom trenutku pomogne, zahvaljujem se laborantu Tanji Prokić.

Vesni, Bogiju i Vladi, radnicima u Vivarijumu Medicinskog fakulteta u Nišu, zahvaljujem na svesrdnoj pomoći u radu sa eksperimentalnim životinjama.

Svim zaposlenim u Institutu za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu, zahvaljujem za prijateljstvo i pomoć.

Saradniku Jeleni Rajković, diplomiranom biologu, zahvaljujem na pomoći u obradi uzoraka za skening elektronsku mikroskopiju.

SKRAĆENICE

ALP – alkalna fosfataza

BCP – bifazni kalcijum fosfat

BMP (*eng. bone morphogenetic protein*) – kostni morfogenetski protein

BMSC (*eng. bone marrow stromal cells*) – matične ćelije strome kostne srži

CaP – kalcijum fosfat

CFU-Fs (*eng. fibroblast colony-forming unit*) – kolonija koja formira fibroblaste

DBM (*eng. demineralized bone matrix*) – demineralizovani kostni matriks

DK – demineralizovana kost

ECM – ekstracelularni matriks

EDTA (*eng. Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*) – etilendiaminotetrasirćetna kiselina

FGF (*eng. fibroblast growth factor*) – fibroblastni faktor rasta

HA – hidroksiapatit

HE - hematoksilinom i eozinom

IGF (*eng. insulin-like growth factor*) – insulinu sličan faktor rasta

PAS (*eng. Periodic-acid Schiff*) – bojenje perjodne kiseline

PCL – poli-kaprolakton

PDGF (*eng. plateled-derived growth factor*) – trombocitni faktor rasta

PGA - poli-glikolna kiselina

PLGA – poli-DL-mlečna-co-glikolna kiselina

PLLA – poli-L-mlečna kiselina

POE - poliortoestar

PPF - polipropilenfumarat

SEM (*eng. scanning electron microscope*) – skening elektronski mikroskop

TCP – trikalcijum fosfat

WB - Westen-Bainton ćelije

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. POSTAVLJANJE PROBLEMA	1
1.1.1. TRAUMA KOSTNOG TKIVA I TRETMAN	1
1.1.2. EKSPERIMENTALNI MODELI NA ŽIVOTINJAMA	3
1.1.3. MODELI DEFEKTA KOSTI	4
1.2. PREGLED LITERATURNIH PODATAKA	7
1.2.1. OPŠTI OPIS KOSTI	7
1.2.1.1. Tipovi kosti	8
1.2.1.2. Ekstracelularni kostni matriks	9
1.2.1.3. Obrazovanje i popravka kosti	9
1.2.1.4. Zarastanje frakturna	11
1.2.2. PRESAĐIVANJE KOSTI	12
1.2.2.1. Ortopedska primena kostnih kalema	13
1.2.2.2. Upotreba kostnih kalema u oralnoj i maksilofacialnoj hirurgiji	14
1.2.3. ALTERNATIVE ZA AUTOLOGE KOSTNE KALEME	15
1.2.3.1. Alokalemi	16
1.2.3.2. Ksenokalemi	17
1.2.3.3. Kolagen	17
1.2.3.4. Porozna keramika	17
1.2.4. KONCEPT I STRATEGIJE U INŽENJERSTVU KOSTNOG TKIVA	18
1.2.4.1. Nosači za osteogene ćelije	19
1.2.4.2. Faktori rasta u kostnom tkivu	23
1.2.4.3. Osteogene ćelije	26
1.2.5. KORACI U ISTRAŽIVANJIMA – OD IDEJE DO PACIJENTA	31
1.2.5.1. Mehanističke studije	31
1.2.6. KORACI KA KLINIČKOJ PRIMENI	37
1.2.6.1. Kalembska vijabilnost i vaskulogeneza	38
1.2.6.2. <i>In vitro</i> modeli za studiranje vaskularizacije kosti	39
1.2.6.3. <i>In vivo</i> modeli sa vaskularizovanim tkivno-projektovanim kostnim sklopovima	39
1.2.6.4. Problemi koja se odnose na domaćina	40
1.2.7. TRENUTNI STATUS TKIVNOG INŽENJERINGA KOSTI	42
1.2.7.1. Kliničko iskustvo u ortopediji	42
1.2.7.2. Klinička iskustva u maksilofacialnoj i oralnoj hirurgiji	44
1.2.7.3. Ograničenja u kliničkoj primenljivosti	45
1.2.7.4. Buduće smernice u istraživanjima	46
2. PREDMET I CILJ ISTRAŽIVANJA	48
3. MATERIJAL I METODE	49
3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE	49
3.2. IMPLANTIRANI MATERIJALI	49
3.3. ANESTEZOLOŠKA I OPERACIONA PROCEDURA	50
3.4. EKSPERIMENTALNI DIZAJN	53
3.5. PATOHISTOLOŠKA ANALIZA	53
3.6. HISTOHEMIJSKA BOJENJA	54
3.7. SVETLOSNA MIKROSKOPIJA	55
3.8. SEM ANALIZA	55
4. REZULTATI	56
4.1. ANALIZA MATERIJALA PRIPREMLJENIH ZA IMPLANTACIJU	56
4.1.1. Analiza mineralnog matriksa	56
4.1.2. Analiza kolagene membrane	56
4.1.3. Analiza demineralizovane kosti	57
4.2. EFEKTI SUBKUTANE IMPLANTACIJE	58
4.2.1. Stanje I nedelje posle implantacije	58

4.2.1.1. Histološki nalaz posle implantacije mineralnog matriksa	58
4.2.1.2. Histološki nalaz posle implantacije kolagene membrane	59
4.2.1.3. Histološki nalaz posle implantacije demineralizovane kosti	59
4.2.2. Stanje III nedelje posle implantacije	62
4.2.2.1. Histološki nalaz posle implantacije mineralnog matriksa	62
4.2.2.2. Histološki nalaz posle implantacije kolagene membrane	63
4.2.2.3. Histološki nalaz posle implantacije demineralizovane kosti	63
4.2.3. Stanje VI nedelje posle implantacije	65
4.2.3.1. Histološki nalaz posle implantacije mineralnog matriksa	65
4.2.3.2. Histološki nalaz posle implantacije kolagene membrane	66
4.2.3.3. Histološki nalaz posle implantacije demineralizovane kosti	66
4.3. EFEKTI INTRAMUSKULARNE IMPLANTACIJE	67
4.3.1. Stanje I nedelje posle implantacije	67
4.3.1.1. Histološki nalaz posle implantacije mineralnog matriksa	67
4.3.1.2. Histološki nalaz posle implantacije kolagene membrane	69
4.3.1.3. Histološki nalaz posle implantacije demineralizovane kosti	70
4.3.2. Stanje III nedelje posle implantacije	71
4.3.2.1. Histološki nalaz posle implantacije mineralnog matriksa	71
4.3.2.2. Histološki nalaz posle implantacije kolagene membrane	73
4.3.2.3. Histološki nalaz posle implantacije demineralizovane kosti	73
4.3.3. Stanje VI nedelje posle implantacije	75
4.3.3.1. Histološki nalaz posle implantacije mineralnog matriksa	75
4.3.3.2. Histološki nalaz posle implantacije kolagene membrane	76
4.3.3.3. Histološki nalaz posle implantacije demineralizovane kosti	77
4.4. EFEKTI IMPLANTACIJE U KOSTNI DEFEKT FEMURA	79
4.4.1. Stanje I nedelje posle implantacije	79
4.4.1.1. Histološki nalaz posle implantacije mineralnog matriksa	79
4.4.1.2. Histološki nalaz posle implantacije kolagene membrane	80
4.4.1.3. Histološki nalaz posle implantacije demineralizovane kosti	81
4.4.2. Stanje III nedelje posle implantacije	84
4.4.2.1. Histološki nalaz posle implantacije mineralnog matriksa	84
4.4.2.2. Histološki nalaz posle implantacije kolagene membrane	85
4.4.2.3. Histološki nalaz posle implantacije demineralizovane kosti	85
4.4.3. Stanje VI nedelje posle implantacije	88
4.4.3.1. Histološki nalaz posle implantacije mineralnog matriksa	88
4.4.3.2. Histološki nalaz posle implantacije kolagene membrane	89
4.4.3.3. Histološki nalaz posle implantacije demineralizovane kosti	89
5. DISKUSIJA	92
6. ZAKLJUČAK	102
7. LITERATURA	104
8. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM	130
8.1. BIOGRAFSKI PODACI	130
8.2. PROFESIONALNA KARIJERA	131
8.3. STRUČNO USAVRŠAVANJE	131
8.4. RAD U TELIMA NA FAKULTETU	132
8.5. UČEŠĆE NA PROJEKTIMA	132
8.6. PODACI O OBJAVLJENIM NAUČNIM RADOVIMA	132
8.6.1. Naučni radovi u časopisu međunarodnog značaja (M23=3 poena)	132
8.6.2. Naučni radovi u časopisu nacionalnog značaja (M52=1,5poen)	133
8.6.3. Naučni radovi u naučnim časopisima (M53=1poen)	133
8.6.4. Naučni radovi saopšteni na skupu međunarodnog značaja štampani u izvodu (M34=0,5poena)	134

1. UVOD

1.1. POSTAVLJANJE PROBLEMA

1.1.1. TRAUMA KOSTNOG TKIVA I TRETMAN

Defekti kosti koji su rezultat frakturna, trauma, ugradnje veštačkog kuka, uklanjanja tumora ili osteolize, uobičajeni su razlog velikog broja ortopedskih operacija. Konvencionalni reparativni tretman kostnih defekata podrazumeva korišćenje kostnih kalema uzetih sa tkiva pacijenta (autogeni kalemi) ili sa tkiva donora (alogeni kalemi), kao i korišćenje ksenogenih kalema i kostnih supstituenata. Najčešće korišćeni kostni kalemi su autogeni kalemi uzeti sa ilijačne kreste, sunđerasti alokalemski čipovi i veštački biomaterijali. Autogeni kostni kalemi ostaju zlatni standard u tretmanu kostnih defekata (*Oklund et al., 1986; Boyan et al., 2003*). Ipak, ograničena količina, preosetljivost donorskog mesta, anatomske i strukturne probleme, ekonomski i hospitalizacioni ograničenja onemogućavaju široku primenu ovog tretmana (*Younger and Chapman, 1989; Rocha et al., 2002*). Alogenih kalema se široko koriste kao odgovor na nedostatak autogenih kalema i obično se dobijaju iz banaka kostiju (*Tomford et al., 1987*). Budući da se oni uzimaju od drugih individua, bakterijske infekcije, imunogenost, prenos sistemskih bolesti kao što su AIDS i hepatitis su potencijalni rizik povezani sa upotrebom alogenih kalema (*Tomford, 2000; Betz, 2002*). Sterilizacione metode uz korišćenje zračenja, autoklaviranja, tretiranja etilen oksidom i antibioticima (*Solheim, 1998*) mogu redukovati imunogenost i smanjiti rizik od infekcije (*Friedlaender et al., 1976*), ali isto tako mogu štetno uticati na osteoinduktivnost i strukturne osobine kalema (*Prolo et al., 1982; Yu et al., 2003*). Kalemi ksenogenog porekla uzeti sa vrsta kao što su goveče, svinja i ovca, nameću slične probleme. Postoji veliki broj supstituenata za kostne kaleme, kako prirodnih tako i sintetičkih baziranih na kalcijum fosfatu, kalcijum karbonatu ili kalcijum sulfatu (*Boyan et al., 2003*), ali nijedan od njih ne poseduje regenerativne osobine autogenih kalema zbog odsustva induktivnih molekula.

U savremenoj kliničkoj praksi, pri rekonstruktivnim zahvatima u ortopediji i maksilofacialnoj hirurgiji, koristi se mnogo različitih supsticijata kosti. Prema svojim hemijskim i fizičkim svojstvima, svaki od njih ima i prednosti i mane. Neorganski materijali se koriste u svojstvu mineralnog matriksa kosti. Organski materijali na bazi kolagena u svojstvu organskog matriksa kosti. Kost poseduje svoj mineralni matriks i sopstvena kolagena vlakna.

Ideja demineralizovane kosti, kao materijala za supsticiju kosti, nudi neke prednosti iz razloga što je to prirodna kost kojoj je uklonjen mineralni deo, a u ostaku, organskom delu, zadržava se originalna mikrostruktura kosti, što treba da omogući rast osteogenih ćelija. Zato je napravljeno ovo istraživanje da se uporede, pod istim uslovima, demineralizovana kost i neorganski mineralni matriks, kao i koliko organski deo kosti (kolagen) ima ulogu u reparativnom rastu kosti. Sa opštim ciljem da se pribave nove informacije za potencijalnu ortopedsku primenu demineralizovane kosti.

Ektopična indukovana osteogeneza je uzeta kao model da bi se sagledali samo implantati kao faktor u komparaciji sa osteogenezom *in situ* u kojoj fiziološki faktori iz kostnog tkiva deluju na reparativne osteogene procese.

Mišić kao model za idukovanu ektopičnu osteogenezu je uzet zbog visoke okrvljenosti, s obzirom da je vaskularizacija fiziološki uslov za osteogene procese.

Sa druge strane, u subkutanom modelu oskudan je vaskularni faktor što nam omogućava da sagledamo osteogeni potencijal implantata nezavisno od procesa vaskulogeneze. Pojava krvnih sudova u sukuštanom implantatu govori u prilog dobrog osteogenog potencijala biomaterijala, zato što je vaskularizacija faza koja prethodi osteogenoj fazi.

Kostni defekt model obezbeđuje sve navedene uslove na jednom mestu. Prisutan je mineralni deo, kolagen iz okolnog organskog matriksa, dosta krvnih sudova i još kostna srž kao pul matičnih osteogenih ćelija. Kost je ortotopično mesto osteogeneze.

Klinička potvrda bezbednosti i efikasnosti je krucijalna pre nego što supstituenti za kostne kaleme postanu klinički primenljivi. Imajući u vidu da je kostna reparacija kompleksan proces sinergičkih interakcija između unutrašnjih i spoljašnjih faktora, supstituente najpre treba ispitati u biološkom okruženju, npr. *in vivo* modelu. *In vitro* studije u kontrolisanim biološkim sistemima, kao što su kulture ćelija, ne pružaju

dovoljan uvid u to kako se živo tkivo ponaša u kompletnoj sredini (*Balaburski and O'Connor, 2003*). Za neke materijale koji su zadovoljili bezbednosne standarde i za koje je dozvoljena klinička upotreba, teško je utvrditi dinamičku efikasnost i mehanizme usled ograničene količine biopsionih tkiva (*Bucholz, 2003*). Klinička ispitivanja na ljudima su takođe ograničena velikim troškovima, etičkim razmatranjima i nemogućnošću studija na velikim populacijama (*Bucholz, 2003*). Problemi na mestu intervencije, kao i broj promenljivih, često ovakve studije čine teško izvodljivim. Procene kostnih formacija korišćenjem neinvazivnih metoda, kao što su radiografija i druge metode slikanja, su subjektivne i daju ograničenu količinu informacija (*Bucholz, 2003*). Zbog toga, životinje se rutinski koriste kako bi se procenio koncept, izvodljivost, bezbednost i efikasnost eksperimentalno implantiranih materijala (*Sandhu and Khan, 2002*). Eksperimenti na životinjama obezbeđuju živu mikrosredinu za pravilno razumevanje bioloških procesa. Reproducibilni i merljivi podaci, koji se teško dobijaju korišćenjem mrtvih ljudskih subjekata ili kompjuterskih simulacija, lako se obezbeđuju iz eksperimenata na životinjama (*Sandhu and Khan, 2002*).

1.1.2. EKSPERIMENTALNI MODELI NA ŽIVOTINJAMA

Životinje se rutinski koriste kao pretklinički *screening* za procenu izvodljivosti hirurških tehnika ili vijabilnosti implantata pre nego se pređe na humana klinička ispitivanja. U mnogim oblastima istraživanja, postoje životinjski modeli koji dele određeni stepen sličnosti sa ljudskim fiziološkim uslovima i bolestima. U ortopediji, kostni reparacioni modeli na životinjama su relevantni sve dotle dok je njihov proces zarastanja kostiju sličan ljudskom. Frakture dugih kostiju (*Bonnares and Einhorn, 1984; Brighton and Hunt, 1991; Walsh et al., 1997*), kalvarijalni defekti (*D'Aoust et al., 2000*), distrakciona osteogeneza (*Richards et al., 1998*) i mandibularna distrakcija su neki od često korišćenih modela na životinjama, koji se ne razlikuju puno od uslova kod ljudi. Po rečima Perena, kostni reparacioni modeli omogućavaju „razbijanje kompleksnih kliničkih problema u različite fizičke entitete, njihove međusobne odnose i biološke reakcije“ (*Perren, 1979*).

Životinje, kao i ljudi, fiziološki i u svojim rekcijama, zavise od svoje biološke konstitucije i sredine. Kao takve, životinje pokazuju veliki broj varijacija u ekspresiji gena u zavisnosti od životnog doba, pola, fizioloških i genetskih faktora. Ispitivanja na

životinjskim modelima su praktičnija i klinički relevantnija od *in vitro* studija. Kontrolisani biološki testovi, kao što su kulture ćelija, pokazuju malo varijacija između različitih uzoraka, ali pružaju slab uvid u to kako živa tkiva reaguju u kompleksnoj *in vivo* sredini (*Balaburski and O'Connor, 2003*).

Krupne životinje koje se često koriste u ortopedskim istraživanjima su: zečevi, ovce, koze, svinje, psi, kao i nehuman primati. Nehuman primati su u bliskom srodstvu sa ljudima, sa 98% genetske homologije i zbog toga, predstavljaju osnov za najtačnije testove pretkliničke efikasnosti (*Sandhu and Khan, 2002*), iako troškovi i mala veličina ispitivanog uzorka ograničavaju njihovo korišćenje (*Heiple et al., 1987*). Dok krupne životinje obezbeđuju bolju prezentaciju ljudskih uslova zahvaljujući filogenetskoj srodnosti (*Lind, 1998*), male životinje imaju određene prednosti, kao što su veličina ispitivanog uzorka, lakše gajenje, kao i manji troškovi (*Lind, 1998; Le et al., 2001*). Glodari su dobro proučeni i poseduju osobine pogodne za istraživanje. Mogućnosti za genetsku manipulaciju kod miša dodatno mu pojačavaju status životinjskog modela neprocenjive vrednosti (*Porter, 1993*).

1.1.3. MODELI DEFEKTA KOSTI

Reparacija kosti kod životinja je istraživana na ektopičnoj osteogenezi i modelima defekta kosti. Obrazovanje ektopične kosti se dešava na vanskeletnim mestima, a najčešće u mišićima ili na potkožnim mestima (*Aspenberg and Andolf, 1989; Tsai et al., 2002*). Iako ektopično-kostni modeli reflektuju absolutni osteinduktivni kapacitet proučavanog materijala, ukupna reparativna sposobnost testnog materijala se bolje procenjuje u kosti (ortotopično), te otuda postoji potreba za modelima defekta kosti (*Lane and Sandhu, 1987*). Modeli defekta kosti omogućavaju procenu osteokonduktivnih i osteoinduktivnih potencijala supstituenata kosti, drugih materijala, proteina i shvatanja zasnovanih na tkivnom inženjerstvu. Modeli defekta mogu da pruže važnu kliničku informaciju za tretman frakturna sa prekidom kontinuiteta kosti, defekata usled poremećaja kostiju, kao i defekata jatrogenog porekla. Modeli sa prekidom kontinuiteta kosti kod miševa i pacova se puno koriste, počevši od frakturna rebara (*Hashimoto et al., 1989; Nakase et al., 1994; Yamagiwa et al., 1999; Asaumi et al., 2000*), pa sve do femurnih (*Bourque et al., 1992; Thompson et al., 2002; Manigrasso and O'Connor, 2004*) i tibijalnih frakturna (*Bourque et al., 1992; Hiltunen et al., 1993; Le et al., 2001*). Najčešći modeli

defekta koji se koriste su kalvarijalni defekti (*Lee et al., 2001; Lee et al., 2002; Aalami et al., 2004*), segmentalni defekti (*Kirkeby et al., 1992; Raschke et al., 2001*) i otvoreni defekti (*Cheng et al., 2005*).

Segmentalni defekti se obično prave na dugim kostima uklanjanjem segmenta kosti, pri čemu je pokretljivost životinje očuvana do određenog stepena. Defekti koji su 1.5 ili 2 puta veći od dijafiznog dijametra dovode do nemogućnosti srastanja kod odraslih životinja (*Heiple et al., 1987; Lane and Sandhu, 1987*). Frakture rebara nisu neuobičajene i primenjuju se kod malih sisara (*Brighton and Hunt, 1991; Hashimoto et al., 1989; Nakase et al., 1994; Yamagiwa et al., 1999; Asaumi et al., 2000*). Frakture rebara podrazumevaju slične morfološke promene, tipične za duge kosti i ne zahtevaju imobilizaciju (*Brighton and Hunt, 1991; Street et al., 2000*).

Model kalvarijalnog defekta se često koristi za procenu implantata i faktora rasta (*Schmitz and Hollinger, 1986; Lee et al., 2001*). Upotreba trepanacije osigurava standardizaciju i ponovljivost u poređenju sa drugim modelima, kao što je segmentalni defekt. Defekt kritične veličine se definiše kao defekt koji ne zarasta za vreme života životinje (*Schmitz and Hollinger, 1986; Einhorn, 1999*). Kalvarijalni defekt kritične veličine je ostvariv kod miševa (*Lee et al., 2001; Aalami et al., 2004*), pacova (*Bosch et al., 1998; Tamura et al., 2001*) i ovaca (*Schmitz and Hollinger, 1986*). Međutim, položaj i okruženje lobanje nameće veliki broj ograničenja. Lokalna prokrvljenost u lobanji je prirodno oskudna, a lobanja je građena uglavnom od trabekularne kosti, gde je mehaničko opterećenje minimalno (*Kleinschmidt and Hollinger, 1992*). Zbog toga, ovaj model nije primenljiv kada treba proceniti uticaj angiogeneze i mehaničkog opterećenja – dva važna faktora zarastanja kostiju. Kod miševa, ovaj model nije pogodan zbog male veličine životinje i osetljivosti spoljašnje moždane opne (*dura mater*) (*Aalami et al., 2004*).

Otvoreni defekti se mogu praviti uklanjanjem dela kosti, kao što su tibia ili femur (*Stubbs et al., 2004*). Kortikalni sloj i endosteum se uklanjaju pri čemu kostna srž ostaje nesečena. Rezultat je udubljenje koje može da primi materijale sa osteogenim potencijalom.

Segmentalni modeli defekta, kao što su frakturni modeli sa prekidom kontinuiteta kosti, obično zahtevaju upotrebu fiksatora ili stabilizatora da bi se obezbedila imobilizacija i stabilnost, naročito kad su smešteni na mestima koja nose težinu tela.

Unutrašnji i spoljašnji fiksatori, npr. Kirschnerove žice mogu da izazovu dodatne vaskularne povrede, povrede mekog tkiva (*Cheung et al., 2003*) ili da onemoguće normalno kretanje životinje (*Brand, 1983*), na taj način komplikujući proces zarastanja. Modeli defekta bez upotrebe fiksatora omogućavaju da se izbegnu ovakve komplikacije.

Mnoge teorije i hipoteze su pokušale da objasne faktore koji dovode do zarastanja kostiju, kao što su angiogeneza (*Hausman et al., 2001; Street et al., 2002*), mehaničko opterećenje (*Hankemeier et al., 2001*), starost, trauma mekog tkiva, kao i faktore lokalne sredine kao što su korteks, kostna srž, i periosteum (*O'Driscoll and Fitzsimmons, 2001*). Uticaj imunskog sistema (urođenog ili stečenog) predstavlja još jedan faktor koji utiče na zarastanje kostiju. Novija istraživanja su pokazala da imunski odgovor i reparacija kosti nisu dva odvojena odgovora, već su u međusobnoj interakciji (*Kong and Penninger, 2000; Alliston and Derynck, 2002; Takayanagi et al., 2002*).

Razvoj i proučavanje alokalemske terapije za primenu na ljudima zahteva korišćenje modela imunodeficientnih životinja. Odbacivanje transpliranog tkiva se dovodi u vezu sa imunskim mehanizmima domaćina, kao što je celularni imunski odgovor T-limfocita (*Kirkeby et al., 1992; Horowitz and Friedlaender, 1987; Fox and Harrison, 2000*). Odbacivanje tkiva nameće dodatne promenljive i neželjeno ometanje u proceni bioloških efekata terapije. Imunodeficientne životinje eliminisu ovaj problem s obzirom da im nedostaje reakcija imunskog sistema.

Imunodeficientne životinje se često koriste u istraživanjima biologije kosti kako bi se ispitali vijabilnost kalemskih supstituenata, kao što je demineralizovana kost (*Aspenberg and Andolf, 1989*), faktori rasta (*Li et al., 2003*) i genska terapija (*Varady et al., 2001*).

Odabir modela životinje je presudan aspekt pri izvođenju *in vivo* eksperimenta. Razumevanje prednosti i mana pri korišćenju određenog životinjskog modela je integralni deo svakog planiranja eksperimenta. Uobičajena greška pri selekciji modela je pokušaj proučavanja određene ljudske fiziološke aktivnosti koja ne postoji kod date životinje. Obrazovanje kosti i regeneracija su slični kod pacova, ovaca i ljudi (*Baron et al., 1984; Kleinschmidt and Hollinger, 1992*).

Einhorn je naveo nekoliko važnih kriterijuma pri odabiru eksperimentalnog modela. Prvo, model mora biti biološki i fiziološki blizak čoveku (*Einhorn, 1999*). Iako su *in vitro* modeli manje kompleksni i osiguravaju kontrolisanu sredinu, sinergističke i

antagonističke interakcije između ćelija u živom biološkom sistemu tj. *in vivo* ne postoje u prostim *in vitro* modelima (*Postlethwaite and Kang, 1988*). Drugo, eksperimentalni model mora pokazivati sposobnost zarastanja samo nakon sprovodenja strategije studije. U ortopedskim istraživanjima, npr. kostni defekt sme da zaraste samo ako je podvrgnut terapeutskoj intervenciji.

Imajući u vidu sve osobine pomenutih modela defekta kosti, u ovoj disertaciji se koristi model kostnog defekta femura pacova za proučavanje efekta implantirane alogene demineralizovane kosti na proces zarastanja kosti.

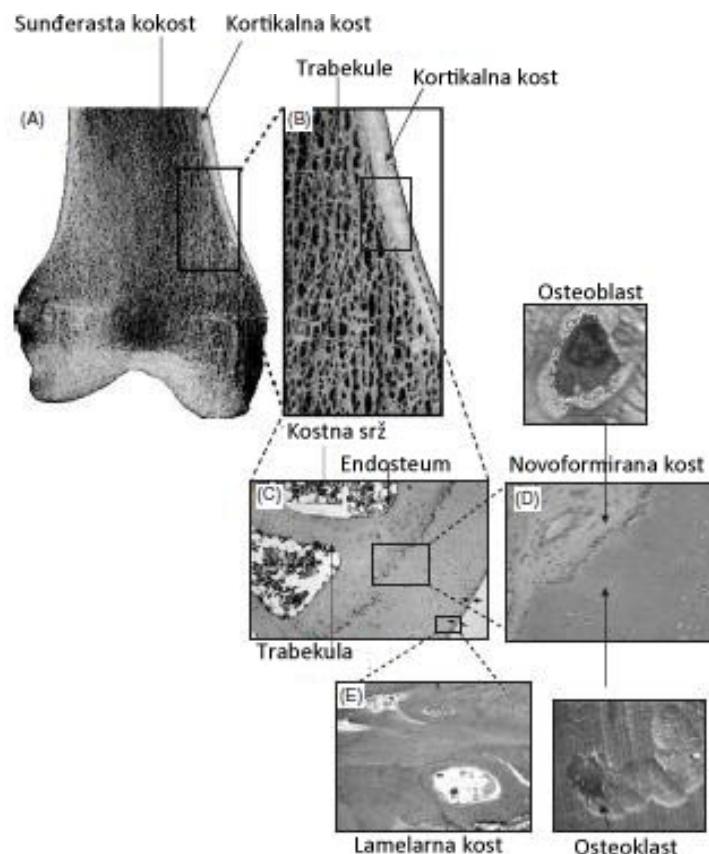
1.2. PREGLED LITERATURNIH PODATAKA

1.2.1. OPŠTI OPIS KOSTI

Kost predstavlja glavni potporni sistem u ljudskom telu. To je jedinstvena kombinacija minerala i tkiva koje obezbeđuje odličnu žilavost i snagu opterećenja. Neorganska mineralna komponenta je ta koja je odgovorna za čvrstinu. Ćelije i tkivo čine organsku komponentu, odgovornu za održavanje, čvrstinu i elastičnost. Ćelija karakteristična za kost je osteocit i ona obitava unutar malih komora (lakuna) okruženih mineralizovanim koštanim matriksom. Okolni koštani matriks se depnuje od strane osteoblasta kao nekalcifikovani matriks (tj. osteoid) koji se kalcificuje deponovanjem soli kalcijuma. Osteoblasta ima na mestima formiranja nove kosti oni ograničavaju ova mesta takozvanom osteoblastnom zonom. Osteoblasti koji su inkorporirani u lakunama postaju osteociti, a oni drugi prelaze u stanje mirovanja kao flat-bone-lining ćelije. Aktivni osteoblasti vode poreklo od ovih graničnih ćelija ili su potomci osteoprogenitorskih ćelija koje se nalaze u stromi kostne srži i u dobro vaskulizovanim membranama koje se nalaze na unutrašnjoj ili spoljašnjoj površini kosti (periosteum i endosteum). Pored potporne uloge kost ima važnu funkciju i u regulaciji nivoa kalcijuma i fosfora u krvi. Veruje se da pored toga što osteoklasti razgrađuju kost, osteociti i osteoblasti takođe imaju krucijalnu ulogu u ovom procesu. Konačno, u kosti se nalazi i kostna srž koja je glavno mesto u kome nastaju bele i crvene krvne ćelije.

1.2.1.1. Tipovi kosti

Makroskopski, skelet se sastoji od dugih kosti, kao što je femur, ravnih kosti, kao što je lobanja i kuboidnih kosti kao što su pršljenovi i karpalne kosti. Na strukturnom nivou, razlikuju se dva tipa kosti: sunđeraste (trabekularne) i kompaktne (guste, kortikalne) kosti (slika 1.1 A – C).



Slika 1.1. Makroskopski prikaz građe kosti: (A) pokazuje mehanički jaku kortikalnu kost sa spoljne strane i unutrašnju sunđerastu kost na metafiznom kraju kosti; (B) pokazuje detalj kortikalne kosti i unutrašnju sunđerastu kost sa trabekulama od kojih je građena; (C) pokazuje detalj sunđeraste kosti gde je označena jedna trabekula sa šupljinama kostne srži, koje su ograničene endosteumom sa svake strane. Ovakve šupljine čine ovaj tip kosti poroznijim u poređenju sa gušćom kortikalnom kosti; (D) pokazuje novoformirani (vunenasti) tip kosti koja je tipično mlada i neorganizovana; (E) je primer lamelarne kosti koja je remodeledvana u mehanički jači tip kosti. Iznad (D) je izdvojen primer osteoblasta koji se tipično može naći na mestima aktivnog formiranja kosti. Slično tome, osteoklast se može naći na istim mestima pri daljem remodeledvanju kosti (ispod (D)). Primetan kanal resorbovane kosti je iza osteoklasta.

Sunđerasta kost je najdinamičnija i najaktivnija komponenta, kao kruna drveta. Ona je aktivna u rastu, homeostazi kalcijuma i hematopoezi, a njena potporna uloga dolazi do izražaja uglavnom na mestima sa predominantnom kompresionom opterećenošću, kao što je to u telima pršljenova i u blizini pokretljivih zglobova (zglob kolena, na primer). Kompaktne kosti su statičnije i najače, kao stablo drveta. Glavne lokacije na kojima se može naći su osovina dugih kosti i periferna granica ravnih kosti.

Mikroskopski, dve osnovne forme kosti su: novoformirana i lamelarna kost (slika 1.1 D-E). Novoformirana kost je nezrela i neorganizovana. Uglavnom je ima kod novorođenčadi, kao i na mestima gde se odvija brzo obrazovanje kosti, kao što su ploče rasta i popravke preloma. Nakon formiranja nove kosti, ona se organizuje remodelovanjem i postaje lamelarna kost. Haverzna kost je najsloženija kompaktna, lamelarna kost, koja sadrži vaskularne Haverzove kanale okružene lamelarnom kosti, i ovaj kompleks se naziva osteon.

1.2.1.2. Ekstracelularni kostni matriks

U ovom delu, naglašava se razlika između kalcifikacije i osifikacije (osteogeneze). Kalcifikacija se može odvijati u ekstracelularnom kostnom matriksu, ali isto tako i u zidovima arterija (arterioskleroza). Osifikacija je isključivo mineralizacija/kalcifikacija osteoida. Osteoid je uglavnom građen od vlakana kolagena tipa 1. Opšte je prihvaćeno da se kalcifikacija osteoida inicira obrazovanjem malih pupoljaka u matriksu, tzv. matriks vezikula koje imaju ulogu centralnih mesta početnog nagomilavanja minerala. Alkalna fosfataza (ALP) je važan enzim u ovom procesu, s obzirom da je u stanju da hidrolizuje organske fosfate i supstrate koji sadrže kalcijum kako bi stvorio prezasićene koncentracije i pokrenuo mineralnu depoziciju. Smatra se da se nepravilna ektopična (na vanskeletnim mestima) kalcifikacija dešava usled odsustva normalno prisutnih inhibitornih supstanci. Specifični procesi kao što su nekroza (ćelijsko odumiranje) i zapaljenje su povezani sa smanjenom aktivnošću ovih inhibitora, što često rezultira lokalnom kalcifikacijom.

1.2.1.3. Obrazovanje i popravka kosti

Pri formiranju skeleta, kao i pri održavanju i popravci kosti dva posebna mehanizma se mogu posmatrati odvojeno ili kombinovano. To su intramembransko i endohondralno formiranje kosti.

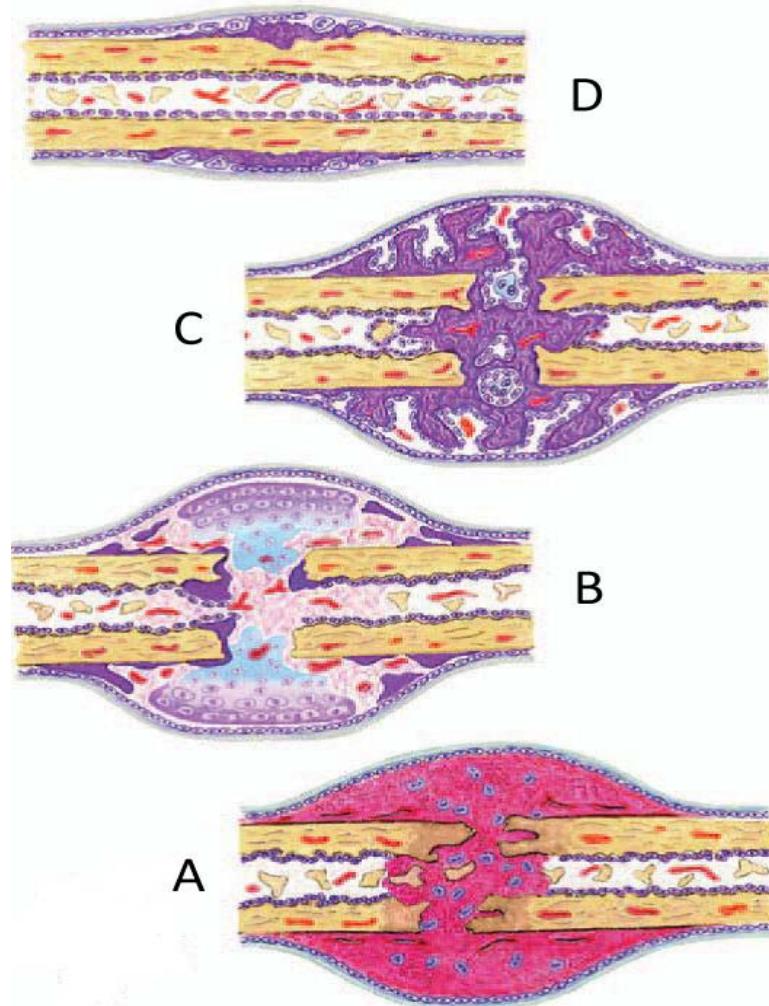
Intramembransko formiranje kosti je mehanizam za obrazovanje ravnih kosti kao što su kranijalne kosti i skapula. Na kraju drugog meseca gestacije ovaj tip formiranja kosti počinje sa grupacijama rastresitog mezenhimskog tkiva koje sadrži osteogene ćelije. Zajedno sa adekvatnom vaskularizacijom, osifikacija počinje i napreduje bez bilo kakvih međustanja. Prva mala koštana masa nepravilnog oblika se naziva spikula.

Nekoliko spikula se izdužuju u trabekule. Kontinuiran rast ovih trabekula vodi ka formiranju trabekularne kosti (poznate i kao sunđerasta kost). Na trabekularnoj površini, zone osteoblasta će nastaviti sa formiranjem osteoida sloj po sloj što se naziva apoziciono obrazovanje kosti. Ovaj proces se nastavlja sve dok se ne postigne dovoljna gustina kosti. Nakon toga, kost se remodelira kako bi se postigao optimalan oblik i gustina delovanjem simultane resorpcije kosti od strane osteoklasta i formiranja kosti od strane osteoblasta. Ovaj proces vodi ka kompaktnoj (gustoј) kosti prisutnoј u korteksu ili ka sunđerastoј kosti u unutrašnjosti. Uprkos činjenici da je intramembransko formiranje kosti visoko efikasan proces, on je nepogodan za brz uzdužni rast apendikularnog skeleta (ruke i noge) za vreme detinjstva.

Endohondralno formiranje kosti je mehanizam za formiranje i izduživanje dugih kosti. Karakteristika ovog mehanizma je da formiranju kosti prethodi obrazovanje hrskavice. U razvoju prvog ekstremitetnog pupoljka, u avaskularnom okruženju mezenhimske ćelije se grupišu i diferenciraju u hondroblaste koji proizvode matriks hrskavice (kontura buduće kosti). Na periferiji je prekriven gustim fibroznim slojem koji je poznat kao perihondrijum. Na početku, izduživanje se postiže uzastopnim deobama hondrocita i produkcijom matriksa, dok se proširivanje ekstremitetnog pupoljka postiže apozicionim rastom iz perihondrijuma. Nakon toga, u svakoj kosti se pojavljuju centri osifikacije, najpre centralno (dijafizno), a nakon toga i na krajevima (epifizno). Pre osifikacije, hondrociti se uvećavaju (hipertrofija) i dalje sazrevaju, što rezultira u povećanoj intracelularnoj koncentraciji kalcijuma. Tanki hrskavični matriks koji okružuje hipertrofirane ćelije služi kao substrat za kalcifikaciju koja se poklapa sa smrću (apoptozom) hondrocita. Ovo dovodi do stvaranja kalcifikovane osnove za dalju koštanu apoziciju. Istovremeno, u perihondrijum prodiru kapilari, a on se diferencira u periosteum koji produkuje pre-osteoblaste. Iz periosteuma kapilari i osteogene ćelije prodiru u kalcifikovanu hrskavicu i počinju da nagomilavaju osteoid, koji predstavlja početak osifikacije. Skoro cela kost se osifikuje osim centralnog kanala i dve transverzalne ravni neposredno ispod epifize. To su ploče rasta (fize) odgovorne za izduživanje kosti sve do adolescencije.

1.2.1.4. Zarastanje frakturna

Proces zarastanja frakturna ima za cilj da brzo stabilizuje prelomljene delove kostiju pri čemu se malo pažnje pridaje anatomiji. Kada se desi frakturna, to za posledicu ima stvaranje oblasti ćelijskog odumiranja (nekroze).



Slika 1.2. Šematski prikaz uzastopnih stadijuma u zarastanju frakturna: (A) formiran je svež hematom, (B) inflamatorne i mezenhimske ćelije nadolaze nakon što su mali krvni sudovi prodrli u oblast, (C) formira se kalus endostealnom i periostealnom reakcijom i (D) kalus je remodelovan.

Pre bilo kakvog obnavljanja, ova oblast se mora očistiti, što predstavlja inflamatornu fazu. Nakon toga, nastupa faza popravke gde kost (čvrsti kalus) zamjenjuje hrskavicu (meki kalus), kao u endohondralnom obrazovanju kosti. Istovremeno, mogu se naći intramembranske koštane formacije u zavisnosti od lokalne snabdevenosti kiseonikom. Samo kad je frakturna stabilna i sa nepromenjenom anatomijom (kao u naprslinama) intramembranska reparacija je dovoljna. Nakon faze reparacije, nastupa

faza remodelovanja. U poređenju sa kosti bez frakture, ova faza će rezultirati najboljom mogućom anatomijom (slika 1.2).

1.2.2. PRESAĐIVANJE KOSTI

Kada zbog obima povrede, infekcije ili iz drugih razloga mehanizam koštane reparacije ne uspe, pokazano je da je presađivanje visoko uspešna terapija. Presađivanje kosti je primena kosti sa nekog drugog mesta u cilju stimulacije formiranja kosti. Poželjno je da je kost poreklom od samog pacijenta (autologa) i uzeta sa mesta koje je lako dostupno, npr. iz pelvisa. Takođe se primenjuje i kost drugih ljudi (alogenika) ili životinja (ksenogena). 1881. Macewen je jedan od prvih koji je opisao proceduru alokalemske rekonstrukcije humerusa (ramene kosti) kod malog deteta (*Macewen, 1881*). Danas, presađivanje se još uvek koristi kao terapija, kao što su komplikovane frakture koje ne mogu da zarastu ili teško atrofirana mesta (kao što je vilica posle vađenja zuba) koja treba nadograditi. Pored toga, često se primenjuje u slučajevima frakturna sa visokim rizikom nesrastanja, kada su uklonjeni veliki regioni kosti (kao što je to u slučaju maligniteta ili infekcija), ili da bi se olakšala fuzija kosti posle krupnih rekonstruktivnih procedura koje se izvode u ortopedskoj i maksilofacijalnoj hirurgiji.

Tačan mehanizam ugradnje koštanog kalema nije potpuno shvaćen, iako je utvrđeno nekoliko mehanizama formiranja kosti. Svakako najvažniji je prevashodno kao nosač-skela (eng. scaffold) koji omogućava nagomilavanje kosti i njenu integraciju u okolnu kost. Osobina materijala da se tako ponaša je osteokonduktivnost. Druga karakteristika koštanog kalema je da ekstracelularni matriks poseduje faktore koji mogu indukovati okolne nekoštane ćelije da se diferenciraju u osteoblaste. Ovo svojstvo se naziva osteoindukcija. Konačno, iako većina osteogenih ćelija neće preživeti transplantaciju, neke mogu doprineti formiranju kosti nakon što je kalem dovoljno vaskularizovan, ovo je očigledno osteogeneza. Kada je potrebna masivna osteogeneza, kao u slučaju velikih defekata, vaskularizovani kalemovi (gde ćelije mogu preživeti) su opcija sa trenutnim mikrohirurškim mogućnostima.

Još jedan važan uslov za uspeh koštanog kalema je da on može biti potpuno resorbovan i remodelovan, tako da ne remeti fiziološku adaptaciju kosti. Kalem autologe sundjeraste kosti se smatra najoptimalnijim, zbog toga što poseduje sve gore pomenute

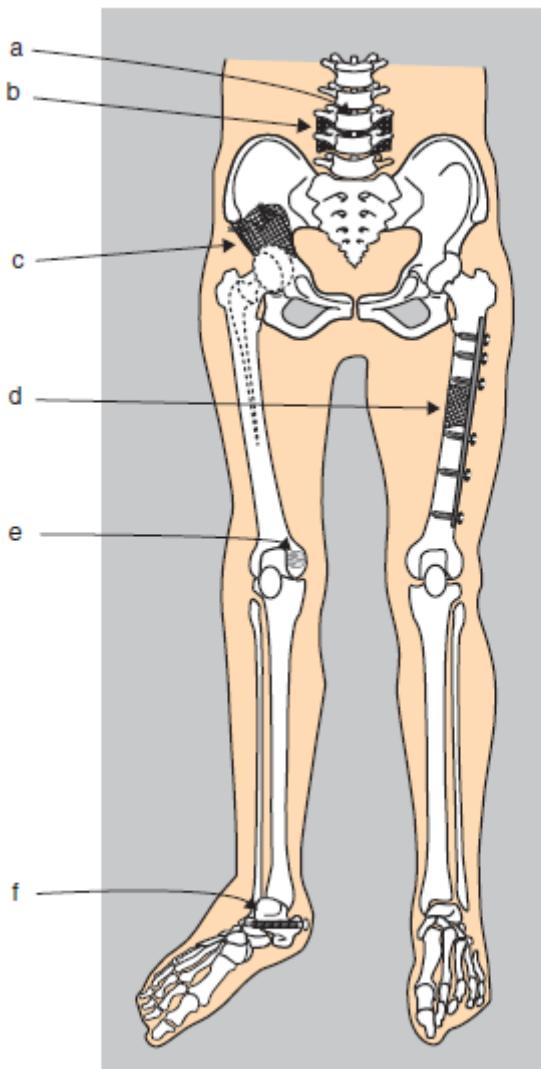
kvalitete. Nedostatak je to što nosi ograničenu mehaničku snagu koja je ponekad neophodna. U tim situacijama, gušća kortikalna kost se primenjuje na uštrb drugih kvaliteta.

Procene broja procedura koštanim kalemovima svake godine su oko 500 000 procedura samo u SAD. Ogromna većina ovih procedura su spinalne fuzije (približno 50%), zatim opšte ortopedске procedure i kraniomaksilosilofacialne procedure (*Boden, 2002*).

1.2.2.1. Ortopedska primena kostnih kalema

Spinalna fuzija se primenjuje za stabilizaciju oštećenih pršljenova, deformiteta ili za tretman blagog bola u leđima kao posledice degeneracije diskova ili međupršljenske nestabilnosti. Ova procedura se vrši preko prednjeg dela pri čemu se pravi fuzija intervertebralnog prostora i/ili preko zadnjeg i bočnog dela pri čemu se pravi koštani most između vertebralnih lukova i transverzalnih nastavaka susednih pršljenova. U većini slučajeva, pored presađivanja radi se i unutrašnja fiksacija kavezima (anteriorni prilaz) ili uz pomoć šipki i zavrtnja (sa bočne strane tela pršljenova).

Augmentacija osteolitičkih deformiteta i defekata kosti takođe zahteva presađivanje kosti. Nakon zamene zglobova protezama česta je osteoliza, a i mehanička otpornost kosti se menja. Ovo rezultira gubitkom (osteolizom) kosti gde je prirodna biomehanika prevladana biomehanikom implanata. Isto tako, koštani kalemovi mogu popraviti defekte koji su posledica cisti, infekcija i resekcije (uklanjanja) tumora. Mali koštani čipovi su idealni ukoliko se mehanička snaga može postići instrumentima (npr. uz korišćenje šipki, ploča i zavrtnja). Kod nesrastajućih fraktura, presađivanje se može primenjivati, naročito kod tzv. atrofičnih nesrastanja (gde je mehanika kosti očuvana a nedostaje biološki kapacitet za zarastanje).



Slika 1.3. Potencijalne kliničke primene kostnih kalemova u ortopediji: (a) prednja (anteriorna) spinalna fuzija, (b) posterolateralna spinalna fuzija, (c) osteolitični defekt (acetabularni defekt oko ugradene proteze), (d) traumatični koštani defekt/pseudoartrozis ili tumorski defekt femurne dijafize, (e) cistične lezije metafize femurne kondile i (f) degenerativna oboljenja zglobova

1.2.2.2. Upotreba kostnih kalema u oralnoj i maksilofacijalnoj hirurgiji

Često je potrebno uraditi augmentaciju zbog toga što trajna resorpcija alveolarnog grebena posle vađenja zuba na kraju rezultira pojavom nepoželjne prazne zone ispod dentalnih proteza. Kao posledica toga, smanjuju se držanje kao i stabilnost i funkcija ugrađene proteze (*Cawood and Howell, 1991*). Kod ekstremno atrofične vilice, postoje različite augmentacione tehnike koje koriste kalemove sunđeraste kosti rebra kao i kortiko-sundearste ilijačne kalemove (*Fazili et al., 1986*). U situacijama zamene pojedinačnih zuba, augmentacija se može realizovati korišćenjem lokalnih koštanih kalemova uzetih iz oblasti simfize brade. U slučaju trauma, čeoni defekti mogu se

popraviti kortikalnim pločama uzetih sa spoljašnje strane kalvarije ili korišćenjem rebarnih kalemova. Orbitalne frakture se obnavljaju uz pomoć fragmenata rebara, ilijačne ili kalvarijalne kosti. Trajni defekti vilice se mogu rekonstruisati upotrebom kostiju rebarnog ili ilijačnog dela uz stabilizaciju pločama. *Boyne (1992)* je uveo i jedan alternativni pristup: titanijumska osnova, napravljena prema originalnoj vilici i napunjena autologom koštanom pastom se šrafovoma povezuje za originalnu koštanu površinu.

1.2.3. ALTERNATIVE ZA AUTOLOGE KOSTNE KALEME

Decenijama, autologi koštani kalemovi su predstavljali zlatni standard kod ogromne većine primene koštanih kalemova. Ipak, potreba za alternativnim kalemovima je nastala iz sledećih razloga:

- 1.** Uzimanje autokalemova produžava operaciju: naročito kod relativno malih operacija, uzimanje kalema iz ilijačnog grebena ili resekcija rebara značajno produžavaju proceduru;
- 2.** Dostupnost je ograničena: ovo je značajan nedostatak kod onih operacija koje zahtevaju velike količine materijala, kao što je posteriorna spinalna fuzija ili situacije kod kojih je neophodno izvršiti dodatne operacije;
- 3.** Hirurške komplikacije: tu spada i hronični bol na donorskem mestu kod preko 10% pacijenata i infekcije rana (*Banwart et al., 1995; Silber et al., 2003*).

Ovi nedostaci kao i procenjena ekomska tržišna vrednost substituenata koštanih kalemova od oko 2 milijarde dolara godišnje (samo u SAD) drastično je podstakla istraživanja u ovoj oblasti (*Boden, 2002*). Još jedan (budući) razlog za uvođenje alternativnih rešenja je i to što u pojedinim slučajevima autologi kalemovi ne uspeju i zahtevaju poboljšanje. Trenutno postoje neke dobro utvrđene alternative koje će ukratko biti opisane. Ipak, treba imati u vidu da nijedna od njih nije tako dobra kao autologi koštani kalemovi. Zbog toga je njihova primena ograničena na ulogu dopune autologih kalemova (*Gupta and Maitra, 2002*) ili na manje zahtevne lokacije. Neke od osobina kalemova date su u tabeli 1.1.

