



Regeneracija koštanog tkiva upotrebom bioaktivnih molekula i biomaterijala

Ozren Smolec^a, Nikša Bukvić^a, Bojan Toholj^{*b}, Marko Pećin^b, Josip Kos^a, Jovan Spasojević^b

^a Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet

^b Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu

*Autor za kontakt: bojantoholj@gmail.com

SAŽETAK

Napredak u primeni regenerativnih principa dramatično je uticao kako na humanu tako i na veterinarsku ortopediju, no ortopedija se javlja kao jedna od najatraktivnijih grana za primenu regenerativne medicine i tkivnog inženjeringu. Osnovni koncept regenerativne ortopedije temelji se na razumevanju i preciznom usklađivanju međuodnosa tri osnovna faktora: ćelije, okoline i nosača. Tkvni inženjering za cilj ima kombinovanje progenitornih ili zrelih matičnih ćelija s biokompatibilnim materijalima ili nosačima, sa ili bez odgovarajućih faktora rasta kako bi se podstakla reparacija i regeneracija. Budući da je razumevanje molekulskih i ćelijskih događanja tokom kaskade zarastanja postepeno povećava, istražuju se nove strategije za poboljšavanje procesa zarastanja. Razvijen je celi niz terapijskih postupaka i bioaktivnih molekula kako bi se poboljšao odgovor organizma i ubrzalo zarastanje kosti. Neki od primera su različiti tipovi glukozaminoglikana, faktori rasta, matične ćelije, prirodni transplataci (auto-, alo- ili ksenograftovi) te nosači s biološkom i sintetičkom bazom nastale na bazi tkivnog inženjeringu. Ovi biomaterijali i bioaktivni molekuli imaju neka značajna ograničenja, i još uvek ne postoje opšteprihvачene terapijske metode koje bi zadovoljile sve očekivane zahteve u smislu poboljšanja zarastanja koštanog tkiva. Inženjering koštanog tkiva, kao skup novih terapijskih metoda, mogao bi prevladati mnoga ograničenja upotrbe koštanih transplatasta.

KLJUČNE REČI: Zarastanje kosti, transplatacija, faktori rasta

Uvod

Inženjering koštanog tkiva je preduslov razvoja regenerativne ortopedije, a podrazumijeva bilo koji pokušaj stimulacije stvaranja kosti implantatima koji su napravljeni poštujući principe prirodnih nauka i inženjeringu. To je interdisciplinarno područje u kojem se koriste najsavremenija dostignuća iz područja molekularne biologije, hemije, inženjeringu i nauke o materijalima s ciljem uspostavljanja i kontrolisanja prirodnih procesa zarastanje koji za krajnji rezultat imaju regeneraciju oštećenih tkiva i organa. Osnovni koncept regenerativne ortopedije temelji se na razumevanju i preciznom usklađivanju međuodnosa tri osnovne sastavnice: ćelije, okoline i nosača. Ćelije su osnovne biološke jedinice koje upravljaju svim procesima regeneracije tkiva. Okolina sadržava različite bioaktivne signale (faktore rasta, transkripcione faktore, mehaničku silu) koji moduliraju ćelijski odgovor, a trodimenzionalni nosači služe kao privremena skela koja sadržava i orientiše ćelije na samom mestu oštećenja. Trauma primarno kao i druge bolesti a posebno malformacije mišićno-koštanog sistema često dovode do strukturnih oštećenja hrskavice, kostiju i mišića uzrokujući bol i nemogućnost kretanja ljudi i životinja. Kod složenih preloma vrlo često dolazi do znatnijeg gubitka koštane mase i slabije prokrvljenosti te zbog toga nastaju nekrobiotičke promene u koštanom tkivu i povezanim strukturama. U sklopu tih procesa propada i deo osteogenih ćelija potrebnih za reparatore procese. Postoje brojne metode kojima se takva stanja nastoje poboljšati počevši od autolognog koštanog transplatasta, vaskulariziranog koštanog implatata pa sve do korištenja koštanih morfogenetskih proteina te drugih lokalnih faktora rasta. Lečenje takvih preloma zahteva pronalazak metode kojom bi se poboljšalo snadbevaljne krvlju koštanog tkiva i povećala količina osteogenih ćelija u zoni preloma. Poznato je da su izvori osteogenih ćelija determinisane koštane ćelije, preteče periosta, endoosta i koštane srži koje stvaraju koštano tkivo bez dodatnog stimulansa. Najveći deo induktibilnih koštanih ćelija čine nediferentovane mezenhimske ćelije okolnih mišića i mišićnih ovojnica koje pod uticajem lokalnih faktora rasta metaplaziraju u osteogene ćelije, koje potom učestuju u izgradnji koštanog tkiva. U ovom radu razmotrit ćemo najčešće biomaterijale i biomolekule koje se koriste u bioregenerativnoj medicini koštanog tkiva.

AKTIVNE BIOMOLEKULE

Lokalni faktori rasta

Lokalni faktori rasta ili citokini predstavljaju veliki broj proteinskih molekula koji deluju kao medijatori i regulatori ćelijskih komunikacija, u fiziološkim i patološkim uslovima. Odgovor ćelije na faktore rasta odvija se u kaskadama, a svaka od njih ima precizno određenu ulogu. Put prenošenja signala podstaknut faktorima rasta uključuje receptor, substrat, enzim, proteine staničnog skeleta, faktore transkripcije, proteina koji vežu DNA i konačno enzime koji usmeravaju preteče deoksi- i ribonukleotida prema replikaciji DNA.

Fibroblastični faktor rasta (FGF)

Porodicu fibroblastičnih faktora rasta sačinjava devet strukturno sličnih polipeptida. U literaturi su opisivani pod različitim nazivima: astroglijalni faktor rasta, heparin vezajući faktor rasta, tumorski faktor angiogeneze, hrskavični faktor rasta-1, endotelijalni faktor rasta, makrofagni faktor rasta. Potiču angiogenezu, diferencijaciju, hemotaksu i deluju mitogeno na brojne ćelije. Stimulacija stvaranja koštanog tkiva *in vivo* posledica je verovatne stimulacije urastanja kapilara i proliferacije nediferentovanih mezenhimalnih ćelija ili uticaja na još ranije procese u mehanizmu stvaranja kosti. (Aspenberg et al., 1989).

Vaskularni endotelijalni faktor rasta Vascular endothelial growth factor-VEGF

VEGF je visoko specifičan mitogen za endotelne ćelije krvnih sudova. Postoji 5 izoformi ovog faktora koje se međusobno razlikuju u molekulskoj masi i sposobnosti vezanja za proteoglikane ćelijske membrane. VEGF indukuje proliferaciju endotelnih ćelija, potiče ćelijsku migraciju i sprečava apoptozu ćelija. Različite izoforme VEGF vezuju se na dva tipa tirozin-kinaza receptora VEGFR-1 i VEGFR-2 koje se gotovo isključivo nalaze ne endotelnim ćelijama. VEGF pospešuje stvaranje novog koštanog tkiva, potiče osifikaciju kalusa frakture femura miša. Nadalje, pozitivno deluje na premoštavanje segmentalnog pukotinastog defekta radiusa kunića te pojačava osteoblastičnu i osteoklastičnu aktivnost (Street et al., 2002).

Plazma bogata trombocitima (platelet rich plasma)

Prve upotrebe PRP u skeletnim rekonstruktivnim terapijama bilie su u maksilofacialnoj hirurgiji za tretman mandibularnih i parodontnih defekata (Alsousou et al., 2009). Od tad se koristi u ortopediji kako bi se poboljšalo zarastanje preloma (Kitoh et al., 2007b,) i spinalna fuzija (Hartmann et al., 2010, Inttini et al., 2009). Učinci zarastanja, koristeći PRP posredovani su aktivacijom kaskade koagulacije, što oslobađa faktore rasta iz alfa-granula trombocita (Cenni et al. 2010). Ti faktori rasta uključuju VEGF, TGF-b, IGF, PDGF i epidermalni faktor rasta (EGF).

Faktor rasta sličan insulinu (Insulin-like growth factor-IGF)

IGF su o hormonu rasta zavisni polipeptidi molekularne težine 7.600 (Canalis et al., 1988.). Sintetišu ih brojna tkiva uključujući kosti i hrskavicu. IGF-1 i IGF-2 pojačavaju stvaranje koštanog kolagena i smanjuju razgradnju kolagena *in vitro* u kalvariji pacova i deluju na umnažavanje osteoblasta u kulturi ljudskih koštanih ćelija. Nadalje, IGF-1 ubrzava zarastanje veštački izazvanih defekata mandibule, zigomatičnog luka, dijafize dugih kostiju te prevremeno zatvaranje čeonih sutura u pacova (Thaller et al., 1993).

Trombocitni faktor rasta (Platelet-derived growth factor -PDGF)

PDGF je polipeptid molekularne težine 28000- 35000 a sintetišu ga trombociti, makrofagi, endotelne ćelije kao i većina ćelija mezodermalnog porekla ref111). Stimuliše migraciju i proliferaciju mezenhimalnih ćelija kao i sintezu DNK i proteina u koštanim i hrskavičnim ćelijama.