Koštani kalem	Imunogenost	Mehanička svojstva	Osteokonduktivnost	Osteoinduktivnost	Osteogeneza
Autokalem					
<i>Sunderast</i>	0	0	3	3	3
<i>Kortikalan</i>	0	3	2	2	2
Alokalem					
<i>Sunderast zamrznut</i>	2	0	2	1	0
<i>Zamrznut-sušen</i>	1	0	2	1	0
<i>Kortikalan zamrznut</i>	2	3	1	0	0
<i>Zamrznut-sušen</i>	1	1	1	0	0
DBM	1	0	1	2	0

0 = bez efekata; 1 = minimalni efekti; 2 = veliki efekat; 3 = veoma veliki efekat.

Tabela 1.1. Relativne vrednosti različitih kalemova (zasnovano na podacima Goldberga i Stevensonaga (1990) i Giannoudis et al. (2005))

1.2.3.1. Alokalemi

Alokalemovi su poreklom od drugih osoba (donora). Glavni problemi su prenos bolesti kao i imunogenosti zajedno sa kalemom. Zbog toga se alokalemovi podvrgavaju nekolicini tretmana. Kalemovi se devitalizuju zamrzavanjem (-80°C), a često i dodatno tretiraju sterilizacijom etilen oksidom i/ili visokim dozama gama zračenja. Ipak, ova sterilizaciona procedura može značajno da umanji osteoinduktivnost kalema (Friedlaender, 1987). Pre ovih koraka, primenjuju se mehaničko čišćenje i ultrasonični tretman kako bi se uklonila većina mekog tkiva, uključujući i ćelije. Najuobičajenije metode prezervacije su zamrzavanje i zamrzavanje-sušenje (lifilizacija). Ovaj drugi metod značajno menja osobine materijala. Još jedan tretman je demineralizacija alokalema što rezultuje demineralizovanim koštanim matriksom (DBM). Poštovanjem specifičnog protokola, osteoinduktivni proteini su sačuvani u materijalu tako da se mogu primeniti kao deo nedostajuće kosti. Pri korišćenju alokalema prolazi se kroz slične stadijume inkorporacije u domaćina kao kod autologih koštanih kalema s tim što je čitav proces značajno produžen. Ovo se može objasniti činjenicom da alokalemi ne sadrže žive

ćelije koje bi bile osteogene i osteoinduktivne. Isto tako, dokazano je, da što je genetska razlika između donora i recipijenta veća, duži je i/ili nekompletnej proces reparacije.

Ovo ukazuje na to da uprkos procesu preparacije određeni stepen imunogenosti ostaje (*Bos et al., 1983*). Bez obzira na ove mane, korišćenje koštanih alokalemova je značajno uvećano naročito u SAD (*Friedlaender, 1983; Mankin et al., 1983; Prolo i Rodrigo, 1985*).

1.2.3.2. Ksenokalemi

Goveđi DBM je takođe korišćen kao zamena za koštani kalem. Njegov osteoinduktivni potencijal pripisuje se preostalom ECM koji sadrži koštane morfogenetske proteine (*Pietrzak et al., 2005*). Klinički ishodi su promenljivi, od osrednjih do dobrih kliničkih rezultata kod nekih oralno/maksilofacijalnih primena (*Maiorana et al., 2006; Nevins et al., 2003*). Sa druge strane, njegova upotreba kod operacija zamene kuka pokazala je loše rezultate uz odbacivanje kalema (pseudo-infekcija) (*Charalambides et al., 2005*). Imunološki odgovor *in vivo* može se pripisati poreklu donora i nekim koracima u proceduri, kao što je fotooksidacija (*Hetherington et al., 2005*).

1.2.3.3. Kolagen

Kolagen je značajna komponenta ECM-a kosti. Igra važnu ulogu u vaskularnom rastu, mineralnom nagomilavanju kao i vezivanju faktora rasta (*Cornell, 1999*). Klinička primena kolagena kao koštanog substituenta je pokazala razočaravajuće rezultate zbog minimalne strukturne potpore i moguće imunogenosti (*Fleming et al., 2000*). Kao kompozitni materijal sa drugim koštanim substituentima, može imati ulogu efikasnog ekstendora osobina autokalema (*Muschler et al., 1996*) ili biti jedinstven oslonac implanta (*Boden et al., 2000*).

1.2.3.4. Porozna keramika

Keramika je sintetički materijal često pravljen od kalcijuma i fosfata koji je veoma mnogo korišćen u stomatologiji i ortopediji u protekle 3 decenije (*Hollinger et al., 1996; Bohner, 2000*). Koralni hidroksiapatit (HA) je hidrotermalni prelazni oblik prirodnog

poroznog karbonatnog matriksa morskih korala. Poznata je njegova uspešna klinička primena (*Elsinger i Leal, 1996*), iako je njegova strukturna otpornost ograničena. Neke keramike su pokazale i osteoinduktivna svojstva (*Habibovic et al., 2006*). Trikalcijum fosfat (TCP) je keramika koja se brzo resorbuje *in vivo*; HA, sa druge strane, se teško resorbuje. Oba materijala su biokompatibilna ali usled slabe resorpcije HA, zaštita od stresa tokom vremena predstavlja problem. Zbog toga se prave kombinovani implanti kao što je bifazni kalcijum fosfat (BCP); kombinacija HA i TCP (*Daculsi et al., 1989*). Dobra poroznost materijala osigurava dobru površinu za vaskularni razvoj i osteokondukciju.

Iz svega navedenog jasno je da dobra alternativa koja ima sve prednosti autologe kosti, bez njenih nedostataka, ne postoji. Tek je nedavno naučni svet shvatio da rešenje ovih problema zahteva saradnju prirodnjaka i inženjera. Ova interdisciplinarna naučna oblast, koja stremi ka otkriću bioloških substituenata koji obnavljaju tkiva, poznata je kao tkivni inženjerering (*Caplan i Goldberg, 1999; Langer i Vakanti, 1993*).

1.2.4. KONCEPT I STRATEGIJE U INŽENJERSTVU KOSTNOG TKIVA

Inženjering kostnog tkiva podrazumeva bilo koji pokušaj stimulisanja obrazovanja kosti implantatima koji su napravljeni poštujući principe prirodnih nauka i inženjerstva. U idealnom slučaju, tkivni inženjerering može zameniti autologi kostni kalem, uz uslov da proizvod bude u najmanju ruku dobar koliko i autologi kostni kalem. Takođe, proizvodi tkivnog inženjerstva koji ne mogu u potunosti zameniti autologu kost mogu joj se dodati kako bi poboljšali njen kvalitet i umanjili količinu potrebne autologe kosti. Uopšte, implanti tkivnog inženjeringa su sagrađeni od nosača i biološki aktivnih faktora. Ovi faktori mogu biti ćelije i proteini koji stimulišu ćelije domaćina (ili kombinacija navedenog). Ovi materijali su dizajnirani da poseduju jedan ili više pomenutih kvaliteta: osteokonduktivnost, osteoinduktivnost i osteogenezu. Zbog toga, svi sastojci u inženjeringu koštanog tkiva se u osnovi dele na 3 grupe: nosači, faktori rasta i ćelije. Ova podela, naravno, nije tako prosta kao što izgleda.

1.2.4.1. Nosači za osteogene ćelije

Dobro dizajniran nosač u inženjerstvu koštanog tkiva ima višestruku ulogu. Jedna od njih je da obezbedi sredinu za prenos osteoinduktivnih molekula i/ili osteogenih ćelija. Dalje, ova komponenta tkivnog inženjerstva mora da popuni prazninu u koštanom defektu i olakša zarastanje. Da bi to radio efikasno, dobar noseći materijal mora imati nekoliko kvaliteta kao što su biokompatibilnost, osteokonduktivnost, poroznost, biodegradabilnost, mehanički kvaliteti i intrinzična osteoinduktivnost (*Habibovic et al., 2006*). Dodatno, mora se imati u vidu i skladištenje, rukovanje i sterilizacija materijala pre upotrebe. Dve klase materijala koje se široko proučavaju su keramike i polimeri.

1.2.4.1.1. Biokompatibilnost

Verovatno najvažnija osobina nosača je biokompatibilnost. Pošto se ugradi, nosač ne sme izazivati zapaljenske i toksične reakcije koje bi dovele do ćelijske smrti i daljeg širenja povrede. Sve komponente i proizvodi materijala takođe moraju biti biokompatibilni, uključujući i nereaktivne monomere, inicijatore, stabilizatore, povezujuće agense, emulgatore, rastvarače i otpuštene razložene proizvode (*Temenoff et al., 2000*).

Kalcijum fosfatne (CaP) keramike, kao što su HA i TCP, su vrlo slične neorganskoj komponenti prirodnog koštanog tkiva. Zbog toga i nije iznenadujuće što CaP keramike pokazuju izvrsnu biokompatibilnost. Čak šta više, vrlo je moguće i direktno vezivanje sa koštanim tkivom (*Ruhe et al., 2006*). Dok je biokompatibilnost veća briga kod sintetičkih polimera u poređenju sa CaP keramikama, razgrađujući polimeri kao što su poli(L-mlečna kiselina) (PLLA), poli(glikolna kiselina) (PGA), poli(DL-mlečna-co-glikolna kiselina) (PLGA) i poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) se već široko koriste za neke biološke primene. Dodatno, razni drugi polimeri kao što je poliortoestar (POE), polianhidridi i polipropilenfumarat (PPF) se proučavaju u tkivnom inženjeringu, i pokazuju poželjnu biokompatibilnost kod životinjskih modela (*Hutmacher, 2000; Mistry and Mikos, 2005*).

1.2.4.1.2. Osteokonduktivnost

Osteokonduktivnost je ključna za uspešnu zamenu kosti. Nosač mora da obezbedi substrat na kome se koštane ćelije mogu vezivati, deliti, migrirati i deponovati kost. CaP keramike obezbeđuju odličnu osteokonduktivnost, nejverovatnije jer su hemijski slične neorganskoj komponenti kosti. Važna karakteristika keramika, koja značajno poboljšava osteokonduktivnost, je velika površinska oblast usled uvećane mikroporoznosti (*Wilson et al., 2006*).

Pokazano je da neki biorazgradivi polimeri takođe poseduju osteokonduktivnost, iako u manjem stepenu nego keramika, na primer PPF/PLGA noseći implant u radiusu zeca (*Hedberg et al., 2005a*). Osteokonduktivnost mnogih polimera može se poboljšati vezivanjem određenih peptida poreklom od ECM proteina. Jedan takav peptid, Arg-Gly-Asp (RGD) dobija se iz ECM proteina fibronektina i laminina, i široko se ispituje njegov efekat na biomolekulsko prepoznavanje, ćelijsko vezivanje i ćelijske funkcije (*Shin et al., 2003*). Biomaterijali modifikovani specifičnim peptidima kao što je RGD pospešuju rast i migraciju osteoprogenitornih ćelija, kao i osteoblasta (*Shin et al., 2003*). Drugi pristup osteokonduktivnim nosačima je ugradnja kolagenih vlakana koja oponašaju nanostrukturu ECM-a prirodnog koštanog tkiva (*Hartgerink et al., 2001*). Ovi materijali se pripremaju sintezom kolagenih peptidnih lanaca, koji se potom polimerizuju, a zatim sami sklapaju u nanovlakna prečnika svega nekoliko nanometara i dužine više mikrometara (*Hartgerink et al., 2001*)

1.2.4.1.3. Poroznost

Još jedna ključna neophodnost za olakšan koštani rast unutar materijala je povezana porozna arhitektura. Potreban je prazan (slobodan) prostor kako bi se omogućio rast krvnih sudova i okolne kosti u nosač, a i da bi se osiguralo nagomilavanje kosti od strane ugrađenih i/ili migrirajućih ćelija. Dodatno, poroznost povećava dostupnu površinsku oblast za vezivanje ćelija, rast i funkciju u defektu (*Temenoff et al., 2000*). U zavisnosti od osobina materijala i željene arhitekture pora mogu se koristiti različite metode da bi se napravio porozni nosač. Jedan takav primer je metod iscrpljivanja soli (eng. salt leaching) kao što je to prikazano za PPF polimer (*Hedberg et al., 2005b*). Druge metode za pravljenje poroznog nosača uključuju hidrokarbonatno umrežavanje, gasno parenje i faznu separaciju (*Hacker et al., 2003*). U novije vreme, na

ovu listu su dodati i elektrospining (*Yoshimoto et al., 2003*) i stereolitografija (3D printing). Ovaj drugi metod omogućava specifičniji vid kontrole geometrije nosača, i arhitekture pora kao i optimizaciju mehaničkih svojstava (*Cook et al., 1995; Lin et al., 2004; Wilson et al., 2004*).

1.2.4.1.4. Biorazgradivost

Trajni implant materijali koji se trenutno koriste, kao što su metali, se često povezuju sa pojavama kao što su infekcije, korozija, zamor i otkaz, i svaka od njih zahteva zamenu implanta (*Temenoff et al., 2000*). Dodatno, nerazgradivi materijali su ometajući stimulus za rast okolne kosti i njenu homeostazu. Sa druge strane, biorazgradivi materijali, koji se koriste kao nosači u kostnom inženjeringu privremeno popunjavaju defekt i postepeno se razgrađuju kako se kost regeneriše. Dok se materijal razgrađuje, stvara se prostor za tkivo u razvoju, a opterećenje se postepeno prenosi sa nosača na kost. Na kraju, defekt je zamenjen prirodnim kostnim tkivom, i biomaterijal se bezbedno razlaže i uklanja iz tela (*Timmer et al., 2003a*).

Keramike i polimeri se različito razgrađuju, što zavisi od sastava. Kao što je pomenuto, HA se teško resorbuje pa se zbog toga smatra praktično nerazgradivim, dok se TCP razlaže prilično brzo (*Yuan et al., 2007*). Poli (metilmetakrilat) (PMMA) polimer se smatra nerazgradivim, dok se polimeri PLGA, PCL i PPF razgrađuju hidrolizom estra. Stepen degradacije PPF-baziranih sistema, na primer, može da varira u zavisnosti od sastava i uslova sinteze, omogućavajući usmeravanje dizajna nosača za specifične primene (*Peter et al., 1998*). Dalje, mnogi materijali se mogu modifikovati određenim peptidnim sekvencama što omogućava degradaciju proteaznim enzimima (*Shin et al., 2003*).

Degradacioni produkti ovih biomaterijala takođe moraju da pokazuju biokompatibilnost. Na primer, PPF-bazirane mreže polimera se razlažu na fumarnu kiselinu i propilen glikol, kao i na malu količinu akrilne kiseline i poli (akrilna kiselina-co-fumarna kiselina). *Timmer et al. (2003b)* su pokazali da ove pojedinačne degradacione komponente izazivaju *in vitro* citotoksičnost samo pri većim koncentracijama. Zbog toga, očekivano sporo oslobođanje ovih produkata iz sporo degradirajućeg polimera ne bi trebalo da značajno utiče na biokompatibilnost.

1.2.4.1.5. Mehanička svojstva

Interakcija čvrstih HA kristala i elastičnih kolagenih vlakana u nanostrukturi kosti daju joj jedinstvena mehanička svojstva, zbog čega je kost teško zameniti sintetičkim materijalima (*Taton, 2001*). Metali, kao što su titanijum i nerđajući čelik, se često koriste u ortopediji zbog veće snage u poređenju sa kosti. Ipak, koštano tkivo se oslanja na mehaničku stimulaciju pri regeneraciji i remodelovanju. Trajni metalni implanti apsorbuju veći deo ovih stimulišućih sila. Ova pojava je poznata kao pozadinski stresni efekat (eng. stress shielding) i rezultira u resorpciji kosti oko implanta (*Bobyn et al., 1992*). U idealnom slučaju, nosač tkivnog inženjeringu mora biti dizajniran tako da odgovara mehaničkim svojstvima specifične kosti koju zamenjuje. Novija strategija za poboljšanje mehaničkih svojstava biorazgradivih polimera je inkorporacija nanofilera u masu polimera. Na primer, inkorporacija veoma niske koncentracije površinski-modifikovanih alumoksanskih nanočestica ili funkcionalnih karbonskih nanotubula u biorazgradive PPF-bazirane sisteme rezultira značajnim poboljšanjem zateznih i sabijajućih mehaničkih svojstava (*Horch et al., 2004; Shi et al., 2006*).

1.2.4.1.6. Osteoinduktivnost

Osteoindukcija je fenomen koji je dobro poznat po faktorima rasta. Ipak, bez administracije faktora rasta, intrinzična osteoinduktivnost je kvalitet specifičan za demineralizovanu kost u svojstvu nosača. Nedavno je pokazano da ovo svojstvo značajno pospešuje zarastanje kosti (*Habibovic et al., 2006*). 1969. Winter je opisao ektopičnu osteoindukciju sunđerom napravljenim od poroznog polimera, polihidroksimetilakrilata (pHEMA), što je pokazalo da ne samo faktori unutar kosti, već i same fizičke strukture mogu imati induktivne osobine. Nekoliko decenija kasnije, drugi (*Ripamonti, 1991; Zhang, 1991*) su otkrili da porozni CaP takođe može podstaknuti obrazovanje kosti kad se ugradi ekstraskeletno. Kasnije je demonstrirano da koštana indukcija biomaterijalima zahteva specifičnu 3D poroznu strukturu ugrađenog biomaterijala ali i *in vivo* remineralizaciju porozne strukture (*Habibovic et al., 2005*). Mehanizam ovog fenomena još uvek nije rasvetljen, iako postoje neki nagoveštaji da CaP rastvaranje i kasnije taloženje, verovatno zajedno sa inkorporacijom stimulišućih faktora imaju određenu ulogu (*Yuan, 2001*).

1.2.4.2. Faktori rasta u kostnom tkivu

Faktori rasta su signalni molekuli koji mogu da utiču na određene ćelijske funkcije preko vezivanja za specifične receptore na ćelijskoj membrani. Najbolja ilustracija ove funkcije je osteoindukcija, pojava koju je pre više od 40 godina opisao Friedenstein (1962) i intenzivno proučavao Urist (1965), koji je otkrio prisustvo BMP-a unutar ekstracelularnog koštanog matriksa. Tačna priroda ovih BMP-a ostala je enigma do pre oko 15 godina, kada je dokazano da ne samo svaki protein za sebe (naročito BMP-2 i BMP-7) već i čitava klasa BMP-a može indukovati kost (*Wozney et al., 1988; Wozney, 1992*).

Osim osteoinduktivnih faktora, i drugi faktori su povezivani sa stimulacijom formiranja kosti i zarastanja frakture, kao što su transformišući faktor rasta (TGF)- β , vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF), faktor rasta sličan insulinu (IGF), fibroblastni faktor rasta (FGF) i faktor rasta poreklom od krvnih pločica (PDGF).

1.2.4.2.1. Osteoinduktivni faktori rasta

Kod korišćenja faktora rasta u tkivnom inženjeringu kosti najčešće se govori o osteoinduktivnim faktorima. Strukturno, BMP izgledaju kao dimerni proteini koji imaju višestruke signalne epitope. Nekoliko membranskih serin/treonin kinaznih receptora je identifikovano za ove ligande. Efekat BMP-a zavisi od mnogih faktora kao što su tip i kombinacija faktora, koncentracija, vreme izloženosti, sposobnost odgovora ćelija i tip nosača. Iako je do sada identifikovano preko 20 različitih BMP-a, u tkivnom inženjeringu se uglavnom koriste BMP-2 i BMP-7 (OP-1) (*Borden et al., 2004; Jansen et al., 2005; Kroese-Deutman et al., 2005; Riley et al., 1996; Ripamonti et al., 2001; Ruhe et al., 2004; Vehof et al., 2002; Wan and Cao, 2005*). Koncentracija je ključni faktor i ona je *species* specifična. Na primer, kod ljudi, na žalost, potrebne su mnogo veće koncentracije nego kod zečeva i pasa (*Boden et al., 1999*). Ćelije koje su verovatno najošetljivije na indukciju su bliske osteogenoj liniji, kao što su mezenhimske progenitorske ćelije, iako je ustanovljena i osteoindukcija limfocita (*Friendenstein et al., 1970*). Materijal nosača je krucijalan za optimalni profil otpuštanja, ali su važne i površinske karakteristike. Na primer, titanijumski nosači optočeni CaP-om su pokazali bolje rezultate sa BMP od sličnih golih nosača (*Vehof et al., 2002*).

1960-tih godina Marshal R. Urist (*Urist, 1965*) je istraživao dekalcifikovanu kost koja je ugrađivana na različitim lokacijama, i hetero i homotopičnim, kod nekoliko tipova životinja i kod ljudi. Ove aćelijske, dekalcifikovane kosti (tj. samo organski deo koštanog tkiva) su proizvele novu kost u količini proporcionalnoj veličini implanta, sa pozitivnim rezultatima eksperimenta od preko 90%. Procena uz korišćenje svetlosnog mikroskopa je pokazala da su ovi implanti u početku (3 nedelje posle ugradnje) bili inkapsulirani u dobro vaskularizovanom, inflamatornom i vlaknastom vezivnom tkivu.

BMP	Funkcija
<i>BMP-2</i>	Osteoinduktivan, diferencijacija osteoblasta, apoptoza
<i>BMP-3 (osteogenin)</i>	Najzastupljeniji BMP u kosti, inhibira osteogenezu
<i>BMP-4</i>	Osteoinduktivan, razviće pluća i oka
<i>BMP-5</i>	Hondogeneza
<i>BMP-6</i>	Diferencijacija osteoblasta, hondogeneza
<i>BMP-7 (OP-1)</i>	Osteoinduktivan, razviće bubrega i oka
<i>BMP-8 (OP-1)</i>	Osteoinduktivan
<i>BMP-9</i>	Nervni sistem, retikuloendotelijalni sistem jetre, hepatogeneza
<i>BMP-10</i>	Razvoj srca
<i>BMP-11 (GDF-8, miostatin)</i>	Oblikovanje mezodermalnih i neuralnih tkiva
<i>BMP-12 (GDF-7)</i>	Indukuje obrazovanje tkiva nalik tetiva
<i>BMP-13 (GDF-6)</i>	Indukuje obrazovanje tkiva tetiva i ligamenata
<i>BMP-14 (GDF-5)</i>	Hondogeneza, pospešuje zarastanje tetiva i obrazovanje kosti
<i>BMP-15</i>	Modifikuje aktivnost folikulo-stimulišućih hormona

GDF = faktor rasta/diferencijacije. BMP-1 nije član TGF-β porodice; on ima proteaznu aktivnost pa se zbog toga veoma razlikuje od ostalih BMP-ova

Tabela 1.2. BMP koji su članovi velike TGF-β porodice (naznačena je njihova pojedinačna funkcija *in vivo*).

Dalje, nadolazeće ćelije domaćina su započele proces resorpcije kolagenog matriksa, da bi nakon 4-6 nedelja depoziti kosti postali vidljivi. Ovi rani depoziti su uvek nalaženi na unutrašnjosti dobro vaskularizovanih izdubljenih komora. Takođe, primećene su i formacije hrskavice na zatvorenim krajevima, starih, vaskularnih kanala, i one su postepeno (između osme i šesnaeste nedelje) zamjenjivane kostnim tkivom kroz proces endohondralne osifikacije. Urist je ovaj proces nazvao „osteogenezom autoindukcijom“. U kasnijim eksperimentima (*Urist et al., 1976*), Urist uvodi termin BMP proteinski sastojak koji je dobijen hromatografskom separacijom kolagenskog želatina iz digestije

koštanog matriksa. Ovaj sasojak je dodat u difuzione komora, koje su ugrađene u mišićne džepove kod odraslih pacova, i pokazano je da one indukuju osteogenezu u neposrednom okruženju dufuzione komore.

Prečišćavanje i opisivanje BMP-a je urađeno kasnih 1980-tih, kada je ustanovljena njegova amino kiselinska sekvenca i DNK klonovi (*Luyten et al., 1989; Wozney et al., 1988; Wozney, 1992*). Trenutno, identifikovano je mnogo različitih tipova BMP-a, koji se razlikuju u funkcijama (Tabela 1.2) (*Rengachary, 2002*). Iako je količina svežeg BMP-a koja se dobija iz kosti izuzetno mala (10 kg samlevene goveđe kosti daje oko 10 µg BMP-a), tehnologija rekombinantne DNK omogućava dobijanje velikih količina tzv. rekombinantnog BMP-a (rhBMP) za komercijalnu eksploataciju i kliničku upotrebu. Nekoliko kliničkih izveštaja o tretmanu nesrastanja tibije, femura i kičme su takođe pokazali dobre rezultate korišćenja rhBMP-a. Modeli spinalne fuzije, kao što su anteriorni i posterolateralni prilaz (sa i bez fiksatora), su demonstrirali dodatne pozitivne rezultate pri upotrebi rhBMP-2 i OP-1 (rhBMP-7) kao alternative koštanog autokalema.

1.2.4.2.2. Osteostimulišući faktori rasta

Kod sisara, identifikovane su tri izoforme TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3. Od svih njih, TGF- β 1 se najčešće koristi za stimulisanje formiranja kosti u tkivnom inženjeringu kostiju. Za razliku od BMP-a, koji mogu indukovati osteogenezu, oni nisu osteoinduktivni (*Borden et al., 2004; Sampath et al., 1987*). Ipak, TGF- β 1 je često proučavan i pokazano je da on stimuliše obrazovanje kosti na titanijumskim i razgradivim poliestarskim ortopedskim nosačima (*Jansen et al., 2005; Ripamonti et al., 2001; Sampath et al., 1987*). FGF postoji u obliku kisele (FGF-1) i bazne (FGF-2) izoforme. Obe stimulišu deobu endotelnih ćelija, fibroblasta, hondroblasta i osteoblasta, prisitne su u kosti i deluju na nju. *In vivo* studije na životinjama su pokazale snažniji efekat FGF-2 (*Chiou et al., 2006; Fujita et al., 2005*) u poređenju sa FGF-1 (*Nakajima et al., 2001*). PDGF stimuliše replikaciju u kulturama ćelija osteoblasta *in vitro* i povećava sintezu kolagena tipa I. PDGF takođe stimuliše resorpciju kosti *in vitro* uz pomoć mehanizama koji uključuju sintezu prostaglandina (inflamatorni faktori). Glavna funkcija PDGF je hemotaksična: privlači inflamatorne ćelije na mesto frakture i stimuliše deobu mezenhimskeh ćelija (*Nash et al., 1994*). IGF-1 pospešuje proliferaciju i diferencijaciju osteoprogenitornih ćelija (*Thaller et al., 1993*), ali još uvek nema ubedljivog efekta u

studijama zarastanja velikih kosti. Rekombinantni humani hormon rasta ima sličnu ulogu kao IGF-1, ali pokazuje veći i dozno-zavisni efekat na čvrstinu tibije pacova, kako u intaktnim tako i u kostima zarašlim nakon frakture (*Carpenter et al., 1992*).

Dostupnost i cena faktora rasta predstavljaju prepreku za njihovu sistematsku primenu u kliničkoj praksi. Iako postoje molekularne tehnike za proizvodnju faktora rasta kao alternativa za njihovu izolaciju iz kosti (BMP-2 i TGF- β 1) ili trombocita (TGF- β 1), cena je i dalje veoma visoka, a izgleda da su ovi rekombinantni faktori rasta manje potentni (*Osborn, 1980*) u poređenju sa faktorima dobijenih iz koštanog matriksa.

Uprkos ovim troškovima, rezultati eksperimenata tkivnog inženjeringu kosti sa BMP su ukazali na njihov pojedinačni potencijal u femurnim defektima (*Takagi and Urist, 1982*) ili u kombinaciji sa rekombinantnim BMP-2 u spinalnom fuzionom modelu (*Boden et al., 1998*) čak i u perkutanom injekcionom obliku (*Alden et al., 1999*). U skorije vreme, pokazano je da je kombinacija alokalema i BMP-a dobra kao i autokalem u kompromitovanim farakturama tibije na slučajnim i kontrolisanim probnim ispitivanjima (*Jones et al., 2006*). Na sreću, uprkos velikoj potentnosti implanata u BMP-baziranom tkivnom inženjeringu kosti, oni nikada ne podstiču rast kosti na neželjenim mestima kao što je kičmeni kanal (*Boden et al., 1999*) nakon uklanjanja vertebralnog luka (laminektomija).

1.2.4.3. Osteogene ćelije

Tkvni inženjerинг kosti zasnovan na ćelijama datira još od otkrića da ektopično ugrađena kostna srž može da dovede do formiranja kosti (*de Bruyn, 1955*). Interesantno, izgleda da je uloga te nove ektopične kosti zaštita kostne srži tako da ona može da nastavi hematopoezu. Ruski naučnik Friedenstein je otkrio koje su ćelije odgovorne za ovaj fenomen. Ove ćelije su se vezivale za plastiku na kulturi i bile prisutne u razmeri od 1-10 ćelija na 100000 jedarnih ćelija kostne srži. Pošto su formirale posebne kolonije koje su nalikovale fibroblastima, u početku su nazvane *colony-forming unit* fibroblasta (CFU-Fs) (*Friedenstein, 1968; Friedenstein and Kuralesova, 1971; Friedenstein et al., 1978*). Iako je početni broj prilično ograničen, one se lako umnožavaju u kulturi, što potencijalno omogućava razvoj neograničenih količina kosti. Od njihovog otkrića mnogi naučnici su ovim CFU-Fs ćelijama (specifičnim podgrupama) davali razna imena. Neki su ih smatrali (mezenhimskim) stem ćelijama, jer je CFU-Fs populacija očigledno

pokazivala karakteristike stem ćelija, tj. samoobnavljanje, klonogenost i potencijal za formiranje mnogo različitih mezenhimskih tkiva. Ipak, one nisu homogene (jednog ćelijskog tipa). Ovo se odražava razlikama u sposobnosti rasta (veličina kolonije), kao i u spontanim putevima diferencijacije unutar i između kolonija (*Ashton et al., 1980; Aubin, 1998; Bianco et al., 2001; Mendes et al., 2002; Phinney et al., 1999; Prockop, 1997*). Još jedno odstupanje od definicije mezenhimskih stem ćelija je i to što se od (svih) CFU-Fs ćelija ne mogu formirati svi tipovi mezenhimskih tkiva. Zbog toga, bolje je ove ćelije posmatrati kao stromalne ćelije poreklom iz kostne srži (BMSC), što one u osnovi i jesu.

1.2.4.3.1. Izvori osteogenih ćelija

Sofisticiranim subletalnim eksperimentima zračenja je dokazano da BMSC ćelije predstavljaju zasebnu mezenhimsku liniju unutar kostne srži koja je pretežno hematopoetska (*Friedenstein, 1968*). U stvari, ektopično transplantirane donorske BMSC ćelije najpre obrazuju pogodnu sredinu za dalje vraćanje hematopoetskih ćelija. Unutar kosti, smatra se da su BMSC ćelije u dodiru sa ćelijama koje ograničavaju endotel vaskularne mreže, tzv. periciti (*Bianco et al., 2001*). U tom kontekstu na njih se posmatra kao na stromalne fibroblaste ili retikularne ćelije (Westen-Bainton (WB) ćelije) (*Bianco and Boyde, 1993; Westen and Bainton, 1979*). WB ćelije aktivno proizvode veliki broj preosteogenih ćelija, što ih čini važnim u razvoju kosti. U kasnijem razvoju, WB ćelije održavaju hematopoetsku mikrosredinu (*Krebsbach et al., 1999*). Kada se kostna srž povredi ove ćelije se lako otpuštaju u krvotok. Drugi izvori progenitorskih ćelija se mogu naći u periosteumu koji pokriva kost. Ćeljske kulture dobijene iz ovog izvora pokazuju morfologiju sličnu fibroblastima, a dokazano je i da poseduju sličan osteogeni potencijal i kapacitet za regeneraciju kolonije u poređenju sa BMSC ćelijama (*Nakahara et al., 1990; Takushima et al., 1998*). Novije studije su pokazale i potencijal progenitorskih ćelija poreklom iz mišića (*Peng et al., 2004; Sun et al., 2005*) ili adipoznog tkiva (*Ogawa et al., 2004*). Očigledno, pluripotentne mezenhimske ćelije su prisutne u nekoliko ljudskih tkiva koja poseduju regenerativni kapacitet.

1.2.4.3.2. Uspostavljanje kostne srži

Danas se primenjuju dva različita pristupa za uzimanje i uspostavljanje kostne srži: *in vivo* uzimanje kostne srži (obično iz ilijačnog grebena) i uzimanje kostne srži iz

šupljine femura i tibije posle smrti, što se često primenjuje za istraživanje kod singenih modela miševa i pacova.

Kod *in vivo* uzimanja, uzorak je uglavnom nastanjen krvnim ćelijama i vrlo mali deo čine CFU-Fs ćelije sa sposobnošću vezivanja za plastiku na kulturi (*Krebsbach et al., 1999*). Na primer, utvrđeno je da u uzorcima 32 sredovečna zdrava donora, na 1 milion jedarnih ćelija ima svega 36 CFU-Fs ćelija koje se boje pozitivno na ALP (marker za osteogenu liniju) (*Muschler et al., 1997*). Interesantno je da 70% varijacija u sadržaju ALP-pozitivnih CFU-Fs ćelija zavisi od donora, a 20% je rezultat korišćene tehnike uzimanja. Takođe je primećeno da višestruko uzeti uzorci male zapremine (manje od 2 ml) daju veće koncentracije BMSC ćelija nego pojedinačno uzeti veći uzorci (*Muschler et al., 2004*). Ovo je verovatno zbog toga što su pojedinačni uzorci uzeti samo lokalno, sa jednog mesta. Još jedan metod koji se često koristi za uvećanje BMSC ćelijskog sadržaja je centrifugiranje u gradijentu gustine - ovaj metod omogućava odvajanje eritrocita i drugog relativno gustog krvnog sadržaja, i uvećanje gustine i do 5 puta (*Aubin, 1998*).

Što se tiče uzimanja kostne srži iz šupljine femura i tibije posle smrti, vadi se kompletna stroma šupljine u kojoj se nalazi srž. U početku je ova stroma nosač za hematopoetske ćelije, i sadrži mnoge tipove ćelija kao što su adipociti srži, ćelije kostne linije (neaktivni osteoblasti), osteoblastne ćelije i naravno WB ćelije (*Bianco and Boyde, 1993; Westen and Bainton, 1979*).

Iako je poznato da strukturalna uređenost mikrosredine stromalnog tkiva ne mora da bude očuvana pri transferu kostne srži, mehaničko rastavljanje, bilo centrifugiranjem, bilo resuspenzijom uz pomoć igle, smanjuje količinu ALP pozitivnih CFU-Fs ćelija, kao i njihov osteogeni potencijal kod miševa. Blaga upotreba tripsina, enzima koji se koristi za ćelijsko odvajanje, kao alternative za pomenute metode, uspešno neutralizuje ovaj fenomen (*Friedenstein et al., 1992*).

1.2.4.3.3. Selekcija BMSC

Već u ranim radovima Friedenstein sa kulturama BMSC ćelija, primećeno je da je glavni kriterijum za dobijanje mezenhimskih ćelija snažno vezivanje ovih ćelija za posude sa tkivnim kulturama. Nakon što se u roku od jednog dana većina CFU-Fs ćelija veže, ostale ćelije (uglavnom hematopoetskog porekla) se mogu lako ukloniti ispiranjem (*Friedenstein et al., 1976, 1987*). Ovo, ipak, rezultuje relativno heterogenim BMSC

kulturama. Sa razvojem novih čelijski specifičnih markera, postao je dostupan uvid u podgrupe unutar heterogenog skupa CFU-Fs ćelija. Jedan takav marker, koji je specifičan za rane i nezrele porogenitore osteoblasta, je monoklonalno antitelo poznato kao STRO-1 (*Gronthos and Simmons, 1995; Stewart et al., 1999*). Drugi markeri osteogenosti se mogu naći među nekolagenim proteinima koštanog matriksa, kao što je osteokalcin, koji čini 10-20% svih nekolagenih proteina kosti i blisko je povezan sa mineralizacijom kosti. Osteonektin je protein kosti koji poseduje kalcijum i mineral-kolagen vezujuća svojstva, reguliše oblik i migracije ćelije. Osteopontin, protein koštanog matriksa sa integrinskom (čelijsko-vezujućom) aktivnošću, je povezan sa regulacijom mineralne proliferacije. Takođe je kod osteopontin deficijentnim modelima miševa dokazana njegova važna uloga u angiogenezi, obrazovanju kalusa i remodelovanju kosti (*Duvall et al., 2006*). Korišćenjem imunskog obeležavanja moguće je izolovati BMSC i pozitivnom i negativnom selekcijom. Kod negativne selekcije podgrupa ćelija se može dobiti uklanjanjem ciljnih ćelija (kao što su CD45⁺ i glikoforin A⁺, hematopetske ćelije) iz cele populacije ćelija kostne srži kako bi se dobile mezenhimske progenitorske ćelije (*Reyes et al., 2001*). Kod pozitivne selekcije BMSC ćelije se izdvajaju nakon obeležavanja antitelima usmerenim protiv membranskih molekula specifičnih za primitivne mezenhimske ćelije kao što je STRO-1 (*Simmons and Torok-Storb, 1991*). Ipak, STRO-1 pozitivne ćelije nisu uniformna grupa, i druge ćelije stromalnog i hematopoetskog porekla takođe mogu biti STRO-1 pozitivne (*Gronthos et al., 1994*). Zbog toga, HOP-26 (*Joyner et al., 1997*), SB-10 (CD 166) (*Bruder et al., 1997, 1998a*) i CD49a (*Deschaseaux and Charbord, 2000*) dalje definišu podgrupe čelijskih markera specifičnih za primitivne ljudske stromalne ćelije srži. *In vivo*, većina ćelija je HOP-26 negativno (osteoblasti) osim nekih ćelija koje su locirane bliže površini kosti. *In vitro*, HOP-26^{+/ALP⁺ ćelije se mogu naći u BMSC kulturama uz povećanje ove frakcije nakon tretmana deksametazonom (čelijski diferencijacijski faktor za osteoprogenitorske ćelije (*Walsh et al., 2001*)). Nedavno, novi metod pokazivanja faga (*Griffiths et al., 1994*) (korišćenjem filamenata bakteriofaga za pokazivanje različitih skupova (do 10^{10}) fragmenata antitela) je otkrio C15, kao novo antitelo za detekciju zrelih i nezrelih osteogenih ćelija u kulturama kostne srži (*Letchford et al., 2006*).}

Upotreba fluorescentno-aktivirajućeg sortiranja ćelija (FACS) se čini glavnom i ključnom u ovim istraživanjima. Kod FACS tehnike, fluorescentno obeležena antitela se vezuju za ciljne ćelije koje se jedna po jedna propuštaju kroz cev brzinom od nekoliko

hiljada ćelija u sekundi. Na ćeliji, prisustvo obeleživača se otkriva, što omogućava precizna merenja pa čak i sortiranje ćelija. Manje komplikovano je dodavanje malih magnetnih zrna na antitela što omogućava sortiranje ćelija magnetnim privlačenjem (*Oyajobi et al., 1999*).

1.2.4.3.4. Metode kultura

U poslednjih 40 godina, razvijene su opšte prihvачene metode za selekciju i pravljenje kultura pre svega humanih BMSC ćelija (*Colter et al., 2000, 2001*). Često se cela kostna srž razdvaja u gradijentu gustine (Ficoll (*Baksh et al., 2003*) ili Percoll (*Kadiyala et al., 1997*) gradijenti) kako bi se centrifugiranjem selektovale mononuklearne ćelije. Ove ćelije se potom obično gaje u kulturi u medijumu koji sadrži 10-20% fetalni teleći serum (FCS), L-glutamin i antibiotike. Neki više koriste standardizovani sintetički serum kao što je 2% Ultroser (*de Brujin, 1998*) umesto FCS seruma, drugi preferiraju dodavanje FGF-2 da bi stimulisali deobu BMSC ćelija (*Kruyt et al., 2003a*). Ćelije se obično gaje u plastičnim posudama (često obloženim fibronektinom zbog optimalnog vezivanja ćelija) sa različitim površinama uz dodatak približno 1 cm³ medijuma kulture na svakih 5 cm². Medijum se menja na svaka 3-4 dana sve dok se ćelije ne nagomilaju u roku od 7-14 dana u zavisnosti od početne gustine i vrste BMSC ćelija. Kada je medijum uklonjen i ćelije isprane PBS-om, koristi se Trypsin 0.25% u EDTA u vidu tankog filma uz 5 minutnu inkubaciju na 37°C kako bi se ćelije odvojile. Nakon toga, ćelije se mogu brojati i premestiti u željenoj gustini korišćenjem standardizovanog medijuma ili sačuvane u tečnom azotu uz pomoć 5% dimetilsulfoksida i 30% FCS.

U pokušaju da se proizvedu upotrebljive količine tkivno-obrađenih koštanih produkata, razvijen je sistem direktnog perfuzionog bioreaktora (*Janssen et al., 2006*). Smer i brzina toka, položaj bioreaktora su faktori koji utiču na količinu i homogenost ćelija posejanih na površini nosača. Pokazano je uspešno zasejavanje ćelija kozje kostne srži u sistem bioreaktora na količini nosača (2-6 mm) od oko 10 cm³. Na žalost, osteogenost ovih sklopova je dokazana jedino na ektopičnim modelima miševa gde su ugrađivane granule od 0.03 cm³ (*Janssen et al., 2006*).

1.2.4.3.5. BMSC diferencijacija

Iako veći deo BMSC ćelija može da se diferencira u osteogenu liniju *in vitro*, *in vivo* obrazovanje kosti ostaje prilično nepredvidivo naročito u sklopovima sa humanim BMSC ćelijama (*Kuznetsov and Gehron Robey, 1996*). Ovo može biti rezultat nedovoljnog broja ili potentnosti ćelija osteogene loze. Metod kojim se ovaj problem može prebroditi je stimulisanje ćelija deksametazonom (10nM) (*Maniatopoulos et al., 1988; Walsh et al., 2001*) ili nekim ubedljivijim faktorima kao što je BMP. Još radikalnija mera je genetski modifikovati ćelije prenošenjem gena za faktor rasta (*Bianco et al., 2001; Caplan, 2000*). Ovaj metod predstavlja napredak u ćelijski baziranom tkivnom inženjeringu ali i unapređenje tkivnog inženjringa baziranog na faktorima rasta u tom smislu da je konačno pronađeno rešenje za regulisani transport faktora u ove (mezenhimske) ćelije.

1.2.5. KORACI U ISTRAŽIVANJIMA – OD IDEJE DO PACIJENTA

1.2.5.1. Mehanističke studije

Tkivni inženjerинг kosti je obećavajuća tehnologija koja može ukloniti potrebu za autologim kostnim kalemovima u budućnosti. U ovom trenutku, hiljade naučnika na svetskom nivou istražuju mnoge njegove aspekte, od kojih su najpoznatiji inženjerинг biomaterijala i biologija ćelije. Tehnologija biomaterijala danas može proizvesti nosače precizno oblikovane u skladu sa predizajniranim 3D virtuelnim modelom, koji mogu nositi ćelije, faktore rasta ili i jedno i drugo (*Warnke et al., 2006; Wilson et al., 2004*). Ipak, optimalno oblikovanje materijala za nosače još uvek treba definisati. Biologija ćelije je napravila veliki napredak u izolaciji i funkcionalnoj diferencijaciji zrelih BMSC ćelija (*Jiang et al., 2002*). Ipak, tačna uloga, optimalna koncentracija ćelija i optimalni nivo diferencijacija i dalje nisu dovoljno razjašnjeni. Uprkos ovim nejasnoćama, različite discipline su otišle daleko u ćelijski baziranom tkivnom inženjeringu kosti.

Preklinička istraživanja u tkivnom inženjeringu se po pravilu sprovode na različitim nivoima sličnosti sa kliničkim situacijama. Na prvom nivou, vrše se *in vitro* studije a potom se ocenjuje dokaz koncepta na malim životinjskim modelima, što je praćeno studijama izvodljivosti sa klinički prikladnjim mestima. Konačno, mogu biti potrebne i studije efikasnosti koje imitiraju kliničke situacije što je više moguće (npr.

studije na primatima). Važno je prepoznati ove različite nivoe da bi se koristili prigodni modeli. Na primer, za ispitivanje diferencijacije i proliferacije ćelija u kombinaciji sa nosačem pogodnije su *in vitro* studije (Vasiljević, 2010). Sa druge strane, za procenu izvodljivosti tkivno obrađene kosti kao zamene za koštani kalem u spinalnoj fuziji, potrebni su modeli koji imitiraju biomehaniku i dimenzije kliničke situacije. U budućnosti treba razraditi različite podgrupe studija, koje je potrebno sprovesti, kako bi se tkivni inženjerинг kosti doveo do pacijenta.

In vitro modeli

In vitro modeli su osnova svih razvoja u tkivnom inženjeringu. Svaku ideju najpre treba temeljno testirati *in vitro* pre nego što se razmišlja o bilo kakvim *in vivo* testovima. Što se tiče faktora rasta, to podrazumeva prečišćavanje, uvid u njihovo otpuštanje i efekat na BMSC ćelije ili okarakterisane ćelijske linije kao što su 3T3 fibroblasti. Što se tiče BMSC ćelija, rađena su obimna *in vitro* istraživanja kako bi se identifikovale ove ćelije i procenila interakcija između ovih ćelija, nosača i faktora rasta. Takve studije takođe pružaju uvid u osteogeni potencijal samih ćelija i prednosti dodatnih tretmana, tj. lekova ili genske terapije. Sumirane su neke od ključnih *in vitro* tehnika za studiranje ćelija u kulturi.

Brojanje ćelija – ovo je veoma važno za standardizaciju i optimizaciju kulture i procedura zasejavanja ćelija. Čini se lako, ali je u stvari veoma komplikovano. I dan danas, još uvek je nemoguće tačno izbrojati ćelije u 3D sredini kao što je hibridni sklop. Takođe, većina istraživanja uključuju liziranje ćelija. U 2D kulturi, brojanje uz korišćenje invertnog fazno-kontrastnog mikroskopa je najraširenije kada gustina nije prevelika. Slobodne ćelije se broje citometarskom komorom, sa predodređenom zapreminom i mrežom. Kada su ćelije u rastvoru, pogodni su ranije pomenuti automatizovani sistemi kao što je FACS, a i citometri. Merenje DNK se primenjuje onda kada pojedinačne ćelije nisu uočljive. Ovo je obično slučaj u skloporima tkivnog inženjeringu gde su saznanja o ćelijskom vezivanju, deobi, preživljavanju i diferencijaciji ključna. Ćelije se liziraju kako bi se DNK oslobođila, koja se potom boji a njena količina meri fotospektrometrijom. Trenutno su dostupna mnoga komercijalna pomagala. Da bi se količina DNK dovela u vezu sa brojem ćelija, potreno je napraviti standardnu krivu reference, i proceniti uzorak u skladu sa tipom ćelije i nosača koji se koristi. Drugi način je korišćenje metaboličkih ispitivanja, gde se supstrat uz pomoć sposobnih ćelija prevodi u produkt specifične boje

fluorescencije. Potom se reakcija zaustavlja, a proizvod meri spektrometrijom (*Wilson et al., 2002*). Problem ove tehnike je taj što se ćelijski metabolizam menja sa ćelijskom gustinom. Većina radova uključuje liziranje ćelija, npr. proba sa tetrazoliumskom soli, iako su razvijena i nonletalna ispitivanja zasnovana na redoks indikatorima (*Nikolaychik et al., 1996*).

Ispitivanje efikasnosti formiranja kolonije – kako bi se utvrdio kvalitet sržnog aspirata, mora se uraditi Ispitivanje efikasnosti formiranja kolonije (CFU-E). Ono uključuje frakciju jedarnih ćelija koje se vezuju za plastiku i obrazuju koloniju (CFU-F). Nakon što je kostna srž uzeta, jedarne ćelije se seju na različitim gustinama, od oko 10^3 do 10^5 ćelija/cm², medijum se osvežava nakon 3-5 dana, i od 7-10 dana mogu se bojiti i brojati relativno male kolonije. Broj kolonija u odnosu na broj inicijalno zasejanih ćelija izgleda da varira u zavisnosti od vrste, tehnike i starosti a kreće se od 1 do 10 ćelija na 100 000 zasejanih ćelija (*Bianco et al., 2001; Friedenstein et al., 1970*).

Ispitivanja diferencijacije – najspecifičniji markeri ćelijske diferencijacije prema osteogenoj liniji su mRNA probe ili specifični antigeni. Za dobru indikaciju osteogenosti postoje lakša *in vitro* ispitivanja koja takođe dozvoljavaju merenja. Najpoznatije je bojenje karakterističnog produkta osteogeneze tj. nagomilani kalcijum. Ovo se može uraditi sa Alizarin crvenim ili Kalcein zelenim bojenjem.

Još specifičnije je kvantifikovati aktivnu formu karakterističnog enzima ALP. Postoje mnogi komercijalni oblici ALP. Deljenjem sa istovremeno dobijenom količinom DNK, broj jedinica ALP-a po ćeliji pruža solidan uvid u ćelijsku diferencijaciju. Drugo ispitivanje se fokusira na hidroksiprolin, važnu komponentu trostrukog heliksa kolagena (*Acil et al., 2000*). Ipak, hidroksiprolin nije specifičan za kolagen tip 1 (dominantan oblik kolagena u kosti) i zbog toga se ne može koristiti kao jedini indikator prisustva ćelija koje proizvode koštani matriks.

In vivo modeli: dokaz koncepta

Ovaj tip studija je dizajniran kako bi se dokazalo hipotetički ispravan mehanizam (koncept) tehnike. U slučaju ćelijski baziranog tkivnog inženjeringu kosti, većina istraživača veruje da su ćelije odgovorne za obrazovanje nove kosti u smislu da je ove ćelije proizvode. Ovaj koncept je jasan i čini se lakim za dokazivanje. Ipak, uprkos činjenici da su mnoge studije pokazale povećanu količinu kosti nakon dodavanja BMSC

ćelija, svega nekoliko istraživača je stvarno uspelo da dokaže direktnu zavisnost između ćelija i nove kosti (*Burder et al., 1998b; Goshima et al., 1991*). Razlog zbog koga je ovo teško je taj što uočena formirana kost nije po definiciji poreklom od implantiranih ćelija. Kao što znamo, ona može nastati delovanjem još najmanje dva mehanizma: osteokondukcija i osteoindukcija. Zbog toga, dokaz koncepta ćelijski baziranog tkivnog inženjeringu kosti mora da isključi ova dva mehanizma što je više moguće. U praksi, implantacija se poželjno radi u sredini van kosti kako bi se isključila osteokondukcija. To je tzv. ektopična lokacija, nasuprot ortotopičnoj lokaciji (unutar kosti) koju treba koristiti za funkcionalne studije. Kontrolno stanje bez ćelija ili, još bolje, sa devitalizovanim ćelijama treba se primeniti u cilju kontrole osteoindukcije (*Kruyt et al., 2003a*). Još efikasniji način ispitivanja doprinosa implantiranih ćelija je postavljanje sklopa u sredinu koja je zaklonjena od prodora okolnih ćelija, tzv. difuzione komore. Dobro utemeljeni ektopični modeli su potkožna i intramuskularna implantacija kod malih životinja, kao što su miševi i pacovi. Dostupni su imunodeficijentni sojevi ovih životinja, što predstavlja prednost u cilju prevazilaženja problema povezanih sa implantacijom genetski različitih ćelija. Još jedna prednost ovih malih životinjskih modela je skoro potpuno odsustvo osteoindukcije samog biomaterijala, što u velikoj meri umanjuje ovaj problem (*Yuan et al., 2006*).

Jednostavnim *in vivo* modelima, dokaz osteogeneze podstaknute BMSC ćelijama ostaje indirektan. Čak i kad su ispunjena oba uslova: ektopična lokacija i odsustvo koštane indukcije kod kontrola, jedini način da se direktno utvrdi konceptualni mehanizam osteogeneze je identifikacija originalnih BMSC ćelija unutar nove kosti. Takva elegantna metoda se sastoji u identifikovanju genetski različitih ćelija kod imunodeficijentnih životinja (*Goshima et al., 1991*), npr. ljudskih ćelija kod miševa ili ćelija muškog pola kod ženskog pola (polni mismeč). Ipak, kad se koriste imunokompetentne životinje, bira se metod obeležavanja ćelija. Takav obeleživač ne sme nikako da utiče na ćelije ili da vrši selekciju. Ne sme da se gubi za vreme ćelijskih deoba i mora biti kompatibilan sa histologijom kosti. Očigledno, obeleživač bi trebalo da bude specifičan i ne sme se prenositi na susedne ćelije. Trenutno, postoji svega nekoliko potencijalno spremnih i dostupnih obeleživača, koji su još uvek daleko od idealnih. Većina poznatih obeleživača su fluorescentne boje koje se mogu pripojiti za unutrašnjost membranskog dvosloja ili unutar citosola (*Horan and Slezak, 1989*). Pri svakoj deobi, ovi obeleživači se dele na jednakе količine između čerki ćelija, što omogućava ulaganje u

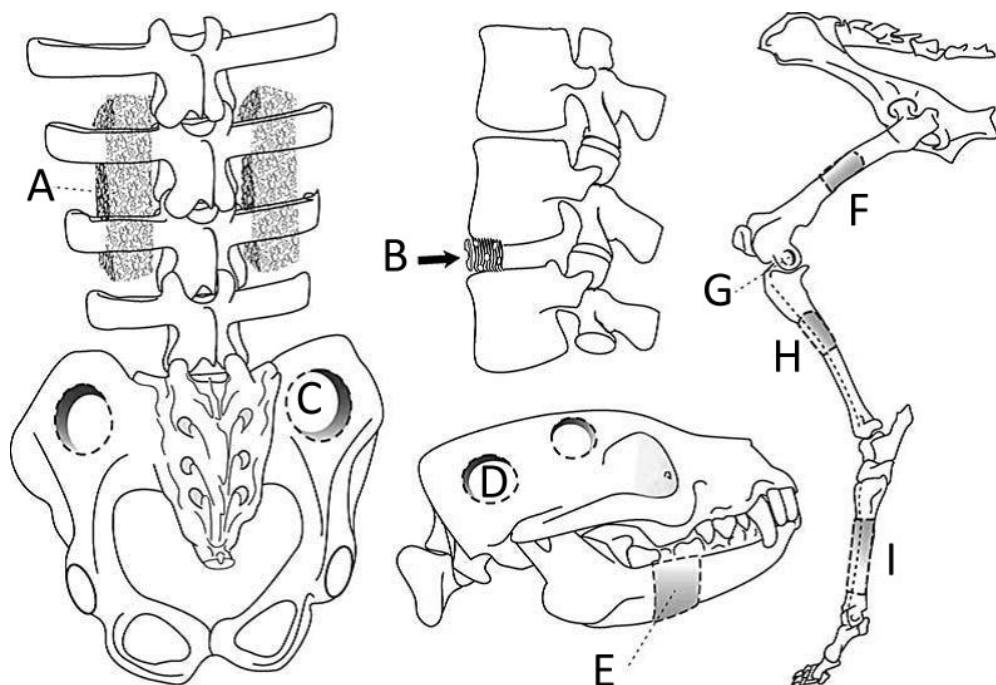
trag čelijskom potomstvu, ali tokom vremena se intenzitet obeleživača smanjuje. Na žalost, oni nisu pouzdani na duže staze zbog transfera obeleživača (*Emans et al., 2006; Kruyt et al., 2003b*). Poslednjih godina, postalo je dostupno genetsko obeležavanje (marking), a i dokazano je da je ono kompatibilno sa histologijom kosti. Ova tehnika koristi sposobnost (retro)virusa da unesu marker gene u čeliju bez vidnog ometanja čelija (*Verma and Somia, 1997*). Marker geni mogu kodirati kratke sekvence amino kiselina koje daju proteine koje je moguće otkriti imunohistohemijom. U drugom slučaju, ovi proteini mogu biti pušteni u krvotok gde se mogu meriti (npr. interleukin-3). Novije tehnike koriste proteine koji sačinjavaju enzime kao što je luciferaza svica, koja proizvodi svetlost velike talasne dužine, koja prolazi kroz kost i može se meriti van životinje neinvazivnim bioluminiscentnim imidžingom (*Contag et al., 1998; Feeley et al., 2006*).

In vivo modeli: studije izvodljivosti

U sledećem koraku, potreban je dokaz izvodljivosti kako bi se utvrdilo da li tehnika rezultira funkcionalnom kosti. Razvijeni su mnogi modeli, od radius defekt modela kod miševa do modela kolena konja. Generalno, modeli izvodljivosti se mogu podeliti u nekoliko grupa: augmentacioni modeli (npr. posteriorna spinalna fuzija i vilična kruna), defekt modeli koji ne nose opterećenje, segmentalni defekt modeli i funkcionalno spojni modeli. Segmentalni defekt modeli se čine najpopularnijim za proučavanje inženjeringu koštanog tkiva u klinički velikim modelima. 1988. Bruder et al., su prvi pokazali efekat BMSC čelija na segmentalnom defekt modelu psa; ova studija je kasnije ponovljena sa alogenim čelijama koje su imale sličan efekat (*Arinze et al., 2003; Brodke et al., 2006; Bruder et al., 1998a; Kraus et al., 1999*). Trenutno, segmentalne defekt studije na ovcama i kozama su veći deo uspešnih publikacija čelijski baziranog tkivnog inženjeringu kosti. Tu spadaju defekti kranijuma (*Shang et al., 2001*), mandibule (*Schliephake et al., 2001; Yuan et al., 2007*), femura (*Zhu et al., 2006*), tibije (*Kon et al., 2000; Mastrogiacomo et al., 2006*) i metatarzalnih kosti (*Bensaid et al., 2005; Petite et al., 2000; Viateau et al., 2004*).

Važna prednost bilo kog modela je potencijal za procenu višestrukih (različitih) uzoraka u istoj životinji. Ovo ne samo što smanjuje broj potrebnih životinja, već umanjuje i veličinu ispitivanog uzorka (n) što sa druge strane predstavlja problem parnog poređenja zbog isklučenja individualnog variranja osobina među jedinkama. Nedavno je uveden model koji omogućava simultanu procenu više stanja i on se

primenjuje kod uvećane kosti na transverzalnim nastavcima kičme (*Kruyt et al., 2006; Wilson et al., 2006*). Prirodno, u slučaju parnih poređenja, uzorci nikako ne smeju da deluju jedan na drugog. Zbog toga, funkcionalni spinalni fuzioni modeli ne bi smeli da imaju različita stanja sa obe strane kičme, zbog toga što spoj na jednoj strani obezbeđuje stabilnost i na taj način utiče na spoj sa druge strane. Iz sličnih razloga, neki autori zastupaju upotrebu samo jednog tipa fuzionog modela. Što se tiče segmentalnih modela i defekt modela koji ne nose opterećenja, bolje je koristiti defekte kritične veličine, što znači da oni nikad ne zarastaju spontano. Ovo je ključna osobina koja nam dozvoljava da zaključimo da je, u slučaju uspeha, terapija zacelila defekt, a ne samo pojačano spontano zarastanje. Zlatno pravilo (koje se ne treba automatski prihvati i zahteva potvrdu u slučaju novih defekt modela) kaže da se segmentalni defekti u zrełom skeletu mogu nazivati kritičnim onda kada je njihova veličina 2,5 puta veća od širine dijafizne osovine. Prednosti segmentalnih defekata su dobre mogućnosti radiološke procene u vremenu, kao i mogućnosti konačne procene funkcionalnosti kosti mehaničkim testovima. Uprkos hardverskoj podršci, dijafizni defekti su obično jednostrani. Ipak, ulnarni i radijalni defekti mogu biti i bilateralni.



Slika 1.4. Životinjski modeli za testiranje kostnih implanata: (A) posterolateralna intertransverzalna spinalna fuzija, (B) anteriorna između pršljenova (uz korišćenje kaveza), (C) defekt ilijske kosti, (D) defekt lobanje, (E) mandibularni segmentalni defekt, (F) segmentalni defekt femura, (G) intrakondilarni metafizički defekt, (H) tibijalni segmentalni defekt i (I) metatarzalni defekt.

Defekti koji ne trpe opterećenje su očigledno manje komplikovani i obično se mogu uparivati. Dobro poznati primeri su defekti lobanje, koji dozvoljavaju i četvorostruke procene (četiri defekata u jednoj lobanji). Nešto funkcionalniji su kavez-asistirani anteriorni spinalni fuzioni modeli. Relativno novi trend su totalno zglobni modeli (eng. *total joint models*), koji kombinuju tkivni inženjerинг kosti i hrskavice za stvaranje funkcionalnih zglobova. Njihov potencijal je pokazan u studijama kliničkih slučajeva (*Ohgushi et al., 2005*). Studije efikasnosti se poželjno rade na nečovekolikim majmunima. Do sada ni jedna nije prijavljena u ćelijski – zasnovanom tkivnom inženjeringu kosti. Ipak, BMP – zasnovan tkivni inženjerинг kosti je već rađen na nečovekolikim majmunima (*Boden et al., 1998*).

1.2.6. KORACI KA KLINIČKOJ PRIMENI

Konačno dokaz tehnologije će dati slučajna klinička ispitivanja. Trenutno su objavljene pilot studije koje se tiču BMP-baziranog tkivnog inženjeringu. Što se tiče ćelijski zasnovanog tkivnog inženjeringu, još uvek nema objavljenih proba, iako neki istraživači veruju da se ova tehnologija može primeniti kod ljudi (*Cancedda et al., 2003; Kitoh et al., 2004; Marcacci et al., 2007; Nocini et al., 2006; Ohgushi et al., 2005; Quarto et al., 2001; Schimming and Schmelzeisen, 2004; Vacanti et al., 2001*). Postalo je jasno da napredni tkivni inženjerинг u kliničkim situacijama nameće nekoliko izazova koji se mogu odnositi na vrstu, veličinu sklopa kao i na lokaciju implanata.

Species-zavisne teškoće uključuju inferiorni kvalitet aspirata ljudske kostne srži i BMSC ćelija u poređenju sa drugim vrstama, npr. mišjim BMSC ćelijama (*Krebsbach et al., 1997; Majors et al., 1997*). Dalje, ograničenje za upotrebu ljudskih BMSC ćelija je i duboko životno doba kada se tretman radi (*Bab et al., 1984; Bianco et al., 2001; Mendes, 2002*).

Potencijal BMSC ćelija može biti umanjen kao rezultat replikativne starosti (ukupan broj potencijalnih ćelijskih deoba je smanjen kao rezultat narušavanja telomera koje pokrivaju vrhove hromozoma) (*Bianco et al., 2001*). Za prevazilaženje ovog problema, unošenje telomeraze (koja delimično vraća telomere) u BMSC ćelije inhibira replikativno starenje BMSC ćelija i omogućava i do 10 puta veći broj deoba populacije (*Shi et al., 2002; Simonsen et al., 2002*).

Uvećanje dimenzija sa kubnog milimetra (kod miševa) na kubni centimetar (1000 puta) ima dramatične reperkusije, kako za implant, tako i za ležište rane. Krupni implanti tkivnog inženjeringa su, do danas, nevaskularizirani sklopovi i zbog toga loša sredina za preživljavanje ćelija. Opšte je poznato da organizmi čija zapremina prevazilazi nekoliko kubnih milimetara zahtevaju vaskularizaciju za snabdevenost kiseonikom i hranom - aksiom koji egzistira u mnogim živim sistemima. Tipični primeri su limitirana veličina nevaskularizovanih životinja kao što su insekti kao i rani razvoj aktivne perfuzije kod embriona čoveka, već tokom pete nedelje gestacije, kada je on dug oko 3 mm. Dodatno, kod primene krupnijih konstrukta tkivnog inženjeringa, ima za posledicu veću povredu sa dubljom reakcijom zarastanja. Unutar hematoma rane, dovodi se u pitanje ćelijsko preživljavanje, usled visoke koncentracije kalijuma, kao rezultat lize eritrocita (*Street et al., 2000*).

1.2.6.1. Kalemska vijabilnost i vaskulogeneza

Bliska povezanost osteogeneze i krvnih sudova je prvi put predložena u drugoj polovini dvadesetog veka. 1963., Trueta je predvideo postojanje vaskularno-stimulišućih faktora, koji deluju na mestima koštanih oštećenja. U skorije vreme, knockout životinje (životinje kojima nedostaju neki geni, npr. oni uključeni u angiogene procese kao što je VEGF) i tretman frakturna angiogenim inhibitorima su pružili novi uvid u interakciju angiogeneze i obrazovanja kosti. U vezi s tim, pokazano je da inhibicija VEGF sprečava BMP-2-posredovano formiranje kosti (*Peng et al., 2005*). Paralelno, niz drugih faktora rasta prisutnih unutar hematoma frakture, kao što su PDGF i FGF, poseduju visok angiogeni potencijal. Za neke od njih je pokazano i da značajno stimulišu i menjaju remodelovanje kosti i zarastanje frakturna (*Gerber et al., 1999; Hausman et al., 2001*).

U koštanim sklopovima ćelijski baziranog inženjeringa tkiva, postoje indikacije vaskularizaciono-zavisnog obrazovanja kosti. Na primer, u ektopičnom modelu miša (*Kruyt et al., 2004a*), formiranje kosti počinje na periferiji implanata i pojavljuje se u srcu nosača kasnije. Paralelno, vaskularizacija implanata se nastavlja sporo, a prvi krvni sudovi dospevaju u centar nosača tek nakon nekoliko nedelja implantacije (*Pacheco et al., 1997; Pelissier et al., 2003*). Očigledno, neoosteogeneza zahteva neovaskularizaciju; zato ubrzanje vaskularizacije može značajno pospešiti obrazovanje kosti.

1.2.6.2. *In vitro* modeli za studiranje vaskularizacije kosti

U regenerativnoj medicini, endotelijalno, ćelijsko formiranje cevastih formacija u kulturi je glavno sredstvo za razumevanje mehanizama koji stoje iza neoangiogeneze u vaskularno-projektovanim sklopovima. Takvi modeli su korišćeni za proučavanje reciprocitetnih efekata zrelih humanih endotelijalnih ćelija (HUVEC), osteoblasta ili BMSC ćelija (*Meury et al., 2006*). U kokulturama, ćelije utiču jedne na druge otpuštanjem rastvorljivih faktora sa parakrinnim efektom, tako što proizvode ECM za ćelijsku adheziju i uspostavljaju fizički kontakt. Ove interakcije se mogu analizirati odvojeno upotrebom jednostavnih 2D sistema kultura ili simultano, korišćenjem 3D sistema (*Wenger et al., 2004*). Za proučavanje efekata solubilnih faktora, BMSC ćelije u kulturi se izlažu medijumu koji je porekлом od kultura endotelijalnih ćelija. Ovaj medijum sadrži neodređeni koktel faktora rasta koje proizvodi endotel (*Villars et al., 2000*). Ipak, bolji metod za studiranje parakrinskih efekata je kokultura u transwell filterovanim komorama. Različiti tipovi ćelija se mogu zasebno zasejavati, jedni na dnu komore, a drugi na filteru iznad njega. Filter dozvoljava difuziju nutrijenata i ćelijski-sekretovanih faktora, pri čemu zadržava ćelije u njihovim komorama. Prednost transwell sistema je ta što različiti tipovi ćelija mogu interagovati dinamično, što nije moguće u sistemima sa kondicioniranim medijumom.

1.2.6.3. *In vivo* modeli sa vaskularizovanim tkivno-projektovanim kostnim sklopovima

Većina *in vivo* modela za poboljšanje vaskularizaciju implantata tkivnog inženjeringu kostiju istražuje efekat angiogenih faktora rasta koji se mogu kombinovati sa nosačima, npr. kao omotač. Nakon implantacije faktori se lokalno otpuštaju, obezbeđujući stimulus za endotelne ćelije, prekursorske ćelije i infiltrirajuće osteoblaste. Na primer, oblaganje PLG (polilaktid-ko-glikolidnih) nosača VEGF-om poboljšava formiranje kosti u poređenju sa neobloženim nosačima (*Sun et al., 2005*). Angiogeni faktori se takođe mogu isporučiti na željenim mestima *in vivo* ubrizgavanjem: lokalnim ubrizgavanjem u nekrotični koštani implant, FGF-2 povećava formiranje i dužinu novih krvnih sudova za oko 2 puta (*Nakamae et al., 2004*). Pri aplikaciji angiogenih faktora rasta na mestu implanta, koncentracija i kombinacija tih faktora je od kritične važnosti, imajući u vidu da je moguće narušavanje osteogene diferencijacije BMSC ćelija

(Kratchmarova et al., 2005). Dodatno, mnogi angiogeni faktori sa sličnim načinom delovanja mogu u realnosti biti veoma ćelijski specifični. Na primer, VEGF deluje selektivno na proliferaciju i diferencijaciju endotelnih ćelija, dok FGF-2 stimuliše migraciju i proliferaciju glatkih mišićnih ćelija i fibroblasta. Na kraju, vreme unošenja je važno, pošto različiti faktori rasta mogu biti efikasni i stimulisati osteogenezu samo u određenim trenucima za vreme ovog procesa. Kada se primenjuju *in vivo*, angiogeni potencijal tretmana može biti ograničen degradacijom faktora rasta, kao i frakcijom aktivnog faktora koji se oslobađa. Isto tako, može proći dosta vremena pre nego što nosači budu potpuno vaskularizovani, a malo je verovatno da će BMSC ćelije preživeti za to vreme (Rouwkema et al., 2006).

Još jedan novi razvoj na polju tkivnog inženjeringu je *in vitro* prevaskularizacija. U ovom slučaju, prevaskularna mreža raste unutar sklopa tkivnog inženjeringu *in vitro*. Nakon implantacije, sklop može biti vaskularizovan povezivanjem vaskularne mreže domaćina sa ovim prepostojećim sudovima (Levenberg et al., 2005).

1.2.6.4. Problemi koja se odnose na domaćina

Velika prepreka za primenu tehnike su uslovi u domaćinu koji su daleko od idealnih kod ljudi (pacijenata). Dva važna aspekta su lokalni reparacioni odgovor na mestu rane kao i tok zarastanja frakture. Obe pojave čine inflamatorni odgovor uz uklanjanje detritusa koje je praćeno prođorom krvnih sudova i ćelija za reparaciju (Tabela 1.3).

Odgovor zarastanja frakture (kosti) zavisi od mehaničke situacije. Ako je dovoljno stabilna i sa minimalnim praznim prostorom, kost će premostiti defekt takozvanom "puzećom supstitucijom" oštećenih frakturnih strana (intramembransko ili direktno koštano obrazovanje). Ovo je ekvivalentno primarnom zatvaranju rane kod hirurških rana. Ako lokalno mesto nije apsolutno stabilno što je obično slučaj sa implantima, inflamatorna faza je praćena hrskavičavim međustanjem pre transformacije u kost (endohondralno formiranje kosti). Ćelijski baziran tkivni inženjerинг, direktnim uključivanjem osteoprogenitornih ćelija, u stvari odstupa od prirodne strategije reparacije. Sa druge strane, u kasnijim fazama ćelije su očigledno neophodne i može da

Zarastanje rane (<i>Anderson 2000; Dvorak et al., 1987</i>)	Popravka frakture (<i>Bolander 1992; Jingushi and Bolander, 1991</i>)
eksudativna faza (na samom početku)	eksudativna faza (na samom početku)
Formira se hematom uz otpuštanje signalnih faktora	Hematom u kosti i mekom tkivu
formiranje fibrinskog matriksa	Otpuštanje faktora, npr. IL-1, IL-6, TGF- β , PDGF
	formiranje fibrinskog matriksa
Akutna inflamatorna faza	neposredna inflamatorna faza
Još eksudacije	Proliferacija susednih nediferenciranih ćelija
Prodor inflamatornih ćelija, kao što su makrofagi	Prodor inflamatornih ćelija, kao što su makrofagi
Hronična inflamatorna faza	Faza organizacije
Rast krvnih sudova	Rast krvnih sudova
Proliferacija fibroblasta i reparacija sa formiranjem vlaknastog tkiva	Ugrušak je transformisan u fibrozni reparativni granulom, koji se naziva eksternalni kalus
Faza reorganizacije	Inicijalna faza tvrdog tkiva
Reorganizacija tkiva ožiljka	Formiranje stabilizirajuće hrskavice (meki kalus) od strane diferenciranih, mezenhimskih ćelija
Ožiljak ostaje zauvek	Membranozno (direktno) formiranje tkiva je inicirano od strane periosta (tvrdog kalusa)
	Faza remodeliranja
	Transformacija hrskavice u kost i kompletno remodeliranje preliminarne kosti u normalnu kost

Tabela 1.3. Skica toka koja reprezentuje uzastopne korake u zarastanju rane (leva strana) u poređenju sa zarastanjem frakture kosti (desna strana). Ne postoji očigledna sličnost sa izuzetkom konačnog proizvoda: ožiljak se formira kod zarastanja rane, a kost se obrazuje kod zarastanja frakture

se dopunjuje proces, naročito kada fiziološki odgovor nije adekvatan. Bez obzira na funkciju, ćelijsko preživljavanje može biti teško ostvarivo ili nemoguće zbog sledećih široko prihvaćenih kompromitujućih okolnosti:

1. Za veći implantat je neophodno veće ležište rane sa povećanim difuzionim rastojanjem.
2. Ćelije će biti predmet početnog inflamatornog odgovora koji je dizajniran tako da očisti oblast od nefunkcionalnih supstanci.
3. Kao rezultat lize eritrocita u hematomu će biti prisutna određena koncentracija toksičnog kalijuma (*Street et al., 2000*).

Zbog toga, kada se cilja na ćelijski potstaknuto obrazovanje kosti u ćelijski zasnovanom inženjeringu tkiva, potrebna je radikalna promena u dizajnu ukoliko se želi poboljšano ćelijsko preživljavanje. Ovo se može postići stimulisanjem brze vaskularizacije sklopa obezbeđivanjem endotelnih ćelija i/ili faktora (*Levenberg et al., 2005*). U suprotnom, koncept implantiranih ćelija kao glavnog izvora obnove tkiva mora biti preispitan. Što se tiče inženjeringa koštanog tkiva, to bi značilo da će ćelije imati uglavnom stimulišuću i indukujuću ulogu, ulogu koja je već dobro poznata za ćelije autologih koštanih kalemova (*Burchardt, 1983; Yaszemski et al., 1996*).

1.2.7. TRENUTNI STATUS TKIVNOG INŽENJERINGA KOSTI

1.2.7.1. Kliničko iskustvo u ortopediji

Tokom poslednje dekade, nekoliko grupa istraživača je napravilo korak ka kliničkoj primeni ćelijski baziranog tkivnog inženjeringa kosti, što je objavljeno u priznatim časopisima (*Quarto et al., 2001; Vacanti et al., 2001*). Uprkos ponekad obećavajućim rezultatima, treba razumeti da, sa trenutnim znanjem, nijedna od ovih studija nije dizajnirana da istraži pravi doprinos dodavanja BMSC ćelija.

Quarto et al. (2001) se prvi pojavio sa izveštajem o tretmanu velikih (4-7 cm) koštanih defekata tibije, ulne i humerusa kod tri pacijenta starosti od 16 do 41 godine, gde „konvencionalne“ hirurške terapije nisu imale rezultata. Oni su ugradili ručno

napravljeni neresorbabilni porozni HA nosač zasejan sa *in vitro* umnoženim autologim BMSC ćelija. Spoljašnji fiksaciona naprava je primenjivana u cilju stabilizacije 6-13 meseci nakon operacije. Ni kod jednog od ovih pacijenata nije bilo većih komplikacija. Korišćenjem radiografa i kompjuterizovane tomografije (CT), zahvaljujući prisustvu kalusa i koštanog mosta drugog meseca nakon operacije zapaženo je spajanje na mestu kontakta implanta i kosti domaćina. Funkcija ekstremiteta je povraćena između 6. i 12. meseca. Nijedna kompletna fraktura u regionu implanta nije primećena za vreme od 6.5 godina, iako vremenomimplanti pokazuju progresivne pukotine i fisure, što ukazuje na keramičku dezintegraciju (*Marcacci et al., 2007*).

Vacanti et al. (2001) su prijavili slučaj čoveka koji je imao traumatičnu avulziju distalne falange palca. Ona je zamenjena poroznim, koralnim implantom na kome su zasejane *in vitro* umnožene autologe periostne ćelije. Pored histoloških biopsija urađeni su radiografi i magnetno rezonantni imidžing. Pokazano je da su radiografi demonstrirali remodelovanje implanata 28. meseca nakon operacije. Ipak, 10 meseci nakon operacije histomorfometrija je pokazala da je samo 5% lamelarne kosti i osifikovanog endohondralnog tkiva ispunilo implant.

Morishita et al. (2006) su tretirali defekt, nastao usled operacije benignog tumora kod tri pacijenta, upotrebom HA nosača zasejanih sa *in vitro* umnoženim autologim BMSC ćelijama nakon njihove osteogene diferencijacije. Tretirana su 2 defekta tibije i jedan defekt femura. Iako je pomenuto da ektopični implanti kod „golih“ miševa pokazuju osteogeničnost ćelija, detalji kao što su procenat implanata koji sadrži kost i u kojoj količini, nisu objavljeni. Ista grupa istraživača je izvela i artroplastiku gležnja kod tri pacijenta sa protezom gležnja izgrađenom od aluminijuma obloženog sa HA na kome su pre implantacije zasejane i gajene BMSC ćelije (*Kitamura et al., 2004; Ogushi et al., 2005*).

Druga tehnika gde BMSC ćelije mogu predstavljati prednost je distrakciona osteogeneza. Ova tehnika se sastoji od vrlo spore distrakcije kosti (1 mm/dan) kako bi se omogućilo obrazovanje reparativnog kalusa u defektu. Kitoh et al. (2004) su kod 3 pacijenta uradili distrakcionu osteogenezu femura i tibije sa savremenom transplantacijom autologih BMSC ćelija i plazme bogate trombocitima (PRP). Tretirana su dva pacijenta sa ahondroplazijom i jedan sa kongenitalnim pseudoartrozisom tibije. BMSC ćelije umnožene u autologoj kulturi (u proseku $14\text{-}50 \times 10^6$ ćelija) su ubrizgane u

distrakcioni kalus zajedno sa autologim PRP-om (u proseku 1.7×10^{10} trombocita po PRP preparaciji). Rezultati su upoređeni između 2 od 3 eksperimentalna slučaja (ahondroplasti) i 30 ahondroplasta koji su podvrgnuti sličnim procedurama izduživanja sa istom monolateralnom spoljnom fiksacionom napravom u kontrolnoj grupi koja ne prima injekcije. Prosečni indeks zarastanja se čini u korist 2 eksperimentalna slučaja (22.0 dana/cm distrakcije u poređenju sa 37.8 dana/cm kod kontrola). Ipak, veličina grupe od svega 2 pacijenta u eksperimentalnoj grupi je po priznanju autora premala za donošenje bilo kakvih statistički zdravih zaključaka.

U kliničkom okruženju dokaz tehnike očigledno još uvek nedostaje. Budući da osteokondukcija daje važan doprinos ugrađivanju implanta, efekti BMSC ćelije se mogu analizirati samo kada su dostupne kontrole bez ćelija. Dodatno, ni jedan od ovih izveštaja ne može da pruži čvrst dokaz ćelijskog preživljavanja u ugrađenim kalemima. To je zbog toga što je jedini pouzdan metod za pronalaženje ćelija baziran na retrovirusnoj transfekciji ovih ćelija, što nije kompatibilno sa humanim studijama. Najbolji metod za procenu ćelijske funkcionalnosti u kliničkom okruženju je verovatno analiza biopsija. Na žalost, retke su prilike za njenu primenu sa izuzetkom dentalnih. Pošto je mehaničko testiranje implanta u živoj jedinki nemoguće, CT skeniranje visoke rezolucije može biti moćno oruđe za analiziranje uspeha u smislu obrazovanja kosti u kliničkim studijama. Najvrednije su naravno slučajne kliničke probe, kod kojih se ishod terapije inženjeringu tkiva upoređuje sa adekvatnim kontrolnim stanjem.

1.2.7.2. Klinička iskustva u maksilofacijalnoj i oralnoj hirurgiji

Prijavljeno je svega nekoliko kliničkih studija maksilofacijalne hirurgije sa korišćenjem nosača i zasejanih ćelija. Ishodi ovih studija su razočaravajući i ukazuju da ćelijski baziran tkivni inženjerинг treba da pređe dug put. Schimming i Schmelzeisen (2004) su objavili kliničku studiju u kojoj je urađena augmentacija posteriorne maksile korišćenjem polimernog matriksa zasejanog ćelijama poreklom od mandibularnog periosta. Ukupno je tretirano 15 pacijenata u proceduri u 2 koraka. Prvi stadijum je bila rekonstrukcija oblasti defekta uz pomoć tkivno obrađene kosti; 3 meseca kasnije, sprovedena je druga faza sa postavljanjem dentalnih implanata kojom prilikom su uzeti histološki uzorci. Kod 8 od 15 pacijenata zapažen je neuspešan ishod; u histološkim biopsijama pronađeno je vezivno tkivo. U slučajevima sa pozitivnim ishodom (sedam

pacijenata), autori nisu pomenuli da li je uočeno formiranje kosti poreklom od osteoindukcije ili osteokondukcije. Meijer et al. (2007) su sprovedli studiju na ljudima kako bi ispitali potencijalnu doprinos BMSC ćelija zasejanih na nosaču u restauraciji intra-oralnog kostnog defekta. Sedam od deset gajenih konstrukta koji su dodatno proučavani u subkutanom modelu miša su pokazali kost, što je ukazalo na osteogenost ovih konstrukta. Ipak, samo kod jednog pacijenta je zapaženo formiranje kosti, koje bi moglo biti poreklom od implantiranih ćelija.

1.2.7.3. Ograničenja u kliničkoj primenljivosti

Ćelijski baziran inženjering kostnog tkiva, iako uspešan u prijavljenim slučajevima, očigledno zahteva dalja ispitivanja, pre nego što se počne široko primenjivati u kliničkoj praksi. Tokom poslednje dekade, mnogi aspekti ove tehnike su unapređeni kada se govorи o razvoju nosača i tehnika ćelijskih kultura. Trenutno se istražuju uzbudljive mogućnosti, kao što je potencijal za korišćenje alogenih ćelija (*Le Blanc et al., 2003; Di Nicola et al., 2002*) i ćelija koje su poreklom od drugih tkiva kao što je masno tkivo (*Liu et al., 2007*) ili čak periferna krv (*Wan et al., 2006*). Ipak, neki aspekti tehnike ostaju težak izazov koji se mora rešavati u budućnosti. Prvo, problem svih tkiva ćelijski baziranog inženjeringu, uključujući i kost, predstavlja snabdevanje ćelija kiseonikom i nutrijentima, pošto se ugrade implanti kliničkih dimanzija. Istraživanje prirode i mehanizama delovanja faktora rasta koji podstiču angiogenezu je jedan vid tretiranja ovog problema. Druga strategija je prevaskularizacija konstrukta dodavanjem endotelnih ćelija. Ovo će zahtevati primenu novih tehnologija kako bi se omogućilo povezivanje implanta i krvne mreže domaćina.

Drugi problem predstavlja trajna potraga za boljim nosačima, koji bi trebalo da budu biokompatibilni i imaju pogodnu 3D poroznu strukturu i biomehanička svojstva, pri čemu ostaju razgradivi i osteokonduktivni. Kao i (autologi) koštani kalem, oni moraju imati ulogu privremenog okvira za ćelije dok se ne obrazuje nova kost. Biokeramike građene od 100% HA poseduju veliku snagu na mehanička opterećenja, ali se ne mogu resorbovati. Nasuprot tome, nosači napravljeni od prirodnog korala ili trikalcijum fosfata se resorbuju, ali se resorpција dešava previše brzo tako da su oni suviše krhki da izdrže težinsko opterećenje.

Nedavno je napravljena keramika koja se može resorbovati od strane osteoklasta kao u fiziološkom remodelovanju kosti. Ovo je možda pravac kojim treba ići da bi se razvio idealni nosač (*Langsraff et al., 1999, 2001; Mastrogiacomo et al., 2006, 2007*).

1.2.7.4. Buduće smernice u istraživanjima

Kao što se očekuje, tkivni inženjerинг kosti je obećavajući, ali je potrebno prevazići mnoge prepreke kako bi se on mogao smatrati pravom alternativom za autologe koštane kalemove. Sa ćelijskog aspekta, da bi se postigla ubrzana vaskularizacija u cilju potpore obrazovanja kosti i da bi se bolje razumeli međusobni odnosi osteoblasta i endotela u tkivnom inženjeringu kosti, potrebno je uraditi obimna pretklinička ispitivanja. Potrebno je da *in vitro* studije čine osnovu selekcije faktora i kriterijuma za razvoj novih strategija u cilju ubrzavanja perfuzije nosača i njihovog povezivanja sa vaskularnom mrežom domaćina.

Rešenje problema može biti dodavanje faktora rasta koji stimulišu rast krvnih sudova. Drugi pristup za zaobilaznje problema ćelijkog prehranjivanja i toksičnosti kalijuma, indukovane hematomima, može biti prethodno ugrađivanje nosača, koje je praćeno ubrizgavanjem BMSC ćelija u drugoj proceduri. U tom trenutku, u hematomu su prisutni novi nastavci krvnih sudova i samim tim dovoljno kiseonika i hrane se može isporučiti nakon ubrizgavanja BMSC ćelija, što povećava šanse za opstanak ubrizganih ćelija.

U međuvremenu treba da postoji oprezan pristup kliničkoj primeni budući da su prijavljeni neki zabrinjavajući rezultati u pionirskom kliničkom radu, kao što je slučaj rekonstrukcije palca kod jednog pacijenta (*Hentz and Chang, 2001; Vacanti et al., 2001*) ili serija od 27 pacijenata sa augmentacijom vilice (*Schimming and Schmelzeisen, 2004*). Kod ove dve publikacije očigledno nedostaju dokazi preživljavanja transplantiranih ćelija. Nivo prisustva kosti u konstruktu bi mogao jednostavno da ukazuje na uspešnu osteokondukciju sa susedne kosti domaćina na korišćene transplante. Ovaj koncept je prikazan i u sličnoj ali temeljnijoj studiji od strane Meijer et al. (2007) koji je radio na ektopičnom modelu miša kako bi pokazao osteogeni potencijal ćelija, ali je ponovo naglasio ograničenja biopsija uzetih sa sklopova tkivnog inženjeringu kod kojih se ne može utvrditi poreklo ćelija. Ove studije ukazuju da je ćelijski baziran tkivni inženjerинг još uvek daleko od odobrenja za kliničku primenu od strane zakonodavnih organa u

oblasti zdravstvene nege (*Logeart-Avramoglou et al., 2005; Muschler et al., 2004*). Zbog toga, treba shvatiti da je dugoročni cilj razvoj strategija koje iskorišćavaju endogeni regenerativni kapacitet lokalnih tkiva, uključujući i ćelije domaćina. Ovo može dovesti do situacije gde *ex vivo* ekspanzija i, ponekad, diferencijacija ćelija domaćina neće više biti neophodna, što može biti jeftinije i manje komplikovano u smislu zakonski regulatornih problema zdravstvene zaštite.

Krupan izazov sa kojim se suočava inženjerинг koštanog tkiva u pogledu razvoja nosača je postizanje adekvatne ravnoteže između mehaničkih svojstava, porozne arhitekture i razgradivosti, pri čemu se zadržava osteokonduktivnost i biokompatibilnost. Metode razvoja nosača koje najviše obećavaju se fokusiraju na razumevanje bioloških procesa i osobina materijala na *nano* nivou. Proučavanje interakcije između biomolekula (faktora rasta ugrađenih u strukturu nosača) i ćelija kao i novih metoda sinteze nosača, kao što su elektrospining i upotreba nanofilera, može na kraju dovesti do boljih i efikasnijih nosača.

Jedan interesantan razvoj sa velikim potencijalom, jer nema ograničenja u pogledu faktora rasta i opstanka ćelija, predstavljaju intrinzični koštano-induktivni implantati kao što je demineralizovana kost. Nedavno je dokazano da su ove osobine nosača efikasne u stimulisanju obrazovanja kosti kod modela na životinjama (*Habibovic et al., 2006*).

2. PREDMET I CILJ ISTRAŽIVANJA

Predmet istraživanja je:

- Osteogeni efekat demineralizovane kosti u procesu zarastanja defekta kosti kod eksperimentalnih životinja.

Rešavanje ovog problema je bazirano na sledećim postavkama:

1. Da se osteogeni efekat demineralizovane kosti može proceniti kroz poređenje sa
 - osteogenim efektima mineralnog matriksa kosti, kao nedostajuće komponente u odnosu na potpuni matriks kosti,
 - čistim kolagenom, kao najzastupljenijom komponentom demineralizovane kosti
2. Da se mehanizam reparatornog potencijala nekog kostnog supstituenta može dobro proceniti ako se uporedi njegova osteogena aktivnost u ortotopičnom mestu sa ektopičnim mestima.

Ciljevi istraživanja su:

1. Utvrditi osteogene efekte ispitivanih materijala, supkutano implantiranih.
2. Utvrditi osteogene efekte ispitivanih materijala, intramuskularno implantiranih.
3. Na modelu kostnog defekta femura ispitati reparatori efekat:
 - a) mineralnog matriksa kosti;
 - b) kolagene membrane;
 - c) alogene demineralizovane kosti.
4. Proceniti efekat implantirane demineralizovane kosti kao potencijalne zamene za nedostajuće kostno tkivo.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

U eksperimentima su korišćeni pacovi soja Wistar, muškog pola starosti 3 meseca i telesne mase 250 - 300 g. Životinje su držane na sobnoj temperaturi (20 - 22°C) u 12 časovnom ciklusu svetla i mraka. Hranjene su i pojene *ad libitum*.

3.2. IMPLANTIRANI MATERIJALI

U eksperimentima su implantirana tri biomaterijala. Biomaterijal Bio-Oss® Osteohealth, Shirley, USA (slika 3.1) je proizveden od mineralnog matriksa goveđe kosti. Veličina granula je 0,25-1,0mm. Namjenjen je za supstituciju kosti u oralnoj, periodontalnoj i maksilofacialnoj hirurgiji.



Slika 3.1. Komercijalno pakovanje Bio-Oss®

Bio-Gide® Osteohealth, Shirley, USA (slika 3.2) je dvoslojna kolagena membrana proizvedena od tehnološki obrađenog svinjskog kolagena. Nalazi primenu kolagene matrice za regenerativne procese u oralnoj i maksilofacijalnoj hirurgiji.



Slika 3.2. Komercijalno pakovanje Bio-Gide®.

Za pravljenje implantata demineralizovane kosti uzeta je alogena kost dijafiznog dela femura pacova iste starosti. Dijafize femura su odvojene i očišćene od okolnog mišićnog i vezivnog tkiva kao i od kostne srži. Kost je smrznuta u tečnom azotu, a zatim smrvljena u avanu. Demineralizacija je vršena u 10% rastvoru EDTA na sobnoj temperaturi, uz stalno mešanje na magnetnoj mešalici, tokom 7 dana. Po završenoj demineralizaciji vršeno je ispiranje ostataka EDTA u fiziološkom rastvoru tokom 24 sata. Implantati demineralizovane kosti su pre implantacije dezinfikovani u 70% etanolu, a zatim isprani u sterilnom fiziološkom rastvoru.

3.3. ANESTEZIOLOŠKA I OPERACIONA PROCEDURA

Životinje su anestezirane intraperitonealnom injekcijom 10% Ketamina u dozi od 8mg/kg.

Na operativnom mestu je obrijana dlaka, a obrijano mesto je potom dezinfikovano Povidon jodom.

Subkutana implantacija je vršena u interskapularnom regionu tako što je skalpelom napravljen kratak rez 3-5mm i ispod kože ubačen implantat. Rez je zašiven hirurškim koncem.

Intramuskularna implantacija je vršena u musculus gastrocnemius. Ispod reza od 5-8mm odvojeni su potkožni delovi kako bi se pristupilo mišiću u koji je pomoću biopsione igle ubačen implantat. Rez je zašiven hirurškim koncem.

Implantacija u kostni defekt vršena je u distalnom delu femura. Napravljen je rez veličine 15-20mm u oblasti distalne trećine femurne osovine kako bi se razdvajanjem potkožnih slojeva i fascija okolnih mišića pristupilo dijafizno-metafiznom delu kosti.

Defekt u kosti distalnog femura pomoću zubarske bušilice SURGIC XT, SG50MS, NSK, JAPAN je izbušen burgijom dijametra 2.1mm. Konačni rezultat bušenja je rupa ili krater, napravljen slično kao što je opisano kod Tielinen (*Tielinen et al., 2001*). Zadnji deo korteksa je ostavljen intaktan kako bi osigurao oslonac i kretanje životinje.

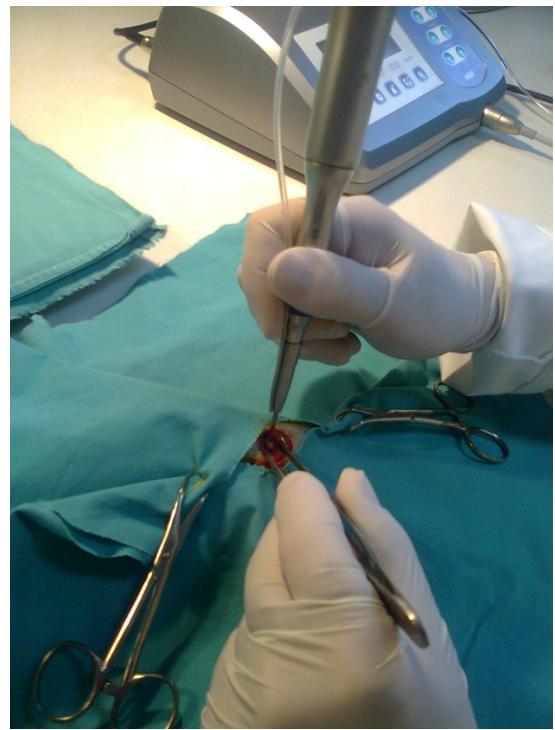
Implantacija jednog od biomaterijala je vršena na jednoj nozi, dok je na drugoj nozi rađena kontrolna operacija bez ubacivanja implantata. Mesta defekta su ispirana 0.9% NaCl kako bi se uklonili ostaci kosti, krvi i iscurele kostne srži i na taj način je onemogućeno pregrevanje i uticaj spoljašnjih faktora. Nakon ispiranja defekta 0.9% rastvorom NaCl radi uklanjanja fragmenata tkiva ubačen je implantat, a okolni mišić, fascija i koža su zašiveni. Operacionatehnike prikazana na slikama 3.3 do 3.6.

Nakon povratka svesti, životinje su vraćene u svoje kaveze. Monitoring je rađen svakog dana za vreme prve nedelje nakon operacije, a posle toga je rađen jednom nedeljno. Životinjama su proveravani masa, zarastanje rane, uzimanje hrane i vode, kao i znaci iznurenosti i imobilnosti.

Životinje su žrtvovane posle 1, 3 i 6 nedelja postoperativno jednokratnim davanjem visoke doze anestetika.



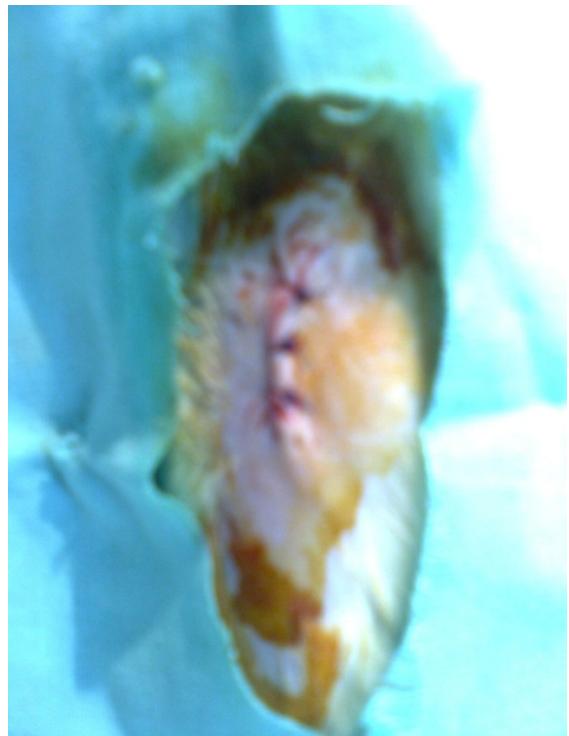
Slika 3.3. Priprema operativnog mesta.



Slika 3.4. Bušenje defekta u femur.



Slika 3.5. Ubacivanje implantata u kostni defekt.



Slika 3.6. Šavovi na operativnom mestu.

3.4. EKSPERIMENTALNI DIZAJN

Da bi se sagledao efekat organske komponente kostnog tkiva u reparaciji kostnog defekta kao komparativna kontrola služio je mineralni matriks kosti od hidriksiapatita u vidu komercijalnog preparata Bio-Oss®. Sam kolagen, kao glavni sastojak organske komponente kosti, u vidu komercijalnog preparata Bio-Gide® je posebno testiran na modelu kostnog defekta u komparaciji sa mineralnom komponentom.

Negativna kontrola je bila samo defekt bez implantiranog biomaterijala.

U ovoj disertaciji korišćena su tri eksperimentalna modela: subkutani, intramuskularni (ektopični modeli) i femurni kostni defekt (ortotopični model).

Svi modeli su imali tri eksperimentalne grupe: grupu sa implantacijom mineralnog matriksa; grupu sa implantacijom kolagene membrane i grupu sa implantacijom alogene demineralizovane kosti.

U svakoj od eksperimentalnih grupa ekstrakcija implantata je rađena posle 3 vremenska perioda: 1, 3 i 6 nedelja, kako bi se sagledala dinamika bioloških promena u procesu reakcije organizma na implantat i efekti na zarastanje kosti.

3.5. PATOHISTOLOŠKA ANALIZA

Uzimani su uzorci implanatata sa delom okolnog tkiva i fiksirani u 10% formalinu sa fosfatnim puferom. Fiksacija je ključna za prezervaciju tkivne strukture i sprečavanje ćelijske autolize od strane enzima, ćelijske razgradnje, degradacije tkiva i degeneracije proteina. Formaldehid obrazuje unakrsne veze između susednih proteinских lanaca i ćelije čini pogodnim za bojenje. Tkivo sa implantatom je dekalcifikovano u 10% EDTA kako bi se uklonile neorganske komponente iz tkiva i olakšalo sečenje tkiva za histološku i histohemijsku analizu.

3.6. HISTOHEMIJSKA BOJENJA

Fiksirana i dekalcifikovana tkiva su dalje obrađena prema standardnom laboratorijskom protokolu. Tkiva su dehidrirana postepeno od 70% do apsolutnog etanola i isprana ksilenom. Tkiva su zatim učvršćena u parafinu i sečena (debljina preseka 3-6 μ m) na mikrotomu LEICA RM2255, GERMANY. Preseci su sušeni u laboratorijskoj peći na 56°C preko noći, a zatim su bojeni Harrisovim hematoksilinom i eozinom (H&E), Masonovim trihromom, PAS (Periodic-acid Schiff), Jones i Toluidin plavim.

Hematoksilin-eozin je standardna histološka metoda bojenja koje se koristi za definisanje ćelijskih struktura. Hematoksilin je bazna boja koja kisele strukture tkiva boji plavo, dok eozin predstavlja kiselu boju i boji u različite nijanse crvene pozitivno nanelektrisane strukture, kao što je citoplazma.

Masonov trihrom je korišćen kako bi se pojedine strukture tkiva definisale različitim bojama. Za ovu tezu je uzet protokol sa Weigertovim hematoksilinom, kiselim fuksinom, fosfomolibdenskom kiselinom i metil plavim. Na ovaj način jedro se boji ljubičasto plavo, kolagen svetlo plavo ili svetlo zeleno, a kostna srž i krvni sudovi roze.

PAS metodom, tkivne strukture koje sadrže visoke koncentracije ugljenohidratnih makromolekula (glikogen, glikoproteini, proteoglikani), boje se purpurno, sa posebnom namenom u vizualizaciji bazalnih membrana i struktura koje sadrže visoke količine šećernih komponenti, kao što je mlado sintetisani ekstracelularni matriks.

Jones-ov metod histohemijskog bojenja, označava ugljenohidratne komponente ekstracelularnog matriksa, preko mehanizma oksidacije do aldehyda i njihove posledične upotrebe za redukciju soli srebra do metalizovanog stanja na ciljnim mestima.

Toluidin plavo je upotrebljeno za histohemijsko obeležavanje anjonskih glikokonjugata, kao što su proteoglikani i glikozaminoglikani, dajući reakcioni produkt u različitim nijansama i intenzitetima plave boje, čime se markiraju novi delovi ekstracelularnog matriksa i granule mastocita.

3.7. SVETLOSNA MIKROSKOPIJA

Morfološka analiza i stepen proliferacije ćelija u implantiranim biomaterijalima na obojenim histološkim preparatima vršena je na invertno-fazno-kontrastnom mikroskopu AXIO OSERVER Z.1, CARL ZEISS. Fotomikrografije su snimljene digitalnom kamerom AXIOCAM, CARL ZEISS pomoću softvera AXIOVISION 4.7.1, CARL ZEISS.

3.8. SEM ANALIZA

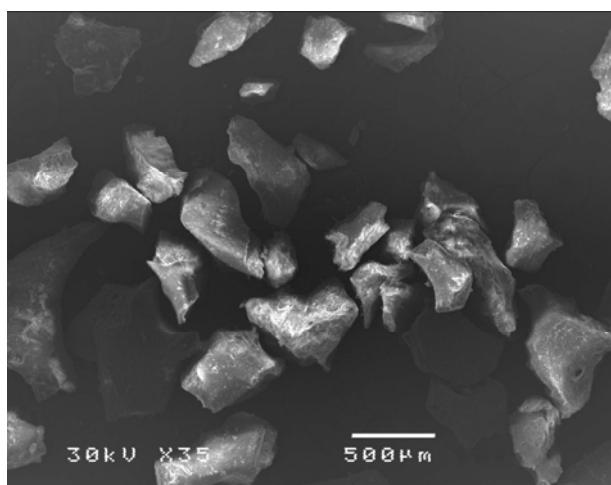
Mikrostruktura površine uzoraka ispitivanih biomaterijala, pre i posle implantiranja, analizirana je skening elektronском mikroskopijom (SEM) na uređaju JSM 5300, JEOL. Uzorci su fiksirani u 0,4% gluteraldehidu 24 sata, a posle ispirani u 0,2M PBS-u (pH7,2–7,4). Postfiksacija je vršena sa 1% osmium tetroksidom u veronalnom puferu (pH7,2–7,4) tokom 2 sata. Fiksirani uzorci su dehidrirani u rastućim koncentracijama alkohola, a zatim u rastućim koncentracijama acetona. Dehidrirani uzorci su sušeni u tečnom CO₂. Osušeni uzorci su zlatom spaterovani u jonskom naparivaču JFC 1100E JEOL.