Koštani morfogenetski protein (Bone morphogenetic protein- BMP)

BMP jedini je poznat faktor koji indukuje stvaranje heterotopne koštane tvari indukujući diferencijaciju nediferentovanih mezenhimalnih ćelija u osteoblaste. Izolovan je prvi put 1965. godine iz demineraliziranog koštanog matriksa, a danas se može proizvesti i genetskim putem (URIST et al., 1965). Koštani morfogenetski proteini su multifunkcionalne molekule čije se delovanje opaža u različitim tkivima. Svrstani su u TGF β superfamiliju, izuzev BMP-1 i do danas je opisano više od četrdeset podtipova BMP-a. Važni su za razvoj koštanog tkiva, njegovu regeneraciju, a uključeni su i u određene patološke procese jer mutacija njihovih gena može prouzrokovati razvojne anomalije. Klinički efekti BMP-ova vidljivi su u mnogim biološkim procesima u ćelijama kao što su hemotaksu i mitogeneza, ćelijska diferencijacija, regulacija ćelijskog ciklusa i vaskularizacija. Mnogi BMP-ovi sami ili u kombinaciji sa drugima uključeni su u stvaranje hrskavičnog i koštanog tkiva kao i u procese

kalcifikacije i remodeliranja koštanog kalusa. U eksperimentalni radovima BMP je dokazao svoje delovanje u promociji zarastanja kosti u koštanim defektima ovce, kunića i pasa, kao i u modelima spinalne fuzije majmuna i pasa.

Biomaterijali

Koštani graftovi

Koštani graft je svaki implantirani materijal koji sam ili u kombinaciji sa drugim materijalom pospešuje zarastanje kosti i djeluje osteogeno, osteokonduktivno i osteoinduktivno na mestu njegove aplikacije (Muschler et al., 1992). Koštani graft sa osteogenim svojstvima sadrži osteoblastne ćelije na različitom stepnu diferencijacije koje su sposobne stvoriti novu kost putem enhondralne osifikacije. Osteoinduktivni koštani graftovi sadrže citokine koji su sposobni transformisati lokalne ćelije u osteoblastne ćelije. Osteokonduktivni materijali služe kao izvor biokompatibilne strukturalne osnove koja pospešuje stvaranje nove kosti (Berven et al., 2001). U širem smislu materijale koje koristimo za koštane graftove podelili smo na: autograftove, alograftove, ksenograftove, sintetske materijale a, moguće su i kombinacije navedenih materijala. Autograft (autogeni graft) označava deo tkiva koji je uzet sa nekog dijela tijela jedinke te kasnije apliciran istoj jedinki. Alograft označava deo tkiva koje je presađeno sa jedne jedinke na drugu jedinku iste vrste. Ksenograft označava deo tkiva presađen sa jedinke jedne vrste na jedinku druge vrste pri čemu najčešće dolazi do jake imunološke reakcije na tkivo donora.

Autologni koštani graftovi

Autologni koštani graftovi poseduju značajan osteogeni, osteoinduktivni i osteokonduktivni potencijal. U njih svrstavamo spongiozni graft, vaskularizovani kortikalni graft, nevaskularizovani kortikalni graft i koštanu srž (Axhausen et al., 1956). Autologni spongiozni graft pokazuje snažnu osteogenu aktivnost, brzo se revaskularizuje i integrše na mestu ugradnje. Spongiozni graft dobro ispunjava nastali koštani defekt ali, ne pridonosi mehaničkoj stabilnosti na mestu ozlede. Zbog poroznosti spongioznog grafta krvni sudovi, osteoblasti i preosteoblastične ćelije počinju urastati u graft sa periferije prema centru grafta već drugog dana posle operacije (Ray et al., 1972). Kako proces napreduje rubni osteoblasti počinju odlagati osteoid koji sada okružuje nekrotičnu kost pa dolazi do preoblikovanja grafta. Taj proces započinje resorpcijom nekrotične kosti od strane osteoklasta i posljedičnom zamenom iste sa novom kosti koju stvaraju osteoblasti. U završnoj fazi dolazi do potpune integracije grafta u organizovanu koštanu strukturu (Stevenson et al., 1998).

Kortikalni autograftovi mogu biti vaskularizovani i nevaskularizirani. Najznačajniji izvori kortikalnih graftova su fibula, crevna kost i rebra. Vaskularizovani autograft ima prednost pred nevaskularizovanim jer održava vitalnost koštanih ćelija. Osim toga u vaskularizovani autograft je uključeno nešto okolnog tkiva uključujući i periost (Shaffer et al., 1985). Nevaskularizovani kortikalni autograft pokazuje umerenu osteogenu aktivnost, doprinosi mehaničkoj čvrstoći kosti i sporo se revaskularizuje (Stevenson et al., 1998). Za kompletну revaskularizaciju kortikalnog grafta treba jedan do dva meseca dok u prvih šest dana uopšte nema znakova revaskularizacije. Revaskularizacija spongioznog grafta počinje nekoliko sati posle operacije, a u potpunosti završi za dve nedelje.