4. REZULTATI

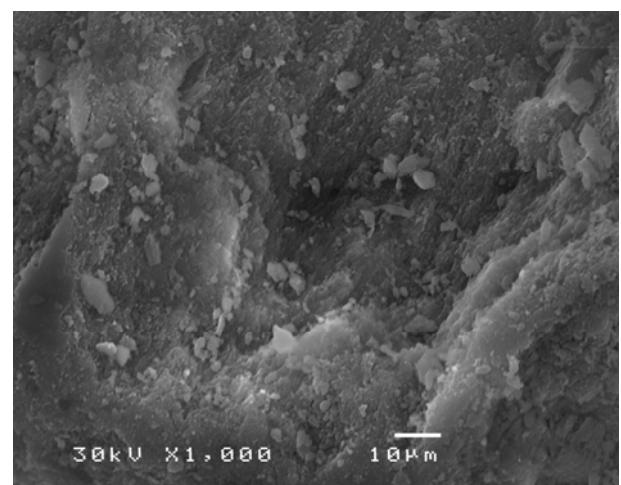
4.1. ANALIZA MATERIJALA PRIPREMLJENIH ZA IMPLANTACIJU

4.1.1. Analiza mineralnog matriksa

SEM analiza mineralnog matriksa pokazuje granularnu strukturu različite veličine i nepravilnog oblika (Slika 4.1). Na većem uvećanju na površini partikula se zapaža sitnogranularna struktura i mikropore koje se pružaju u dubinu materijala (Slika 4.2).



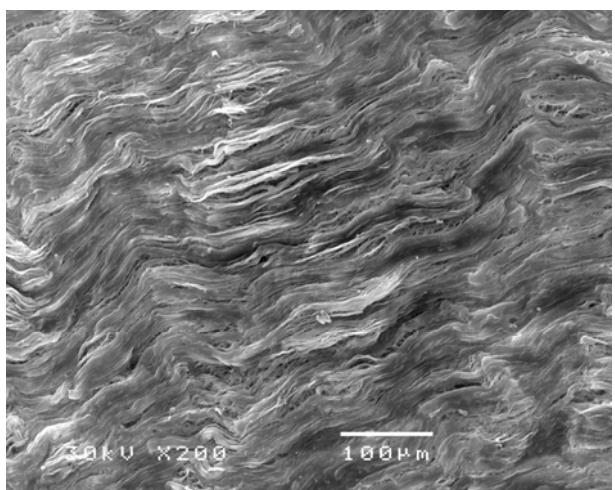
Slika 4.1. SEM izgled partikula mineralnog matriksa.



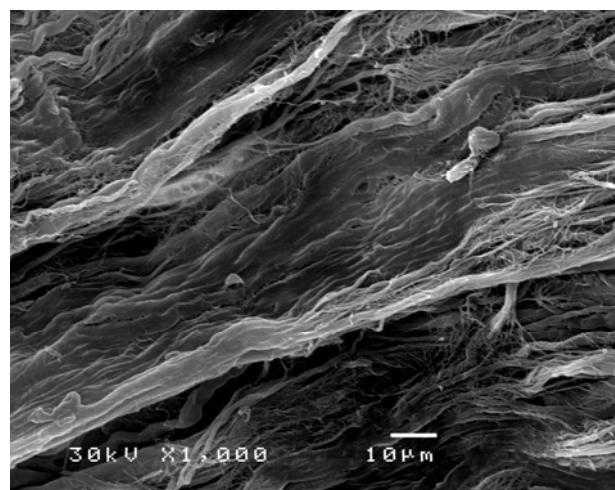
Slika 4.2. SEM mikrostruktura površine partikula mineralnog matriksa.

4.1.2. Analiza kolagene membrane

Analiza kolagene membrane pokazuje vlaknastu talasasto gusto upakovani strukturu (Slika 4.3). Mestimično postoje rascepi sa pojedinačno odvojenim vlknima i oklno mrežastom strukturom (Slika 4.4).



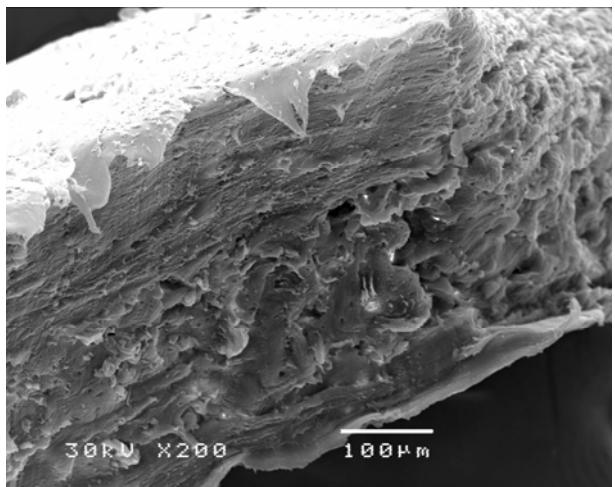
Slika 4.3. SEM kolagene membrane.



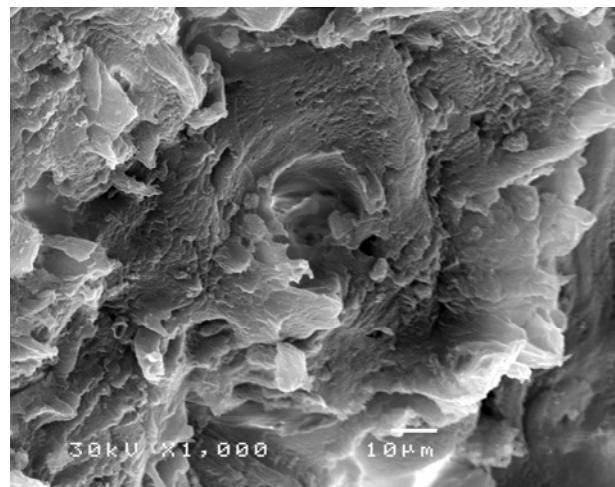
Slika 4.4. SEM mikrostruktura kolagene membrane.

4.1.3. Analiza demineralizovane kosti

Na uzorcima preimplantne demineralizovane kosti prisutan je periosteum i endosteum u vidu membrane sa spoljašnje i unutrašnje strane (Slika 4.5). U delu kompaktne kosti zapaža se originalna anatomska mikroarhitektura sa očuvanim Haverzovim kanalima i drugim mikropornim elementima (Slika 4.6).



Slika 4.5. SEM partikule demineralizovane kosti.



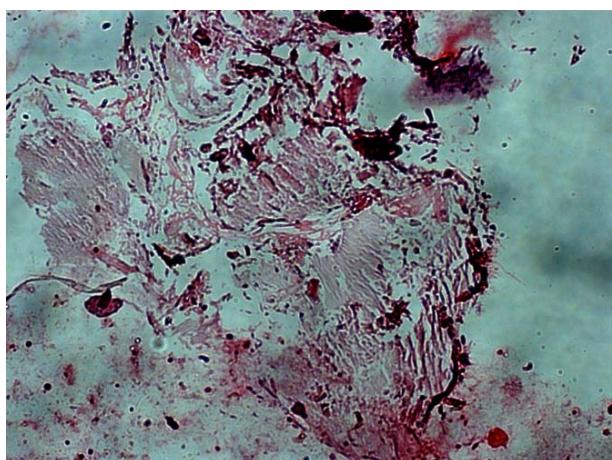
Slika 4.6. SEM unutrašnje strukture demineralizovane kosti.

4.2. EFEKTI SUBKUTANE IMPLANTACIJE

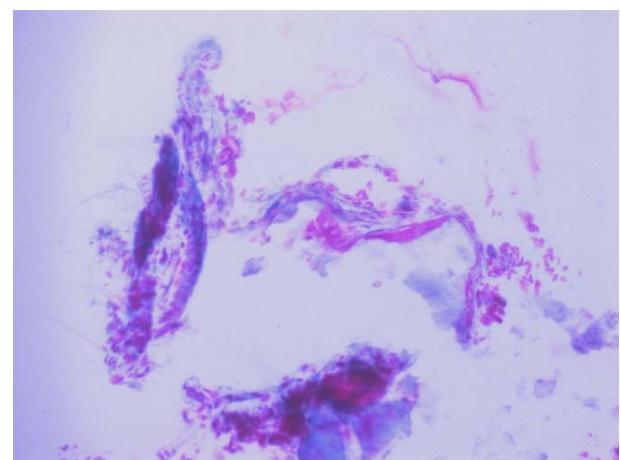
4.2.1. Stanje I nedelje posle implantacije

4.2.1.1. Histološki nalaz posle implantacije mineralnog matriksa

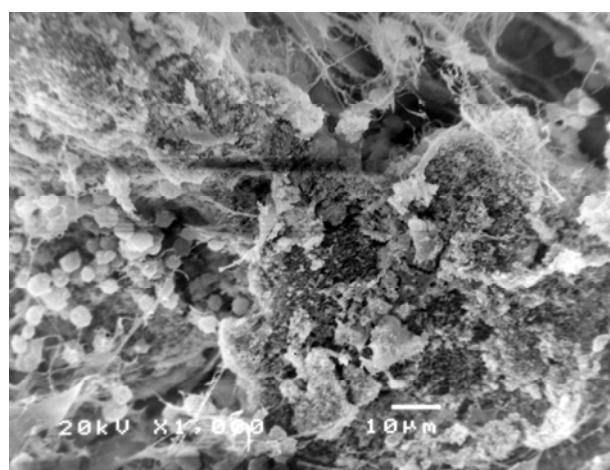
Implantirani mineralni matriks pokazuje kompaktnu strukturu (Slika 4.7). Oko implantata zapažaju se ostaci hemoragije, infiltracija makrofagnih ćelija i fibroblasta (Slika 4.8 i 4.9).



Slika 4.7. Izgled implantiranog mineralnog matriksa. (Mason trihrom)



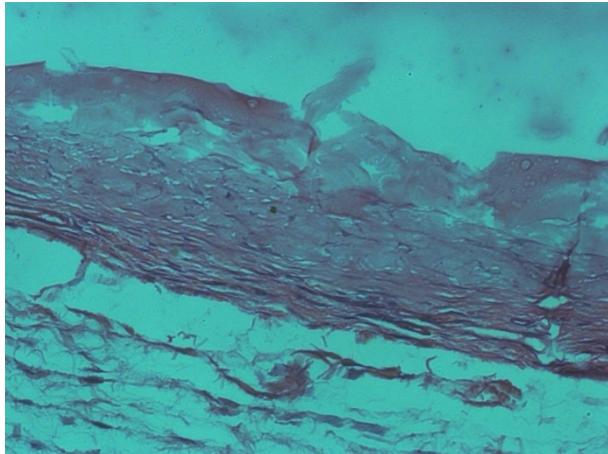
Slika 4.8. Ćelijski infiltrat i vezivna kapsula oko implantata mineralnog matriksa.(PAS)



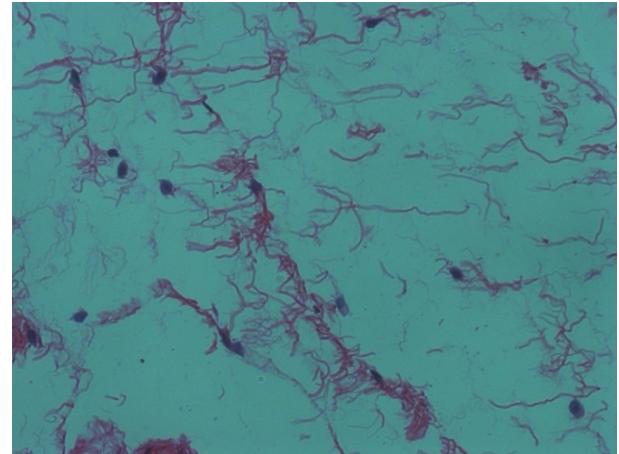
Slika 4.9. SEM mikrografija implantiranog mineralnog matriksa.

4.2.1.2. Histološki nalaz posle implantacije kolagene membrane

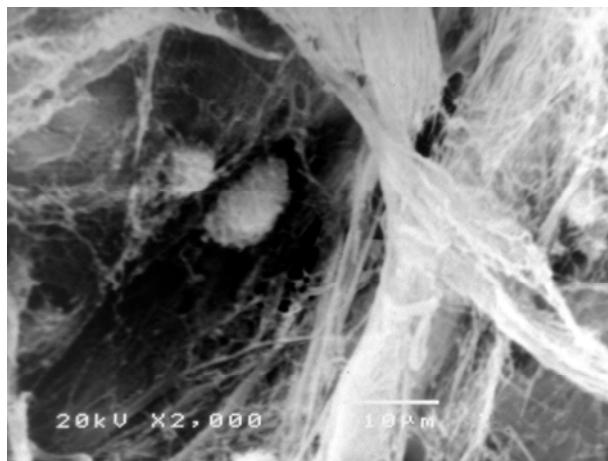
Na uzorcima subkutano implantirane kolagene membrane zapaža se infiltracija fibroblastnih ćelija u implantat. Implantat ima još uvek originalnu konzistenciju (Slika 4.10). Infiltracija fibroblasta ide iz okolnog mekog tkiva (Slika 4.11 i 4.12).



Slika 4.10. Implantat kolagene membrane sa okolnim tkivom. (Mason trihrom x100)



Slika 4.11. Ćelije uz površinu implantata kolagene membrane. (Mason trihrom x200)



Slika 4.12. Vezivanje ćelija za implantat kolagene membrane. SEM

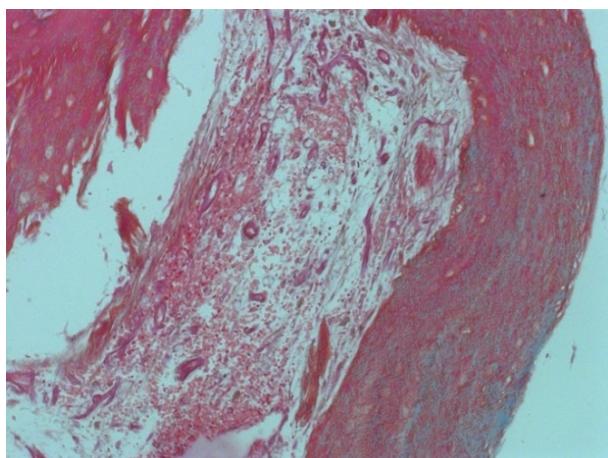
4.2.1.3. Histološki nalaz posle implantacije demineralizovane kosti

Na uzorcima subkutano implantirane demineralizovane kosti u prvoj nedelji od početka eksperimenta zapaža se najvećim delom očuvana masa implantata (Slika 4.13). Implantat pokazuje strukturu lamelarne kosti sa prirodnim odnosom lamela, odsustvo minerala, prisustvo Haverzovih kanala i osteocitnih lakuna (osteoplasti). Najveći broj ćelija koje pripadaju lamelarnoj kosti ili pokazuje odsustvo ili je u devitalizovanom

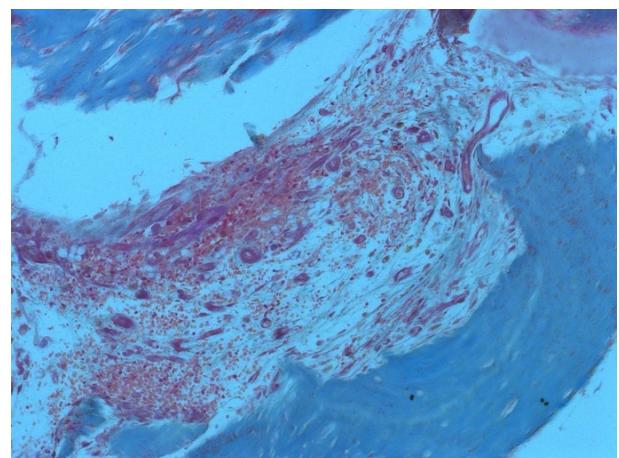
stanju i to do 90% od ukupnog broja. Međutim, u ostatku originalna ćelijska populacija pokazuje znake vitalnosti u vidu pojedinačnih osteocita i sadržaju Haverzovih kanala.

Površina implanta je na pojedinim mestima u manjoj meri resorbovana reakcijom okolnog vezivnog tkiva po tipu slabo razvijenog granulomatoznog tkiva do mlado organizovanog fibroznog vezivnog tkiva (Slika 4.14). Po površini implantata, u najvećem njegovom delu, zapaža se tanka membrana sačinjena od fibroblastolikih ćelija koje grade periosteoidnu formaciju. Njena razvijenost je najizraženija na okrajcima (na užim krajevima na završecima implanta) gde se povećava na debljinu od nekoliko (4-5) slojeva fibroblastolikih ćelija gde se stiče utisak da proces formiranja periosteoidnog sloja ima najuznapredovaniji tok (Slika 4.15). Ima se utisak da se infiltracioni proces odvija po dužini implantata, uglavnom prateći pružanje paralelno usnopljenih lamela demineralizovane kosti (Slika 4.16 i 4.17). U ostatku materijala, van periosteoidne reakcije, uočava se normalno žuto masno tkivo u kome se zapažaju sporadične zapaljenske ćelije sa retkim fokalnim infiltratima po tipu hroničnog inflamatornog odgovora. Mestimično takođe se zapaža umereno povećanje broja krvnih sudova neposredno uz implantat ili u okviru njegove bliže okoline.

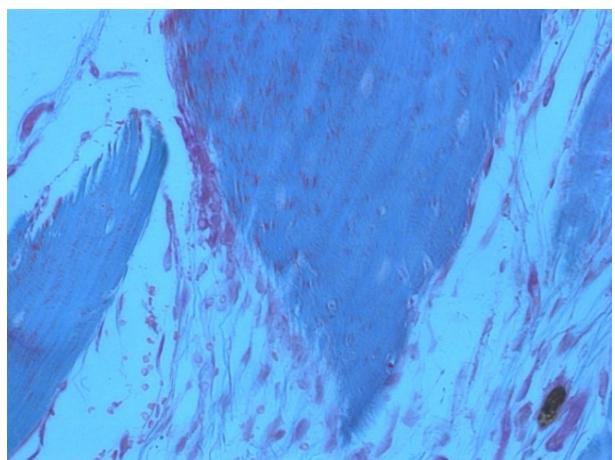
Trihrom bojenje pokazuje da je ceo implantat dobro obojen na kolagen što je u saglasnosti sa prethodno viđenim stanjem o snažnoj ćelijskoj infiltraciji.



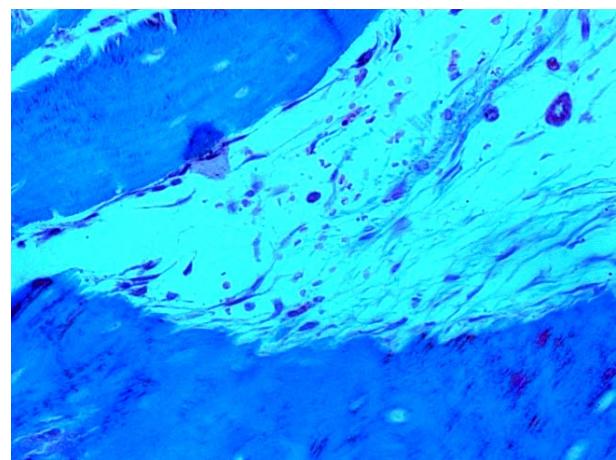
Slika 4.13. Granulomatozna reakcija na strano telo.(HE x100)



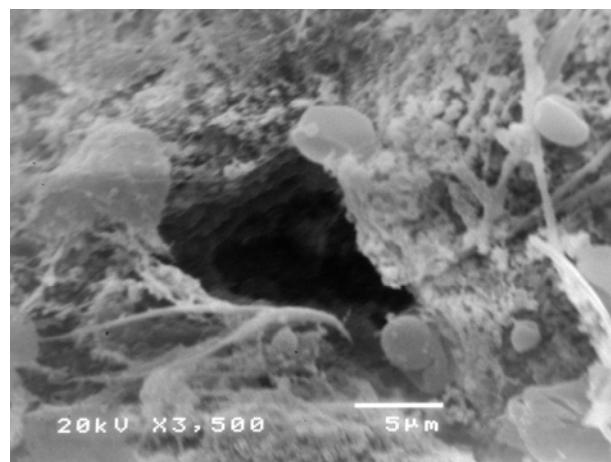
Slika 4.14. Rastresita vezivna kapsula sa krvnim sudovima. (Mason trihrom x100)



Slika 4.15. Kontakt infiltriranih ćelija sa implantatom. (Mason trihrom x100)



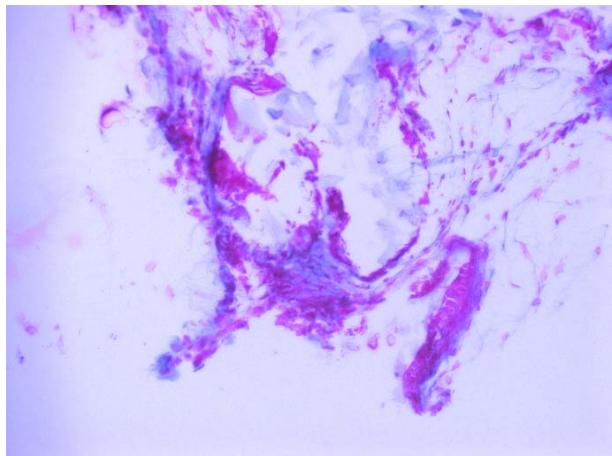
Slika 4.16. Pravac migracije ćelija.(PAS x200)



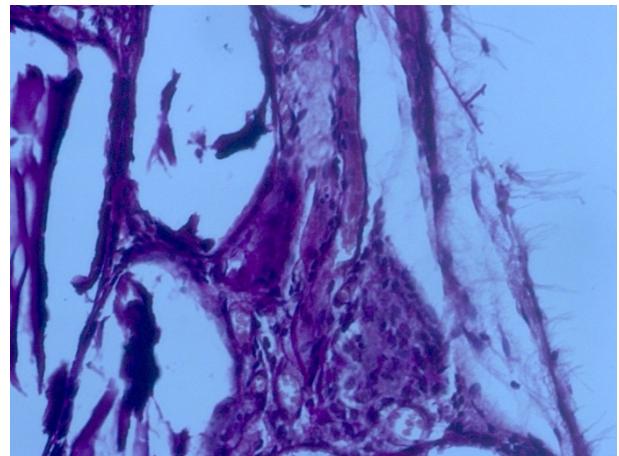
Slika 4.17. Prodor ćelija u prazan prostor implantata. SEM

4.2.2. Stanje III nedelje posle implantacije

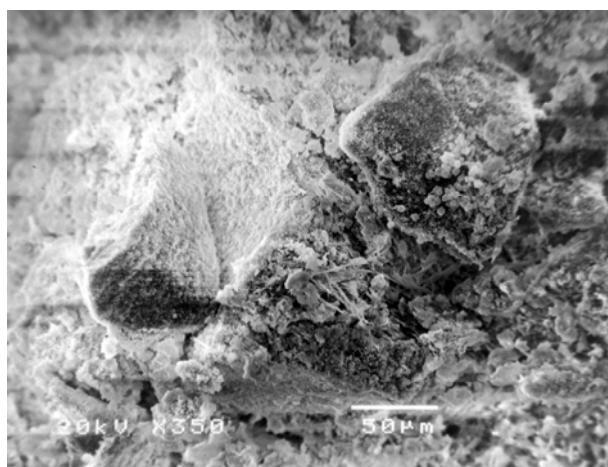
4.2.2.1. Histološki nalaz posle implantacije mineralnog matriksa



Slika 4.18. Vezivnotkviva kapsula oko implantata.(PAS x100)



Slika 4.19. Granulomatozna reakcija uz implantat. (Mason trihrom x200)

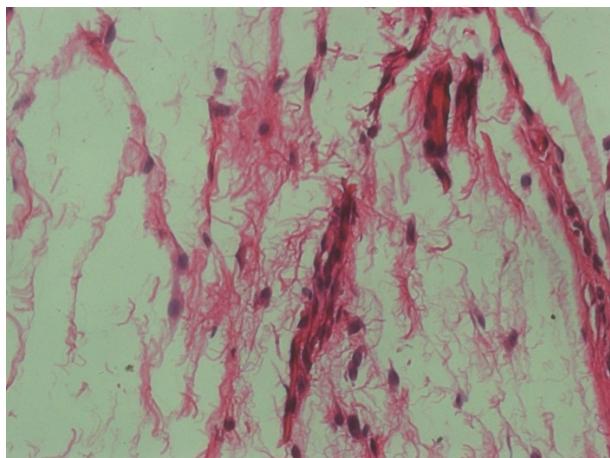


Slika 4.20. Vezivnotkviva kapsula i ćelije oko partikule implantata. SEM

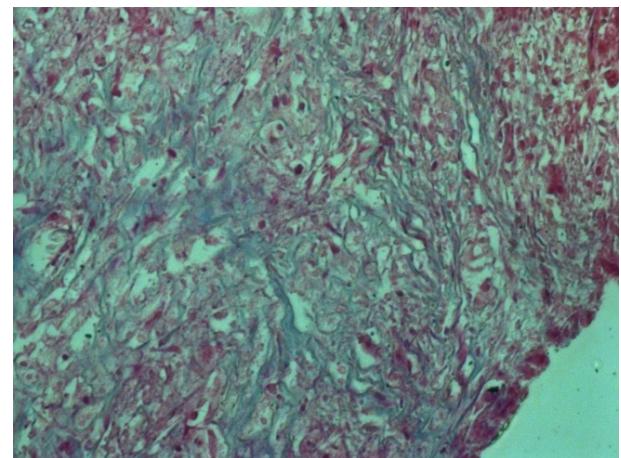
Posle 3 nedelje partikule implantiranog mineralnog matriksa su obavijene vezivnom kapsulom. Na granici kapsule i partikule uočavaju se depoziti koji su posledica aktivnosti ćelija (Slika 4.18). U vezivnoj kapsuli su prisutne nakupine ćelija koje ukazuju na granulomatoznu reakciju (Slika 4.19 i 4.20).

4.2.2.2. Histološki nalaz posle implantacije kolagene membrane

Posle tri nedelje od implantacije kolagene membrane uz implantat je prisutno rastresito vezivno tkivo u kome se uočavaju aktivne ćelije uz i na fragmentima implantata (Slika 4.21). Unutrašnjost implantata je infiltrirana ćelijama i prožeta kolagenim vlaknima (Slika 4.22).



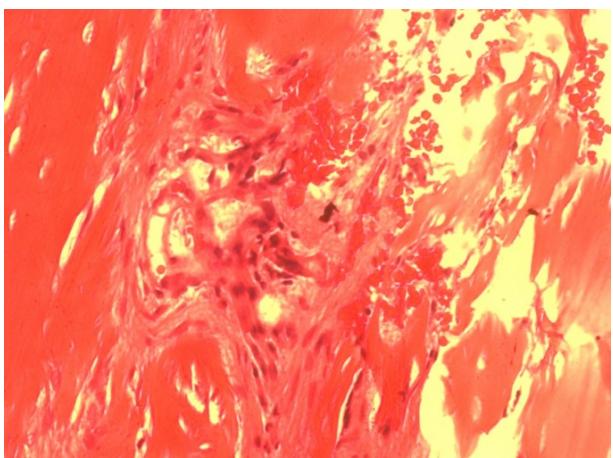
Slika 4.21. Rastresito vezivno tkivo uz implantat kolagene membrane.(HE x200)



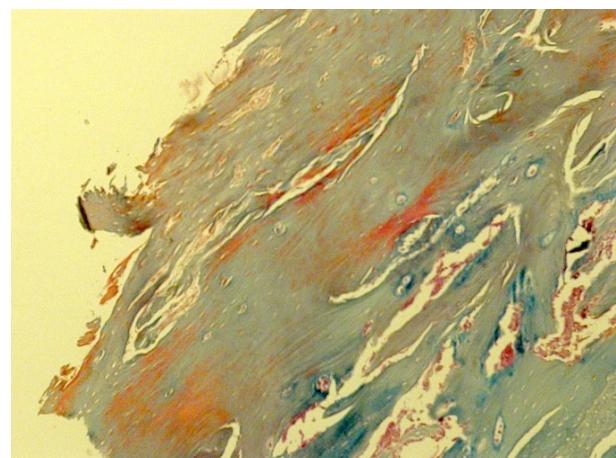
Slika 4.22. Infiltrat ćelija i kolagena u implantatu kolagene membrane. (Mason trihrom x100)

4.2.2.3. Histološki nalaz posle implantacije demineralizovane kosti

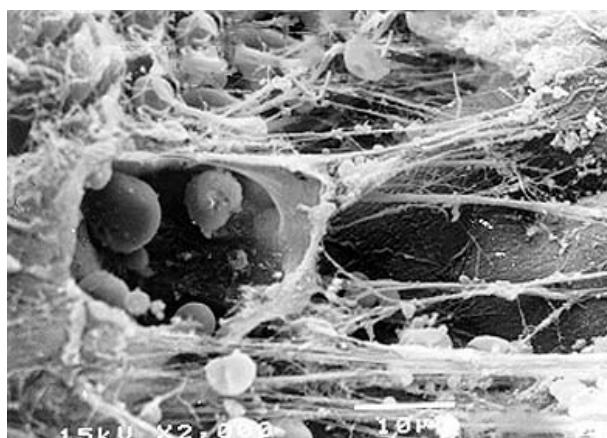
Posle implantacije demineralizovane kosti sve pukotine u implantatu su popunjene ćelijama. Što je manje konzistentan (kompaktan) implantat, ima više ćelija (Slika 4.23). Haverzovi kanali, kao i po neka lakuna su zaposednuti ćelijama. U nekim kanalima su ćelije gusto nastanjene. Kanali demineralizovane kosti su popunjeni sa najmanje dva tipa ćelija po izgledu jedra, sa sitnim heterohramatinskim ili krupnim euhromatinskim jedrom, koje su po obliku okrugle, vretenaste i polimorfne. Za njihovo useljavanje su poslužili Haverzovi kanali iz kojih su, kako se vidi na histološkim slikama, pravljeni novi kanali i stvarani novi prostori za ćelijsku infiltraciju (Slika 4.24). Mesta useljavanja su i prethodno degradisana polja u implantatu. Vide se mesta na površini implantata koja su naseljena osteoblastima. Prodor osteoklasta i osteoblasta u Haverzov sistem formira osteogena žarišta (Slika 4.25).



Slika 4.23. Najintenzivnija resorpcija na krajevima.(HE x200)



Slika 4.24. Zona intenzivne resorpcije gde je površina iskidana. (Mason trihrom x100)



Slika 4.25. Invazija ćelija u resorptivno polje na implantatu demineralizovane kosti. SEM

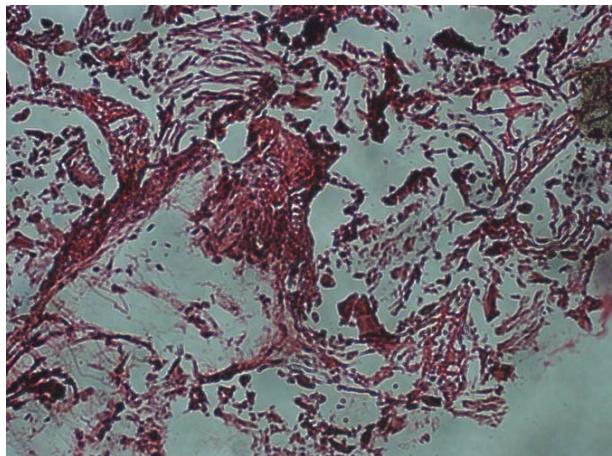
Na površini implantata se vide znaci angiogeneze. Neravni krajevi implantata su osteogeno najaktivniji. Veziva kapsula oko implantata je tanka, rastresita i bogata krvnim sudovima.

Trihrom bojenje pokazuje kolagenu reakciju sa većim ćelijskim odgovorom i krvnim sudovima. Iskidani krajevi implantata služe za hvatanje ćelija i intenziviranje kolagenogeneze. Kolagen zaposeda raspoloživi prostor u implantatu i oko njega. Za krajeve implantata obično su vezana kolagena vlakna. Oko praktikula implantata DK je razvijena veziva kapsula sa mnoštvom krvnih sudova. Pojava krvnih sudova je znak snažne ćelijske reakcije, intenziviranja procesa degradacije implantata i kolagenogeneze.

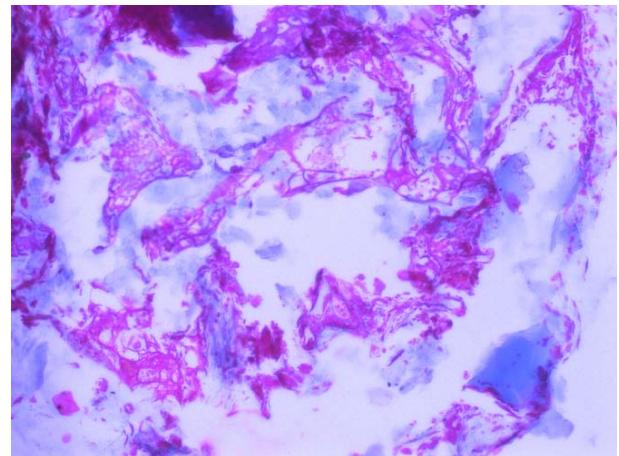
Polja sa jačom akumulacijom kolagena, koja su posledica rada infiltriranih ćelija, predstavljaju predfazu formiranja nove kosti.

4.2.3. Stanje VI nedelje posle implantacije

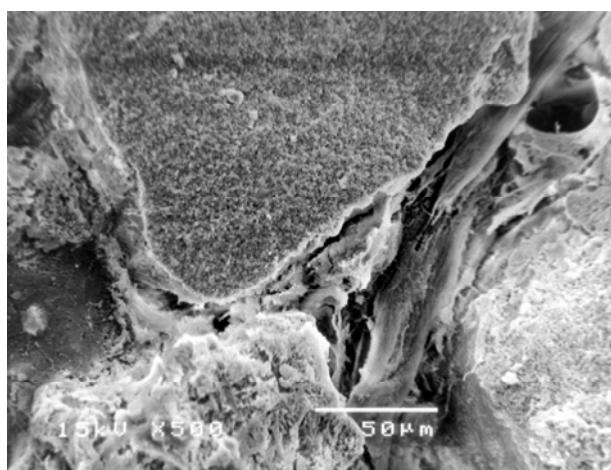
4.2.3.1. Histološki nalaz posle implantacije mineralnog matriksa



Slika 4.26. Izmenjena fizička struktura implantata mineralnog matriksa. (Mason trihrom x100)



Slika 4.27. Depoziti kolagena u partikule implantiranog mineralnog matriksa. (PAS x100)

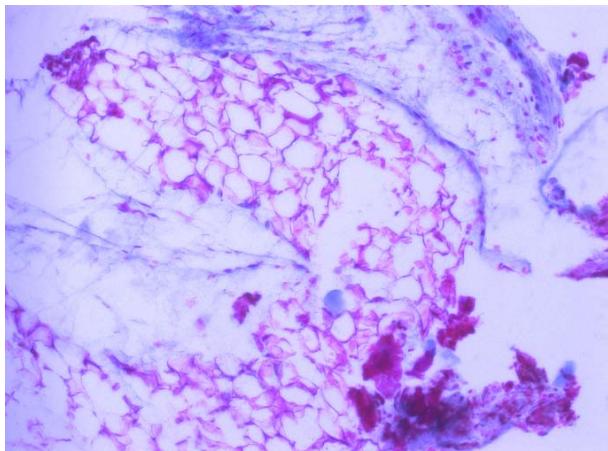


Slika 4.28. Partikula implantata mineralnog matriksa i vezivna kapsula. SEM

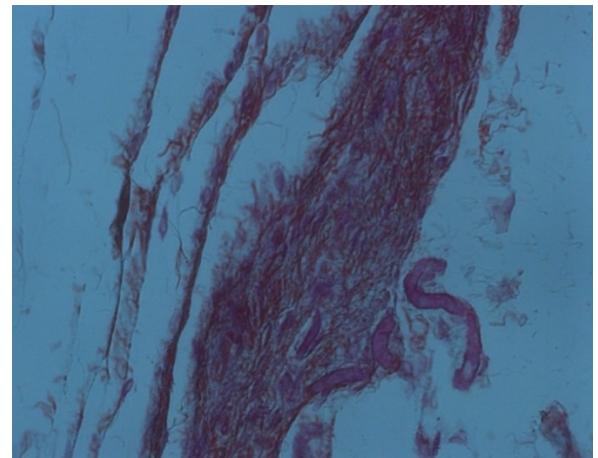
Histološki nalaz na implantatima mineralnog matriksa posle 6 nedelja pokazuje da je fizička struktura implantata promenjena (Slika 4.26 i 4.28). PAS bojenje pokazuje da je između partikula, a delom i u njihovoј unutrašnjosti, nataložen kolagen (Slika 4.27). Intenzivnije obojena polja uz ivicu implantata ukazuju na intenzivan proces ektopične osteogeneze.

4.2.3.2. Histološki nalaz posle implantacije kolagene membrane

Posle 6 nedelja od implantacije kolagene membrane u okolnom rastresitom vezivu oko implantata nakuplja se adipozno tkivo (Slika 4.29). Slika 4.30 pokazuje da se implantat kolagene membrane resorbuje u vidu odvajanja pojedinačnih vlakana. Kroz implantat i pored njega uočavaju se krvni sudovi.

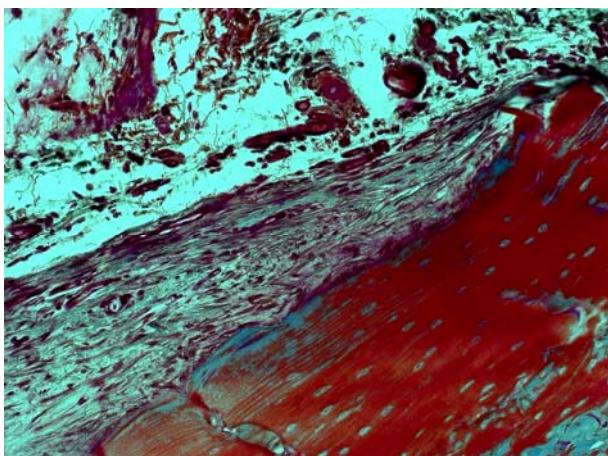


Slika 4.29. Adipozno tkivo oko implantata kolagene membrane.(PAS x100)

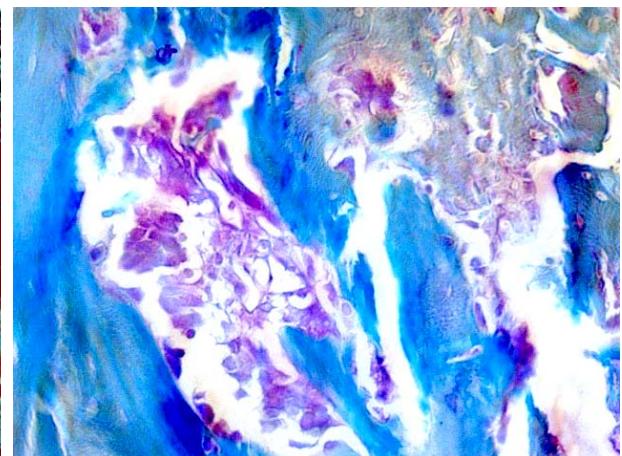


Slika 4.30. Krvni sudovi i detalj resorpcije kolagene membrane. (Mason trihrom x100)

4.2.3.3. Histološki nalaz posle implantacije demineralizovane kosti



Slika 4.31. Deo implanta demineralizovane kosti sa okolnom vezivnom kapsulom. (Mason trihrom x100)



Slika 4.32. Resorptivno polje unutar implanta. Kolagenogeneza i osteogeneza. (PAS x200)

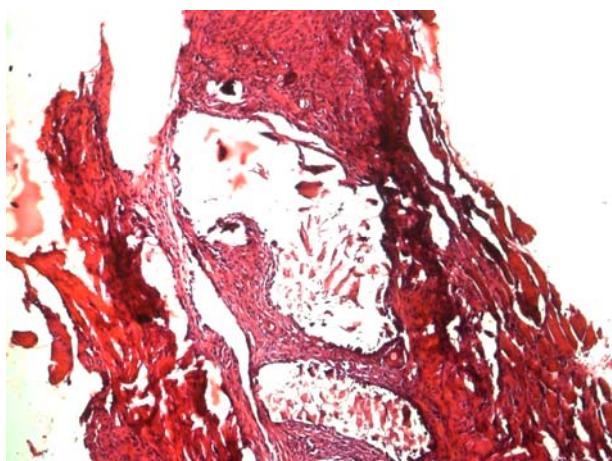
Posle 6 nedelja zapaža se snažna vezivna reakcija u implantatu, resorpcija implantata i početak stvaranja nove kosti (Slika 4.31). Vezivna kapsula je izgrađena od zrelog veziva ka implantatu, a periferija od rastresitog veziva. Zapaža se bogata

vaskularna mreža u regionu implatata. Na slici 4.32 vidi se intenzivna resorpcija i invazija ćelija u implantat. Lakune su naseljene ćelijama nalik osteocitima. Kako izgleda, putevi migracije ćelija idu preko Haverzovih kanala. Na mnogo mesta unutar implantata infiltrati ćelija formiraju vezivno tkivo u poljima resorpcije. PAS pozitivnost ovih ćelija potvrđuje da su one kolageno sintetske. Na ivicama ovih polja prisutne su cementne linije, kao znak formiranja nove kosti aktivnošću osteoblastnih ćelija koje intimno naležu na demineralizovani matriks kosti. Ovako nastali kostni i kolageni depoziti su deo ektopično novoformirane kosti.

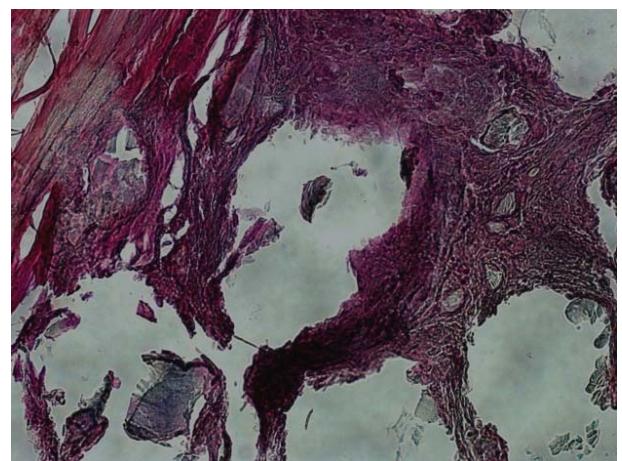
4.3. EFEKTI INTRAMUSKULARNE IMPLANTACIJE

4.3.1. Stanje I nedelje posle implantacije

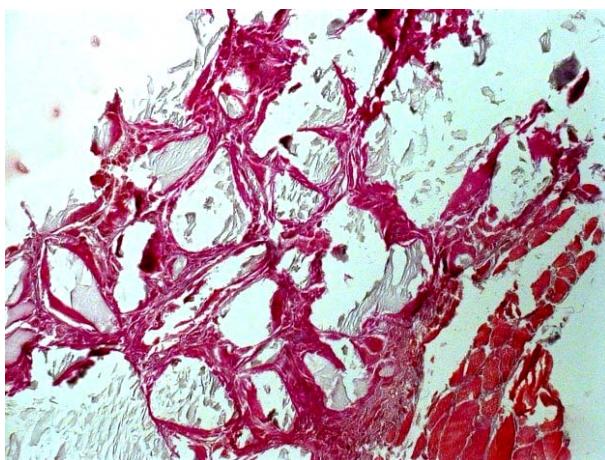
4.3.1.1. Histološki nalaz posle implantacije mineralnog matriksa



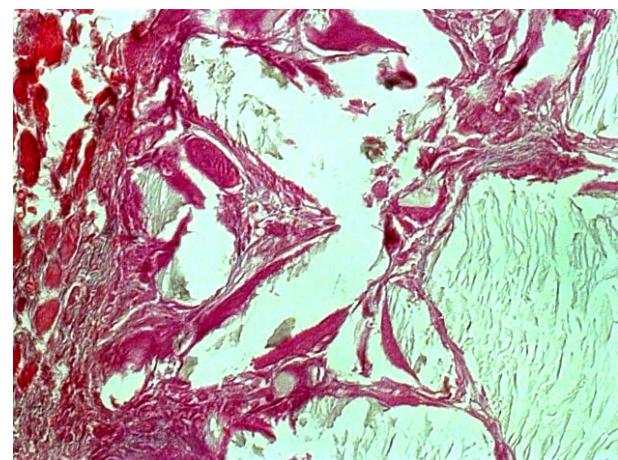
Slika 4.33. Vezivna kapsula i ćelijski detritus pomešan sa materijalom.(HE x100)



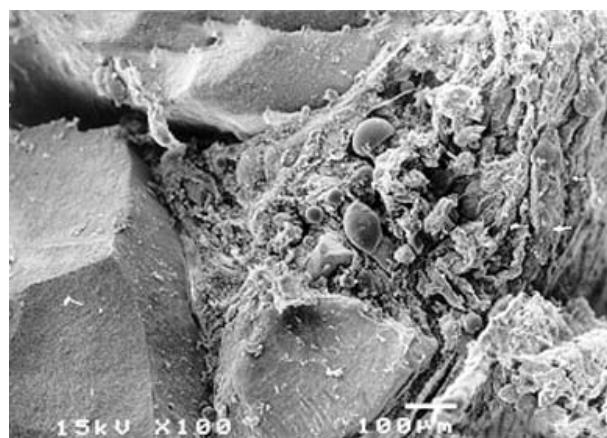
Slika 4.34. Širenje granulomske infiltracije i u mišić. (Mason trihrom x200)



Slika 4.35. Proliferacija vezivnog tkiva. (Mason trihrom x100)



Slika 4.36. Makrofagna populacija u proliferativnom jezgru. (Mason trihrom x200)

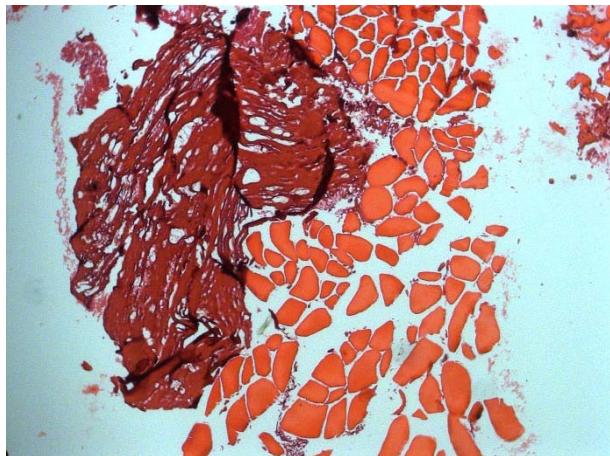


Slika 4.37. Detritus i ćelije u kapsuli oko implantata mineralnog matriksa. SEM

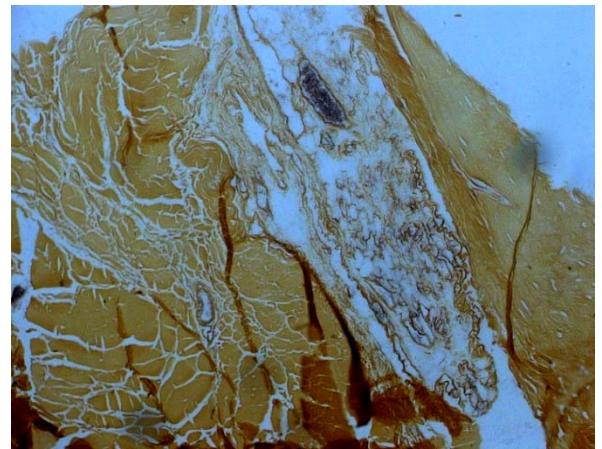
Intramuskularne implantate mineralnog matriksa, posle prve nedelje, karakteriše ćelijski detritus pomešan sa materijalom, kolageni depozit i početak formiranja krvnih sudova (Slike 4.33 i 4.34). Prisutna je snažna granulomska reakcija koja se ogleda u makrofagnoj infiltraciji sa posledičnim formiranjem vezivne kapsule i krvnih sudova (Slika 4.36). Palisadni raspored po površini implantata podseća na osteoblastne ćelije. Ima se utisak da mišić stimuliše resorpciju. Vezivno-tkivna kapsula oko implantata sadrži mnogo krvnih sudova, a interfejs prema implantatu odlikuje prisustvo krupnih ćelija sa makrofagnom aktivnošću. To korelira sa slikom resorpcije i vrlo intenzivne destrukcije implantiranog materijala (Slike 4.35 i 4.36). Na slikama se vide tragovi kolagena i jako proliferisano vezivno tkivo. U vezivnoj kapsuli, na strani prema mišiću,

zapaža se veća aktivnost makrofagnih ćelija i deponovanje kolagena. Kolagena kapsula i osteoblastni raspored su po površini implantata (Slika 4.37).

4.3.1.2. Histološki nalaz posle implantacije kolagene membrane



Slika 4.38. Struktura implantirane kolagene membrane.(HE x100)



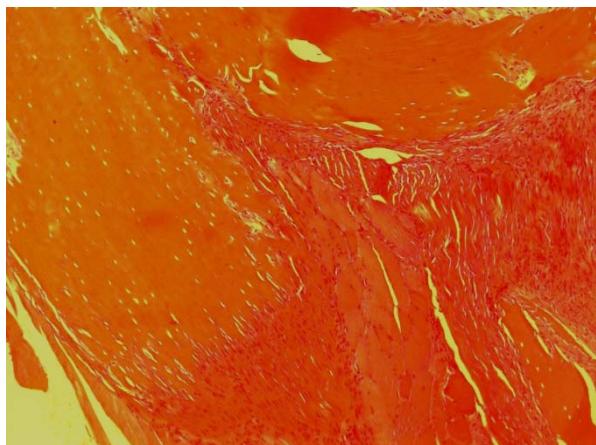
Slika 4.39. Depoziti mladog vezivnog tkiva u implantatu kolagene membrane.(Jones x100)



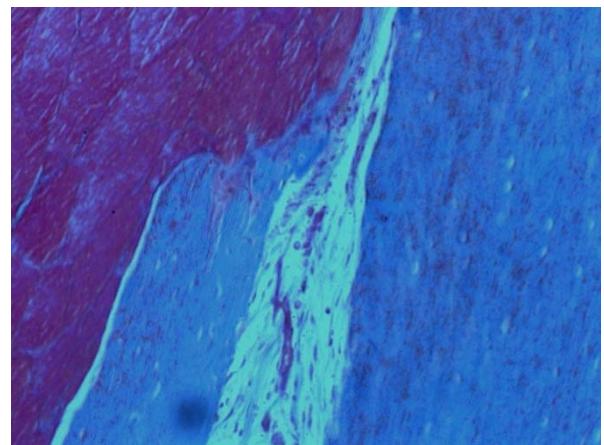
Slika 4.40. Ćelije i novosintetisana vezivna vlakna u implantatu. SEM

Na uzorcima intramuskularno implantirane kolagene membrane posle prve nedelje uočava se da materijal zadržava originalnu lamelarno-mrežastu strukturu (Slika 4.38). Bojenje na retikulin pokazuje da je po površini i delom u unutrašnjosti implantata deponovano novo vezivno tkivo (Slika 4.39 i 4.40).