Koštana srž

Koštana srž koristi se za pomoć pri stimulaciji stvaranja nove kosti na mestu koštanih lomova i kod pseudoartroza. Glavna prednost ove tehnike je ta što se može izvesti perkutanom punkcijom gotovo bez ikakve opasnosti za pacijenta. Koštana srž se aspirira pomoću velike punkcijske igle, najčešće iz krila crevne kosti (*os ilii*). Uspešnost ove tehnike zavisi o broju i aktivnosti koštanih primiridijalnih ćelija u aspiratu koštane srži. Koštana srž je izvor osteogenih ćelija koje mogu bez dodatnog stimulansa direktno stvarati novu kost (Hayensworth et al., 1992). Kombinacijom koštane srži i demineraliziranog koštanog matriksa postižu se bolji rezultati pri zarastanju pseudoartroza a, povećano je i stvaranje koštanog tkiva u odnosu prema samoj koštanoj srži (Tiedeman et al., 1991).

Alograftovi

Demineralizovani koštani matriks

Demineralizovani koštani matriks pokazuje umerena osteoinduktivna svojsva, brzo se revaskulariše ali ne pridonosi mehaničkoj stabilnosti na mestu loma kosti. Na mestu ugradnje demineralizovanog koštanog matriksa dolazi do upalne reakcije koja rezultuje migracijom polimorfonuklarnih leukocita u transplantat. Kasnije, dolazi do proliferacije mezenhimalnih ćelija i njihove interakcije sa matriksom. Ta reakcija dovodi do diferenciranja mezenhimalnih ćelija u hondrocite koji luče hrskavični matriks. Biološka aktivnost demineralizovanog koštanog matriksa nedvosmisleno zavisi od prisutnosti proteina

i raznih činioca rasta prisutnih u vančeliskom matriksu. Osteoinduktivni kapacitet demineralizovanog koštanog matriksa može se oslabiti u postupcima skladištenja, pripreme i sterilizacije. (Munting et al., 1988).

Kortikospongiozni i kortikalni alograftovi

Ovi koštani graftovi pridonose mehaničkoj stabilnosti na mestu loma kosti a, osteoinduktivni kapacitet im je ograničen. Najčešći izvori ovih graftova su crevna kost, distalna butna i proksimalna goljenična kost (Pelker et al., 1983). Zbog razlika u glavnom sastavu tkivne podudarnosti dolazi do senzibilizacije primaoca grafta te posledične imunološke reakcije. Sveži alograft izaziva humoralnu i ćelijsku imunološku reakciju u domaćina, a intenzitet imunološke reakcije proporcionalan je koncentraciji antiga. Klinička istraživanja na životinjama potvrdila su uticaj specifične imunološke reakcije na smanjenu vaskularizaciju i remodelisanje kortikalnog grafta. Stoga kortikalni alograftovi pokazuju znatno slabija svojstva od kortikalnih autograftova u istom vremenskom periodu nakon transplantacije

Omentum

Omentum predstavlja specifičnu anatomsku strukturu koja se sastoji od dve mezotelijalne ovojnica između kojih su smeštene masne ćelije, limfne kapilare, vezivno tkivo te nakupine mononuklearnih ćelija (slika 1). Omentum je bogat krvnim žilama i brojnim karakterističnim kapilarnim spletovima koji se nazivaju omentalni glomeruli. U osnovi, omentum je dobro prokrvljen organ bogat faktorima rasta krvnih sudova pa kao takav uzrokuje stvaranje novih krvnih sudova u tkivima u koje je inkorporiran (slika 2). Razgranati limfnji sistem omentuma može absorbovati velike količine edemske tečnosti, otpadnih metabolita i toksičnih tvari i korpuskularnih elemenata. Novija istraživanja pokazala su da omentum može poslužiti kao izvor različitih faktora rasta, neurotransmitera, upalnih medijatora kao i multipotentnih primogenih ćelija koje se mogu diferentovati u različite tipove tkivnih ćelija (Alagumuthu et al., 2006). Uzimajući u obzir pre navedene činjenice, omentum postaje tkivo izbora kod složenijih hirurških zahvata gde su moguće komplikacije u zarastanju i povećena mogućnost od infekcije. Slobodni transplatanat omentuma utiče na brže zarastanje koštanog defekta u kunića i psa (Kos et al., 2006; Saifzadeh et al., 2009) kao i pomoć pri liečenju osteoradionekroze mandibule u čoveka gdje podstiče stvaranje novih krvnih sudova i služi kao izvor ćelija za regeneraciju oštećenog tkiva (Kobayashi et al., 2000). Iz svega navedenog proizlazi da omentum ima značajnu ulogu u području plastične i rekonstruktivne hirurgije, a sve njegove kliničke potencijale i moguće aplikacije valja istraživati i u budućim vremenima.