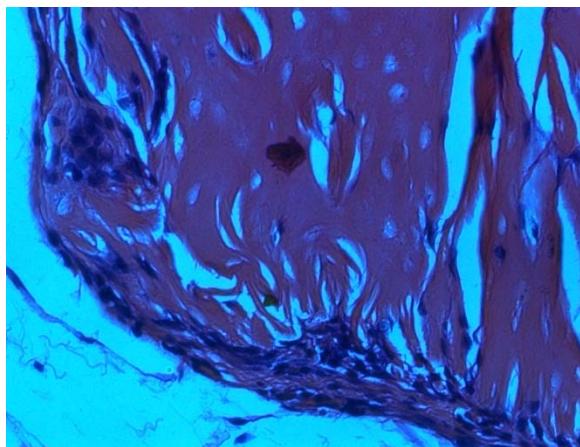
4.3.1.3. Histološki nalaz posle implantacije demineralizovane kosti



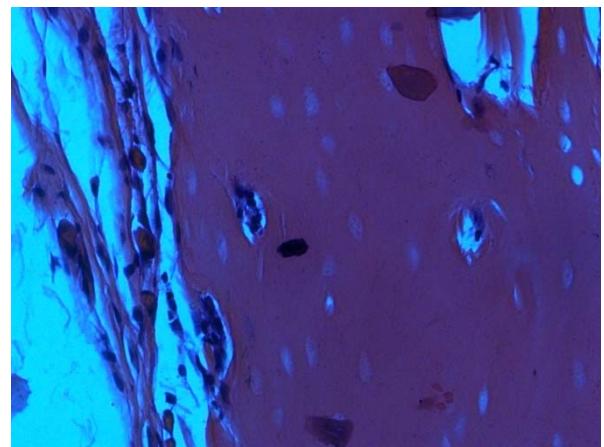
Slika 4.41. Ostaci hemoragije i aktivacija ćelija.(HE x100)



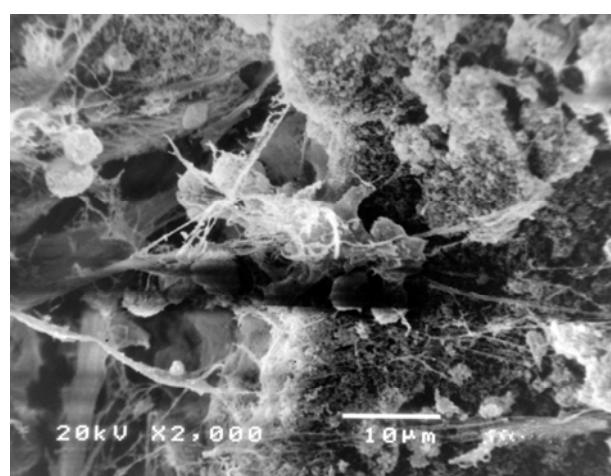
Slika 4.42. Invazija ćelija i veziva u rascep implantata. (Mason trihrom x100)



Slika 4.43. Deo neravnog okrajka implantata i invazija ćelija. (Mason trihrom x200)



Slika 4.44. Vezivna kapsula iz koje invadiraju makrofagne ćelije. (Mason trihrom x200)

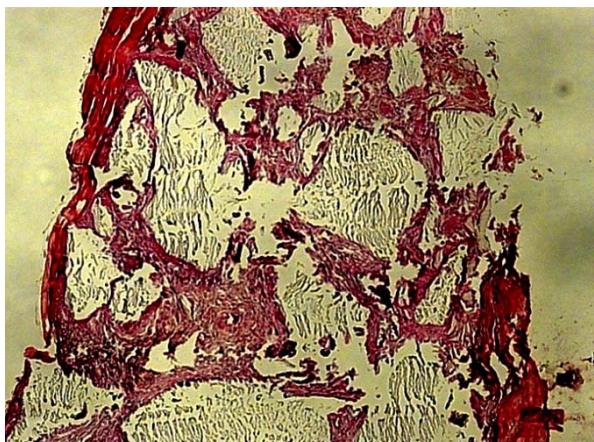


Slika 4.45. Invazija ćelija u implantat demineralizovane kosti. SEM

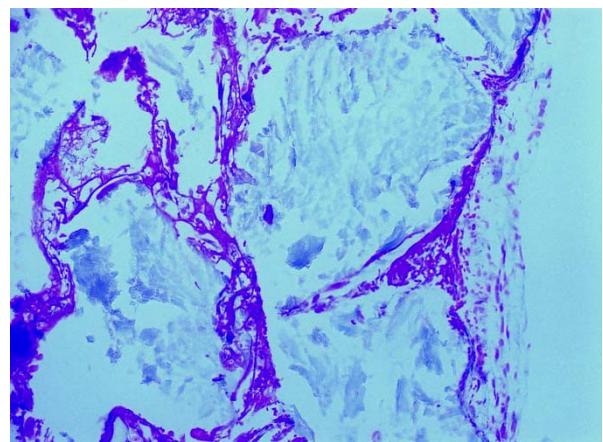
Slika 4.41 pokazuje da je implantat demineralizovane kosti dobro inkorporiran u mišićno tkivo. Na implantatu se uočavaju prazne lakune. Oko implantata postoje ostaci hemoragije i znaci čelijske aktivacije. Na mestima rascepa implantata prisutna je infiltracija čelija i mladog vezivnog tkiva (Slika 4.42 i 4.45). Partikule implantata su obavijene tankom vezivnom kapsulom (Slika 4.43 i 4.44) koja na neravnim okrajcima ima kompaktniju strukturu i veći broj čelija u odnosu na ravne longitudinalne delove. Sa ovih delova krupne makrofagne čelije zaposedaju prazne prostore implantata i formiraju resorptivna polja.

4.3.2. Stanje III nedelje posle implantacije

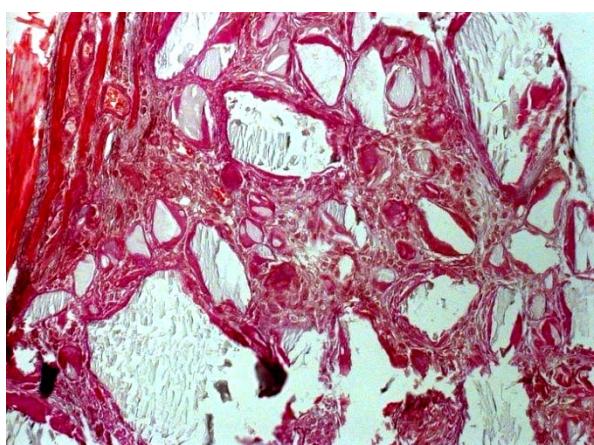
4.3.2.1. Histološki nalaz posle implantacije mineralnog matriksa



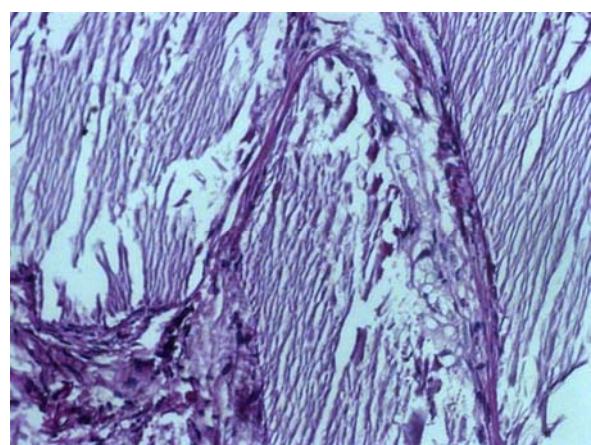
Slika 4.46. Vezivna kapsula, makrofagna infiltracija.(HE x100)



Slika 4.47. Kolagen i krvni sudovi. Kolagen u vezi sa mišićima.(Toluidin plavo x200)



Slika 4.48. Krvni sudovi unutar vezivne kapsule i na periferiji u mišiću. (Mason trihrom x100)



Slika 4.49. Osteoklasti oko implantata mineralnog matriksa.(PAS x200)

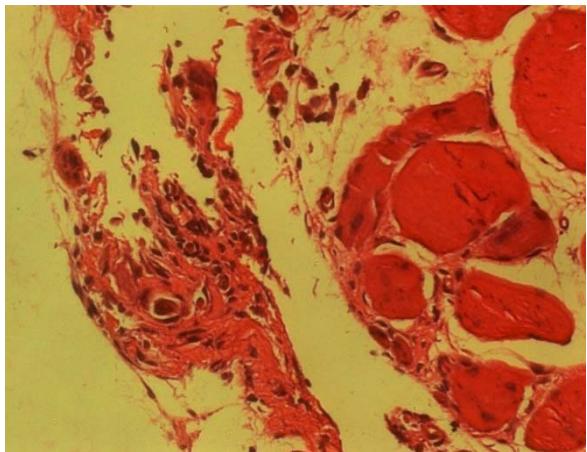


Slika 4.50. Deo vezivne kapsule i makrofag na površini partikule implantata mineralnog matriksa. SEM

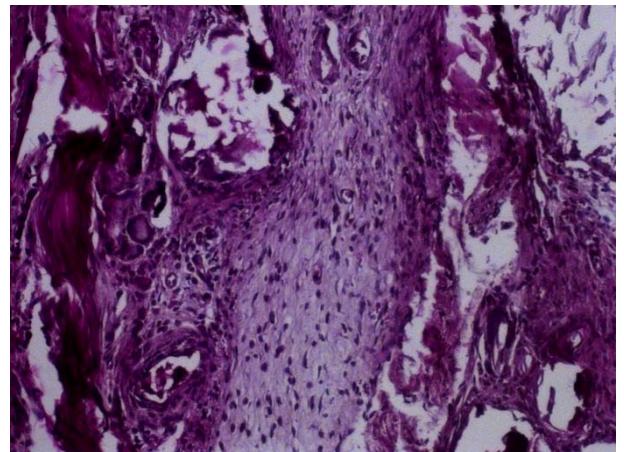
U uzorku skeletnog mišića u koji je implantiran mineralni matriks zapaža se opsežna redukcija skeletnog mišićnog tkiva (Slika 4.48), a posebno atrofija pojedinih mišićnih ćelija u blizini implantata. Implantirani biomaterijal ne prezentuje se kao jedinstvena masa već je rasčlanjen na veliki broj ostrvaca koja su ograničena trakama reaktivno formiranog vezivnog tkiva. Ovo se ne može opisati kao tipično granulaciono tkivo budući da sadrži pored fibroblastoidnih ćelija i vaskularnih elemenata i osteoidne bazofilne ćelijske predstavnike koji se uz trakaste komponente postavljaju u vidu jednog gustog lamelarnog rasporeda (Slika 4.46). Ostaci implantata, koji su evidentno na tu meru svedeni aktivnom resorpcijom reaktivnog vezivnog tkiva, pokazuju mestimično u svojim spoljašnjim delovima fokuse osteogenetskog procesa u neposrednom kontaktu sa prethodno opisanim celularnim elementima (Slika 4.47). Ta „gnezda“ u implantatu, prema središtu pokazuju svetlobazofilni karakter, a prema periferiji povećanu bazofilnost u jednom pojasu, na koji od spolja naležu osteoidne ćelije (Slika 4.49). Ova bazofilna „ljuska“ mogla bi se smatrati fenomenom mineralizacije ovog biomaterijala. Ćelije fibroblastoidnog karaktera imaju obilne bazofilne citoplazme, vretenastog su oblika, poseduju centralno postavljeno krupno jedro, i mestimično su praćene makrofagima „penušave“ citoplazme. Vezivna kapsula oko implantata, kao i vezivno tkivo unutar implantata je zrelijе, tj. ima više kolagenih vlakana, a manje je celularno u odnosu na prethodni period. Depoziti kolagena su pretežno raspoređeni uz mišić. Unutar implantata nalazi se dosta krvnih sudova i to pretežno krupnih. Uz krvne sudove

je dosta kolagena, osteoklasta i osteoblastnih ćelija (Slika 4.50). Na celoj površini preparata zapaža se snažna vaskularna proliferacija.

4.3.2.2. Histološki nalaz posle implantacije kolagene membrane



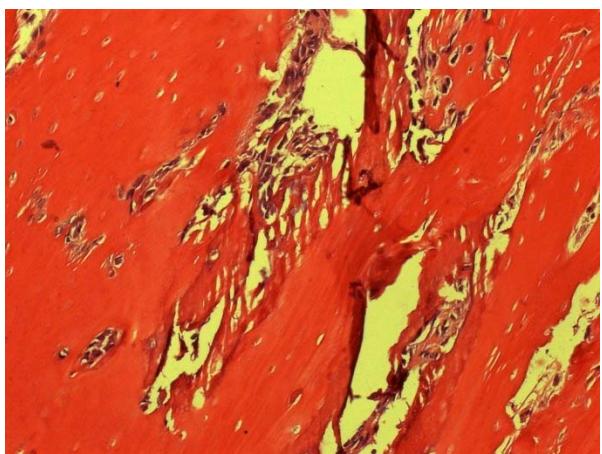
Slika 4.51. Deo resorbovanog implantata kolagene membrane.(HE x100)



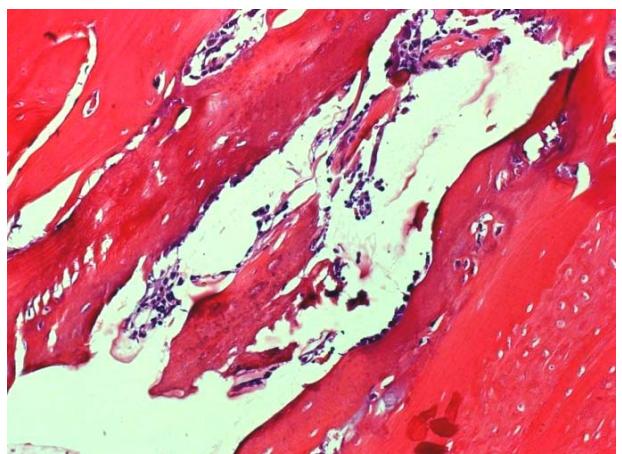
Slika 4.52. Ćelije i krvni sudovi u implantatu kolagene membrane.(PAS x200)

Intramuskularno implantirana kolagena membrana posle 3 nedelje pokazuje znake uznapredovanog procesa resorpcije (Slika 4.51). Ostaci implantata su bogato naseljeni ćelijama, a kroz implantat i u susedstvu sa mišićem su prisutni mnogobrojni krupni krvni sudovi (Slika 4.52).

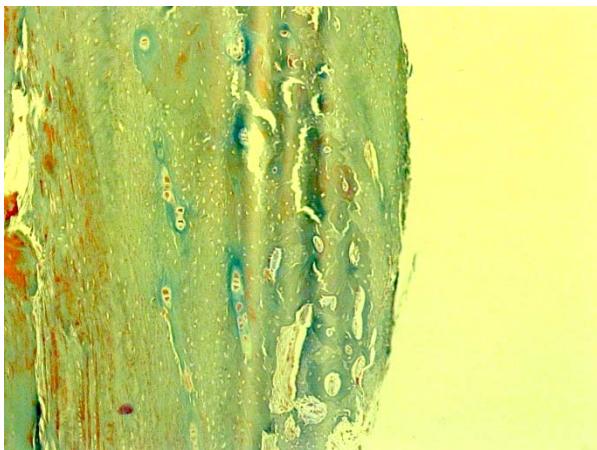
4.3.2.3. Histološki nalaz posle implantacije demineralizovane kosti



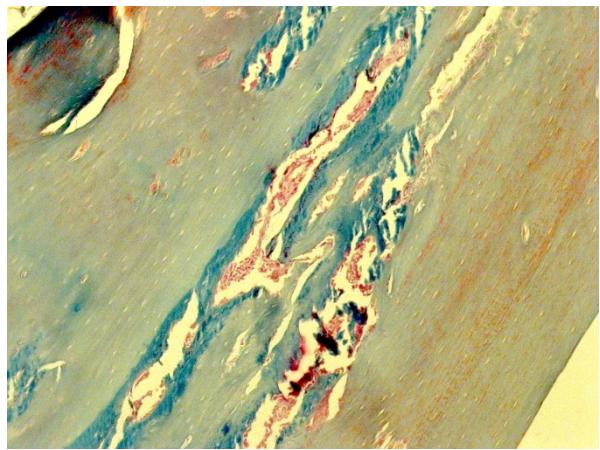
Slika 4.53. Invazija ćelija u prostore implantata demineralizovane kosti.(HE x100)



Slika 4.54. Lamelarni raspored ćelija uz ivicu invadiranog polja. (Mason trihrom x200)



Slika 4.55. Površinska resorpcija sa prodom celija u dubinu implantata demineralizovane kosti. (Mason trihrom x100)

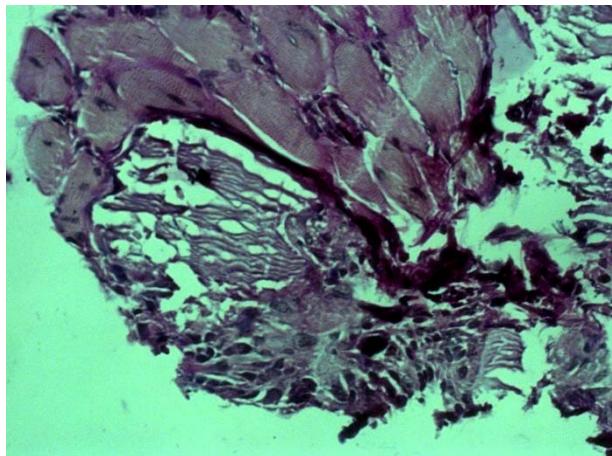


Slika 4.56. Vaskulogeneza i proliferacija celija u implantatu demineralizovane kosti. (Mason trihrom x100)

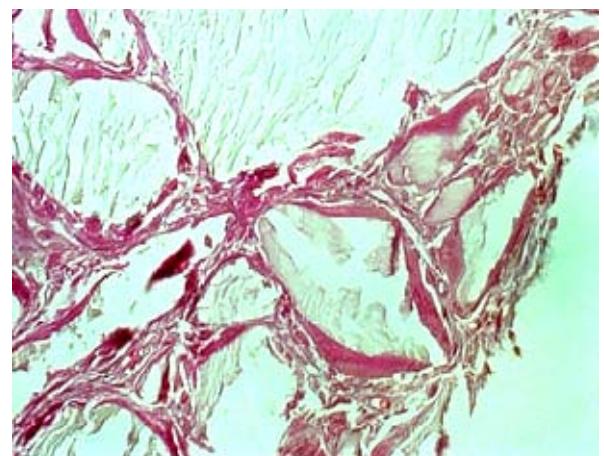
U uzorku skeletnog mišića pacova zapažaju se ostaci strukture implantirane demineralizovane kosti, uključujući šupljinu Haverzovih kanala i prazne osteocitne lakune kao i lamelarni raspored organske komponente implantata (Slika 4.53). Skeletno mišično tkivo u regionima udaljenih od implantata pokazuje normalnu građu mišićnog tkiva bez znakova atrofije ili zapaljenskih infiltrata. U neposrednoj blizini implantata zapaža se opsežna reakcija okolnog tkiva po tipu granulacione reakcije i formiranja mladog fibroznog veziva koje pokazuje gusti raspored fibroblastoidnih celija sa intenzivnom resorpcijom površine implantirane demineralizovane kosti (Slika 4.55). Spomenuto vezivno tkivo se trakasto širi u okolni skeletni mišić raslojavajući njegove snopove i zavlačeći se između pojedinačnih mišićnih celija. Prostiranje ovog vezivanog tkiva zapaža se i prema dubini implantata uvlačeći se u Haverzove kanale, čak i do središnjih delova implantata, kada je resorbovan okolni demineralizovani matriks (Slika 4.54 i 4.56). Zapaža se naseljavanje implantata fibroblastolikim vezivno-tkivnim celijama, koje se postavljaju na jedan pravilan paralelan način invadirajući u implantat prateći njegovu lamelarnu organizaciju. U invadiranim šupljinama implantata zapažaju se procesi angiogeneze, proliferacije celija, a uz ivicu implantata nalaze se sveže nataloženi depoziti kolagena.

4.3.3. Stanje VI nedelje posle implantacije

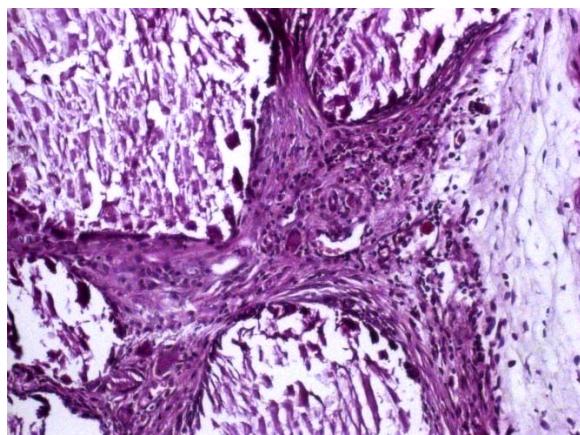
4.3.3.1. Histološki nalaz posle implantacije mineralnog matriksa



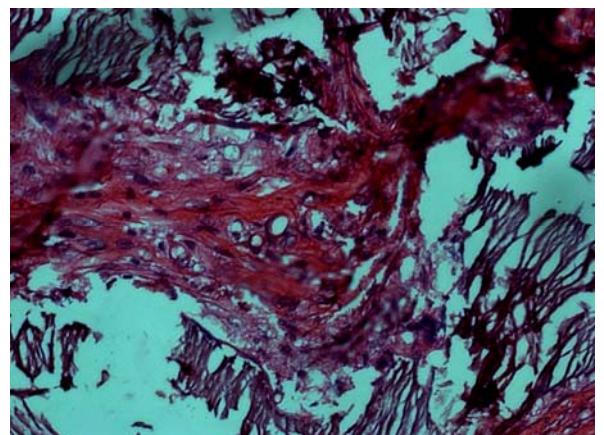
Slika 4.57. Vezivno tkivo i njegova inklinacija u implantat mineralnog matriksa.(HE x100)



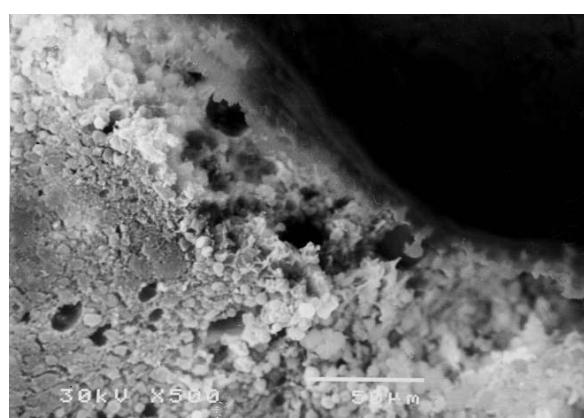
Slika 4.58. Osteoblastne ćelije i kalcijumski depoziti oko partikula implantata mineralnog matriksa. (Mason trihrom x100)



Slika 4.59. Proliferacija rastresitog veziva i resorpција partikula implantata mineralnog matriksa. (Mason trihrom x200)



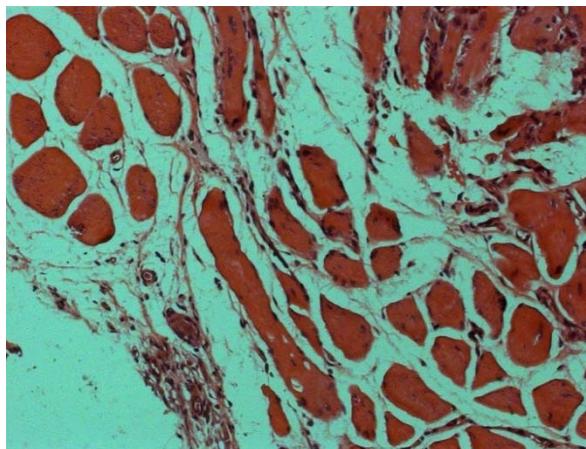
Slika 4.60. Penaste ćelije u polju intenzivne resorpције implantata mineralnog matriksa. (Mason trihrom x200)



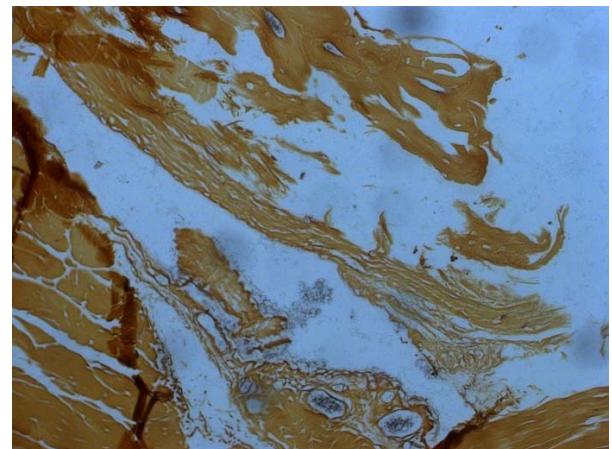
Slika 4.61. Mineralna ljudska u površinskom delu partikule implantata mineralnog matriksa. SEM

Posle 6 nedelja od implantacije mineralnog matriksa, resorpcija implantiranog materijala je još uvek prisutna i ide od spolja ka sredini pojedinih partikula (Slika 4.61). Uočava se infiltracija ćelija u implantat (Slika 4.57). Prisutan je veliki broj krvnih sudova u vezivnoj kapsuli oko partikula implantata. Osteoklasti i osteoblasti su prisutni na površini implantata čijom aktivnošću se očigledno formiraju kalcijumski depoziti (Slika 4.58). Između partikula mineralnog matriksa je zrelo fibrozno tkivo sa mnogo krvnih sudova (Slika 4.59). Mestimično uklinjeno vezivno tkivo u implantat sadrži mnogo krvnih sudova i vlakana, a u odnosu na prethodni period karakteriše ga manji broj fibroblastoidnih ćelija na račun pojave penastih ćelija (Slika 4.60). Ovakva penasta struktura citoplazme ovih ćelija može prezentovati vezikule u njihovoj sekretornoj aktivnosti. Očigledno je, da urastanje vezivnog tkiva u prostor implantata, predstavlja put za useljavanje i drugih tipova ćelija u implantat. Rastresito vezivo proliferiše oko implantata. Na preparatima se zapaža proliferacija mišićnih ćelija.

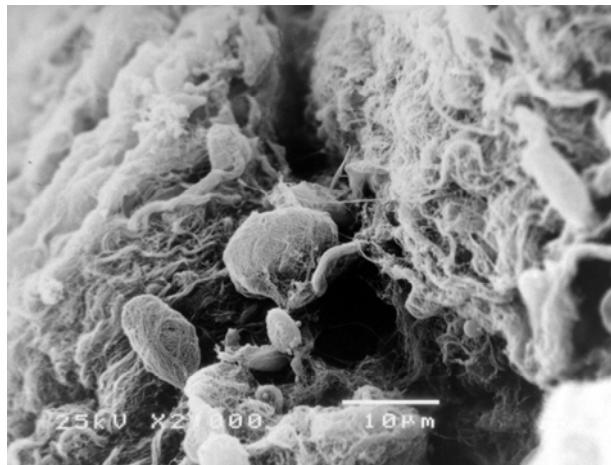
4.3.3.2. Histološki nalaz posle implantacije kolagene membrane



Slika 4.62. Fuzija resorbovane kolagene membrane sa rastresitim vezivnim tkivom.(HE x100)



Slika 4.63. Krupni krvni sudovi u ostatku resorbovane kolagene membrane.(Jones x100)



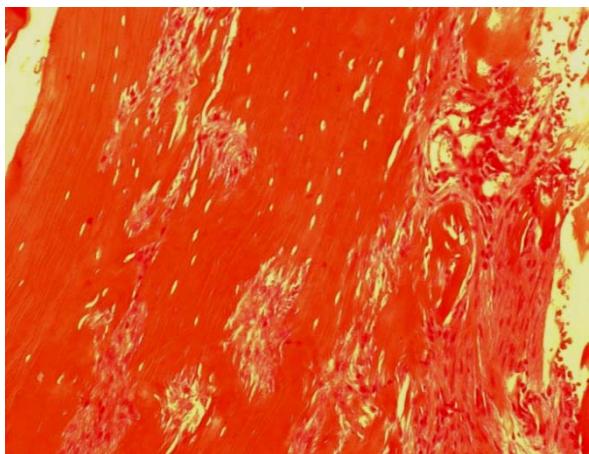
Slika 4.64. Rastresito vezivno tkivo na mestu implantata kolagene membrane. SEM

Nakon 6 nedelja od implantacije volumen kolagene membrane je sveden na minornu meru i gotovo potpuno je resorbovana (Slika 4.62 i 4.63). Resorbovani materijal je zamenjen rastresitim vezivnim tkivom u kome dominiraju krupni krvni sudovi (Slika 4.64).

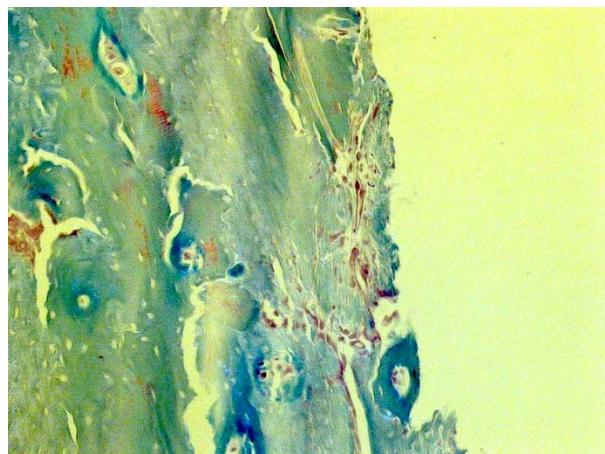
4.3.3.3. Histološki nalaz posle implantacije demineralizovane kosti

Intramuskularno implantiranu demineralizovanu kost posle 6 nedelja karakteriše pojava osteoblasta na površini i njihova migracija u matriks implantata (Slika 4.65). Unutar implantata u pukotinama prisutan je kolagen, krvni sudovi, multinuklearne ćelije i sinusne strukture koje podsećaju na kostnu srž na čijim ivicama su depoziti kolagena (Slika 4.66 i 4.67). Prisustvo multinuklearnih ćelije je dokaz reakcije na strano telo i intenzivne fagocitoze. Implantirana demineralizovana kost ima sačuvanu lakunarnu strukturu. Vidi se formiranje krvnih sudova u blizini i oko resorbovanih polja demineralizovane kosti. U dubljim delovima implantata, takodje se vidi snažna vaskularna reakcija i jako izražena angiogeneza. U blizini pojasa sa krvnim sudovima vide se cementne linije kao znak obrazovanja nove kosti i lakune sa osteocitima (Slika 4.67). Deo implantata je zaposednut strukturama nalik na kostnu srž (Slika 4.68). Uz šupljinu pored kostne srži vidi se novoformirana kost sa gustim lakunama u kojima su osteociti. U resorbovanim prostorima na ivicama vide se osteoblastne ćelije (Slika 4.67).

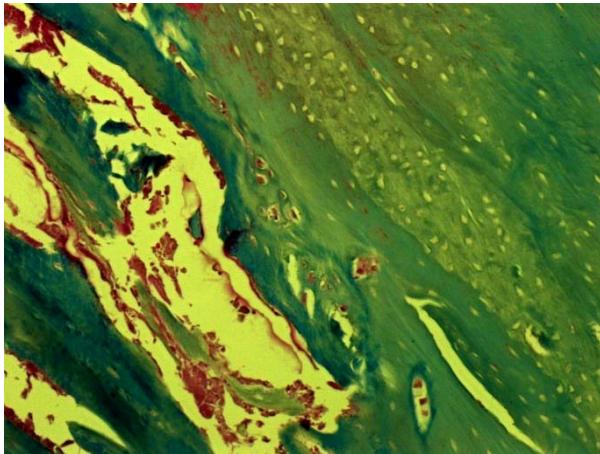
Slika pokazuje kolonizaciju šupljina, verovatno nastalih resorpcijom implantata. Oko svake šupljine nataložen je kolagen. Na slikama 4.69 i 4.70 vidi se invazija ćelija u prostore resorpcije implantata demineralizovane kosti. Zapažen mezenhimski oblik mladih ćelija ukazuje na moguću diferencijaciju ka osteogenoj i angiogenoj liniji. Infiltrat mezenhimskih ćelija u većim prostorima ukazuju na poreklo viđenih ćelija osteoblastnog tipa, zatim retikularnih i fibroblastnih ćelija, koje formiraju stromu kostne srži, kao i epitelnih ćelija, koje se verovatno dalje usmeravaju ka formiranju krvnih sudova. Vidljivo je da resorpciju obavljaju osteoklastne ćelije ili njima slične makrofagne ćelije. Verovatno osteoklasti prave prostor za ostale ćelije.



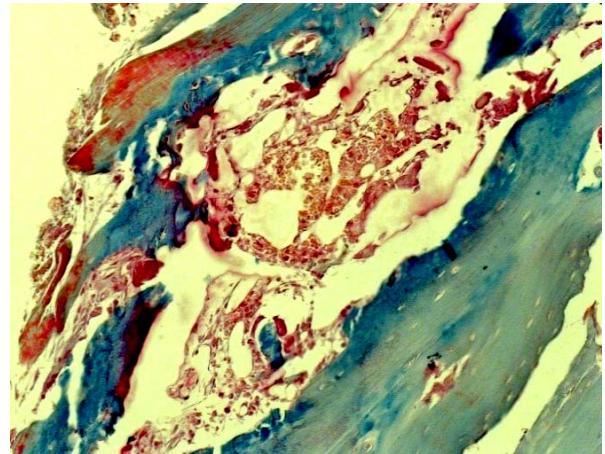
Slika 4.65. Proliferacija ćelija u dubinu implantata demineralizovane kosti.(HE x100)



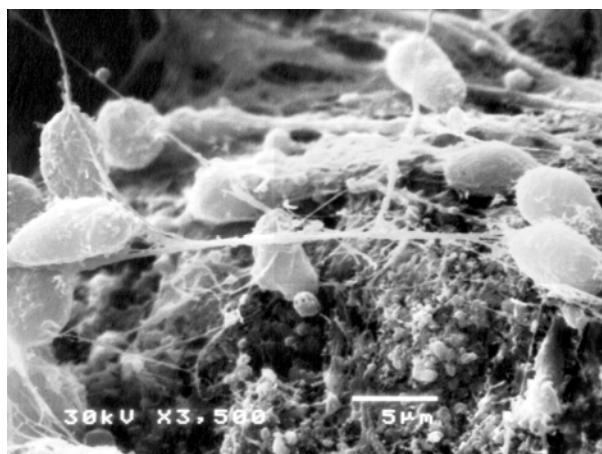
Slika 4.66. Fokusi osteogeneze na površini i u unutrašnjosti implantata demineralizovane kosti. (Mason trihrom x100)



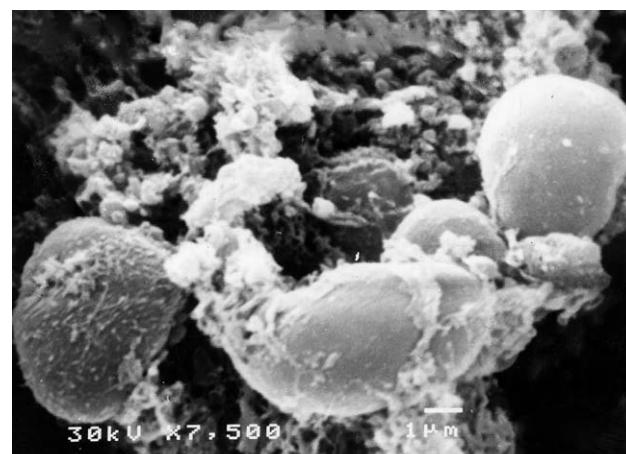
Slika 4.67. Depoziti kolagena i cementne linije novoformirane kosti. (Mason trihrom x100)



Slika 4.68. Uspostavljanje strome kostne srži unutar implantata demineralizovane kosti. (Mason trihrom x200)



Slika 4.69. Fibroblasti i kolagenogeneza u implantatu demineralizovane kosti. SEM



Slika 4.70. Ćelijski klaster u šupljini implantata demineralizovane kosti. SEM

4.4. EFEKTI IMPLANTACIJE U KOSTNI DEFEKT FEMURA

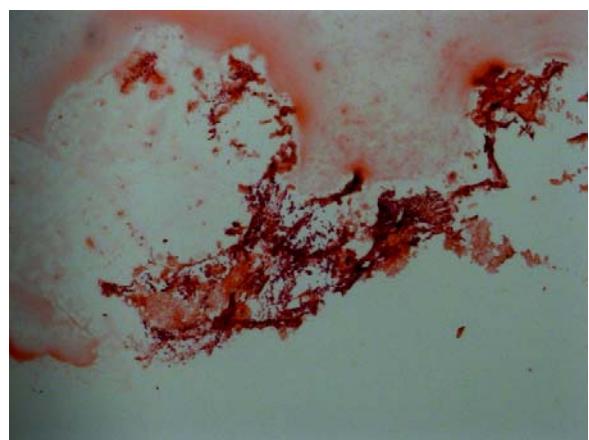
4.4.1. Stanje I nedelje posle implantacije

4.4.1.1. Histološki nalaz posle implantacije mineralnog matriksa

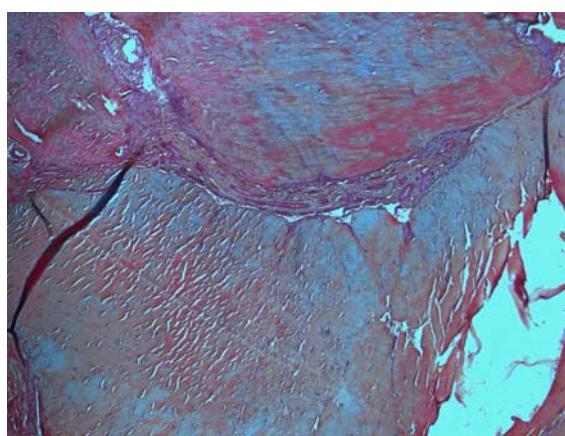
Implantirani mineralni matriks u kostni defekt femura ima svoju originalnu strukturu. Između partikula implantata na mestu defekta zapaža se infiltracija tkivne tečnosti (Slika 4.71). Interesantno je da u ovom slučaju ne postoji granulomatozni odgovor. Uz ivicu defekta prisutni su tragovi hemoragije i ćelijskog detritusa (Slika 4.72). Na mestima intimnog kontakta implantata i kosti, u interfejsu, prisutni su tragovi hemoragije, fibroznog tkiva, kao i pojava makrofagnih ćelija (Slika 4.73 4.74). Ne uočavaju se znaci početka resorpcije implantata.



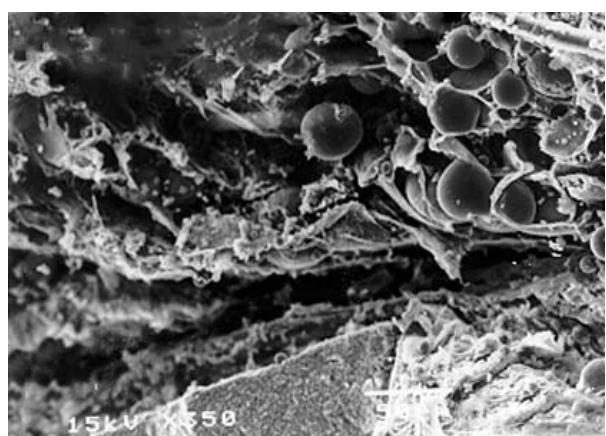
Slika 4.71. Infiltrat telesne tečnosti oko implantata mineralnog matriksa.(HE x100)



Slika 4.72. Ostaci hemoragije i ćelijskog detritusa.(HE x100)

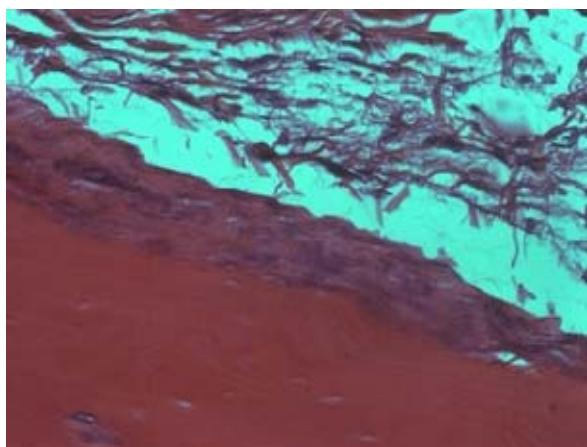


Slika 4.73. Interfejs kosti i implantata mineralnog matriksa. (Mason trihrom x200)



Slika 4.74. Ćelije u interfejsu kosti i implantata mineralnog matriksa. SEM

4.4.1.2. Histološki nalaz posle implantacije kolagene membrane



Slika 4.75. Zona naleganja implantata kolagene membrane na kost.(HE x100)

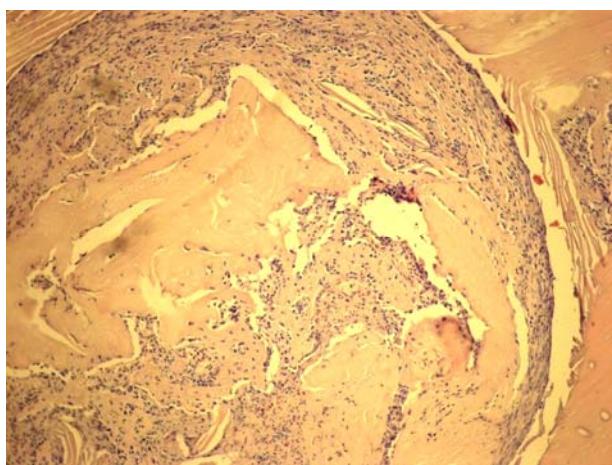


Slika 4.76. Proliferacija vezivno-tkivnih ćelija uz kost. (Mason trihrom x200)

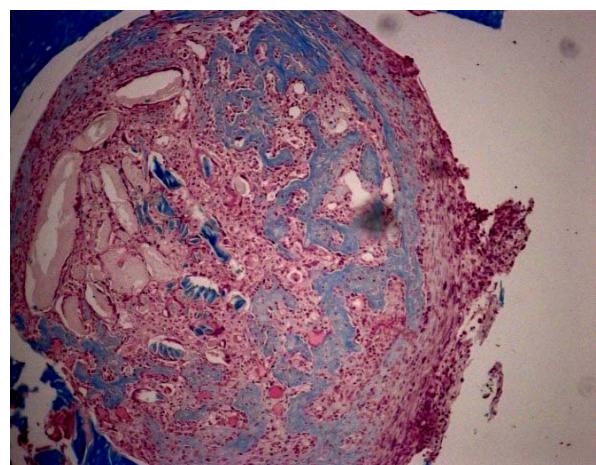
U neposrednoj blizini akceptorske kosti zapažaju se ploče (trakasti raspored) implantirane kolagene membrane koja naleže na gotovo atrofičan izgled kosti (Slika 4.75). Međutim u unutrašnjosti akceptorske kosti (u jednom delu) duž Volkmanovih i Haverzovih kanala zapaža se njihovo proširenje uz porast broja vezivnotkivnih ćelija uz delimičnu resorpciju zidova ovih kanala (Slika 4.76).

4.4.1.3. Histološki nalaz posle implantacije demineralizovane kosti

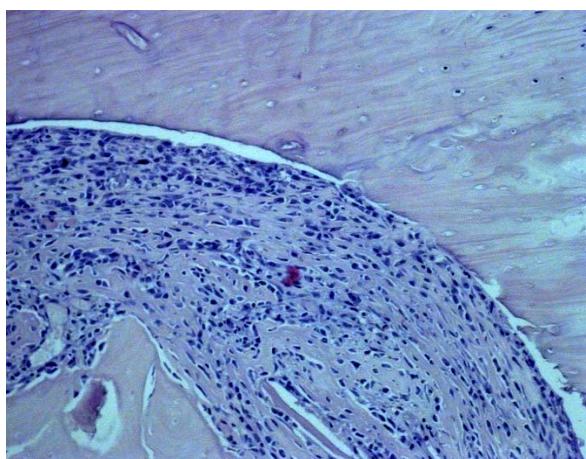
Bojenje hematoksilinom i eozinom pokazuje da je defekt ispunjen fibrinom, nediferenciranim mezenhimskim ćelijama, malim stepenom hemoragije i limfocitima u tragovima (Slika 4.77 i 4.78). Mrtva kost (nekroza) je vidljiva u blizini kontura defekta što ukazuje na traumatizovano tkivo kao posledicu operacije (Slika 4.79). Nekrotičnu kost predstavljaju i koštani ostaci nakon zahvata. Više jedarne ćelije, verovatno osteoklasti, su primećene na spoju demineralizovane kosti i vezivnog tkiva. Zapažen je i mali broj ćelija sličnih limfocitima na periferiji defekta. U kontrolnom defektu ima više ostataka hemoragije u odnosu na defekt sa implantatom demineralizovane kosti (Slika 4.77 i 4.78). Prilikom operacije, u oba slučaja, došlo je i do povređivanja i narušavanja strukture kostne srži. Ovo je očigledno bio stimulus za proliferaciju mezenhimskih ćelija strome kostne srži (Slika 4.80). Proliferacija se odvija iz dela intaktne kostne srži duž kanala femura (Slika 4.81). Difuzno raspoređeni hematomi, koji su posledica hemoragije, verovatno su privukli makrofagne ćelije, granulocite i fibroblastne ćelije koje produkuju kolagen (Slika 4.82). Ćelijska reakcija u površinskom delu implantata ogleda se u prisustvu makrofagnih ćelija i verovatno osteoklasta, kao i palisadno raspoređeinh osteoblastnih ćelija po površini implantata (Slika 4.83; 4.85; 4.87 i 4.89). Implantat je prožet infiltratom vezivnotkivnih ćelija. Prisustvo novog vaskularnog tkiva i formiranje nove kosti je zapaženo na periferiji defekta, kao i iz dela kostne srži (Slika 4.82 i 4.84). Nova sunđerasta kost počinje da se formira u vidu prstastih struktura sa oboda defekta ka centru (Slika 4.84), gde se povezuju sa kolagenim depozitima u stromi, a preko njih, sa partikulama demineralizovane kosti (Slika 4.86). Akceptorska kost je izvor ćelija za infiltraciju. Ćelije za infiltraciju regрутuju se i iz kostne srži. Kao posledica pravljena defekta narušena su biomehanička svojstva kosti, a u reakciji na ovaj mehanički stres dolazi do remodeliranja kosti sa njene unutrašnje strane (Slika 4.84 i 4.88).