Slika 1. Uzimanje dela omentuma iz trbušne duplje (original foto: O. Smolec, 2009).

Figure 1. Harvesting a omental graft from abdominal cavity (original foto: O. Smolec, 2009).



Slika 2. Postavljanje omentalnog grafta u kritični defekt radijusa kunića (original foto: O. Smolec, 2009).

Figure 1. Placing a omental graft in critical defect of rabbit radius (original foto: O. Smolec, 2009).

Sintetički nosači

Veštačka kost (porous ceramics)

Sintetička, porozna kost najčešće se sastoji od hidroksiapatita ili od mešavine hidroksiapatita i trikalciumfosfata (slika 1). Ima slabu osteokonduktivnu sposobnost. Nije toksična i ne uzrokuje imunološku reakciju. Sintetska kost osigurava površinu koja stimulišd urastanje mezenhimalnog tkiva, služi kao izvor minerala ili služi kao matriks koji pomaže orientaciju čdija u prostoru. U kombinaciji sa koštanom srži ubrzava zarastanje koštanog defeka u eksperimentalnih životinja. Takođe, u kombinaciji sa alogenim demineralizovanim koštanim matriksom ubrzava sraštavanje pršljenovaa (Šebečić et al., 1995).

Hidrogelovi

Hidrogelovi, kao što su želatin, agar, kolagen, hijaluronska kiselina ili fibrin čine 3D mrežu hidrofiličnih polimera koji apsorbiraju velike količine vode i bioloških tekućina. Njihova visoki nivo vode, elastičnost i biokompatibilnost kao i mogućnost širenja hranjivih tvari i bioaktivnih molekula čine ih pogodnim za strategije u inžinjeringu hrskavičnog tkiva, ali njihova čvrstoća i strukturne karakteristike čine ih nepovoljnima za strukturne uloge.

Bioaktivna stakla

Komercijalna bioaktivna stakla (e.g. Bioglass®), koja se sastoje od silikata i fosfata, u kliničkoj upotrebi su preko 20 godina (Yang, et al., 2006.). Ova stakla ragiraju sa fizioloskim tekućinama i formiraju snažne veze sa tkivima kroz ćelijsku aktivnost te se sigurno razgrađuju u fiziološkoj okolini. Kako bi se poboljšala njihova mehanička kompetencija, bioaktivnost i modularna degradacija, bioaktivna stakla koriste se i u kombinaciji s drugim sintetičkim nosačima.

DISKUSIJA

Kosti pružaju oblik, fizičku potporu i zaštitu mekim tkivima i ubrzavaju kretanje, a isto tako učestuju u održavanju homeostaze kalcijuma i fosfora. Tokom rasta i razvoja, kosti nastaju u dva različita procesa: 1) intramembranskom i 2) endohondralnom osifikacijom. U prvom procesu stanice kompaktnog mezenhimalnog tkiva diferenciraju se u osteoblaste i direktno tvore koštano tkivo, ali u drugom procesu formiranje kosti uključuje formiranje hrskavičnog kalusa, koji procesom kalcifikacije prelazi u novostvorenou kost. Zarastanje loma kompleksan je proces koji uključuje različite vremenske skale, ćelijske i biofizičke fenomene i mehaničke zahteve (Doblare et al., 2004.). Visokosložen proces zarastanja preloma još uvek nije proniknut u potpunosti, međutim istraživanja su poslednjih godina utvrdila povezanost između različitih faktora (Giannoudis et al., 2007.) kao što su ćelijska aktivnost, angiogeneza, proliferacija i diferencijacija tokom zarastanja loma. Sveobuhvatni proces razumevanja koštanoga tkiva mora biti usmeren prema detaljnem definisanju događanja na molekularnom ćelijskom nivou. Razvijen je celi niz terapijskih postupaka i bioaktivnih molekula kako bi se poboljšao odgovor organizma i ubrzalo zarastanje kosti. Neki od primera su različiti tipovi glukozaminoglikana, faktori rasta, matične ćelije, prirodni presadci (auto-, alo- ili ksenograftovi) kao i nosači (eng. scaffold) s biološkom i sintetičkom bazom nastale na bazu tkivnog inženjeringu. Ovi biomaterijali i bioaktivne molekule imaju neka značajna ograničenja, i još uvijek ne postoje opšte prihvaćene terapijske metode koje bi zadovoljile sve očekivane zahteve u smislu poboljšanja zarastanja koštanog tkiva. Inženjering koštanog tkiva, kao skup novih terapijskih metoda, mogao bi prevladati mnoga ograničenja upotrebe koštanih transplata. Dobro poznata ograničenja vezana uz kliničku uporabu autograftova i allograftova i dalje su razlog nastojanja da se razviju supstitucije koštanih presadaka baziranih na biomaterijalima i tkivnom inženjeringu (Healy et al., 2007.). Takvi materijali trebali bi imati osteoinduktivna i osteokonduktivna svojstva i biti biološki i imunološki inertni. Idealan koštani transplant ne postoji i zavisno o kliničkom problemu potrebne su različite kombinacije biomaterijala i bioaktivnih molekula. Kombinovanje matičnih ćelija s nedavno razvijenim biomaterijalima omogućuje bolje izvođenje različitih tipova osteoregenerativne terapije. Nosači (eng. scaffold) predstavljaju trodimenzionalne biokompatibilne strukture čija je osnovna funkcija omogućiti prijanjanja ćelija koje sintetišu ekstracelularni matriks. Idealan nosač mora biti porozan kako bi se ćelije mogle rasporediti unutar samog nosača i kako bi se nesmetano mogla odvijati difuzija hranjivih tvari. Osnovna podela nosača u ortopediji je na: prirodne, sintetske i mešovite. U prirodne materijale za izradu nosača spadaju kolagen, hijaluronska kiselina, fibrin, kitosan. Odlikuje ih odlična biokompatibilnost i slabije biomehaničke osobine. Sintetički materijali poput polilaktičke kiseline ili hidroksiapatita imaju jako dobre biomehaničke osobine ali i nešto slabiju biokompatibilnost. Stoga je dizajn nosača potrebno prilagoditi biološkim i strukturalnim osobinama tkiva koje regenerišemo. Veštački materijali ne mogu u

potpunosti obnoviti biološku funkciju niti mogu stvoriti prirodno biološko okruženje oštećenog tkiva. Vodeći se načelima prirodne regenerativne medicine, danas je upotreba prirodnih materijala mnogo češća nego sintetičkih. U poređenju s prirodnim materijalima, sintetski materijali mogu se prilagoditi na različite hemijske i fizičke stimulanse. Ti faktori pridonose boljoj kontroli mehaničkih svojstava matriks, uključujući vučnu čvrstoću, otpornost i brzinu razgradnje pa se mogu prilagoditi željenim biološkim svojstvima, kao što je smanjenje rizika od toksičnosti, preosjetljivosti i infekcije. Međutim, sintetičkim materijalima nedostaju bioaktivna svojstva poput biokompatibilnosti, osteoinduktivnosti i osteokonduktivnosti, što zahteva dodatnu modifikaciju pre upotrebe. Prirodni materijali primijenjeni za inženjering koštanog tkiva uključuju biološke polimere (poput kolagena i hijaluronske kiseline) te anorganske materijale (poput hidroksiapatita i trikalcijum fosfata). Preferiraju se materijali koji se prirodno nalaze u nativnoj kosti, poput kolagena, budući da poseduju urođene biološke signale koji pospešuju migraciju ćelija i promovišu hemotaksijski odgovor kad se implantiraju *in vivo* (Stevens et al., 2008.). Glavni minerali u koštanom matriksu, hidroksiapatit i trikalcijum fosfat daljnji su kandidati za koštane nosače. Njihova mehanička svojstva imaju sposobnost pružiti mehaničku potporu na području defekta nakon transplantacije. Međutim, ovi su minerali krhki i mogu se pokazati slabima na mehaničke podražaje. Obično se kombinuju sa polimernim materijalima koji su otporniji na lom kako bi se postigle optimalne performanse u primeni kod inženjeringu koštanog tkiva (Ramay et al., 2004.). U poređenju s prirodnim materijalima, sintetički materijali mogu se prilagoditi za različite hemijske i fizičke stimulanse. Ti faktori doprinoсе boljoj kontroli mehaničkih svojstava nosača, uključujući vučnu čvrstoću, otpornost i brzinu razgradnje pa se mogu prilagoditi željenim biološkim značajkama, kao što je smanjenje rizika od toksičnosti, preosjetljivosti i infekcije. Međutim, sintetičkim materijalima nedostaju bioaktivna svojstva poput biokompatibilnosti, osteoinduktivnosti i osteokonduktivnosti, što zahteva dodatnu modifikaciju pre upotrebe. Terapija matičnim ćelijama na mestu loma u kombinaciji sa faktorima rasta i nosačima omogućuje revaskularizaciju i diferencijaciju osteogenih stanica.