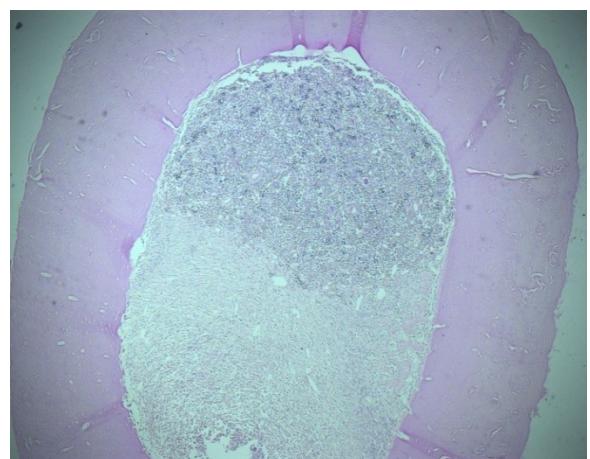
Slika 4.77. Implant i proliferacija mezenhimskih ćelija kostne srži.(HE x100)



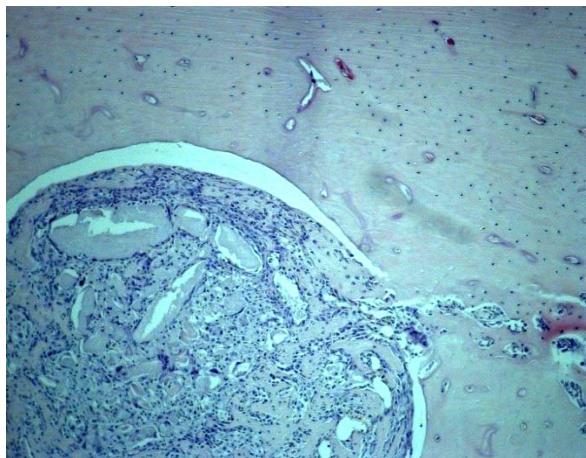
Slika 4.78. Kontrolni defekt sa hematomima i mezenhimskim ćelijama. (Mason trihrom x100)



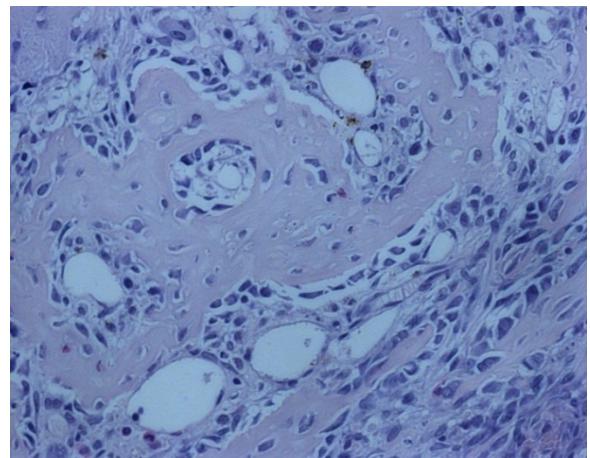
Slika 4.79. Zona nekroze kosti na mestu defekta.
(Mason trihrom x200)



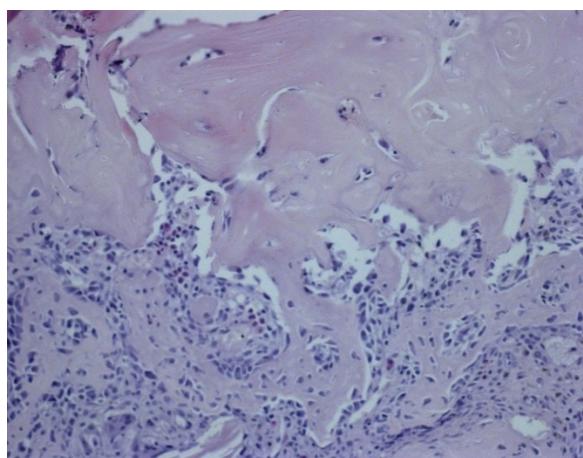
Slika 4.80. Poprečni presek kosti u zoni defekta.
Intaktna i proliferisala kostna srž. (Mason trihrom
x50)



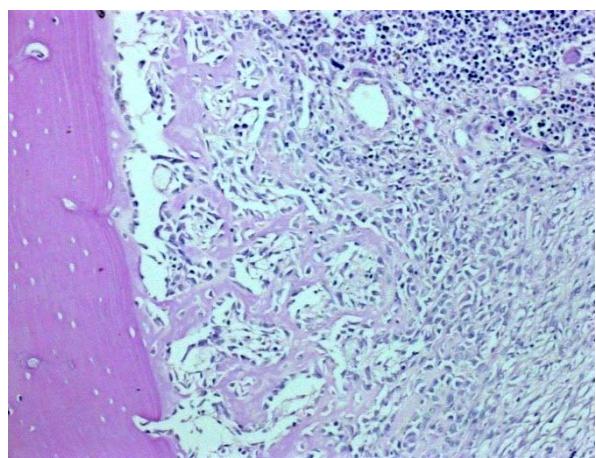
Slika 4.81. Infiltracija ćelija iz kostne srži u defekt.
(Mason trihrom x100)



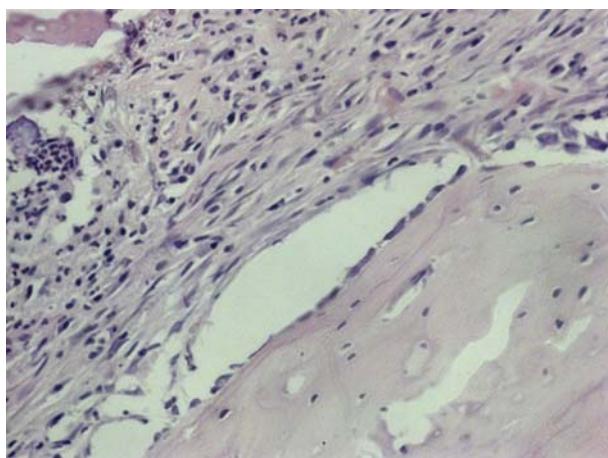
Slika 4.82. Resorpcija ostatka hematoma i vaskulogeneza. (Mason trihrom x200)



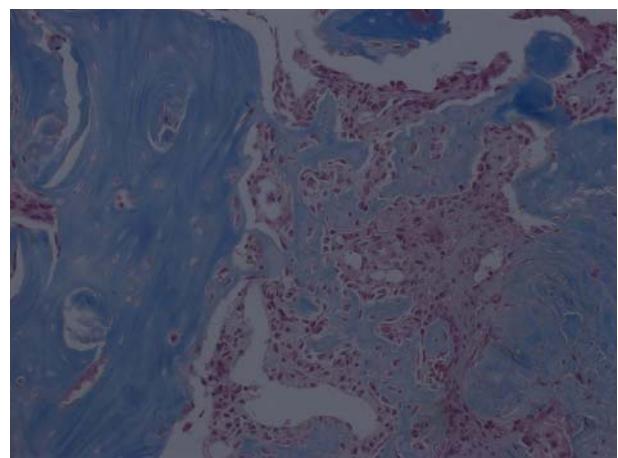
Slika 4.83. Infiltracija ćelija oko i u implantat demineralizovane kosti. (Mason trihrom x100)



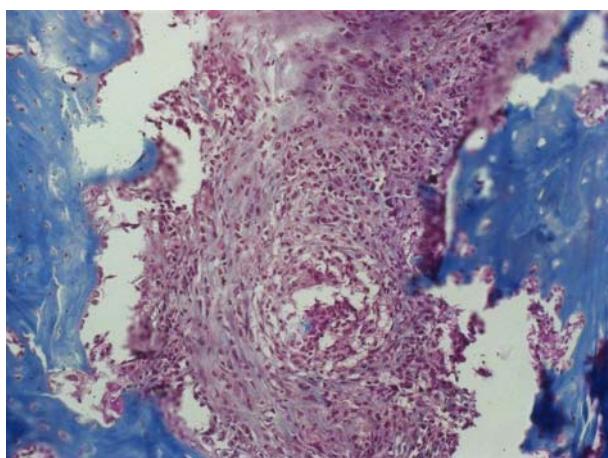
Slika 4.84. Početak osteogeneze sa unutrašnje strane kosti. (Mason trihrom x100)



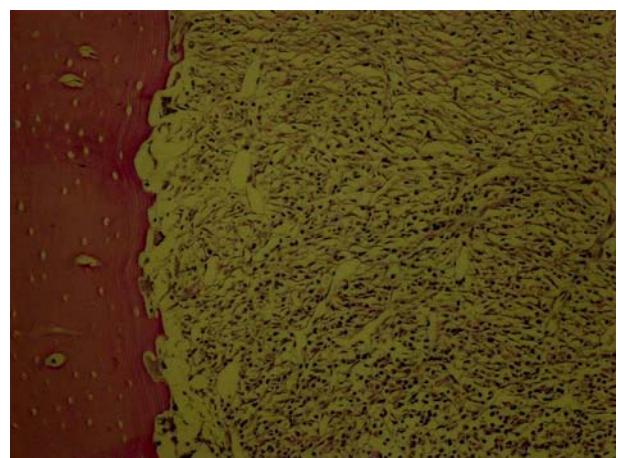
Slika 4.85. Osteoblastne ćelije na površini i u šupljinama implantata demineralizovane kosti. (Mason trihrom x200)



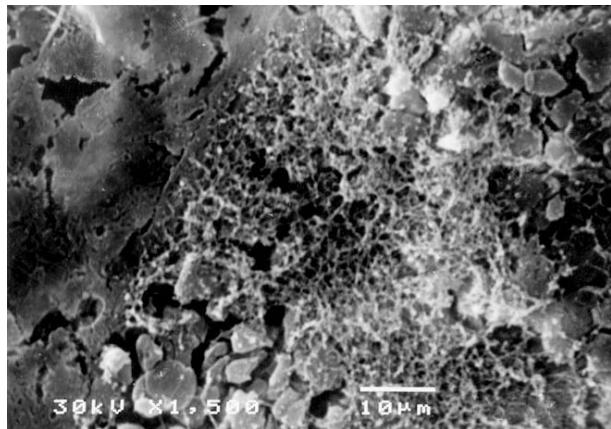
Slika 4.86. Fuzija depozita kolagena iz strome kostne srži sa implantatom demineralizovane kosti.(Mason trihrom x100)



Slika 4.87. Resorptivna aktivnost na partikulama demineralizovane kosti.(Toluidin plavo x100)



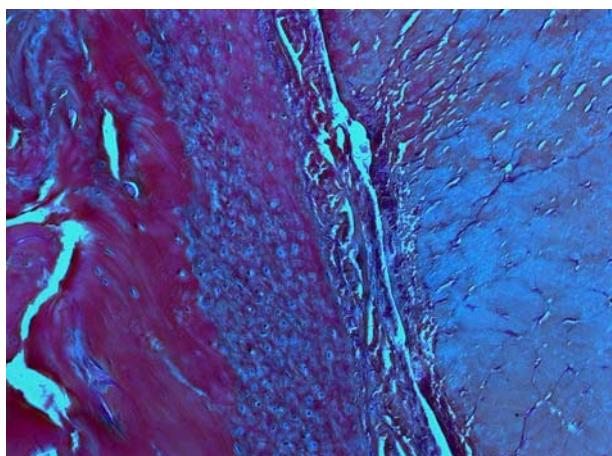
Slika 4.88. Osteoklastna aktivnost na delu domaćinske kosti.(HE x100)



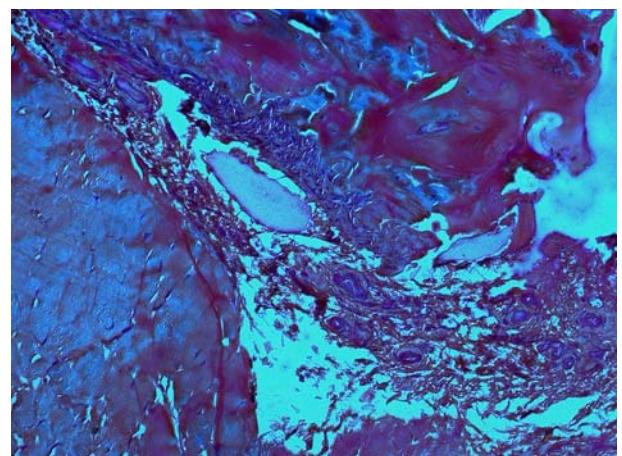
Slika 4.89. Interakcija implantata demineralizovane kosti i strome kostne srži. SEM

4.4.2. Stanje III nedelje posle implantacije

4.4.2.1. Histološki nalaz posle implantacije mineralnog matriksa



Slika 4.90. Ćelijska reakcija akceptorske kosti na mestu kontakta sa implantatom mineralnog matriksa.(Mason trihrom x200)

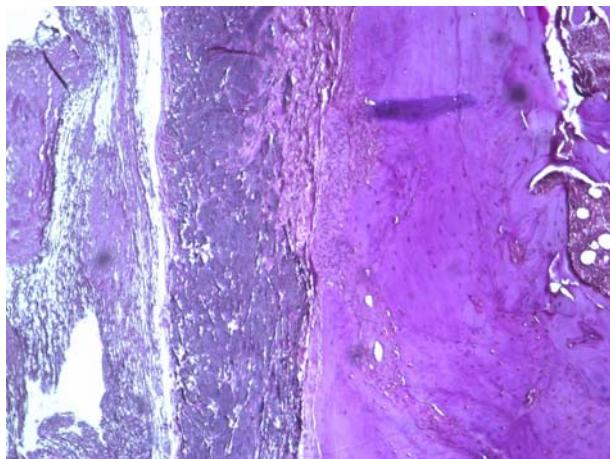


Slika 4.91. Remodeliranje akceptorske kosti u regionu implantata mineralnog matriksa. (Mason trihrom x100)

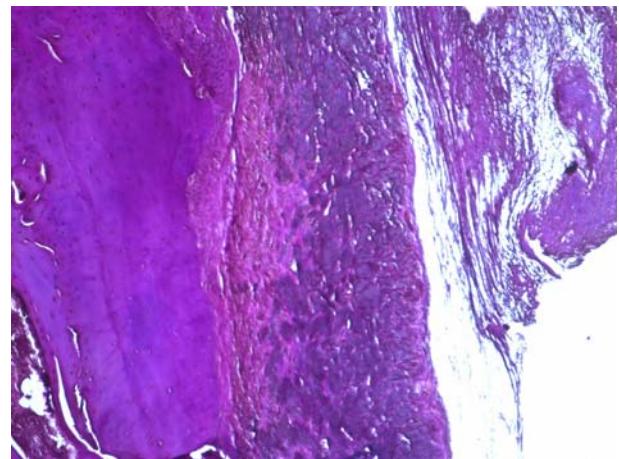
Na ovim uzorcima implantirani mineralni matriks se pojavljuje kao polustruktuirana formacija koja mestimično pokazuje nepravilan raspored šupljina (pora), bazofilnog je karaktera i prezentuje se velikom masom skoro originalno implantiranog volumena (Slika 4.90). Okolna akceptorska kost, kao ni obližnje mekotkivne strukture ne pokazuju elemente resorpcije ovog materijala, kao ni reakciju po tipu granulacionog vezivnog tkiva (Slika 4.91). Iz dela kostne srži zapaža se migracija ćelija i prisustvo krvnih sudova. Međutim, kompaktna kost akceptornog femura

pokazuje očigledno remodeliranje u smislu transformacije kompaktne kosti u trabekularnu, sa potpunim remećenjem normalne građe očekivane za nivo dijafize femura. Stiče se utisak da implantat mineralnog matriksa u svojoj okolini izaziva histološku transformaciju obližnje akceptorske kosti.

4.4.2.2. Histološki nalaz posle implantacije kolagene membrane



Slika 4.92. Dodirna površina implantata kolagene membrane i akceptorske kosti.(PAS x100)



Slika 4.93. Ćelijska reakcija u zoni kontakta implantata kolagene membrane i kosti.(PAS x100)

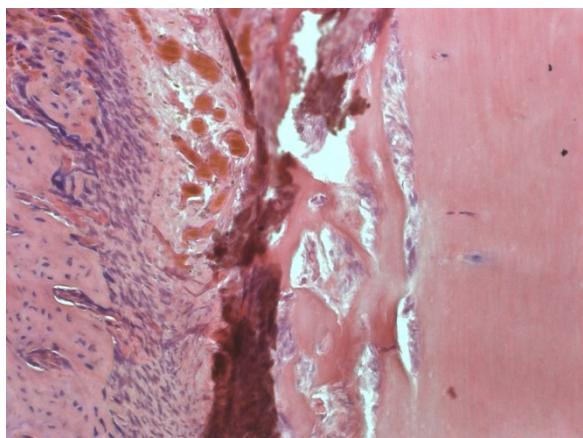
Posle 3 nedelje od implantacije kolagene membrane u kostni defekt zapaža se ćelijska infiltracija u implantat kao i mestimična reakcija akceptorske kosti (Slika 4.92). Reakcija kosti na ovim mestima ogleda se u povećanoj gustini ćelija sa naznakama lokalne transformacije kosti. Put invazije ovih ćelija ide delom od periosta sa spoljne strane i iz kostne srži (Slika 4.93).

4.4.2.3. Histološki nalaz posle implantacije demineralizovane kosti

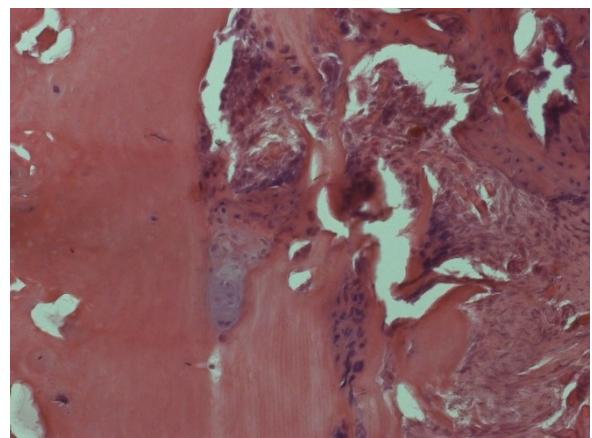
Na uzorcima femura uzetih sa visine prethodno trepanisane kosti na kojoj je implantirana demineralizovana kost na poprečnim i uzdužnim presecima femura pacova zapaža se najvećim delom normalna mikroanatomska struktura kompaktne, lamelarne (sekundarne) kosti. Celularni elementi neobrađene (akceptorske) kosti su u potpunosti očuvanog vitalnog izgleda, tj. normalne građe i rasporeda. Na mestu implantacije zapaža se opsežna reakcija po tipu kalusa koja u potpunosti popunjava šupljinu defekta (Slika 4.94). Ona je sačinjena od ćelija osteoblastnog karaktera koje grade nepravilne, uglaste,

polulučne gredice mlade trabekularne kosti. Gredice su okružene jako vaskularizovanim pratećim stromalnim elementima, koji uglavnom imaju fibroblastoidni karakter (Slika 4.95, 4.96 i 4.97). Cela slika spomenutog tkiva ima karakter celularno bogatog mladog fibroznog veziva. Delovi akceptorske kosti neposredno uz defekt, a u prostoru Haverzovih kanala, pokazuju delimičnu remodelaciju strukture uz diferencijaciju manjeg broja ćelija ka hondroidnom fenotipu (Slika 4.99). U sredini akceptorske kosti zapaža se normalna crvena kostna srž. Prisustvo implantata demineralizovane kosti nije moguće potpuno morfološki evidentirati (Slika 4.98).

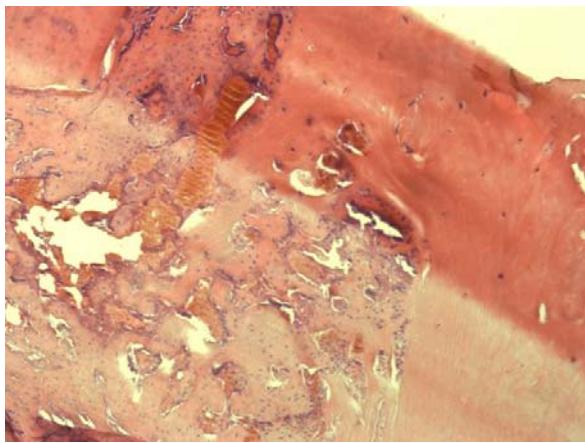
Pored akceptorske kosti, koja je normalne histološke grade, zapaža se odsustvo periosta u regionima neposrednog prisustva demineralizovanog implantata (Slika 4.100). Implantat ima histološke karakteristike delimično resorbovane mase i sa spoljašne strane pokriven je tkivnom membranom koja ima građu jako stimulisanog periosta. Ova membrana je izrazite debljine i sačinjena je od oko desetak ćelijskih slojeva gde su celularni elementi postavljeni u veoma gustom rasporedu. Idući od spolja ka unutra kroz membranu sreću se fenotipovi ćelija od fibroblastolikih do osteoblastnih tipova. Ove druge ćelije imaju oblik širokog vretena gde je centralni deo okupiran jedrom, a voluminozna citoplazma je bazofilnog karaktera.



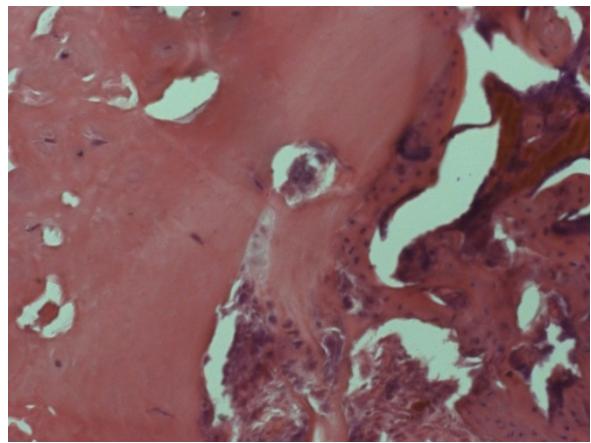
Slika 4.94. Integraciona (vezna) površina. Domaća kost jako stimulisana. (HE x100)



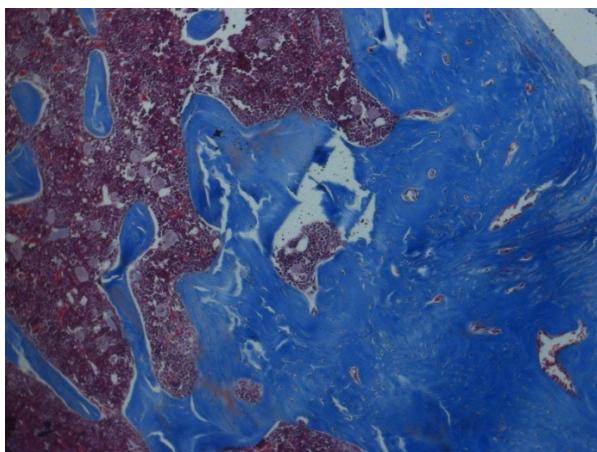
Slika 4.95. Enhondralno okoštavanje Prodor kostne srži i cementne linije. (HE x200)



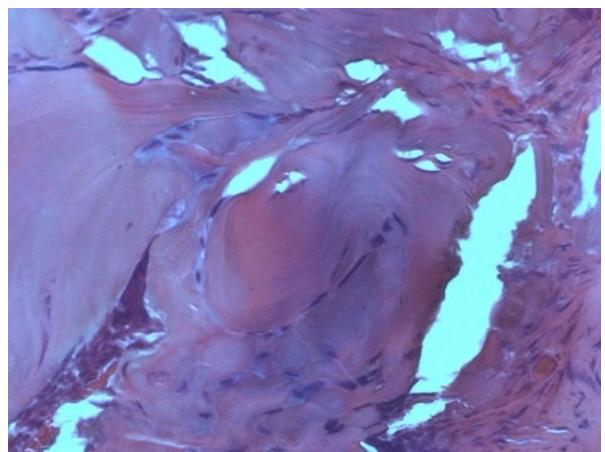
Slika 4.96. Fuzija akceptorske i implantirane demineralizovane kosti. Prisustvo krvnih sudova. (HE x100)



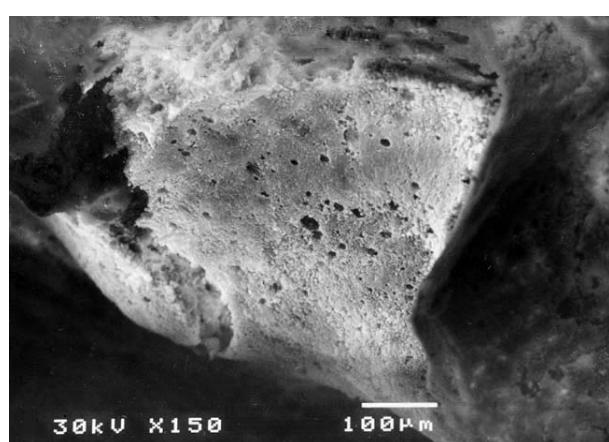
Slika 4.97. Formiranje nove kostne gredice i kostne srži. Implant izuzetno dobro integrisan kroz reparatornu reakciju.(HE x200)



Slika 4.98. Polje fuzionisanja demineralizovane kosti u kost i remodeliranje. Izdvajanje trabekula kosti i kostna srž. (Toluidin plavo x100)



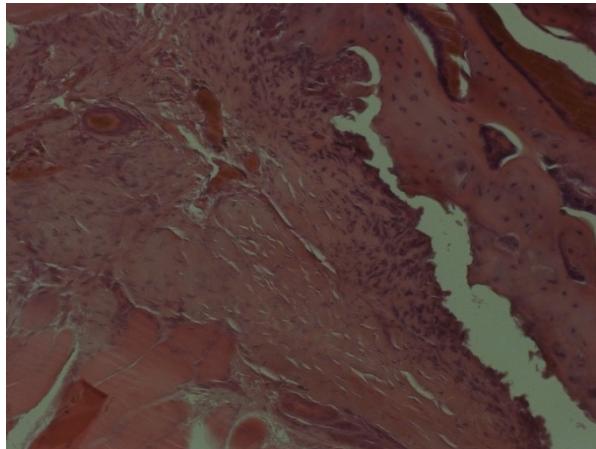
Slika 4.99. Enhondralno okoštavanje i obrazovanje Haverzovog sistema.(Mason trihrom x200)



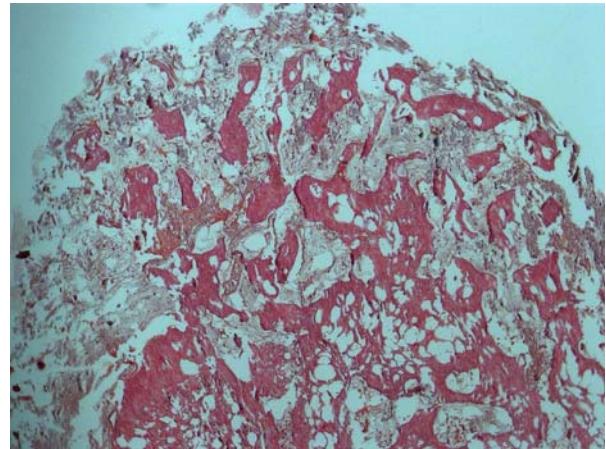
Slika 4.100. Odsustvo periosta na mestu defekta. SEM

4.4.3. Stanje VI nedelje posle implantacije

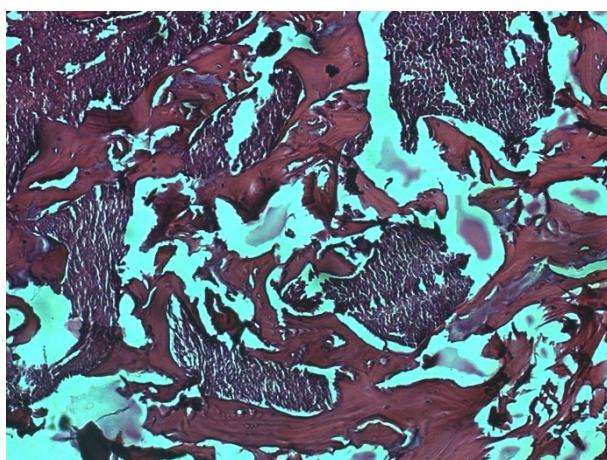
4.4.3.1. Histološki nalaz posle implantacije mineralnog matriksa



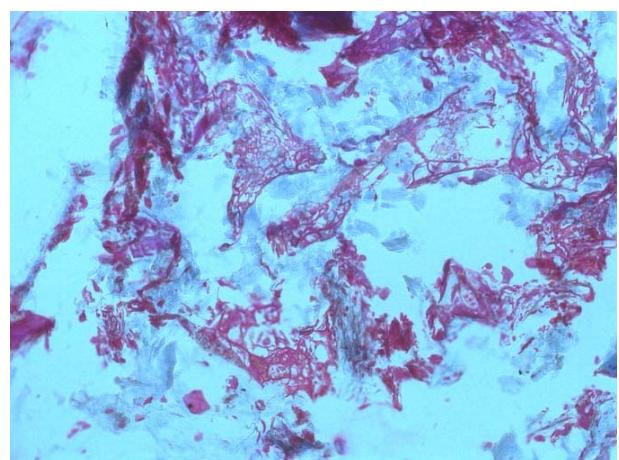
Slika 4.101. Kalusna reakcija akceptorske kosti u kontaktu sa implantatom mineralnog matriksa.(HE x100)



Slika 4.102. Implantat mineralnog matriksa prožet sunđerastom kosti.(HE x100)



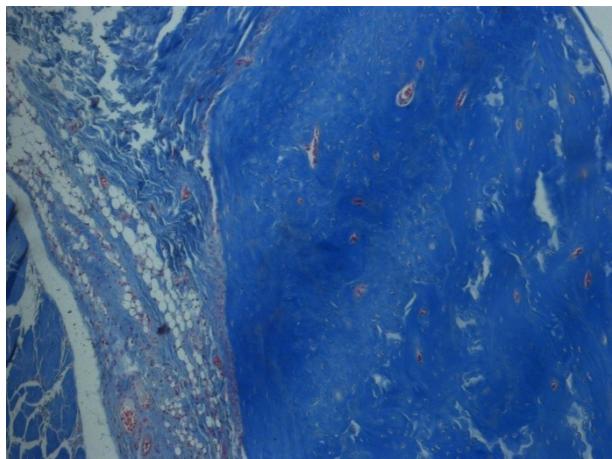
Slika 4.103. Trabekularna (sunđerasta) kost u implantatu mineralnog matriksa.(HE x200)



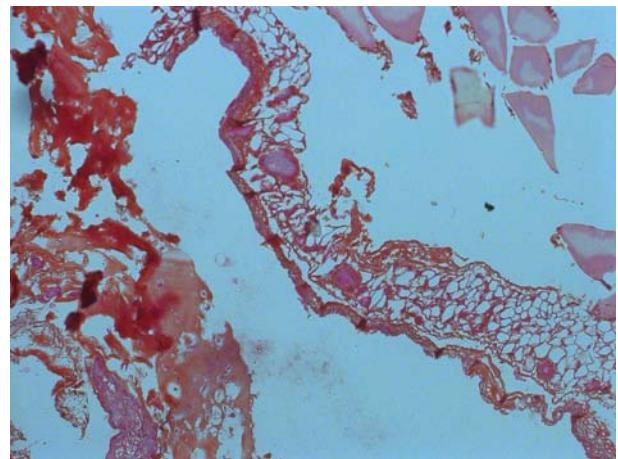
Slika 4.104. Partikula implantaata mineralnog matriksa sa kolagenom i kalcijumskim depozitima.(Mason trihrom x100)

Posle 6 nedelja od implantacije u kostni defekt implantat mineralnog matriksa je histološki još uvek evidentan. U okolnoj akceptorskoj kosti postoji ćelijska aktivnost u vidu kalusne reakcije i remodeliranje iste uz bogatu vaskularizaciju (Slika 4.101). Implantat pokazuje znake polustrukturirane mase, gde se između partikula smeštaju polja trabekularne (sunđeraste) kosti (Slika 4.102 i 4.103). Na ivicama pojedinih partikula mineralnog matriksa, a delom i u njihovoј unutrašnjosti, zapaža se kolagen i znaci kalcijumskih depozita (Slika 4.104).

4.4.3.2. Histološki nalaz posle implantacije kolagene membrane



Slika 4.105. Implantat kolagene membrane i okolna kost. Kolagen i adipociti. (Toluidin plavo x100)



Slika 4.106. Sloj kosti u delu implantata kolagene membrane.(HE x100)

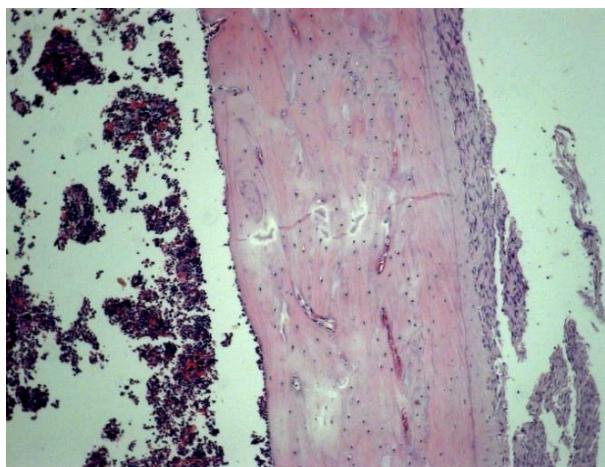
Implantat kolagene membrane posle 6 nedelja čvrsto prianja uz kost (Slika 4.105). Zapaža se da je obilno protkan vezivnim tkivom koje uz površinu kosti pokazuje drugačiju obojenost i konzistenciju od ostatka implantata. Pored veziva, implantat je infiltriran i adipoznim tkivom iz pravca kostne srži. Slika 4.106 pokazuje da u implantatu uz kost postoji jedna uska traka kosti. Ovo ukazuje da je implantat kolagene membrane, u neku ruku, vodica za formiranje koštanih slojeva na površini kosti.

4.4.3.3. Histološki nalaz posle implantacije demineralizovane kosti

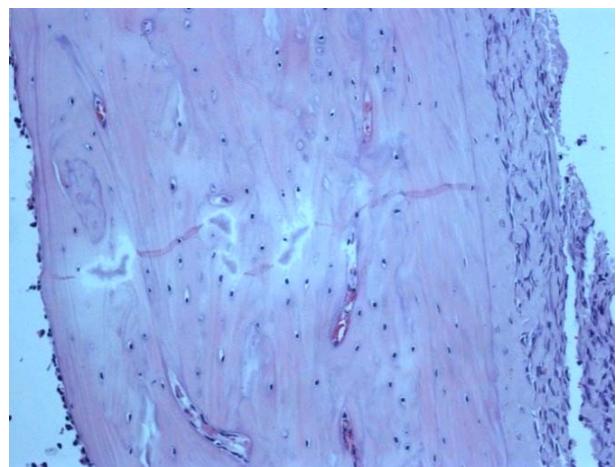
Posle šest nedelja od implantacije demineralizovane kosti u defekt femura mesto defekta je gotovo potpuno zaraslo. Gotovo, nije ga moguće razlikovati od okolne kosti. Jedino se u sredini zaraslog defekta zapaža jedna traka koja predstavlja još neresorbovane ostatke implantata demineralizovane kosti (Slika 4.107). Sa spoljašnje strane kosti, na mestu defekta, još uvek je prisutan kalusni element aktiviranih periostnih ćelija registrovan još u terminu od 3 nedelje (Slika 4.108). U unutrašnjem delu kosti još uvek se, na mikroplanu, odvija fuzija implantata i kosti kroz intenzivan proces remodeliranja kosti i uspostavljanja kostne srži (Slika 4.109 i 4.110). Ovaj proces objašnjava i postojanje trake na mestu nekadašnjeg defekta. Kako pokazuju slika 4.110 i slika 4.111 remodeliranje prvo zahvata periferne delove implantata dok u središnjem delu su još uvek prisutni ostaci demineralizovane kosti sa okolnim mezenhimskim

ćelijama. Dakle, ovakva ostrvca čine traku na mestu defekta. Po završetku resorpcije ove ćelije migriraju kroz sinuse kosti ili se zamjenjuju kostnom srži.

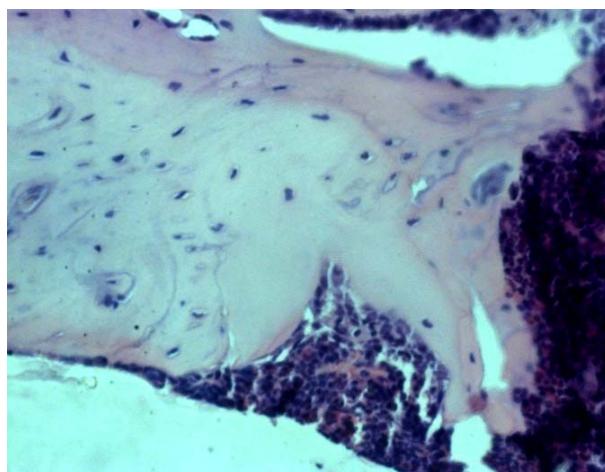
Za razliku od gore navedenih, kontrolni defekt nije zarastao u potpunosti, ni posle 6 nedelja (Slika 4.112). Ovaj defekt karakteriše zarastanje u vidu prstenasto novoformirane kosti, u manjoj meri, sa oboda defekta. Glavni doprinos zarastanju daje aktivnost periosta koji delimično urasta u defekt, a drugim delom ga prerasta u tankom sloju.



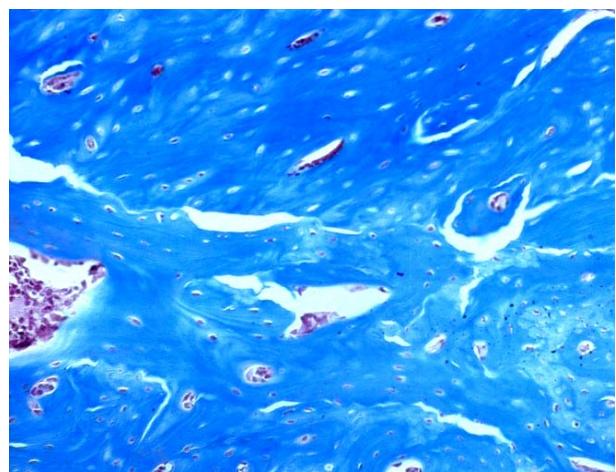
Slika 4.107. Opšti izgled kosti na mestu defekta.
(HE x50)



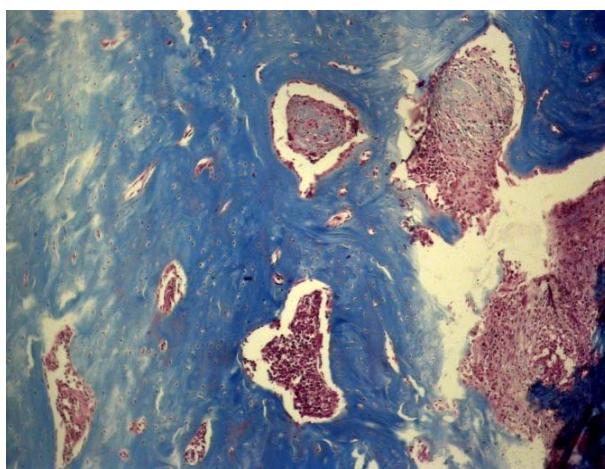
Slika 4.108. Ostaci implantata demineralizovane kosti i hipertrofirani periost.(Mason trihrom x100)



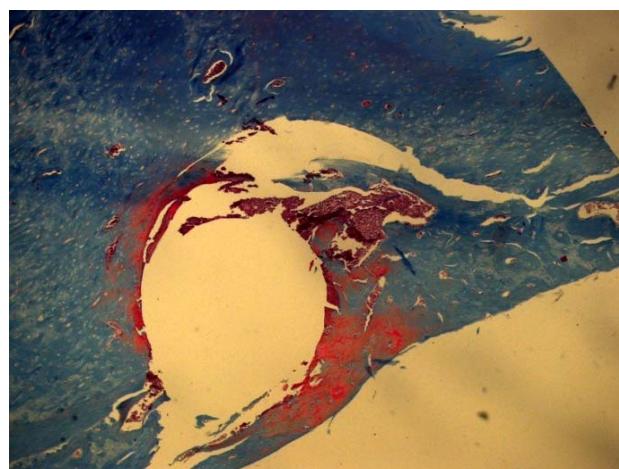
Slika 4.109. Remodeliranje kosti i uspostavljanje kostne srži.(HE x200)



Slika 4.110. Remodeliranje kosti u zoni ostataka implantata demineralizovane kosti. (Toluidin plavo x200)



Slika 4.111. Remodeliranje kosti u zoni nakupina mezenimskih ćelija.(Toluidin plavo x100)



Slika 4.112. Zarastanje kontrolnog defekta.
(Toluidin plavo x100)

5. DISKUSIJA

Razumeti biološke mehanizme zarastanja kosti kod modela na životinjama je od najveće važnosti kako bi se dobili verodostojni podaci, koji vode ka daljem razvoju sredstava za asistiranu reparaciju i regeneraciju kosti i konačno kliničkoj primeni na ljudima. Formiranje dobro okarakterisanog modela kostnog defekta je prvi korak pri proučavanju osteinduktivnosti i osteokonduktivnosti potencijalnih implanata i supstituenata kosti. Ova teza je fokusirana na utvrđivanje i opisivanje efekta implantirane demineralizovane kosti na zarastanje kostnog defekta na skeletnom mestu koje nosi opterećenje kod eksperimentalnih životinja.

Definicija zarastanja kosti može biti posmatrana u različitim kontekstima. Neki autori smatraju da srastanje predstavlja proces formiranja čvrstog kalusa koji spaja frakturne segmente, dok drugi tvrde da je ono povratak mehaničkih osobina (*Brand, 1983*) i funkcionalnih sposobnosti kosti (*Ekeland et al., 1981*). U ovoj disertaciji zarastanje je definisano kao obrazovanje sunđeraste ili lamelarne kosti, sa ili bez regeneracije kostne srži, pri čemu je ono završeno onda kada je mesto defekta potpuno ispunjeno sunđerasom ili lamelarnom kosti.

U našim *in vivo* ispitivanjima eksperimentalnim životinjama je subkutano, intramuskularno i u kostni defekt femura implantiran samo jedan od tri ispitivana materijala. Dobijeni rezultati su razmatrani u vremenskim intervalima posle 1, 3 i 6 nedelja od implantacije.

Ektopična indukovana osteogeneza je uzeta kao model da bi se sagledali samo implanti kao faktor u komparaciji sa osteogenom *in situ* u kojoj fiziološki faktori iz kostnog tkiva deluju na reparativne osteogene procese.

Mišić kao model za idukovanu ektopičnu osteogenezu je uzet zbog visoke okrvljenosti, s obzirom da je vaskularizacija fiziološki uslov za osteogene procese.

Sa druge strane, u subkutanom modelu oskudan je vaskularni faktor što nam omogućava da sagledamo osteogeni potencijal implanta nezavisno od procesa vaskulogeneze. Pojava krvnih sudova u subkutanom implantatu govori u prilog dobrog

osteogenog potencijala biomaterijala, zato što je vaskularizacija faza koja prethodi osteogenoj fazi.

Kostni defekt model obezbeđuje sve navedene uslove na jednom mestu. Prisutan je mineralni deo, kolagen iz okolnog organskog matriksa, dosta krvnih sudova i još kostna srž kao pul matičnih osteogenih ćelija. Kost je ortotopično mesto osteogeneze.

Opšta karakteristika preparata svih implantiranih materijala u našoj histopatološkoj analizi je njihov homogen izgled i mnogo jača eozinofilnost od celularnog kompartimenta preparata. S druge strane, implanti od mineralnog matriksa imaju sitnogranularnu strukturu i uočljivo slabiju eozinofilnost od demineralizovane kosti. Ovo možemo objasniti razlikom u strukturi i molekulskom sastavu ova dva ispitivana materijala, a shodno tome, razlikom u dinamici njihove biodegradacije i nivoom oslobođenih produkata od kojih zavisi vrsta i fenotip infiltriranih ćelija u implantat. Razgradnja demineralizovane kosti, u svim eksperimentalnim modelima, je brža u odnosu na implantirani mineralni matriks i dešava se sa unutrašnje strane implantata invazijom ćelija kroz Haverzove kanale, što se vidi kao rascep na slikama 4.24; 4.53. i 4.56.

Na implantatima mineralnog matriksa ćelije su locirane periferno. Posle ovoga, sekretornom aktivnošću makrofagnih ćelija, pokreće se površinska resorpcija partikula što za posledicu ima da se implantat popunjava telesnom tečnošću, pri čemu u unutrašnjost partikule dospevaju proteini, što se ogleda u promeni stepena eozinofilnosti preparata u 3 i 6 nedelji. Ovo je u saglasnosti sa objavljenim podacima da se razlikuju obrasci degradacionih procesa, kada su u pitanju različiti biomaterijali (*Shikinami et al., 1999*). Uočava se razlika između implaniranog mineralnog matriksa i demineralizovane kosti u tempu degradacionih procesa. Kada je u pitanju implantirani mineralni matriks potreban je izvestan period vremena da degradacioni procesi dosegnu unutrašnjost implantata. S druge strane, implantirana demineralizovana kost omogućuje homogeniju degradaciju zbog verovatno lakše difuzije tečnosti i prolaza ćelija kroz implantat.

Na analiziranim preparatima nađen je granulomatozni odgovor posle 1nedelje od implantacije, koji u 3 i 6 nedelji gubi na intenzitetu. Uočljivo je da je resorpcija najintenzivnija na implantatima demineralizovane kosti, zatim na implantiranim kolegenim membranama, a najsporije ide na implantiranom mineralnom matriksu.

Tako, posle 3 nedelje, resorpcija je još samo malo uočljiva na implantatima demineralizovane kosti, a intenzivna je još uvek na implantatima od mineralnog matriksa. Posle 6 nedelja znaci resorpcije implantirane kolagene membrane su već minorni, ali još uvek su uočljivi na implantatima od mineralnog matriksa. S druge strane, celularni odgovor subkutane i intramuskularne implantacije podseća na onaj viđen kod koštanih implantata.

Postoji više objavljenih nalaza o tome da implantirani biomatarijali mogu da se javе kao inflamatorni agens (*Schumacher, 1987*). Uočeno prisustvo inflamacije oko svih implantata je moralo biti očekivano zato što je to strano telо u organizmu. Treba imati u vidu da i sama povredа tkiva indukuje inflamatorni proces. Takođe, eritrociti i ostatak hemoragijskog procesa su uzrok nekrotičnih pojava. Fe koje se oslobađa iz liziranih eritrocita učestvuјe u stvaranju slobodnih radikala kiseonika i to je važan faktor destrukcije tkiva. Verovatno i kao posledica povrede i hemoragije koja je prati dolazi do fiziološke aktivacije kaskade infiltracije granulocita, makrofaga, limfocita i na kraju fibroblasta. Makrofagi i limfociti preko svojih citokina, privlače druge ćelije, a takođe stimulišu proliferaciju ćelija koje su invadirale u prostore implantata. U takvim patofiziološkim uslovima su stimulisani procesi angiogeneze, koji su ključni događaj za posledičnu osteogenezu.

Multinuklearne ćelije koje se vide na preparatima su znak inflamatornog procesa. Prisustvo intenzivne fagocitoze i posle 6 nedelja na partikulama implantiranog mineralnog matriksa, ali slabo i na implantatima demineralizovane kosti verovatno je posledica razlika u njihovoј strukturi. Dugo održanje fagocitoze je karakteristično za dugotrajnu resorpciju mineralnog matriksa. Inflamatorna reakcija na unošenje kolagene membrane, mineralnog matriksa i alogene demineralizovane kosti je i prisustvo PMN leukocita na analiziranim preparatima. Karakteristika inflamatornog odgovora je i veliki porast broja neutrofila u oblasti implantata. Svakako da osim strukture i hemijskog sastava implantata treba uvažiti i podatke da se neke karakteristike inflamatornog odgovora ne pokazuju u nekim drugim modelima implantacije (*Hooper et al., 2000*).

Nasuprot radiografskoj analizi, gde zbog malih dimenzija defekta i malog volumena implantata nije bilo moguće jasno identifikovati pojedine elemente, detaljniju vizuelizaciju popravke kosti sa biološkog aspekta omogućila su nam diferencijalna histološka bojenja.

Lokacija povrede je jedan od odlučujućih faktora u procesu zarastanja kosti. Pri izradi ove teze, kostni defekt femura je uspešno primenjivan i pokazano je da ispunjava kriterijume izvodljivog mesta, tj. lokalizovan na mestu koje je težinski opterećeno, nema potrebe za spoljnim ili unutrašnjim fiksatorima, ne ometa pokretljivost životinje, ne nalazi se u blizini osetljivih organa, kao u slučaju kalvarijalnih defekata i laka identifikacija površinske anatomije. Defekt femura je pogodan zbog toga što je mesto defekta standardizovane veličine i lako ponovljivo. Veličina defekta je određena promerom burgije. Isto tako, ovaj model može da primi implant bez ulaska u okolno meko tkivo. Uzimajući u obzir sve ove faktore, kostni defekt femura je odabran za ispitivanje efekta implantiranih materijala i uticaja drugih bioloških faktora iz fiziološkog okruženja na proces zarastanja kosti.

Procena ovog modela pokazuje da on, sa implantatom demineralizovane kosti, zarasta za 3 nedelje i ne predstavlja kritično nesrastajući defekt. Do zarastanja dolazi delom zbog intaktnog okolnog korteksa i okolne kostne srži koji su bogati nediferenciranim mezenhimskim matičnim ćelijama i osteoprogenitorskim ćelijama. MSC ćelije imaju potencijal da se diferenciraju u različite ćelijске tipove zavisno od sredine i regulišućih faktora (*Boyan et al., 2003*). Favorizujući uslovi, kao što su bogata vaskularizacija i relativna stabilnost kosti, mogu dovesti do toga da se ćelije diferenciraju u hondrocite ili osteoblaste, što rezultira zarašlom kosti. Kolagena vlakna iz demineralizovane kosti ostaju verovatno integralni deo novog matriksa, a taj kolagen je takođe pogodna mikrosredina za formiranje kostne srži i za naseljavanje mezenhimskih ćelija. Neke ćelije iz kostne srži se mogu diferencirati u adipocite koji su pronađeni u presecima zarastajuće kosti u slučaju impantacije kolagene membrane (Slika 4.105).

U subkutanoj i intramuskularnoj implantaciji demineralizovana kost pruža mikrosredinske uslove za ektopičnu hematopoezu i ektopičnu osteogenezu i ta dva procesa idu uporedno. Između mišićnih ćelija postoje mezenhimoide ćelije i mezoangioblastne ćelije. Ove ćelijске populacije mogu da budu odgovorne za pojavu ektopične hematopoeze i osteogeneze u mišiću kao okruženju, a po dubini kroz implantat od demineralizovane kosti. S druge strane, kontrakcije mišića oko implantata predstavljaju neku vrstu perfuzione pumpe, koja dodatno doprinosi da ove ćelije dospeju duboko u implantat od demineralizovane kosti.

Pravac formiranja nove kosti u defektu femura potvrđuje mišljenje da se „kost ne može obrazovati u odsustvu krvnih sudova“ (*Caplan, 1988*). Zarastanje je napredovalo sa dela femura gde je smeštena intaktna kostna srž bogata krvnim sudovima. Angiogeneza je veoma bitna kod zarastanja kosti (*Hausman et al., 2001*), iako je njen značaj u pojedinim fazama zarastanja diskutabilan. Pokazano je da razaranje vaskularne zalihe odlaže, ali ne zaustavlja srastanje frakture. Chidgey i sar. su demonstrirali da se krutost kalusa vratila na normalu nakon obnavljanja krvotoka između fragmenata kosti (*Chidgey et al., 1986*). Kada je angiogeneza inhibirana, formiranje početnog kalusa i periostne nove kosti je dramatično prigušeno, što rezultuje atrofičnim nesrastanjem (*Hausman et al., 2001*). Jasno je da vaskularna mreža doprinosi razvoju kosti na nekoliko načina. Prvo, sistemski, ona igra ulogu transportnog sistema za kiseonik, hormone, nutrijente i otpadne produkte, ali isto tako i za stem ćelije domaćina i imunski sistem. Drugo, lokalno otpušta faktore, proizvedene od strane endotelnih ćelija, npr. TGF- β 1 i VEGF i BMP proteine, koji stimulišu proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta. Treće, stimuliše proliferaciju stromalnih ćelija kostne srži direktnim kontaktom sa endotelnim ćelijama (*Villars et al., 2000*). Slični po funkciji faktori rasta, kao što su epidermalni faktor rasta (EGF) i PDGF, mogu pod određenim uslovima imati antagonistički efekat na BMSC. Preko svojih tirozin kinaznih receptora, EGF ubrzava osteoblastnu diferencijaciju humanih BMSC ćelija, dok PDGF inhibira njihovu osteoblastnu diferencijaciju (*Kratchmarova et al., 2005*).

Prisustvo hondrocita na mestu defekta dovelo je do diskusije u vezi njihovog porekla. Za vreme operacije, neki defekti su bušeni blizu ploče rasta zbog malih dimenzija femura, na taj način prekidajući fizički kontinuitet ploče rasta. Da li je bušenje pokrenulo proliferaciju hondrocita, hipertrofiju i diferencijaciju u kost ili je prisustvo hondrocita komponenta normalne popravke kosti? Prisustvo hrskavice sugerije da su se enhondralna i intramembranska osifikacija mogle dogoditi istovremeno u reparaciji defekta dugih kosti kod pacova. Ovo je u skladu sa drugim studijama kod kojih je enhondralna osifikacija jedan međustadijum regeneracije kosti kod malih životinja (*Yamagiwa et al., 1999; Uusitalo et al., 2001; Eerola et al., 1998*). U studiji koju je sproveo Glimcher hrskavičavi intermedijni stadijum u kostnoj reparaciji izostaje (*Glimcher et al., 1980*). Ipak, hrskavičave karakteristike moguće bi biti jedinstvene za grupu glodara, kao što je predložio Uusitalo (*Uusitalo et al., 2001*). Poznato je da se obrazovanje kosti ubrzava i povećava kod imunodeficijentnih životinja, dok su se slična istraživanja kod

imunokompetentnih životinja pokazala površna (*Alden et al., 1999; Musgrave et al., 1999*). Alden i sar. su ubrizgavajući BMP-2 u „gole“ pacove zapazili endohondralnu osifikaciju, dok je kod imunokompetentnih pacova formiranje koštanog tkiva bilo inhibirano. Musgrave i sar. su primetili slabije formiranje kosti u mišićima imunokompetentnih miševa u poređenju sa imunodeficijentnim miševima. Esse je pokazao da alogeni kostni kalemi zarastaju kod Balb/c miševa, dok je kod C57BL/10 miševa zarastanje umanjeno (*Esse et al., 1981*). Nekoliko uporednih studija, o kapacitetu prirodnog zarastanja kosti kod imunodeficijentnih i imunokompetentnih životinja, su dale kontradiktorne rezultate. Vignery i sar. su prepostavili da imunodeficijentni miševi pokazuju abnormalnu aktivnost u remodeliranju kosti (*Vignery et al., 1981*), a McCauley i sar. su primetili razlike u njihovoј brzini zarastanja (*McCauley et al., 1989*). Kirkeby, sa druge strane, je pokazao da atimični i normalni pacovi imaju slične kapacitete u zarastanju kosti (*Kirkeby, 1991*).