ZAKLJUČAK

U regenerativnoj ortopediji koristimo dve osnovne vrste ćelija, differentovane i matične ćelije. Matične su nespecijalizovane ćelije koje imaju sposobnost samoobnavljanja koje se pod određenim uslovima mogu diferencirati u terminalne ćelije specifične za određeni organ ili tkivo. Zbog tih svojstava matične ćelije predstavljaju idealnu platformu za razvoj i primenu metoda regenerativne medicine i tkivnog inženjeringu. Tkvni inženjering za cilj ima kombinovanje progenitornih ili zrelih matičnih ćelija s biokompatibilnim materijalima ili nosačima, sa ili bez odgovarajućih faktora rasta kako bi se potaknula reparacija i regeneracija (Rose et al., 2002.). Budući da ee razumevanje molekulskih i ćelijskih događanja tokom kaskade zarastanja, postepeno povećava, istražuju se nove strategije za poboljšavanje procesa zarastanja. Bioaktivni signali modulišu ćelijski odgovor i na taj način kontrolisu regenerativne procese. Najčešće korišteni bioaktivni signali spadaju u grupu faktora rasta pa tako za stimulaciju koštane regeneracije koristimo koštane morfogenetske proteine (BMP), dok se za regeneraciju hrskavice često koriste TGF-beta ili IGF-1. Od ostalih važnih bioaktivnih signala valja izdvojiti delovanje mehaničke sile kao i primenu malih molekula (steroida). Budući da je većina ovih materijala pojedinačno pokazala neki nedostatak, istraživači uglavnom dizajniraju i konstruišu kompozitne materijale koji kombinuju polimere i anorganske materijale, a koji omogućuju da se različita svojstva materijala međusobno dopunjaju i postignu optimalnu brzinu razgradnje i mehanička svojstva, koje je moguće kontrolisati. Zasada je ostvaren veliki napredak u poznavanju biologije kosti, međutim treba preduzeti dalje korake kako bi se bolje razumelo što je potrebno da se razvije komercijalna kost koja je proizvod tkivnog inžinjeringu (Salgado et al., 2007). Za regeneraciju koštanog tkiva za upotrebu u kliničkoj praksi odobrene su dve biomolekule (BMP-2 i BMP-7). Ohrabrujući rezultati postignuti su prilikom kliničkih studija kojima je testirana primena hidroksiapatitnog nosača u kombinaciji s mezenhimalnim matičnim ćelijama kod zarastanja oštećenja dugih cevastih kostiju. Veliki napredak bazičnih naučnih disciplina u području regenerativne medicine i tkivnog inženjeringu otvara velike mogućnosti za adekvatno rešavanje čitavog niza izazova iz kliničke prakse.

Literatura

- Alagumuthu, M., Das Bhupati, B., Pattanayak Siba, P., Mangual, R. 2006. The omentum: A unique organ of exceptional versatility. Indian J. Surg. 68, 136-141.
 Aspenberg P., Lohmander L.S. 1989. Fibroblast growth factor stimulates bone formation. Acta Orthop Scand 60, 473.