Odbacivanje implantata i tkiva je jedan od glavnih problema u rekonstruktivnoj hirurgiji. Pokazano je da T limfociti učestvuju u prepoznavanju i uništavanju stranih materijala koji prodržu u telo. Pored svoje odbrambene uloge, pokazano je da T limfociti menjaju vaskularnu i mišićnu reparaciju (*Hansson et al., 1991*). Atrofija pojedinih mišićnih ćelija oko implantata, koja je evidentirana nakon 1 i 3 nedelje, pored učinka implantata i nekrotičnih procesa, može biti delom pripisana i denervaciji delova mišića, načinjenih operativnim zahvatom. Kao što je poznato, nervni završeci u mišiću imaju sposobnost prorastanja, što delimično vraća funkciju pojedinih mišićnih ćelija, čime možemo objasniti normalan histološki izgled mišića oko implantata posle 6 nedelja. Kod zarastanja rana, dokazano je da T limfociti igraju dvojnu ulogu. U ranoj fazi reparacije imaju uloga stimulatora makrofaga, endotelnih ćelija i fibroblasta, a kasnije ulogu inhibicije migracije fibroblasta, replikacije DNK i sinteze proteina (*Barbul et al., 1989*). Smatra se, da se sličan proces dešava i pri zarastanju kostiju. Pri tome treba imati u vidu i sledeće. Prvo, aktivacija faktora rasta neophodnih za proces zarastanja kosti nije isključivo pod kontrolom imunskog sistema ili samo T limfocita. Drugo, T limfociti prevashodno imaju ulogu u remodeliranju kosti, a ne u iniciranju procesa osteogeneze na mestu povrede kosti. Weitzmann i sar. su pokazali da aktivirane T ćelije pojačavaju osteklastogenezu i ubrzavaju resorpciju kosti, sličnu onoj, koja se sreće kod osteoporotičnih pacijenata (*Weitzmann et al., 2001*).

U slučaju traume ili invazije stranih tela, influks limfocita na povređeno mesto podstiče ranu fazu zapaljenskog odgovora, pri čemu se aktivira kaskada reakcija što rezultira migracijom granulocita, makrofaga i drugih limfocita, kao i produkcijom faktora rasta na mestu defekta (*Remedios, 1999; Simmons, 1985*). Granulociti i makrofagi deluju kao ćelije čistači oštećenog tkiva, a makrofagi i limfociti proizvode i faktore rasta za reparatorne ćelije, kao i angiogene faktore za neovaskularizaciju (*Remedios, 1999; Leibovich and Ross, 1975*).

Nekroza u delu intaktne kosti na obodu defekta femura (Slika 4.79), koja se zapaža posle 1 nedelje, zaslužuje da se posebno prodiskutuje. Može se postaviti pitanje: „da li je odsustvo ćelija posledica termičkog ili mehaničkog oštećenja kosti prilikom bušenja defekta“? Prilikom bušenja kosti mesto zahvata je permanentno hlađeno fiziološkim rastvorom, tako da je zagrevanje okolne kosti smanjeno ili gotovo isključeno, te stoga termičko oštećenje možemo isključiti kao uzrok. S druge strane, burgija pri bušenju izaziva vibracije, koje mogu da načine mikrofrakturne promene u kosti. Na mikroplanu one se ogledaju u razmicanju pojedinih osteona i vlakana, što posledično dovodi do toga da rezidentni osteociti izgube kontakt sa ECM ili im budu iskidani nastavci. Gubljenje kontakata ćelije od ECM dovodi do fenomena *anoikis* (*Frisch and Screamton, 2001*), gde ćelija, u zavisnosti od svog stepena diferenciranosti i preostalog genetskog kapaciteta, menja svoj fenotip i šalje signale okolini a, ako ne može to, ulazi u apoptozu. Apoptoza osteocita (*Verborgt et al., 2000; Noble, 2003*) aktivira osteoklaste, koji se svojom aktivnošću i signalima uključuju u kaskadni proces sanacije traume.

U našim eksperimentima proces reparacije kostnog defekta je imao normalan fiziološki tok, a bez komplikacija koje su moguće u ovakvim situacijama, što ukazuje na to da bi opisani mehanizmi mogli biti uključeni i u ostereparatornim procesima koje smo posmatrali.

Razmatranje rezultata SEM mikrografija implantata, prikazanih na slikama 4.25; 4.28; 4.45; 4.50 i 4.61, ukazuju da je do degradacije i promena došlo samo na površini implantata, ali ne i njihovoj unutrašnjosti, što ilustruje scenario reakcije živog organizma na implantat. Najpre u prvoj fazi, organizam isključivo dolazi u interakciju sa površinom implantata. Svi fenomeni koji se tada dešavaju zavise od fizičko-hemijskih osobina implantata. Tek, nakon površinskog rastvaranja implantata, dolazi do druge faze u kojoj preovladava reakcija živog organizma na implantat, koja se ogleda u migraciji određenih

fenotipova ćelija i u njihovoj proliferaciji. Ova dva fenomena se u kasnijim fazama međusobno preklapaju.

SEM analizom površine implantata uočavaju se ćelije, njihova morfologija, i sa tim u vezi, znaci sintetske aktivnosti, koji se ogledaju u prisustvu velikog broja vlakana i razvijenom ekstracelularnom matriksu. Kolagen iz ekstracelularnog matriksa i kroz vaskularne elemente infiltrirane osteogene ćelije, predstavljaju preduslov za proces mineralizacije i osteogenezu.

Sličnost u fizičkoj strukturi zarasle kosti, između eksperimentalnih grupa, pokazuje da se bilo kakve razlike u zarastanju kosti mogu pre pripisati biološkim dešavanjima u samoj kosti nego li mehaničkim osobinama implantata. S druge strane, formiranje sunđeraste (trabekularne) kosti u implantatu mineralnog matriksa može se pripisati hemijskom sastavu i površinskoj resorpciji sa fenomenom stvaranja mineralne „ljuske“, što je potvrđeno prilikom subkutane i intramuskularne implantacije.

Kritično-nesrastajući defekt se u istraživanjima često koristi kada treba proceniti sposobnost kostnog kalemskog supstituenta ili uticaj različitih bioloških faktora da pokreću zarastanje kosti. Kritično-nesrastajući defekt se definiše kao najmanja unutar-koštana rana koja ne zarasta za vreme životnog doba organizma (*Leunig et al., 2000*). Kada je defekt ovakve prirode, bilo koje zarastanje se dešava zahvaljujući implantatu ili tretmanu. Takođe, ovakav defekt može stimulisati telo da maksimalno iskoristi biološke kapacitete pri regeneraciji povređene kosti (*Kleinschmidt and Hollinger, 1992*).

U ovoj tezi kostni defekt od 2.1 mm je gotovo potpuno zarastao nakon 6 nedelja, na šta ukazuju potpuna regeneracija kostne srži i remodelovana kost u slučaju implantacije demineralizovane kosti.

Iako bi bilo zgodno proučiti efekat još većeg defekta, pokazano je da otpornost na savijanje i torziona snaga kosti značajno opadaju kad defekt premaši 10% dijametra kosti (*Edgerton et al., 1990*). Još veći defekt bi znatno smanjio snagu kosti i strukturu učinio nestabilnom. U tom slučaju, fraktura kosti je vrlo moguća, što bi značilo udaljavanje od cilja teze, a to je zarastanje nefrakturnog defekta. Sve ovo nameće pitanje: „Da li je kritično-nesrastajući defekt na opterećenom mestu moguć bez kompromitovanja strukturne i mehaničke funkcije kosti?“ Hausman i sar. su rekli da je „zarastanje kod glodara snažno i da je neuspeh u zarastanju teško postići“ (*Hausman et al., 2001*). U jednoj kritici koju je dao Brand, on je primetio da je nesrastanje kosti kod

malih životinja teško postići bez „neuobičajenih hirurških sredstava“ (Brand, 1983). Veliki potencijal zarastanja kosti kod neprimatskih sisara, kao što su glodari, može predstavljati prepreku kada treba proizvesti kritično-nesrastajući defekt kosti. Čak, iako je ovakav defekt izvodljiv, nepraktično je ispitivati životinju tokom celog njenog života. Praktično rešenje bi bilo ograničiti bilo kakvu procenu na ranije vremenske termine gde se spontano zarastanje ne dešava. Imajući u vidu da kostni defekt femura nije potpuno zarastao za 3 nedelje, ovaj defekt mogao bi se analizirati u kraćem periodu od 3 nedelje. Iako ovaj defekt nije kritično-nesrastajući, mogao bi da posluži za dodatne studije koje bi uključile *in vivo* ispitivanja osteogenih ćelija gajenih i kondicioniranih u *in vitro* uslovima, kao i njihovu sposobnost rasta i mogućnost formiranja kosti za kratko vreme.

Precizni mehanizmi reparacije kosti još uvek nisu u potpunosti objašnjeni. Iako se u ovoj tezi proučavaju određeni faktori za koje se smatra da utiču na zarastanje kosti kod životinja, poznato je da je reparacija kosti kod ljudi fiziološki kompleksan proces, koji uključuje složene interakcije između endokrinog sistema (Einhorn, 1996), mehaničkih signala iz kosti (Gardner and Mishra, 2003) i mnoštva drugih faktora (pol, životno doba, zdravstveno stanje itd).

U fiziologiji normalne kosti, kao i pri procesu zarastanja i remodeliranja, pored osteoblasta i osteoklasta, bitnu ulogu imaju joni Ca i P, kao i aktivnost enzima alkalne fosfataze. Plazmatski nivo Ca i P u terminima 1, 3 i 6 nedelja posle povrede i implantacije nije se razlikovao od nivoa ovih elemenata kod intaktnih životinja, te stoga ovi rezultati nisu posebno razmatrani. Skeletni sistem je pul jona Ca i P i u sprezi sa digestivnim i ekskretornim sistemom ima ogromni homeostatski kapacitet u regulaciji nivoa ovih jona u cirkulaciji, tako da povreda, možda, lokalno dovodi do toga. Moglo bi se očekivati da u akutnoj fazi naglo dođe do lokalne promene. Obzirom da smo radili sa uzorcima koji su prethodno fiksirani, a potom dekalcinisani nije bilo moguće histohemijski identifikovati prisustvo Ca. Takođe, aktivnost enzima alkalne fosfataze se kompromituje postupkom histološke pripreme uzorka, zbog denaturacije proteina, pa i ovu vrstu nalaza treba uzimati sa rezervom. Dokazivanje Ca i alkalne fosfataze moguće je uraditi na preparatima svežeg tkiva, a za to je potrebno koristiti mikrotom za sečenje čvrstih tkiva, za šta nije postojala tehnička mogućnost. Ovo je bilo jedno od ograničenja našeg istraživanja.

Modeli korišćeni u našem istraživanju imaju svoje prednosti i mane. Male dimenzije eksperimentalnih životinja mogu ograničiti njihovu upotrebu u proučavanju ortotopičnog formiranja kosti (suprotno od ektopičnog formiranja). Iako se kod pacova kostni defekt femura može koristiti za proučavanje osteoinduktivnih i ostekonduktivnih biomaterijala, on je ipak ograničen na veoma male količine ispitivanih materijala. Kritični defekt model je dobar zbog činjenice da se u njegovom slučaju bilo kakvo zarastanje dešava zahvaljujući tretmanu ili implantatu. Ipak, pravljenje većeg defekta kosti na opterećenom mestu kod pacova ne može se ostvariti bez narušavanja mehaničkog i strukturnog integriteta kosti. Sva ova ograničenja kod pacova ne predstavljaju problem kod krupnih životinja. Veće dimenzije eksperimentalnih životinja omogućavaju njihovo korišćenje u modelima koji zahtevaju primenu većih mesta za zahvat, duži period procene osobina biomaterijala, kao i veći volumen uzoraka.

Uprkos svim ograničenjima u ovoj disertaciji, upotreba kostnog defekta femura kod krupnijih životinja predstavlja bi obećavajuće sredstvo u istraživanjima procesa zarastanja kostnih defekata. Imajući u vidu da su ispitivani implantati pokazali različita ponašanja u fiziološkom okruženju trebalo bi da:

Istraživač mora biti svestan da ispitivanja potencijalne kliničke primene kompetitivnih alternativa kostnih autokalema, počinje na kulturama ćelija preko eksperimenata na životnjama do predkliničkih proba. Kliničar, sa druge strane treba da ima odgovornost da tačno pozna prednosti i ograničenja pojedinih biomaterijala, i da, kada dođe do kliničke primene, informiše pacijenta o tome. Svaki stručnjak iz ove oblasti treba da ima odgovornost da kritički proučava mnoge radove iz ove oblasti, koji su objavljeni od strane mnogih istraživača širom sveta, a pri tome su objavljeni rezultati ponekad kontradiktorni.

Konačno, bila bi velika korist da ovakav kolektivni pristup problemu bude vodič zainteresovanim naučnicima, iz oblasti biomedicinskih nauka i nauka o biomaterijalima, u proučavanju i kreiranju budućnosti tkivnog inženjeringu kosti.

6. ZAKLJUČAK

- ❖ Postoji razlika u ponašanju i promenama ispitivanih materijala posle implantacije i izazvan tkivni odgovor.
- ❖ SEM analiza pokazuje promene na površini implantiranih materijala, koje se ogledaju u izmenjenoj mikrostrukturi implantata, a nastaju kao rezultat interakcije sa tkivom.
- ❖ Implantirana demineralizovana kost se homogenije degradira u odnosu na ostale vrste ispitivanog materijala, verovatno zbog lakše difuzije tečnosti i ulaska ćelija u implantat.
- ❖ Razgradnja demineralizovane kosti dešava se sa unutrašnje strane implantata invazijom ćelija.
- ❖ Stepen naseljenosti i dinamika naseljavanja implanata ćelijama su različiti i zavise od implantiranog materijala i mesta implantacije. Najnaseljeniji su implantati od demineralizovane kosti i kolagene membrane.
- ❖ Na partikulama implantiranog mineralnog matriksa ćelije se pretežno naseljavaju periferno.
- ❖ Ćelije bolje adheriraju na neravne površine implantata demineralizovane kosti, nego na glatke površine.
- ❖ Implantirani materijali u inicijalnoj fazi izazivaju granulomsku reakciju.
- ❖ Kada se porede subkutana, intramuskularna i implantacija u kostni defekt femura najsnažniju ćelijsku reakciju se vidi posle intramuskularne i u kostni defekt femura, a subkutana je najslabija, verovatno zato što to vaskularno oskudna sredina.
- ❖ U kostnom defektu femura resorpcija je najintenzivnija na implantatima demineralizovane kosti, zatim na implantiranim kolegenim membranama, a najsporije ide na implantiranom mineralnom matriksu.
- ❖ Osteogeneza na implantiranom mineralnom matriksu dešava se površinski.

- ❖ Pri implantaciji u kostni defekt femura demineralizovana kost se resorbuje i defekt zarasta za 6 nedelja uz remodelaciju kosti, dok mineralni matriks ostaje još uvek neresorbovan u okolnoj novoformiranoj sunđerastoj kosti.
- ❖ S obzirom da postoji razlika u ponašanju ispitivanih materijala u odnosu na brzinu resorpcije i izazvan tkivni odgovor, trebalo bi, pre eventualne upotrebe voditi računa o njihovim bioaktivnim svojstvima.
- ❖ Vlakna kolagena iz implantirane kolegene membrane i demineralizovane kosti su pogodan materijal za reparaciju kosti, jer ćelije dobro adheriraju na njih, lako se destruiraju i mogu da postanu deo novog matriksa kosti.
- ❖ Pri svim tipovima primenjivane implantacije (subkutana, intramuskularna i intrafemoralna) demineralizovana kost pokazuje svojstva osteogenog materijala, što preporučuje njenu primenu u rekonstrukciji oštećenja kosti.

7. LITERATURA

1. AALAMI, O.O., NACAMULI, R.P., LENTON, K.A., COWAN, C.M., FANG, T.D., FONG, K.D., SHI, Y.Y., SONG, H.M., SAHAR, D.E., LONGAKER, M.T. (2004): Applications of a mouse model of calvarial healing: differences in regenerative abilities of juveniles and adults. *Plast Reconstr Surg*, 114(3): p. 713-720.
2. AÇIL, Y., TERHEYDEN, H., DUNSCHE, A., FLEINER, B., JEPSEN, S. (2000): Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. *J Biomed Mater Res*, 51: 703-710.
3. ALDEN, T.D., PITTMAN, D.D., BERES, E.J., HANKINS, G.R., KALLMES, D.F., WISOTSKY, B.M., KERNS, K.M., HELM, G.A. (1999): Percutaneous spinal fusion using bone morphogenetic protein-2 gene therapy. *J Neurosurg*, 90 (1 Suppl): 109-114.
4. ALDEN, T.D., PITTMAN, D.D., HANKINS, G.R., BERES, E.J., ENGH, J.A., DAS, S., HUDSON S.B., KERNS, K.M., KALLMES, D.F., HELM, G.A. (1999): *In vivo* endochondral bone formation using a bone morphogenetic protein 2 adenoviral vector. *Hum Gene Ther*, 10(13): p. 2245-2253.
5. ALLISTON, T. and DERYNCK, R. (2002): Medicine: Interfering with bone remodelling. *Nature*, 416(6882): p. 686-687.
6. ANDERSON, J.M. (2000): *The Cellular Cascades of Wound Healing*. Toronto: EM Squared.
7. ARINZEH, T.L., PETER, S.J., ARCHAMBAULT, M.P., VAN DEN BOS, C., GORDON, S., KRAUS, K., SMITH, A., KADIYALA, S. (2003): Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am*, 85A: 1927-1935.
8. ASAUMI, K., NAKANISHI, T., ASAHIARA, H., INOUE, H., TAKIGAWA, M. (2000): Expression of neurotrophins and their receptors (TRK) during fracture healing. *Bone*, 26(6): p. 625-633.
9. ASHTON, B.A., ALLEN, T.D., HOWLETT, C.R., EAGLESOM, C.C., HATTORI, A., OWEN, M. (1980): Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo*. *Clin Orthop Relat Res*, 151: 294-307.
10. ASPENBERG, P. and ANDOLF, E. (1989): Bone induction by fetal and adult human bone matrix in athymic rats. *Acta Orthop Scand*, 60(2): p. 195-9.

11. AUBIN , J.E. (1998): Bone stem cells .*J Cell Biochem* (Suppl 31): 73–82.
12. BAB, I., ASHTON, B.A., SYFTESTAD, G.T., OWEN, M.E. (1984): Assessment of an *in vivo* diffusion chamber method as a quantitative assay for osteogenesis. *Calcif Tissue Int*, 36: 77–82.
13. BAKSH, D., DAVIES, J.E., ZANDSTRA, P.W. (2003): Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *Exp Hematol*, 31: 723–732.
14. BALABURSKI, G. and O'CONNOR, J.P. (2003): Determination of variations in gene expression during fracture healing. *Acta Orthop Scand*, 74(1): p. 22-30.
15. BANWART, J.C., ASHER, M.A., HASSANEIN, R.S. (1995): Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine*, 20: 1055–1060.
16. BARBUL, A., SHawe, T., ROTTER, S.M., EFRON, J.E., WASSERKRUG, H.L., BADAWY, S.B. (1989): Wound healing in nude mice: a study on the regulatory role of lymphocytes in fibroplasia. *Surgery*, 105(6): p. 764-9.
17. BARON, R., TROSS, R., VIGNERY, A. (1984): Evidence of sequential remodeling in rat trabecular bone: morphology, dynamic histomorphometry, and changes during skeletal maturation. *Anat Rec*, 208(1): p. 137-45.
18. BENSAÏD, W., OUDINA, K., VIATEAU, V., POTIER, E., BOUSSON, V., BLANCHAT, C., SEDEL, L., GUILLEMIN, G., PETITE, H. (2005): *De novo* reconstruction of functional bone by tissue engineering in the metatarsal sheep model. *Tissue Eng*, 11: 814–824.
19. BETZ, R.R., (2002): Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions. *Orthopedics*, 25(5 Suppl): p. 561-70.
20. BIANCO, P. and BOYDE, A. (1993): Confocal images of marrow stromal (Westen-Bainton) cells. *Histochemistry*, 100: 93–99.
21. BIANCO, P., RIMINUCCI, M., GRONTHOS, S., ROBEY, P.G. (2001). Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 19: 180–192.
22. BOBYN, J.D., MORTIMER, E.S., GLASSMAN, A.H., ENGH, C.A., MILLER, J.E., BROOKS, C.E. (1992): Producing and avoiding stress shielding. Laboratory and clinical observations of noncemented total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*, 274: 79–96.
23. BODEN, S.D., KANG, J., SANDHU, H., HELLER, J.G. (2002): Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to achieve posterolateral lumbar spine

fusion in humans: a prospective, randomized clinical pilot trial: 2002 Volvo Award in clinical studies. *Spine*, 27: 2662–2673.

24. BODEN, S.D., MARTIN, G.J. Jr., HORTON, W.C., TRUSS, T.L., SANDHU, H.S. (1998): Laparoscopic anterior spinal arthrodesis with rhBMP-2 in a titanium interbody threaded cage. *J Spinal Disord*, 11: 95–101.
25. BODEN, S.D., MARTIN, G.J. Jr., MORONE, M.A., UGBO, J.L., MOSKOVITZ, P.A. (1999): Posterolateral lumbar intertransverse process spine arthrodesis with recombinant human bone morphogenetic protein 2/hydroxyapatite-tricalcium phosphate after laminectomy in the nonhuman primate. *Spine*, 24: 1179–1185.
26. BODEN, S.D., ZDEBLICK, T.A., SANDHU, H.S., HEIM, S.E. (2000): The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: a preliminary report. *Spine*, 25: 376–381.
27. BOHNER, M. (2000): Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*, 31 (Suppl 4): 37–47.
28. BOLANDER , M.E. (1992): Regulation of fracture repair by growth factors . *Proc Soc Exp Biol Med*, 200: 165–170.
29. BONNARENS, F., EINHORN T.A. (1984): Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res*, 2(27): p. 97-101.
30. BORDEN, M., ATTAWIA, M., KHAN, Y., EL-AMIN, S.F., LAURENCIN, C.T. (2004): Tissue-engineered bone formation *in vivo* using a novel sintered polymeric microsphere matrix. *J Bone Joint Surg Br*, 86: 1200–1208.
31. BOS, G.D., GOLDBERG, V.M., ZIKA, J.M., HEIPLE, K.G., POWELL, A.E. (1983): Immune responses of rats to frozen bone allografts. *J Bone Joint Surg Am*, 65: 239–246.
32. BOSCH, C., MELSEN, B., VARGERVIK, K. (1998): Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg*, 9(4): p. 310-6.
33. BOURQE, W.T., GROSS, M., HALL, B.K. (1992): A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci*, 42(4): p. 369-74.
34. BOYAN, B.D., McMILLAN, J., LOHMANN, C.H., RANLY, D.N., SCHWARTZ, Z. (2003): *Bone Graft Substitutes: Basic information for successful clinical use with special focus on synthetic graft substitutes*, in *Bone Graft Substitutes*, C.T. Laurencin, Editor. ASTM International: West Conshohocken, PA. p. 231-259.
35. BOYNE , P.J. (1992): *Maxillofacial Surgery*. Philadelphia, PA: Saunders.
36. BRAND, R.A. (1983): *Fracture Healing*, in *Surgery of the musculoskeletal system*, C.M. Evarts, Editor. Churchill Livingstone Inc.: New York. p. 65-87.

37. BRIGHTON, C.T., HUNT R.M. (1991): Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg Am*, 73A: p. 832-47.
38. BRODKE, D., PEDROZO, H.A., KAPUR, T.A., ATTAWIA, M., KRAUS, K.H., HOLY, C.E., KADIYALA, S., BRUDER, S.P. (2006): Bone grafts prepared with selective cell retention technology heal canine segmental defects as effectively as autograft. *J Orthop Res*, 24: 857-866.
39. BRUDER, S.P., HOROWITZ, M.C., MOSCA, J.D., HAYNESWORTH, S.E. (1997): Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone*, 21: 225-235.
40. BRUDER, S.P., KRAUS, K.H., GOLDBERG, V.M., KADIYALA, S. (1998a): The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*, 80: 985-996.
41. BRUDER, S.P., KURTH, A.A., SHEA, M., HAYES, W.C., JAISWAL, N., KADIYALA, S. (1998b): Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 16: 155-162.
42. BUCHOLZ, R.W., (2003): *Clinical Issues in the Development of Bone Graft Substitutes in Orthopedic Trauma Care*, in *Bone Graft Substitutes*, C.T. Laurencin, Editor. ASTM International: West Conshohocken, PA. p. 289-297.
43. BURCHARDT, H. (1983): The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res*, 174: 28-42.
44. CANCEDDA, R., MASTROGIACOMO, M., BIANCHI, G., DERUBEIS, A., MURAGLIA, A., QUARTO, R. (2003): *Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone*. Novartis Found Symp, 249: 133-143. discussion 143-147, 170-174, 239-241.
45. CAPLAN, A.I. (2000): Mesenchymal stem cells and gene therapy. *Clin Orthop Relat Res*, 379 (Suppl): S67-S70.
46. CAPLAN, A.I. and GOLDBERG, V.M. (1999): Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues. *Clin Orthop Relat Res*, 367 (Suppl): S12-S16.
47. CAPLAN, A.I., (1988): Bone development. *Ciba Found Symp*, 136: p. 3-21.
48. CARPENTER, J.E., HIPP, J.A., GERHART, T.N., RUDMAN, C.G., HAYES, W.C., TRIPPEL, S.B. (1992): Failure of growth hormone to alter the biomechanics of fracture-healing in a rabbit model. *J Bone Joint Surg Am*, 74: 359-367.
49. CAWOOD, J.I. and HOWELL, R.A. (1991): Reconstructive preprosthetic surgery. I. Anatomical considerations. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 20: 75-82.

50. CHARALAMBIDES, C., BEER, M., COBB, A.G. (2005): Poor results after augmenting autograft with xenograft (Surgibone) in hip revision surgery: a report of 27 cases. *Acta Orthop*, 76: 544–549.
51. CHENG, M.H., BREY, E.M., ALLORI, A., SATTERFIELD, W.C., CHANG, D.W., PATRICK, C.W., MILLER, M.J. (2005): Ovine model for engineering bone segments. *Tissue Eng*, 11(1-2): p. 214-25.
52. CHEUNG, K.M., KALUARACHI, K., ANDREW, G., LU, W., CHAN, D., CHEAH, K.S. (2003): An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res*, 21(4): p. 685-90.
53. CHIDGEY, L., CHAKKALAKAL, D., BLOTCKY, A., CONNOLLY, J.F. (1986): Vascular reorganization and return of rigidity in fracture healing. *J Orthop Res*, 4(2): p. 173-9.
54. CHIOU, M., XU, Y., LONGAKER, M.T. (2006): Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 343: 562–644.
55. COLTER, D.C., CLASS, R., DIGIROLAMO, C.M., PROCKOP, D.J. (2000): Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 3213–3218.
56. COLTER, D.C., SEKIYA, I., PROCKOP, D.J. (2001): Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 7841–7845.
57. CONTAG, P.R., OLOMU, I.N., STEVENSON, D.K., CONTAG, C.H. (1998): Bioluminescent indicators in living mammals. *Nat Med*, 4: 245–247.
58. COOK, S.D., WOLFE, M.W., SALKELD, S.L., RUEGER, D.C. (1995): Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *J Bone Joint Surg Am*, 77: 734–750.
59. CORNELL , C.N. (1999): Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am*, 30: 591–598.
60. DACULSI, G., LEGEROS, R.Z., NERY, E., LYNCH, K., KEREBEL, B. (1989): Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics *in vivo* : ultrastructural and physicochemical characterization. *J Biomed Mater Res*, 23: 883–894.
61. D'AOUST, P., McCULLOCH, C.A., TENENBAUM, H.C., LEKIC, P.C. (2000): Etidronate (HEBP) promotes osteoblast differentiation and wound closure in rat calvaria. *Cell Tissue Res*, 302(3): p. 353-63.

62. de BRUIJN, J.D. (1998): Tissue engineering of goat bone: osteogenic potential of goat bone marrow cells. *Bioceramics* : 497–500.
63. de BRUYN, P.H. (1955): Bone formation by fresh and frozen autogenous and homogenous transplants of bone, bone marrow and periosteum. *Am J Anat*, 96: 375–417.
64. DESCHASEAUX, F. and CHARBORD, P. (2000): Human marrow stromal precursors are alpha 1 integrin subunit-positive. *J Cell Physiol*, 184: 319–325.
65. DI NICOLA, M., CARLO-STELLA, C., MAGNI, M., MILANESI, M., LONGONI, P.D., MATTEUCCI, P., GRISANTI, S., GIANNI, A.M. (2002): Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99: 3838–3843.
66. DUVALL, C.L., TAYLOR, W.R., WEISS, D., WOJTOWICZ, A.M., GULDBERG, R.E. (2006): Impaired angiogenesis, early callus formation, and late stage remodeling in fracture healing of osteopontin deficient mice. *J Bone Miner Res*, 22: 286–297.
67. DVORAK, H.F., HARVEY, V.S., ESTRELLA, P., BROWN, L.F., MCDONAGH, J., DVORAK, A.M. (1987): Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest*, 57: 673–686.
68. EDGERTON, B. C., AN, K. N., MORREY, B.F. (1990): Torsional strength reduction due to cortical defects in bone. *J Orthop Res*, 8(6): p. 851-5.
69. EEROLA, I., UUSITALO, H., ARO, H., VUORIO, E. (1998): Production of cartilage collagens during metaphyseal bone healing in the mouse. *Matrix Biol*, 17(4): p. 317-20.
70. EINHORN, T.A. (1996): *The bone organ system: form and function*, in *Osteoporosis*, R. Marcus, D. Felman, and J. Kelsey, Editors. Academic Press: San Diego, CA. p. 3-22.
71. EINHORN, T.A. (1999): Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clin Orthop*, (367 Suppl): p. 59-67.
72. EKELAND, A., ENGESEAETER, L.B., LANGELAND, N. (1981): Mechanical properties of fractured and intact rat femora evaluated by bending, torsional and tensile tests. *Acta Orthop Scand*, 52(6): p. 605-13.
73. ELSINGER, E.C. and LEAL, L. (1996). Coralline hydroxyapatite bone graft substitutes. *J Foot Ankle Surg*, 35: 396–399.
74. EMANS, P.J., PIEPER, J., HULSBOSCH, M.M., KOENDERS, M., KREIJVELD, E., SURTEL, D.A., VAN BLITTERSWIJK, C.A., BULSTRA, S.K., KUIJER, R., RIESLE, J. (2006). Differential cell viability of chondrocytes and progenitor cells in tissueengineered

- constructs following implantation into osteochondral defects. *Tissue Eng*, 12: 1699–1709.
75. ESSES, S., HALLORAN, P., KLIMAN, M., LANGER, F. (1981): Bone allografts in mice: determinants of immunogenicity and healing. *Transplant Proc*, 13(1 Pt 2): p. 885-7.
 76. FAZILI, M., VAN DER DUSSEN, F.M., VAN WAAS, M.A. (1986): Long-term results of augmentation of the atrophic mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 15: 513–520.
 77. FEELEY, B.T., CONDUAH, A.H., SUGIYAMA, O., KRENEK, L., CHEN, I.S., LIEBERMAN, J.R. (2006): *In vivo* molecular imaging of adenoviral versus lentiviral gene therapy in two bone formation models. *J Orthop Res*, 24: 1709–1721.
 78. FLANAGAN, S.P., (1966): ‘Nude’, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res*, 8(3): p. 295-309.
 79. FLEMING, J.E. JR., CORNELL, C.N., MUSCHLER, G.F. (2000): Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthop Clin North Am*, 31: 357–374.
 80. FOX, A. and HARISON, L.C. (2000): Innate immunity and graft rejection. *Immunol Rev*, 173: p. 141-7.
 81. FRIEDENSTEIN, A. and KURALESOVA, A.I. (1971): Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras. *Transplantation*, 12: 99–108.
 82. FRIEDENSTEIN, A.J. (1962): Humoral nature of osteogenic activity of transitional epithelium. *Nature*, 194: 698–699.
 83. FRIEDENSTEIN, A.J., CHAILAKHJAN, R.K., LALYKINA, K.S. (1970): The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 3: 393–403.
 84. FRIEDENSTEIN, A.J., CHAILAKHYAN, R.K., GERASIMOV, U.V. (1987): Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*, 20: 263–272.
 85. FRIEDENSTEIN, A.J., GORSKAJA, J.F., KULAGINA, N.N. (1976): Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 4: 267–274.
 86. FRIEDENSTEIN, A.J., IVANOV-SMOLENSKI, A.A., CHAJLAKJAN, R.K., GORSKAYA, U.F., KURALESOVA, A.I., LATZINIK, N.W., GERASIMOW, U.W. (1978): Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants. *Exp Hematol*, 6: 440–444.
 87. FRIEDENSTEIN, A.J., LATZINIK, N.V., GORSKAYA, Y.U.F., LURIA, E.A., MOSKVINA, I.L. (1992): Bone marrow stromal colony formation requires stimulation by haemopoietic cells. *Bone Miner*, 18: 199–213.

88. FRIEDENSTEIN, A.Y. (1968): Induction of bone tissue by transitional epithelium. *Clin Orthop Relat Res*, 59: 21–37.
89. FRIEDLAENDER, G.E. (1983): Immune responses to osteochondral allografts. Current knowledge and future directions. *Clin Orthop Relat Res*, 174: 58–68.
90. FRIEDLAENDER, G.E. (1987): Bone banking. In support of reconstructive surgery of the hip. *Clin Orthop Relat Res*, 225: 17–21.
91. FRIEDLAENDER, G.E., STRONG, D.M., SELL, K.W. (1976): Studies on the antigenicity of bone. I. Freeze-dried and deep-frozen bone allografts in rabbits. *J Bone Joint Surg Am*, 58(6): p. 854-8.
92. FRISCH, S.M., SCREATON, R.A. (2001): "Anoikis mechanisms". *Current Opinion in Cell Biology*, 13 (5): 555–62.
93. FUJITA, M., KINOSHITA, Y., SATO, E., MAEDA, H., OZONO, S., NEGISHI, H., KAWASE, T., HIRAKAWA, Y., TAKAMOTO, T., TABATA, Y., KAMEYAMA, Y. (2005). Proliferation and differentiation of rat bone marrow stromal cells on poly(glycolic acid)-collagen sponge. *Tissue Eng*, 11: 1346–1355.
94. GARDNER, T.N. and MISHRA, S. (2003): The biomechanical environment of a bone fracture and its influence upon the morphology of healing. *Med Eng Phys*, 25(6): p. 455-64.
95. GERBER, H.P., VU, T.H., RYAN, A.M., KOWALSKI, J., WERB, Z., FERRARA, N. (1999): VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med*, 5: 623–628.
96. GIANNOUDIS, P.V., DINOPoulos, H., TSIRIDIS, E. (2005): Bone substitutes: an update. *Injury*, 36 (Suppl 3): S20–S27.
97. GLIMCHER, M.J., SHAPIRO, F., ELLIS, R.D., EYRE, D.R. (1980): Changes in tissue morphology and collagen composition during the repair of cortical bone in the adult chicken. *J Bone Joint Surg Am*, 62(6): p. 964-73.
98. GOLDBERG, V.M. and STEVENSON, S. (1990): *Bone Transplantation*. New York: Churchill Livingstone.
99. GOSHIMA, J., GOLDBERG, V.M., CAPLAN, A.I. (1991): The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. *Clin Orthop*, 269: 274–183.
100. GRIFFITHS, A.D., WILLIAMS, S.C., HARTLEY, O., TOMLINSON, I.M., WATERHOUSE, P., CROSBY, W.L., KONTERMANN, R.E., JONES, P.T., LOW, N.M., ALLISON, T.J., et al. (1994): Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBOJ*, 13: 3245–3260.

101. GRONTHOS, S. and SIMMONS, P.J. (1995): The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions *in vitro*. *Blood*, 85: 929–940.
102. GRONTHOS, S., GRAVES, S.E., OHTA, S., SIMMONS, P.J. (1994): The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*, 84: 4164–4173.
103. GUPTA, M.C. and MAITRA, S. (2002): Bone grafts and bone morphogenetic proteins in spine fusion. *Cell Tissue Bank*, 3: 255–267.
104. HABIBOVIC, P., YUAN, H., VAN DEN DOEL, M., SEES, T.M., VAN BLITTERSWIJK, C.A., DE GROOT, K. (2006): Relevance of osteoinductive biomaterials in critical-sized orthotopic defect. *J Orthop Res*, 24: 867–876.
105. HABIBOVIC, P., YUAN, H., VAN DER VALK, C.M., MEIJER, G., VAN BLITTERSWIJK, C.A., DE GROOT, K. (2005): 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*, 26: 3565–3575.
106. HACKER, M., TESSMAR, J., NEUBAUER, M., BLAIMER, A., BLUNK, T., GÖPFERICH, A., SCHULZ, M.B. (2003): Towards biomimetic scaffolds: anhydrous scaffold fabrication from biodegradable amine-reactive diblock copolymers. *Biomaterials*, 24: 4459–4473.
107. HANKEMEIER, S., GRASSEL, S., PLENZ, G., SPIEGEL, H.U., BRUCKNER, P., PROBST, A. (2001): Alteration of fracture stability influences chondrogenesis, osteogenesis and immigration of macrophages. *J Orthop Res*, 19(4): p. 531-8.
108. HANSSON, G.K., HOLM, J., HOLM, S., FOTEV, Z., HEDRICH, H.J., FINGERLE, J. (1991): T lymphocytes inhibit the vascular response to injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(23): p. 10530-4.
109. HARTGERINK, J.D., BENIASH, E., STUPP, S.I. (2001): Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Science*, 294: 1684–1688.
110. HASHIMOTO, J., YOSHIKAWA, H., TAKAOKA, K., SHIMIZU, N., MASUHARA, K., TSUDA, T., MIYAMOTO, S., ONO, K. (1989): Inhibitory effects of tumor necrosis factor alpha on fracture healing in rats. *Bone*, 10(6): p. 453-7.
111. HAUSMAN, M.R., SCHAFFLER, M.B., MAJESKA, R.J. (2001): Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone*, 29(6): p. 560-4.
112. HEDBERG, E.L., KROESE-DEUTMAN, H.C., SHIH, C.K., CROWTHER, R.S., CARNEY, D.H., MIKOS, A.G., JANSEN, J.A. (2005a): Effect of varied release kinetics of the osteogenic thrombin peptide TP508 from biodegradable, polymeric scaffolds on bone formation *in vivo*. *J Biomed Mater Res A*, 72: 343–353.

113. HEDBERG, E.L., KROESE-DEUTMAN, H.C., SHIH, C.K., CROWTHER, R.S., CARNEY, D.H., MIKOS, A.G., JANSEN, J.A. (2005b): *In vivo* degradation of porous poly(propylene fumarate)/poly(DL-lactic-co-glycolic acid) composite scaffolds. *Biomaterials*, 26: 3215–3225.
114. HEIPLE, K.G., GOLDBERG, V.M., POWELL, A.E., BOS, G.D., ZIKA J.M., (1987): Biology of cancellous bone grafts. *Orthop Clin North Am*, 18(2): p. 179-85.
115. HENTZ, V.R. and CHANG, J. (2001): Tissue engineering for reconstruction of the thumb. *N Engl J Med*, 344: 1547–1548.
116. HETHERINGTON, V.J., KAWALEC, J.S., DOCKERY, D.S., TARGONI, O.S., LEHMANN, P.V., NADLER, D. (2005): Immunologic testing of xeno-derived osteochondral grafts using peripheral blood mononuclear cells from healthy human donors. *BMC Musculoskelet Disord*, 6: 36.
117. HILTUNEN, A., VUORIO, E., ARO, H.T. (1993): Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing. *Clin Orthop*, 297: p. 23-27.
118. HOLLINGER, J.O., BREKKE, J., GRUSKIN, E., LEE, D. (1996): Role of bone substitutes. *Clin Orthop Relat Res*, 324: 55–65.
119. HOLUB, M. (1989): *Immunology of nude mice*. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc. 13-52.
120. HORAN, P.K. and SLEZAK, S.E. (1989). Stable cell membrane labeling. *Nature*, 340: 167–168.
121. HORCH, R.A., SHAHID, N., MISTRY, A.S., TIMMER, M.D., MIKOS, A.G., BARRON, A.R. (2004): Nanoreinforcement of poly(propylene fumarate)-based networks with surface modified alumoxane nanoparticles for bone tissue engineering. *Biomacromolecules*, 5: 1990–1998.
122. HOROWITZ, M.C. and FRIEDLAENDER, G.E. (1987): Immunologic aspects of bone transplantation. A rationale for future studies. *Orthop Clin North Am*, 18(2): p. 227-33.
123. HUTMACHER, D.W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21: 2529–2543.
124. JANSEN, J.A., VEHOF, J.W., RUHÉ, P.Q., KROEZE-DEUTMAN, H., KUBOKI, Y., TAKITA, H., HEDBERG, E.L., MIKOS, A.G. (2005): Growth factor loaded scaffolds for bone engineering. *J Control Release*, 101 (1-3): 127–136.
125. JANSSEN, F.W., OOSTRA, J., OORSCHOT, A., VAN BLITTERSWIJK, C.A. (2006): A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of

tissue-engineered bone: *in vivo* bone formation showing proof of concept. *Biomaterials*, 27: 315–323.

126. JIANG, Y., JAHAGIRDAR, B.N., REINHARDT, R.L., SCHWARTZ, R.E., KEENE, C.D., ORTIZ-GONZALEZ, X.R., REYES, M., LENVIK, T., LUND, T., BLACKSTAD, M., DU, J., ALDRICH, S., LISBERG, A., LOW, W.C., LARGAESPADA, D.A., VERFAILLIE, C.M. (2002): Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418 (6893): 41–49.
127. JINGUSHI, S. and BOLANDER, M.E. (1991): Biological cascades of fracture healing as models for bone–biomaterial interfacial reactions. In *The Bone–Biomaterial Interface* (Davies, J.E. and Albrektsson, T., eds). Toronto: University of Toronto Press.
128. JONES, A.L., BUCHOLZ, R.W., BOSSE, M.J., MIRZA, S.K., LYON, T.R., WEBB, L.X., POLLAK, A.N., GOLDEN, J.D., VALENTIN-OPRAN, A.; BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma-Allgraft (BESTT-ALL) Study Group. (2006). Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects. A randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am*, 88: 1431–1441.
129. JOYNER, C.J., BENNETT, A., TRIFFITT, J.T. (1997): Identification and enrichment of human osteoprogenitor cells by using differentiation stage-specific monoclonal antibodies. *Bone*, 21: 1–6.
130. KADIYALA, S., YOUNG, R.G., THIEDE, M.A., BRUDER, S.P. (1997): Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro*. *Cell Transplant*, 6: 125–134.
131. KIRKEBY, O.J. (1991): Bone metabolism and repair are normal in athymic rats. *Acta Orthop Scand*, 62(3): p. 253-6.
132. KIRKEBY, O.J., NORDSLETTEN, L., SKJELDAL, S. (1992): Healing of cortical bone grafts in athymic rats. *Acta Orthop Scand*, 63(3): p. 318-22.
133. KITAMURA, S., OHGUSHI, H., HIROSE, M., FUNAOKA, H., TAKAKURA, Y., ITO, H. (2004): Osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal cells cultured on alumina ceramics . *Artif Organs*, 28: 72–82.
134. KITO, H., KITAKOJI, T., TSUCHIYA, H., MITSUYAMA, H., NAKAMURA, H., KATO, M., ISHIGURO, N. (2004). Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis a preliminary result of three cases. *Bone*, 35: 892–898.
135. KLEINSCHMIDT, J.C. and HOLLINGER, J.O. (1992): *Animal Models in Bone Research*, in *Bone Grafts & Bone Substitutes*, M.B. Habal and A.H. Reddi, Editors. W.B. Saunders Company: Philadelphia, PA. p. 133-146.

136. KON, E., MURAGLIA, A., CORSI, A., BIANCO, P., MARCACCI, M., MARTIN, I., BOYDE, A., RUSPANTINI, I., CHISTOLINI, P., ROCCA, M., GIARDINO, R., CANCEDDA, R., QUARTO, R. (2000): Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res*, 49: 328–337.
137. KONG, Y.Y., BOYLE, W.J., PENNINGER, J.M. (2000): Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immnol Today*, 21(10): p. 495-502.
138. KRATCHMAROVA, I., BLAGOEV, B., HAACK-SORENSEN, M., KASSEM, M., MANN, M. (2005): Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. *Science*, 308: 1472–1477.
139. KRAUS, K.H., KADIYALA, S., WOTTON, H., KURTH, A., SHEA, M., HANNAN, M., HAYES, W.C., KIRKER-HEAD, C.A., BRUDER, S. (1999): Critically sized osteo-periosteal femoral defects: a dog model. *J Invest Surg*, 12: 115–124.
140. KREBSBACH, P.H., KUZNETSOV, S.A., BIANCO, P., ROBEY, P.G. (1999): Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Crit Rev Oral Biol Med*, 10: 165–181.
141. KREBSBACH, P.H., KUZNETSOV, S.A., SATOMURA, K., EMMONS, R.V., ROWE, D.W., ROBEY, P.G. (1997): Bone formation *in vivo*: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation*, 63: 1059–1069.
142. KROESE-DEUTMAN, H.C., RUHÉ, P.Q., SPAUWEN, P.H., JANSEN, J.A. (2005): Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants inserted at an ectopic site in rabbits. *Biomaterials*, 26: 1131–1138.
143. KRUYT, M.C., DE BRUIJN, J., VEENHOF, M., ONER, F.C., VAN BLITTERSWIJK, C.A., VERBOUT, A.J., DHERT, W.J. (2003a): Application and limitations of chloromethyl-benzamidodialkylcarbocyanine for tracing cells used in bone Tissue engineering. *Tissue Eng*, 9: 105–115.
144. KRUYT, M.C., DE BRUIJN, J.D., WILSON, C.E., ONER, F.C., VAN BLITTERSWIJK, C.A., VERBOUT, A.J., DHERT, W.J. (2003b): Viable osteogenic cells are obligatory for tissue-engineered ectopic bone formation in goats. *Tissue Eng*, 9: 327–336.
145. KRUYT, M.C., STIJNS, M.M., FEDOROVICH, N.E., DE BRUIJN, J.D., VAN BLITTERSWIJK, C.A., VERBOUT, A.J., ROZEMULLER, H., HAGENBEEK, A., DHERT, W.J., MARTENS, A.C. (2004a): Genetic marking with the DeltaLNGFR-gene for tracing goat cells in bone tissue engineering. *J Orthop Res*, 22: 697–702.

146. KRUYT, M.C., WILSON, C.E., DE BRUIJN, J.D., VAN BLITTERSWIJK, C.A., ONER, C.F., VERBOUT, A.J., DHERT, W.J. (2006): The effect of cellbased bone tissue engineering in a goat transverse process model. *Biomaterials*, 27: 5099–5106.
147. KUZNETSOV, S. and GEHRON ROBEY, P. (1996): Species differences in growth requirements for bone marrow stromal fibroblast colony formation *in vitro*. *Calcif Tissue Int*, 59: 265–270.
148. LANE, J.M. and SANDHU, H.S. (1987): Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am*, 18(2): p. 213-33.
149. LANGER, R. and VACANTI, J.P. (1993): Tissue engineering. *Science*, 260: 920–926.
150. LANGSTAFF, S., SAYER, M., SMITH, T.J., PUGH, S.M. (2001): Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part II: evaluation of biological response. *Biomaterials*, 22: 135–150.
151. LANGSTAFF, S., SAYER, M., SMITH, T.J., PUGH, S.M., HESP, S.A., THOMPSON, W.T. (1999): Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part I: rational design, sample preparation and material characterization. *Biomaterials*, 20: 1727–1741.
152. LE BLANC, K., TAMMIK, L., SUNDBERG, B., HAYNESWORTH, S.E., RINGDÉN, O. (2003): Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*, 57: 11–20.
153. LE, A.X., MICLAU, T., HU, D., HELMS, J.A. (2001): Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures. *J Orthop Res*, 19(1): p. 78-84.
154. LEE, J.Y., MUSGRAVE, D., PELINKOVIC, D., FUKUSHIMA, K., CUMMINS, J., USAR, A., ROBBINS, P., FU, F.H., HUARD, J. (2001): Effects of bone morphogenetic protein-2-expressing muscle-derived cells on healing of critical-sized bone defects in mice. *J Bone Joint Surg Am*, 83-A(7): p. 1032-9.
155. LEE, J.Y., PENG, H., USAS, A., MUSGRAVE, D., CUMMINS, J., PELINKOVIC, D., JANKOWSKI, R., ZIRAN, B., ROBBINS, P., HUARD, J. (2002): Enhancement of bone healing based on ex vivo gene therapy using human muscle-derived cells expressing bone morphogenetic protein 2. *Hum Gene Ther*, 13(10): p. 1201-11.
156. LEIBOVICH, S.J. and ROSS, R. (1975): The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol*, 78(1): p. 71-100.
157. LETCHFORD, J., CARDWELL, A.M., STEWART, K., COOGANS, K.K., COX, J.P., LEE, M., BERESFORD, J.N., PERRY, M.J., WELHAM, M.J. (2006): Isolation of C15: a novel

- antibody generated by phage display against mesenchymal stem cell-enriched fractions of adult human marrow. *J Immunol Methods*, 308: 124–137.
158. LEUNIG, M., HERTEL, R., SIEBENROCK, K.A., BALLMER, F.T., MAST, J.W., GANZ, R. (2000): The evolution of indirect reduction techniques for treatment of fractures. *Clin Orthop*, (375): p. 7-14.
159. LEVENBERG, S., ROUWKEMA, J., MACDONALD, M., GARFEIN, E.S., KOHANE, D.S., DARLAND, D.C., MARINI, R., VAN BLITTERSWIJK, C.A., MULLIGAN, R.C., D'AMORE, P.A., LANGER, R. (2005): Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat Biotechnol*, 23: 879–884.
160. LI, J.Z., LI, H., SASAKI, T., HOLMAN, D., BERES, B., DUMONT, R.J., PITTMAN, D.D., HANKINS, G.R., HELM, G.A. (2003): Osteogenic potential of five different recombinant human bone morphogenetic protein adenoviral vectors in the rat. *Gene Ther*, 10(20): p. 1735-43.
161. LIN, C.Y., KIKUCHI, N., HOLLISTER, S.J. (2004): A novel method for biomaterial scaffold internal architecture design to match bone elastic properties with desired porosity. *J Biomech*, 37: 623–636.
162. LIND, M., (1998): Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl*, 283: p. 2-37.
163. LIU, T.M., MARTINA, M., HUTMACHER, D.W., HUI, J.H., LEE, E.H., LIM, B. (2007): Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow and adipose tissues derived human mesenchymal stem cells (MSCs) into three mesenchymal lineages. *Stem Cells*, 25: 750–760.
164. LOGEART-AVRAMOGLOU, D., ANAGNOSTOU, F., BIZIOS, R., PETITE, H. (2005): Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med*, 9: 72–84.
165. LUYTEN, F.P., CUNNINGHAM, N.S., MA, S., MUTHUKUMARAN, N., HAMMONDS, R.G., NEVINS, W.B., WOODS, W.I., REDDI, A.H. (1989): Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem*, 264: 13377–13380.
166. MacDONALD, H.R. (1984): Phenotypic and functional characteristics of 't-like' cells in nude mice. *Exp Cell Biol*, 52(1-2): p. 2-6.
167. MACEWAN, W. (1881): Observations concerning transplantation of bone. Illustrated by a case of inter-human osseous transplantation, whereby over two-thirds of the shaft of a humerus was restored. *Proc Roy Soc Lond*, 32: 232–247.
168. MAIORANA, C., SIGURTÀ, D., MIRANDOLA, A., GARLINI, G., SANTORO, F. (2006): Sinus elevation with alloplasts or xenogenic materials and implants: an up-to-4-year clinical and radiologic follow-up. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 21: 426–432.

169. MAJORS, A.K., BOEHM, C.A., NITTO, H., MIDURA, R.J., MUSCHLER, G.F. (1997): Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. *J Orthop Res*, 15: 546–557.
170. MANIATOPoulos, C., SODEK, J., MELCHER, A.H. (1988): Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res*, 254: 317–330.
171. MANIGRASSO, M.B. and O'CONNOR J.P. (2004): Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma*, 18(10): p. 687-95.
172. MANKIN, H.J., DOPPELT, S., TOMFORD, W. (1983). Clinical experience with allograft implantation, The first ten years. *Clin Orthop Relat Res*, 174: 69–86.
173. MARCACCI, M., KON, E., MOUKHACHEV, V., LAVROUKOV, A., KUTEPOV, S., QUARTO, R., MASTROGIACOMO, M., CANCEDDA, R. (2007): Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6 to 7 year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng*, 13: 947–955.
174. MASTROGIACOMO, M., CORSI, A., FRANCISO, E., DI COMITE, M., MONETTI, F., SCAGLIONE, S., FAVIA, A., CROVACE, A., BIANCO, P., CANCEDDA, R. (2006): Reconstruction of extensive long bone defects in sheep using resorbable bioceramics based on silicon stabilized tricalcium phosphate. *Tissue Eng*, 12: 1261–1273.
175. MASTROGIACOMO, M., PAPADIMITROPOULOS, A., CEDOLA, A., PEYRIN, F., GIANNONI, P., PEARCE, S.G., ALINI, M., GIANNINI, C., GUAGLIARDI, A., CANCEDDA, R. (2007): Engineering of bone using bone marrow stromal cells and a silicon-stabilized tricalcium phosphate bioceramic: evidence for a coupling between bone formation and scaffold resorption. *Biomaterials*, 28: 1376–1384.
176. McCUALEY, L.K., ROSOL, T.J., CAPEN, C.C., HORTON, J.E., PIGUET, P.F. (1989): A comparison of bone turnover in athymic (nude) and euthymic mice: biochemical, histomorphometric, bone ash and *in vitro* studies. Change in the humoral response of athymic nude mice with ageing. *Bone*, 10(1): p. 29-34.
177. MEIJER, G.J., de BRUIJN, J.D., KOOLE, R., van BLITTERSWIJK, C.A. (2007): Cell-based bone tissue engineering. *PLoS Med*, 4: e9.
178. MENDES, S.C., TIBBE, J.M., VEENHOF, M., BAKKER, K., BOTH, S., PLATENBURG, P.P., ONER, F.C., DE BRUIJN, J.D., VAN BLITTERSWIJK, C.A. (2002): Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: effect of culture conditions and donor age. *Tissue Eng*, 8(6): 911–920.
179. MEURY, T., VERRIER, S., ALINI, M. (2006): Human endothelial cells inhibit BMSC differentiation into mature osteoblasts *in vitro* by interfering with osterix expression. *J Cell Biochem*, 98: 992–1006.

180. MISTRY, A.S. and MIKOS, A.G. (2005): Tissue engineering strategies for bone regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 94: 1–22.
181. MORISHITA, T., HONOKI, K., OHGUSHI, H., KOTOBUKI, N., MATSUSHIMA, A., TAKAKURA, Y. (2006): Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients mesenchymal stem cells. *Artif Organs*, 30: 115–118.
182. MUSCHLER, G.F., BOEHM, C., EASLEY, K. (1997): Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg Am*, 79: 1699–1709.
183. MUSCHLER, G.F., NAKAMOTO, C., GRIFFITH, L.G. (2004): Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am*, 86A: 1541–1558.
184. MUSCHLER, G.F., NEGAMI, S., HYODO, A., GAISSER, D., EASLEY, K., KAMBIC, H. (1996): Evaluation of collagen ceramic composite graft materials in a spinal fusion model. *Clin Orthop Relat Res*, 328: 250–260.
185. MUSGRAVE, D.S., BOSCH, P., GHIVIZZANI, S., ROBBINS, P.D., EVANS, C.H., HUARD, J. (1999): Adenovirus-mediated direct gene therapy with bone morphogenetic protein-2 produces bone. *Bone*, 24(6): p. 541-7.
186. NAKAHARA, H., BRUDER, S.P., GOLDBERG, V.M., CAPLAN, A.I. (1990): *In vivo* osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. *Clin Orthop*, 259: 223–232.
187. NAKAJIMA, F., OGASAWARA, A., GOTO, K., MORIYA, H., NINOMIYA, Y., EINHORN, T.A., YAMAZAKI, M. (2001): Spatial and temporal gene expression in chondrogenesis during fracture healing and the effects of basic fibroblast growth factor. *J Orthop Res*, 19: 935–944.
188. NAKAMAE, A., SUNAGAWA, T., ISHIDA, O., SUZUKI, O., YASUNAGA, Y., HACHISUKA, H., OCHI, M. (2004): Acceleration of surgical angiogenesis in necrotic bone with a single injection of fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J Orthop Res*, 22: 509–513.
189. NAKASE, T., NOMURA, S., YOSHIKAWA, H., HASHIMOTO, J., HIROTA, S., KITAMURA, Y., OIKAWA, S., ONO, K., TAKAOKA, K. (1994): Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res*, 9(5): p. 651-9.
190. NASH, T.J., HOWLETT, C.R., MARTIN, C., STEELE, J., JOHNSON, K.A., HICKLIN, D.J. (1994): Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone*, 15: 203–208.
191. NEVINS, M.L., CAMELO, M., LYNCH, S.E., SCHENK, R.K., NEVINS, M. (2003): Evaluation of periodontal regeneration following grafting intrabony defects with

- bio-oss collagen: a human histologic report. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 23: 9–17.
192. NIKOLAYCHIK, V.V., SAMET, M.M., LELKES, P.I. (1996): A new method for continual quantitation of viable cells on endothelialized polyurethanes. *J Biomater Sci Polym Ed*, 7: 881–891.
 193. NOBLE, B. (2003): Bone microdamage and cell apoptosis. *Eur Cell Mater*, 21(6): 46–55; discussion 55.
 194. O'DRISCOLL, S.W. and FITZSIMMONS, J.S. (2001): The role of periosteum in cartilage repair. *Clin Orthop*, (391 Suppl): p. 190-207.
 195. OGAWA, R., MIZUNO, H., HYAKUSOKU, H., WATANABE, A., MIGITA, M., SHIMADA, T. (2004): Chondrogenic and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *J Nippon Med Sch*, 71: 240–241.
 196. OHGUSHI, H., KOTOBUKI, N., FUNAOKA, H., MACHIDA, H., HIROSE, M., TANAKA, Y., TAKAKURA, Y. (2005): Tissue engineered ceramic artificial joint – *ex vivo* osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis. *Biomaterials*, 26: 4654–4661.
 197. OKLUND, S.A., PROLO, D.J., GUTIERREZ, R.V., KING, S.E. (1986): Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts, frozen autografts and processed autografts, and allografts in canine skull defects. *Clin Orthop Relat Res*, (205): p. 269-91.
 198. OSBORN, J.F. (1980). *Dynamic Aspects of the Implant–Bone Interface*. Munchen: Carl Hansen Verlach.
 199. OYAJOBI, B.O., LOMRI, A., HOTT, M., MARIE, P.J. (1999). Isolation and characterization of human clonogenic osteoblast progenitors immunoselected from fetal bone marrow stroma using STRO-1 monoclonal antibody. *J Bone Miner Res*, 14: 351–361.
 200. PACHECO, E.M., CIVELEK, A.C., NATARAJAN, T.K., D'ANNA, S.A., ILIFF, N.T., GREEN, W.R. (1997): Clinicopathological correlation of technetium bone scan in vascularization of hydroxyapatite implants, A primate model. *Arch Ophthalmol*, 115: 1173–1177.
 201. PELISSIER, P., VILLARS, F., MATHOULIN-PELISSIER, S., BAREILLE, R., LAFAGE-PROUST, M.H., VILAMITJANA-AMEDEE, J. (2003): Influences of vascularization and osteogenic cells on heterotopic bone formation within a madrepovic ceramic in rats. *Plast Reconstr Surg*, 111: 1932–1941.
 202. PENG, H., USAS, A., GEARHART, B., OLSHANSKI, A., SHEN, H.C., HUARD, J. (2004): Converse relationship between *in vitro* osteogenic differentiation and *in vivo* bone

healing elicited by different populations of muscle-derived cells genetically engineered to express BMP4. *J Bone Miner Res*, 19: 630–641.

203. PENG, H., USAS, A., OLSHANSKI, A., HO, A.M., GEARHART, B., COOPER, G.M., HUARD, J. (2005): VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J Bone Miner Res*, 20: 2017–2027.
204. PERREN, S.M. (1979): Phisical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation. *Clin Orthop Relat Res*, (138): p. 175-96.
205. PETER, S.J., MILLER, S.T., ZHU, G., YASKO, A.W., MIKOS, A.G. (1998): *In vivo* degradation of a poly(propylene fumarate)/beta-tricalcium phosphate injectable composite scaffold. *J Biomed Mater Res*, 41: 1–7.
206. PETITE, H., VIATEAU, V., BENSAÏD, W., MEUNIER, A., DE POLLAK, C., BOURGUIGNON, M., OUDINA, K., SEDEL, L., GUILLEMIN, G. (2000): Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol*, 18: 959–963.
207. PHINNEY, D.G., KOPEN, G., RIGHTER, W., WEBSTER, S., TREMAIN, N., PROCKOP, D.J. (1999): Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem*, 75: 424–436.
208. PIETRZAK, W.S., PERN, S.V., KEYES, J., WOODELL-MAY, J., McDONALD, N.M. (2005): Demineralized bone matrix graft: a scientific and clinical case study assessment. *J Foot Ankle Surg*, 44: 345–353.
209. PORTER, W.P. (1993): *Rats and mice [kit]: Introduction and use in research, Part I and II*. Laboratory Animal Medicine and Science – Series II. Seattle, WA: Health Sciences Center for Educational Resources, University of Washington.
210. POSTLETHWAITE, A.E. and KANG, A.H. (1988): Advantages and limitations of *in vitro* models of wound healing and tissue repair. *Prog clin Biol Res*, 266: p. 237-42.
211. PROCKOP, D.J. (1997): Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276: 71–74.
212. PROLO, D.J. and RODRIGO, J.J. (1985): Contemporary bone graft physiology and surgery. *Clin Orthop*, 200: 322–342.
213. PROLO, D.J., PEDROTTI, P.W., BURRES, K.P., OKLUND, S. (1982): Superior osteogenesis in transplanted allogeneic canine skul following chemical sterilization. *Clin Ortop Relat Res*, (168): p. 230-42.
214. QUARTO, R., MASTROGIACOMO, M., CANCEDDA, R., KUTEPOV, S.M., MUKHACHEV, V., LAVROUKOV, A., KON, E., MARCACCI, M. (2001): Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*, 344: 385–386.

215. RASCHKE, M., KOLBECK, S., BAIL, H., SCHMIDMAIER, G., FLYVBJERG, A., LINDER, T., DAHNE, M., ROENNE, I., HAAS, N. (2001): Homologous growth hormone accelerates healing of segmental bone defects. *Bone*, 29(4): p. 368-73.
216. REMEDIOS, A. (1999): Bone and bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 29(5): p. 1029-44.
217. RENGACHARY, S.S. (2002): Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurg Focus*, 13: e2.
218. REYES, M., LUND, T., LENVIK, T., AGUIAR, D., KOODIE, L., VERFAILLIE, C.M. (2001): Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 98: 2615-2625.
219. RICHARDS, M., GOULET, J.A., WEISS, J.A., WAANDERS, N.A., SCHAFFLER, M.B., GOLDSTEIN, S.A. (1998): Bone regeneration and fracture healing. Experience with distraction osteogenesis model. *Clin Orthop*, (355 Suppl): p. 191-204.
220. RILEY, E.H., LANE, J.M., URIST, M.R., LYONS, K.M., LIEBERMAN, J.R. (1996): Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res*, 324: 39-46.
221. RIPAMONTI, U. (1991): Bone induction in nonhuman primates. An experimental study on the baboon. *Clin Orthop Relat Res*, 269: 284-294.
222. RIPAMONTI, U., CROOKS, J., RUEGER, D.C. (2001): Induction of bone formation by recombinant human osteogenic protein-1 and sintered porous hydroxyapatite in adult primates. *Plast Reconstr Surg*, 107: 977-988.
223. ROCHA, L.B., GOISSIS, G., ROSSI, M.A. (2002): Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials*, 23(2): p. 449-56.
224. ROUWKEMA, J., de BOER, J., van BLITTERSWIJK, C.A. (2006): Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Eng*, 12: 2685-2693.
225. RUHÉ, P.Q., KROESE-DEUTMAN, H.C., WOLKE, J.G., SPAUWEN, P.H., JANSEN, J.A. (2004): Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in cranial defects in rabbits. *Biomaterials*, 25: 2123-2132.
226. RUHÉ, P.Q., WOLKE, J.G., *et al.* (2006). *Calcium Phosphate Ceramics for Bone Tissue Engineering*. Boca Raton, FL: CRC Press.
227. SAMPATH, T.K., MUTHUKUMARAN, N., REDDI, A.H. (1987): Isolation of osteogenin, an extracellular matrix-associated, boneinductive protein, by heparin affinity chromatography . *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 7109-7113.

228. SANDHU, H.S. and KHAN, S.N. (2002): *Animal models for preclinical assessment of bone morphogenetic proteins in the spine*. *Spine*, 27(16 Suppl 1): p. 32-8.
229. SCHIMMING, R. and SCHMELZEISEN, R. (2004): Tissueengineered bone for maxillary sinus augmentation. *J Oral Maxillofac Surg*, 62: 724-729.
230. SCHLIEPHAKE, H., KNEBEL, J.W., AUFDERHEIDE, M., TAUSCHER, M. (2001): Use of cultivated osteoprogenitor cells to increase bone formation in segmental mandibular defects: an experimental pilot study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 30: 531-537.
231. SCHMITZ, J.P. and HOLLINGER, J.O. (1986): The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop*, (205): p. 299-308.
232. SHANG, Q., WANG, Z., LIU, W., SHI, Y., CUI, L., CAO, Y. (2001): Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *J Craniofac Surg*, 12: 586-595.
233. SHI, S., GRONTOSH, S., CHEN, S., REDDI, A., COUNTER, C.M., ROBEY, P.G., WANG, C.Y. (2002): Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nat Biotechnol*, 20: 587-591.
234. SHI, X., HUDSON, J.L., SPICER, P.P., TOUR, J.M., KRISHNAMOORTI, R., MIKOS, A.G. (2006): Injectable nanocomposites of single-walled carbon nanotubes and biodegradable polymers for bone tissue engineering. *Biomacromolecules*, 7: 2237-2242.
235. SHIN, H., JO S., MIKOS, A.G. (2003): Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*, 24: 4353-4364.
236. SILBER, J.S., ANDERSON, D.G., DAFFNER, S.D., BRISLIN, B.T., LELAND, J.M., HILIBRAND, A.S., VACCARO, A.R., ALBERT, T.J. (2003): Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. *Spine*, 28: 134-139.
237. SIMMONS, D.J. (1985): Fracture healing perspectives. *Clin Orthop*, (200): p. 86-95.
238. SIMMONS, P.J. and TOROK-STORB, B. (1991): Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*, 78: 55-62.
239. SIMONSEN, J.L., ROSADA, C., SERAKINCI, N., JUSTESEN, J., STENDERUP, K., RATTAN, S.I., JENSEN, T.G., KASSEM, M. (2002): Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol*, 20: 592-596.

240. SOLHEIM, E. (1998): Osteoinduction by demineralised bone. *Int Orthop*, 22(5): p. 335-42.
241. SPRINGER, I.N., NOCINI, P.F., SCHLEGEL, K.A., DE SANTIS, D., PARK, J., WARNKE, P.H., TERHEYDEN, H., ZIMMERMANN, R., CHIARINI, L., GARDNER, K., FERRARI, F., WILTFANG, J. (2006): Two techniques for the preparation of cell-scaffold constructs suitable for sinus augmentation: steps into clinical application. *Tissue Eng*, 12: 2649-2656.
242. STEWART, K., WALSH, S., SCREEN, J., JEFFERISS, C.M., CHAINY, J., JORDAN, G.R., BERESFORD, J.N. (1999): Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*, 14: 1345-1356.
243. STREET, J., BAO, M., DeGUZMAN, L., BUNTING, S., PEALE, F.V., FERRARA, N., STEINMETZ, H., HOEFFEL, J., CLELAND J.L., DAUGHERTY, A., van BRUGGEN, N., REDMOND, H.P., CARANO, R.A., FILVAROFF, E.H. (2002): Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(15): p. 9656-61.
244. STREET, J., WINTER, D., WANG, J.H., WAKAI, A., MCGUINNESS, A., REDMOND, H.P. (2000): Is human fracture hematoma inherently angiogenic? *Clin Orthop Relat Res*, 378: 224-237.
245. STREET, J.T., McGARTH, M., O'REGAN, K., WAKA, A., McGUIESS, A., REDMOND, P. (2000): Thromboprophylaxis Using a Low Molecular Weight Heparin Delays Fracture repair. *Clin Orthop Rel Res*, 2000(381): p. 278-289.
246. STUBBS, D., DEAKIN, M., CHAPMAN-SHEAT, P., BRUCE, W., DEBES, J., GILLES, R.M., WALSH, W.R. (2004): *In vivo* evaluation of resorbable bone graft substitutes in a rabbit tibial defect model. *Biomaterials*, 25(20): p. 5037-44.
247. SUN, J.S., WU, S.Y., LIN, F.H. (2005): The role of muscle-derived stem cells in bone tissue engineering. *Biomaterials*, 26: 3953-3960.
248. SUN, Q., CHEN, R.R., SHEN, Y., MOONEY, D.J., RAJAGOPALAN, S., GROSSMAN, P.M. (2005): Sustained vascular endothelial growth factor delivery enhances angiogenesis and perfusion in ischemic hind limb. *Pharm Res*, 22: 1110-1116.
249. TAKAGI, K. and URIST, M.R. (1982): The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects. *Clin Orthop*, 171: 224-231.
250. TAKAYANAGI, H., KIM, S., MATSUO, K., SUZUKI, H., SUZUKI, T., SATO, K., YOKOCHI, T., ODA, H., NAKAMURA, K., IDA, N., WAGNER, E.F., TANIGUCHI, T. (2002): RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature*, 416(6882): p. 744-9.

251. TAKUSHIMA, A., KITANO, Y., HARI, K. (1998): Osteogenic potential of cultured periosteal cells in a distracted bone gap in rabbits. *J Surg Res*, 78: 68–77.
252. TAMURA, S., KATAOKA, H., MATSUI, Y., SHIONOYA, Y., OHNO, K., MICHI, K., TAKAHASHI, K., YAMAGUCHI, A. (2001): The effects of transplantation of osteoblastic cells with bone morphogenetic protein (BMP)/carrier complex on bone repair. *Bone*, 29(2): p. 169-75.
253. TATON, T.A. (2001): Nanotechnology. Boning up on biology. *Nature*, 412: 491–492.
254. TEMENOFF, J.S., Lu, L., et al. (2000): *Bone-Tissue Engineering Using Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds*. Toronto: EM Squared.
255. THALLER, S.R., DART, A., TESLUK, H. (1993): The effects of insulinlike growth factor-1 on critical-size calvarial defects in Sprague-Dawley rats. *Ann Plast Surg*, 31: 429–433.
256. THOMPSON, Z., MICLAU, T., HU, D., HELMS, J.A. (2002): A model for intramembranous ossification during fracture healing. *J Orthop Res*, 20(5): p. 1091-8.
257. TIELINEN, L., MANNINEN, M., PUOLAKKAINEN, P., KELLOMAKI, M., TORMOLA, P., RICH, J., SEPALA, J., POKKANEN, P. (2001): Inability of transforming growth factor-beta 1, combined with a bioabsorbable polymer paste, to promote healing of bone defects in the rat distal femur. *Arch Orthop Trauma Surg*, 121(4): p. 191-6.
258. TIMMER, M.D., AMBROSE, C.G., MIKOS, A.G. (2003a): *In vitro* degradation of polymeric networks of poly(propylene fumarate) and the crosslinking macromer poly(propylene fumarate)-diacrylate. *Biomaterials*, 24: 571–577.
259. TIMMER, M.D., SHIN, H., HORCH, R.A., AMBROSE, C.G., MIKOS, A.G. (2003b): *In vitro* cytotoxicity of injectable and biodegradable poly(propylene fumarate)-based networks: unreacted macromers, cross-linked networks, and degradation products. *Biomacromolecules*, 4: 1026–1033.
260. TOMFORD, W.W. (2000): Bone allografts: past, present and future. *Cell Tissue Bank*, 1(2): p. 105-9.
261. TOMFORD, W.W., MANKIN, H.J., FRIEDLAENDER, G.E., DOPPELT, S.H., GEBHARDT, M.C. (1987): Methods of banking bone and cartilage for allograft transplantation. *Orthop Clin North Am*, 18(2): p. 241-7.
262. TRUETA, J. and BUHR A.J. (1963): The vascular contribution to osteogenesis. V. the vasculature supplying the epiphyseal cartilage in rachitic rats. *J Bone Joint Surg Br*, 45: 572–581.

263. TSAI, C.H., CHOU, M.Z., JONAS, M., TIEN Z.T., CHI, E.Y. (2002): A composite graft material containing bone particles and collagen in osteoinduction in mouse. *J Biomed Mater Res*, 63(1): p. 65-70.
264. URIST, M.R. (1965): Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150: 893–899.
265. URIST, M.R., NOGAMI, H., MIKULSKI, A. (1976): A bone morphogenetic polypeptide. *Calcif Tissue Res*, 21 (Suppl): 81–87.
266. UUSITALO, H., RANTAKOKKO, J., AHONEN, M., JAMSA, T., TUUKKANEN, J., KAHARI, V., VUORIO, E., ARO, H.T. (2001): A metaphyseal defect model of the femur for studies of murine bone healing. *Bone*, 28(4): p. 423-9.
267. VACANTI, C.A., BONASSAR, L.J., VACANTI, M.P., SHUFFLEBARGER, J. (2001): Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone. *N Engl J Med*, 344: 1511–1514.
268. VARADY, P., LI, J.Z., CUNNINGHAM, M., BERES, E.J., DAS, S., ENGH, J., ALDEN, T.D., PITTMAN, D.D., KERNS, K.M., KALLMES, D.F., HELM, G.A. (2001): Morphologic analysis of BMP-9 gene therapy-induced osteogenesis. *Hum Gene Ther*, 12(6): p. 697-710.
269. VASILJEVIĆ, P. (2010): *Karakterizacija ćelija kostne srži regrutovanih za reparaciju kostnog tkiva potpomognutog tkivnim matricama*. Doktorska disertacija. PMF, Niš.
270. VEHOF, J.W., TAKITA, H., KUBOKI, Y., SPAUWEN, P.H., JANSEN, J.A. (2002): Histological characterization of the early stages of bone morphogenetic protein-induced osteogenesis. *J Biomed Mater Res*, 61: 440–449.
271. VERBORGT, O., GIBSON, G.J., SCHAFFLER, M.B. (2000): Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue *in vivo*. *J Bone Miner Res*, 15(1):60-7.
272. VERMA, I.M. and SOMIA, N. (1997): Gene therapy – promises, problems and prospects. *Nature*, 389: 239–242.
273. VIATEAU, V., GUILLEMIN, G., YANG, Y.C., BENSAID, W., REVIRON, T., OUDINA, K., MEUNIER, A., SEDEL, L., PETITE, H. (2004): A technique for creating critical-size defects in the metatarsus of sheep for use in investigation of healing of long-bone defects. *Am J Vet Res*, 65: 1653–1657.
274. VIGNERY, A., SILVERGLATE, A., HOROWITZ, M., SHULTZ, L., BARON, R., (1981): Abnormal bone remodeling activity in the immunodeficient nude (Nu/Nu) and Motheaten (me/me) mutant mice. *Calcif Tissue Int*, 33: p. 301 (abstract).

275. VILLARS, F., BORDENAVE, L., BAREILLE, R., AMÉDÉE, J. (2000): Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF? *J Cell Biochem*, 79: 672–685.
276. WALSH, S., JORDAN, G.R., JEFFERISS, C., STEWART, K., BERESFORD, J.N. (2001): High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of osteoblast precursors *in vitro*: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology*, 40: 74–83.
277. WALSH, W.R., SHERMAN, P., HOWLETT, C.R., SONNABEND, D.H., EHRLICH, M.G. (1997): Fracture healing in a rat osteopenia model. *Clin Orthop*, (342): p. 218-27.
278. WAN, C., HE, Q., LI, G. (2006): Allogenic peripheral blood derived mesenchymal stem cells (MSCs) enhance bone regeneration in rabbit ulna critical-sized bone defect model. *J Orthop Res*, 24: 610–618.
279. WAN, M. and CAO, X. (2005): BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun*, 328: 651–657.
280. WARNKE, P.H., WILTFANG, J., SPRINGER, I., ACIL, Y., BOLTE, H., KOSMAHL, M., RUSSO, P.A., SHERRY, E., LÜTZEN, U., WOLFART, S., TERHEYDEN, H. (2006): Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissueengineered mandible. *Biomaterials*, 27: 3163–3167.
281. WEITZMANN, M.N., CENCI, S., RIFAS, L., HAUG, J., DIPERSIO, J., PACIFICI, R. (2001): T cell activation induces human osteoclast formation via receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-dependent and -independent mechanism. *J Bone Miner Res*, 16(2): p. 328-37.
282. WENGER, A., STAHL, A., WEBER, H., FINKENZELLER, G., AUGUSTIN, H.G., STARK, G.B., KNESER, U. (2004): Modulation of *in vitro* angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering. *Tissue Eng*, 10 (9–10): 1536–1547.
283. WESTEN, H. and BAINTON, D.F. (1979): Association of alkalinephosphatase-positive reticulum cells in bone marrow with granulocytic precursors. *J Exp Med*, 150: 919–937.
284. WILSON, C.E., de BRUIJN, J.D., van BLITTERSWIJK, C.A., VERBOUT, A.J., DHERT, W.J. (2004): Design and fabrication of standardized hydroxyapatite scaffolds with a defined macro-architecture by rapid prototyping for bone-tissue-engineering research. *J Biomed Mater Res A*, 68: 123–132.
285. WILSON, C.E., DHERT, W.J., VAN BLITTERSWIJK, C.A., VERBOUT, A.J., DE BRUIJN, J.D. (2002): Evaluating 3D bone tissue engineered constructs with different seeding densities using the alamarBlue assay and the effect on *in vivo* bone formation. *J Mater Sci Mater Med*, 13: 1265–1269.

286. WILSON, C.E., KRUYT, M.C., DE BRUIJN, J.D., VAN BLITTERSWIJK, C.A., ONER, F.C., VERBOUT, A.J., DHERT, W.J. (2006): A new *in vivo* screening model for posterior spinal bone formation: comparison of ten calcium phosphate ceramic material treatments. *Biomaterials*, 27: 302–314.
287. WINTER, G.D. and SIMPSON B.J. (1969): Heterotopic bone formed in a synthetic sponge in the skin of young pigs. *Nature*, 223(201): 88–90.
288. WOZNEY, J.M. (1992): The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev*, 32: 160–167.
289. WOZNEY, J.M., ROSEN, V., CELESTE, A.J., MITSOCK, L.M., WHITTERS, M.J., KRIZ, R.W., HEWICK, R.M., WANG, E.A. (1988): Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 242: 1528–1534.
290. YAMAGIWA, H., TOKUNAGA, K., HAYAMI, T., HATANO, H., UCHIDA, M., ENDO, N., TAKAHASHI, H.E. (1999): Expression of metalloproteinase-13 (Collagenase-3) is induced during fracture healing in mice. *Bone*, 25(2): p. 197-203.
291. YASZEMSKI, M.J., PAYNE, R.G., HAYES, W.C., LANGER, R., MIKOS, A.G. (1996): Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials*, 17: 175–185.
292. YOSHIMOTO, H., SHIN, Y.M., TERAI, H., VACANTI, J.P. (2003): A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 24: 2077–2082.
293. YOUNGER, E.M. and CHAPMAN, M.W. (1989): Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma*, 3(3): p.192-5.
294. YU, Y., CHEN, J.B., YANG, J.L., WALSH, W.R., VERHUEL, R., JOHNSON, N., MORGAN, D.A.F. (2003): *In Vivo Assessment of Gamma Irradiated Bone: Osteoconductivity and Osteoinductivity*. *Adv Tissue Banking*, 7: p. 321-37.
295. YUAN, H. (2001): *Osteoinduction of calcium phosphates*, Faculty of Medicine: Biomaterials Research Group, 2001, Leiden, The Netherlands, p. 156.
296. YUAN, H., van BLITTERSWIJK, C.A., de GROOT, K., de BRUIJN, J.D. (2006): A comparison of bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) implanted in muscle and bone of dogs at different time periods. *J Biomed Mater Res A*, 78: 139–147.
297. YUAN, J., CUI, L., ZHANG, W.J., LIU, W., CAO, Y. (2007): Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials*, 28: 1005–1013.

298. ZHANG, X. (1991): *A Study of Prorous Block HA Ceramics and its Osteogenesis* . Amsterdam: Elsevier Science.
299. ZHU, L., LIU, W., CUI, L., CAO, Y. (2006): Tissue-engineered bone repair of goat-femur defects with osteogenically induced bone marrow stromal cells. *Tissue Eng*, 12: 423–433.

8. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM

8.1. BIOGRAFSKI PODACI

Ljubiša Đorđević rođen je 06. 08. 1961. u Ravnoj Dubravi, opština Gadžin Han, Republika Srbija. Osnovnu školu završio je u Gornjem Prisjanu, a Gimnaziju u Vlasotincu. Posle odsluženog vojnog roka upisuje se na Prirodno-matematički fakultet u Kragujevcu, studijska grupa Biologija, gde je dana 03.09.1987. godine odbranio diplomski rad pod nazivom "*Uticaj mangana na aktivnost superoksid-dizmutaze u tkivima šarana i srebrnog karaša*". Posle diplomiranja zapošljava se na određeno vreme u više osnovnih i srednjih škola, a od 01.09.1997. godine radi na Poljoprivrednom fakultetu u Prištini kao asistent pripravnik za predmet Zoologija. Tokom 1993/94. godine kandidat je na Institutu za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu radio istraživanja za svoj specijalistički rad. Tada su na Institutu bila u toku istraživanja započeta na međunarodnom projektu "**Istraživanja efekata eter-glikola *in vitro* i *in vivo***" sa kolegama iz *L'Hospital St. Louis* u Parizu. Kandidat je deo svojih rezultata iz tih istraživanja pripremio kao specijalistički rad pod naslovom "*Uticaj 2-butoksi etanola na hematopoezne organe i perifernu krv pacova*", koji je odbranio na Prirodno-matematičkom fakultetu u Kragujevcu 1998. godine. Tokom 1998/99. godine kandidat Ljubiša Đorđević je učestvovao u istraživanjima u okviru inovacionog projekta "**Razvoj biokompozitnih materijala za potrebe otorinolaringologije i maksilofacialne hirurgije**"(I.3.1883/1998) koji je finansiralo Ministarstvo za nauku i tehnologiju Republike Srbije. Deo ovih istraživanja je nastavljen što je poslužilo kao osnova za prihvatanje naučno-istraživačkog projekta "**Biokompatibilnost i primena kompozitnih materijala na bazi hidroksiapatita u osteorekonstruktivnoj hirurgiji - eksperimentalna i klinička studija**" takođe kod Ministarstva za nauku Republike Srbije. Sa rezultatima iz navedenih istraživanja je prijavljena tema za magistarsku tezu "**Promene biokompozita na bazi hidroksiapatita i reakcije tkiva posle eksperimentalne implantacije**" koju je uspešno odbranio 12.06.2003. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu u Kragujevcu, studijska grupa Biologija, smer

animalna fiziologija. Iz ovih istraživanja biomaterijala kandidat je neke rezultate kao koautor i autor prezentovao na više Konferencija društva za istraživanje materijala (YUCOMAT) u Herceg Novom, kao i radove u stranim i domaćim časopisima.

8.2. PROFESIONALNA KARIJERA

- Profesor biologije Srednja škola "Nikola Tesla", Boljevac od 1987-1993.
- Profesor biologije Osnovna škola "Vuk Karadžić", Doljevac 1993.
- Profesor biologije Osnovna škola "Đura Jakšić", Zaječar 1997.
- Asistent pripravnik za predmet Zoologija na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Prištini od 1997-2003.
- Asistent pripravnik za grupu predmeta Zoologija na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu od 2003-2004.
- Asistent za predmete Biologija i humana genetika i Molekularna i humana genetika na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu od 2002-2007
- Predavač za predmet Zoologija na Visokoj prehrambeno-poljoprivrednoj školi u Prokuplju od 2006-2010.
- U radnom odnosu na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Nišu je od 2004, u zvanju asistenta za grupu predmeta Zoologija, gde izvodi vežbe iz predmeta Razviće životinja, Opšta fiziologija životinja i Uporedna fiziologija životinja.

8.3. STRUČNO USAVRŠAVANJE

- 2004. godine seminar *Osnovi sterologije* u organizaciji Društva anatoma Srbije i Instituta za anatomiju Medicinskog fakulteta u Nišu.
- 2006. godine *International Workshop and Summer School: CELL AND TISSUE ENGINEERING* organised by: Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade; Faculty of Mechanical Engineering, University of Belgrade; Department of Biomedical Engineering, Boston University; Center for Multidisciplinary Studies, University of Belgrade.
- 2008. godine seminar *Unapređivanje nastavničkih kompetencija* za nastavnike i saradnike Bioloških i srodnih fakulteta u Srbiji, u okviru projekta Tempus Project H.E.R.B.S. (JEP_40094_2005) kroz tri nivoa obuke: bazični, supervizijski I i supervizijski II.

8.4. RAD U TELIMA NA FAKULTETU

- Član NN veća odlukom br.730/1-01 od 21.9.2004.
- Član Saveta PMF-a odlukom br. 618/1-01 od 09.10.2006.
- Član komisije za kontrolu kvaliteta za studijske programe na Odseku za biologiju i ekologiju odlukom NN veća PMF-a br.466/4-01 od 11.6.2008.

8.5. UČEŠĆE NA PROJEKTIMA

- „Istraživanja efekata eter-glikola *in vitro* i *in vivo*“, međunarodni 1993/94 Medicinski fakultet u Nišu sa L'Hospital St. Louis u Parizu.
- „Razvoj biokompozitnih materijala za potrebe otorinolaringologije i maksilofacijalne hirurgije“ (I.3.1883/1998), koji je finansiralo Ministarstvo za nauku, tehnologije i razvoj republike Srbije.
- „Biokompatibilnost i primena kompozitnih materijala na bazi hidroksiapatita u osteorekonstruktivnoj hirurgiji - eksperimentalna i klinička studija“ 1678/ 2002-2004. godine koji je finansiralo Ministarstvo za nauku, tehnologije i razvoj republike Srbije.
- „Regeneracija skeletnih tkiva pomognuta biomaterijalima kao tkivnim matricama – *in vivo* i *in vitro* studija“ 145072B 2006-2010. godine koji finansira Ministarstvo nauke Republike Srbije.
- Razvojno tehnoloski projekat TR-19035 2008/2010 “Razvoj formulacija i tehnologija nove generacije antiseptika prirodnog porekla” evidencioni broj TR – 19035A Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj.

8.6. PODACI O OBJAVLJENIM NAUČNIM RADOVIMA

8.6.1. Naučni radovi u časopisu međunarodnog značaja (M23=3 poena)

1. Ajdukovic Z., Najman S., Đordevic Lj., Savic V., Mihailovic D., Petrovic D., Ignjatovic N., Uskokovic D. Repair of bone tissue affected by osteoporosis with hydroxyapatite-poly-l-lactide (HAp-PLLA) with and without blood plasma. J Biomater Appl 2005; 20: 179 - 190.

2. Zivanov-Curlis J., Tomin J., Vasiljevic P., Vukelic M., Dordevic Lj., Mitic Z. The Influence of Long-term Intake of Cooper and Chromium Compounds on Reproductive Ability and Preadult Development of *Drosophila melanogaster*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2006; 20(2): 62-66.
3. Najman S., Đorđević Lj., Savić V., Ignjatović N., Uskoković D. Biological evaluation of hydroxyapatite/poly-l-lactide composite biomaterials with poly-l-lactide of different molecular weights intraperitonealy implanted into mice. *Bio-Medical Materials and Engineering* 2004; 14 (1): 61-70.
4. Vasiljevic Perica J., Najman Stevo J., Djordjevic Ljubisa B., Savic Vojin P., Vukelic Marija D., Zivanov-Curlis Jelena Z., Ignjatovic Nenad L., Uskokovic Dragan P. Ectopic osteogenesis and hematopoiesis after implantation of bone marrow cells seeded on HAp/PLLA scaffold. *Hemisjska industrija*, 2009: 63(4): 301-307.

8.6.2. Naučni radovi u časopisu nacionalnog značaja (M52=1,5poen)

1. Najman S., Đorđević Lj., Savić V., Ignjatović N., Miljković M., Vasiljević P., Uskoković D. Čelijski odgovor na intraperitonealni implant kompozita PDMS/Hap. *Acta Medica Medianae* 2005; 44 (3): 5-8.
2. Najman S., Đorđević Lj., Savić V. Changes of Hap/PLLA biocomposites and tissue reaction after subcutaneous implantation. *Facta universitatis; series: Medicine and Biology*, Nis 2003; 10 (3): 131-134.
3. Đorđević V., Najman S., Kocić G., Cvetković T., Đorđević Lj., Antonić J. Effect of 2-butoxyethanol treatment on lipid peroxidation, glutathione content and catalase activity in rat tissues. *Facta universitatis; series: Medicine and Biology*. 1996; 3 (1): 13-17

8.6.3. Naučni radovi u naučnim časopisima (M53=1poen)

1. Stanković M., Vasiljević P., Đorđević Lj., Najman S., Savić V. SEM analiza biokompozitnog materijala na bazi Hap/PLLA nakon subkutane implantacije uzoraka ispunjenih hematopoeznim ćelijama. *Tehnika-Novi materijali* 2005; 14 (1): 11-15.
2. Najman, S., Vasiljević, P., Đorđević, Lj., Savić, V. Characteristics of growth of mice bone marrow cultures in presence of biomaterials based on hydroxyapatite and poly-L-lactide. *Acta Fac. Med. Naiss.* 2005: 22(3):135-138.
3. Golubovic Z., Mitkovic M., Najman S., Savic V., Zivanov-Curlis J., Djordjevic Lj., Vasiljevic P., Kostic I. Vaskularizacija osteotomirane dijafize tibije zeca nakon unutrasnje i nakon spoljne fiksacije. *Acta Fac. Med. Naiss.* 2002; 20 (4): 87-95.

8.6.4. Naučni radovi saopšteni na skupu međunarodnog značaja štampani u izvodu (M34=0,5poena)

1. Milojević M., Najman S., Tomić S., Đorđević Lj. Effect of hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylates to erythrocyte resistance to hemolysis. Ninth Annual Conference of the Yugoslav Materials Research Society, Herceg Novi, 2007. Book of Abstracts
2. Janićijević J., Najman S., Beljić N., Vukelić M., Ignjatović N., Uskoković D., Đorđević Lj., Vasiljević P. Osteogenic activity in a mice subcutaneous implant of porous hydroxyapatite/poly-l-lactide loaded with bone marrow cells. Ninth Annual Conference of the Yugoslav Materials Research Society, Herceg Novi, 2007. Book of Abstracts
3. Najman S., Savić V., Djordjević Lj., Djordjević A., Vasiljević P. Flavonoid BP1 prevents hematological alteration caused by 2-butoxyethanol. Second multidisciplinary scientific meeting with international precipitation. Serbian Physiological society with Faculty of Science, Kragujevac and Serbian Biological Society «Stevan Jakovljević», Kragujevac, Kragujevac, 2006. Book of Abstracts.
4. Najman S., Savić V., Lj. Đorđević, P. Vasiljević, I. Jovanović, N. Ignjatović, M. Plavšić, D. Uskoković. Osteogenic effects of added flavonoid extract in implants combined of Hap/PLLA and bone fragments. Eighth Yugoslav Materials Research Society Conference, Herceg Novi, 2006. Book of Abstracts
5. Vasiljević P., Najman S., Djordjević Lj., Savić V. Effects biocomposites Hap/PLLA on the bone marrow cells of BALB/C mice grown in vitro. Eighth Yugoslav Materials Research Society Conference, Herceg Novi, 2006. Book of Abstracts
6. Vasiljević P., Najman S., Djordjević Lj., Vukelić M., Savić V. In vitro interaction between bone marrow cells and biocomposite Hap/PLLA. Seventh Yugoslav Materials Research Society Conference, Herceg Novi, 2005. Book of Abstracts
7. Savić V., Stanković M., Vasiljević P., Djordjević Lj., Vukelić M., Miljković M., Najman S., Ignjatović N., Plavšić M., Uskoković D. SEM analysis bone marrow cells in Hap/PLLA subcutaneous implants. Seventh Yugoslav Materials Research Society Conference, Herceg Novi, 2005. Book of Abstracts
8. Ajduković Z., Mihailović D., Savić V., Najman S., Đorđević Lj., Petrović D., Ignjatović N., Uskoković D. Substitution of osteoporotic alveolar bone with synthetic biomaterials. Sixth Yugoslav Materials Research Society Conference, Herceg Novi, 2004. Book of Abstracts
9. Đorđević Lj., Najman S., Miljković M., Savić V., Ignjatović N., Plavšić M., Uskoković D. SEM analysis of changes of different Hap/PLLA biocomposites after intraperitoneal implantation. Sixth Yugoslav Materials Research Society Conference, Herceg Novi, 2004. Book of Abstracts

10. Savić V., Miljković M., Najman S., Vukelić M., Đorđević Lj., Ajduković Z., Ignjatović N., Plavšić M., Uskoković D. Applicability of Hap/PLLA composite material in femur repair. Sixth Yugoslav Materials Research Society Conference, Herceg Novi, 2004. Book of Abstracts
11. Vasiljević P., Najman S., Đorđević Lj., Savić V., Ignjatović N., Plavšić M., Uskoković D. Interaction of Hap/PLLA biocomposites with bone matrix after ectopic implantation. Sixth Yugoslav Materials Research Society Conference, Herceg Novi, 2004. Book of Abstracts
12. Najman S., Savić V., Đorđević Lj., Ignjatović N., Uskoković D. Methods of evaluation of biological response to biocomposite implant based on hydroxyapatite. Fourth Yugoslav Materials Research Society Conference, Herceg-Novi, 2001. Book of Abstracts
13. Savić V., Najman S., Djordjevic Lj., Ignjatovic N., Uskokovic D. Changes implants made of biocomposites HAp/PLLA and bone fragments after their subcutaneus implantation. Fourth Yugoslav Materials Research Society Conference, Herceg-Novi, 2001. Book of Abstracts
14. Djordjevic Lj., Najman S., Ignjatović N., Miljkovic M., Savić V., Uskoković D. SEM analysis of intraperitoneal implanted biocomposite of polisiloxane and hydroxyapatite. Fourth Yugoslav Materials Research Society Conference, Herceg-Novi, 2001. Book of Abstracts
15. Đorđević Lj., Savić V., Najman S., Miljković M., Ignjatović N., Plavšić M., Uskoković D. SEM analysis of intraperitoneal implants of biocomposite HAp/PLLA. Third Yugoslav Materials Research Society Conference, Herceg-Novi, 1999. Book of Abstracts
16. Najman S., Savić V., Đorđević Lj., Ignjatović N., Plavšić M., Uskoković D. Peritoneal reaction after experimental implantation of composite HAp/PLLA. Third Yugoslav Materials Research Society Conference, Herceg-Novi, 1999. Book of Abstracts
17. Savić V., Najman S., Đorđević Lj., Ignjatović N., Plavšić M., Uskoković D. Tissue response on HAp/PLLA implant and its bioresorbtion. Third Yugoslav Materials Research Society Conference, Herceg-Novi, 1999. Book of Abstracts
18. Najman S., Savić V., Miljković M., Đorđević Lj. SEM analiza uticaja 2-butoksietanola na kostnu srž miša. I Jugoslovenski Kongres elektronske mikroskopije. Novi Sad, 1995. Zbornik radova.
19. Žikić R., Štajn A., Đorđević Lj., Živković R. Uticaj mangana na aktivnost katalaze u jetri šarana. VII Kongres biologa Jugoslavije, Bečići, 1986. Zbornik radova.
20. Đorđević Lj., Žikić R., Štajn A., Živković R., Milenković G. Uticaj kadmijuma na aktivnost SOD u jetri šarana. VII Kongres biologa Jugoslavije, Bečići, 1986. Zbornik radova.



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Љубиша Б. Ђорђевић
Ментор, МН:	Стево Најман
Наслов рада, НР:	ИНДУКТИВНИ ПОТЕНЦИЈАЛИ ИМПЛАНТИРАНЕ ДЕМИНЕРАЛИЗОВАНЕ КОСТИ У ЛОКАЛНОМ РЕПАРАТИВНОМ РАСТУ КОСТИ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публиковања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Југоисточна Србија
Година, ГО:	2011.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: (поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прило- га)	8 поглавља/135 стр/299 цитата/3 табеле/122 слике
Научна област, НО:	Биологија
Научна дисциплина, НД:	Физиологија животиња
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	Имплантација, деминерализована кост, костни дефект, зарастање кости, пацов
УДК	57.089.6 : 591.471.36/.37
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	Експериментални део рада урађен је у Лабораторији за експерименталну хирургију Института за биомедицинска истраживања Медицинског факултета у Нишу

Извод, ИЗ:

У савременој клиничкој пракси, при реконструктивним захватима у ортопедији и максилофацијалној хирургији, користи се много различитих супституената кости. Према својим хемијским и физичким својствима, сваки од њих има и предности и мане. Идеја деминерализоване кости, као материјала за супституцију кости, нуди неке предности из разлога што је то природна кост којој је уклоњен минерални део, а у остатку, органском делу, задржава се оригинална микроструктура кости, што треба да омогући раст остеогених ћелија. Циљ истраживања је да се упореде, под истим условима, деминерализована кост и неоргански минерални матрикс, као и колико органски део кости (колаген) има улогу у репаративном расту кости. Степен насељености и динамика насељавања импланата ћелијама су различити и зависе од уграђеног материјала и места имплантације. Најнасељенији су имплантати од деминерализоване кости и колагене мемране. У костном дефекту фемура ресорпција је најинтензивнија на имплантатима деминерализоване кости, затим на имплантираним колегеним мембранама, а најспорије иде на имплантираном минералном матриксу. При имплантацији у костни дефект фемура деминерализована кост се ресорбује и дефект зараста за 6 недеља уз ремоделацију кости, док минерални матрикс остаје још увек нересорбован у околној новоформиранијој сунђерастој кости. Влакна колагена из имплантиране колагене мемране и деминерализоване кости су погодан материјал за репарацију кости, јер ћелије добро адхерирају на њих, лако се деструирају и могу да постану део новог матрикса кости.

Датум прихватања теме, ДП: 05.02.2007.

Датум одбране, ДО:

Чланови	Председник:	уписује се накнадно руком
	Члан:	
	Члан, ментор:	

Образац Q4.09.13 - Издање 1



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO:	
Identification number, INO:	
Document type, DT:	monograph
Type of record, TR:	textual / graphic
Contents code, CC:	doctoral dissertation
Author, AU:	Ljubiša B. Djordjević
Mentor, MN:	Stevo Najman
Title, TI:	INDUCTIVE POTENTIALS OF IMPLANTED DEMINERALISED BONE IN LOCAL REPARATIVE BONE GROWTH ON EXPERIMENTAL MODEL
Language of text, LT:	Serbian
Language of abstract, LA:	English
Country of publication, CP:	Serbia
Locality of publication, LP:	South east Serbia
Publication year, PY:	2011
Publisher, PB:	author's reprint
Publication place, PP:	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD: (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendices)	8 chapters/135 pp./299 ref./3 tables/122 pictures
Scientific field, SF:	Biology
Scientific discipline, SD:	Animal physiology
Subject/Key words, S/KW:	Implantation, demineralized bone, bone defect, bone healing, rat
UC	57.089.6 : 591.471.36/.37
Holding data, HD:	library
Note, N:	Experimental work was done in the Laboratory for experimental surgery of the Institute for Biomedical Research, Faculty of Medicine in Niš

Abstract, AB:

Various bone supstituents are applied in reconstruction procedures in modern clinical practice in ortopedics and maxillofacial syrgery. Each bone supstituent has own advantages and disadvantages depending on their chemical and physical characteristics. Concept of application of demineralised bone as material for bone supstitution offers an advantage of usitilization of native bone without its mineral part, which contains original microstructure of bone in its organic part. Thus, growth of osteogenic cells is enabled. The aim of this study is comparation of demineralised bone and inorganic mineral matrix and elucidation of role of organic part of the bone (collagen) in repairment growth of bones. Level and dynamics of cell repopulation in are various and depend on applied material and its localization. The most populated implants are those of demineralised bones and collagen membranes. The highest rate of resorption in femur bone defect is obtained with demineralised bone implants and collagen membrane implants and the lowest rate of resorption with mineral matrix. During implantation in femur bone defect demineralised bone is resorbed and defect repaired in 6 weeks with bone remodeling, while mineral matrix stayed unsorbed in surrounding spongy bone. Collagen fibers from implanted collagen membrane and demineralised bone are excellent material for bone repairment because of good cell adhesion, easy destruction and tendency to become part of new bone matrix.

Accepted by the Scientific Board

05.02.2007.

Defended on, DE:**Defended Board,** President:

Member:

Member, Mentor:

Образац Q4.09.13 - Издање 1