- Alsousou, J., Thompson, M., Hulley, P., Noble, A., Willett, K., 2009. The biology of plateletrich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *J. Bone Joint Surg.Br.* 91:987-996.
- Berven, S., Tay, K.B., Kleinstueck, F.S., Bradford, D.S. 2001. Clinical applications of bone graft substitutes in spine surgery: consideration of mineralized and demineralized preparations and growth factor supplementation. *Eur. Spine J.* 10, S169-S177.
- Cenni, E., Avnet, S., Fotia, C., Salerno, M., Baldini, N., 2010. Platelet-rich plasma impairs osteoclast generation from human precursors of peripheral blood. *J.Orthop.Res.*
- Chang, N.S., Simone, A.F., Schultheis, L.W. 2005. From the FDA: what's in a label? A guide for the anesthesia practitioner. *Anesthesiology* 103:179-185.
- Canalis, E. 1980. Effect of insuline growth factor 1 on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J. ClinInvest* 66, 709-719.
- Doblare, M., Gomez, M.J. 2004. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics*, 71, 1809-40.
- Giannoudis, P., Tzioupis, C., Almalki, T. 2007. Fracture healing in osteoporotic fractures: is it really different? A basic science perspective. *Injury*, 38, 90-9.
- Haynesworth, S.E., Goshima, J., Goldberg, V.M., Caplan, A.I. 1992. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*. 13(1), 81-88.
- Hartmann, E.K., Heintel, T., Morrison, R.H., Weckbach, A., 2010. Influence of platelet-rich plasma on the anterior fusion in spinal injuries: a qualitative and quantitative analysis using computer tomography. *Arch.Orthop. Trauma Surg.* 130:909-914.
- Healy, K.E., Guldberg, R.E., 2007. Bone tissue engineering. *J Musculoskelet NeuronallInteract*, 7, 328.
- Intini, G., 2009. The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials* 30:4956-4966.
- Kitoh, H., Kitakoji, T., Tsuchiya, H., Katoh, M., Ishiguro, N., 2007b. Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in distraction osteogenesis of the long bones. *Bone* 40:522-528.
- Kobayashi, W., Kobayashi, M., Nakayama, K., Hirota, W., Kimura, H., 2000. Free omental transfer for osteoradionecrosis of the mandible. *Int. J. Orl. Maxillofac. Surg.* 29, 201-206.
- Kos, J., Nadinić, V., Huljev, D., Turčić, J., Košuta, D., Anić, T., Babić, T., Kreszinger, M., Smolec, O. 2006. Healing of bone by application of free of greater omentum. *Vet. arhiv* 76(5), 367-379.
- Muschler, G.F., Lane, J.M. 1992. Orthopaedic surgery. (HABAL, M.B., A.H. REDDI urednici). Bone grafts and bone substitutes. Saunders. Philadelphia. pp. 375-407.
- Munting, E., Wilmart, J.F., Wijne, A., Hennebert, P., Delloye, C. 1988. Effect of sterilization on osteoinduction. Comparaison of five methods in demineralized rat bone. *Acta Orthop. Scand.* 59, 34-38.
- Pelker, R.R., Friedlaender, G.E., Markham T.C. 1983. Biomechanical properties of bone allografts. *Clin. Orthop.* 174, 54-57.
- Ramay, H.R.R., Zhang, M. 2004. Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering. *Biomaterials*, 25, 5171-80.
- Rose, F., Oreffo, R.O.C. 2002. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochemical and biophysical research communications*, 292, 1-7.
- Ray, R.D. 1972. Vascularization of bone graft and implants. *Clin. Orthop.* 87, 43-48.
- Saifzadeh, S., Pourreza, B., Hobbenaghi, R., Naghadeh, B.D., Kazemi S. 2009. Autogenous greater omentum as a free non-vascularized graft, enhances bone healing: an experimental nonunion model. *J Invest Surg*, 22:129-37.
- Stevenson, S. 1998: Enhancement of fracture healing with autogenous and allogenic bone grafts. *Clinical Orthop. and Related Research*. 355, 239-246.
- Shaffer, J.W., Field, G.A., Goldberg, V.M., Davy, D.T. 1985: Fate of vascularized and non-vascularized autografts. *Clin. Orthop.* 197, 32-43.
- Street J., Min, B., Guzman L. 2002. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *J. Periodontol.* 64(5 Suppl), 416-431.
- Stevens, M.M. 2008. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today*, 11, 18-25.
- Thaller S.R., Dart, A., Tesluk, H. 1993. The effects of insuline growth factor 1 on critical-size defects in Sprague-Dawley rats. *Ann Plast Surg* 31, 429-433.
- Tiedeman, J.J., Connolly, J.F., Strates, S.B., Lippiello, L. 1991. Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix. *Clin. Orthop.* 268, 294-302.
- Urist, M.R. 1965. Bone: formation byautoinduction. *Science* 150, 893-899.

Bone regeneration, using s bioactive molecules and biomaterials

Ozren Smolec^a, Nikša Bukvić^a, Bojan Toholj^{*b}, Marko Pećin^b, Josip Kos^b

^a University of Zagreb, Faculty of veterinary medicine

^b University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of veterinary medicine

* Corresponding author: bojantoholj@gmail.com

ABSTRACT

The progress in implementing regenerative principles has affected both the human and the veterinary orthopaedics, with orthopaedics appearing as one of the most attractive areas for application of regenerative medicine and tissue engineering. The basic concept of regenerative orthopaedics is based on the understanding and accurate harmonization of relations between the three major components: cells, environments and carriers. The aim of the tissue engineering is to combine the progenitor or the adult stem cells with biocompatible materials or carriers, with or without the appropriate growth factors, in order to facilitate reparation and regeneration. Since there has been a gradual growth in understanding of the molecular and cellular events during the healing cascade, new strategies to improve the healing process have been explored. The whole row of therapeutic procedures and bioactive molecules have been developed to improve the body response and to accelerate the process of bone healing. Some examples are the different types of glycosaminoglycans, growth factor, stem cells, natural grafts (auto-, allo- and xenografts) as well as scaffolds with biological and synthetic basis developed through tissue engineering. These biomaterials and bioactive molecules have some significant limitations, and there are still no generally accepted therapeutic methods to satisfy all the requirements in terms of improving the healing of the bone tissue. The bone tissue engineering, as a set of new therapeutic methods, has the potential to overcome many of the limitations in terms of the bone graft application.

KEY WORDS: bone healing, transplataion, growth factors

Primljen: 3.10.2018.

Prihvaćen: 19.12.2018.