

KONCEPT I STRATEGIJE U INŽENJERINU KOSTNOG TKIVA

Ljubiša B. Đorđević¹, Perica J. Vasiljević¹, Stevo J. Najman²

¹Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu

²Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Sažetak. U savremenoj kliničkoj praksi, pri rekonstruktivnim zahvatima u ortopediji i maksilofacijalnoj hirurgiji koriste se supstituenti kosti u vidu implantata. Prema svojim fizičkim i hemijskim svojstvima, svaki od njih ima prednosti i mane. Ideja inženjeringa kostnog tkiva je stimulisanje obrazovanja kosti implantima, kao nosačima, u kombinaciji sa osteogenim ćelijama i osteostimulirajućim (osteoinduktivnim) faktorima. Dizajn implanta u pogledu izabranog nosača sa svojim karakteristikama, tip ćelija koje su zasejane, vrsta i kombinacija stimulišućih faktora, igraju bitnu ulogu u ponašanju implantiranog materijala unutar organizma. Tkivni inženjering kosti je obećavajući, ali je potrebno prevazići mnoge prepreke, kako bi se mogao smatrati pravom alternativom za autologe kostne kalemove.

Ključne reči: kostno tkivo, osteogene ćelije, osteoinduktivnost, osteokonduktivnost, faktori rasta..

Uvod

Inženjering kostnog tkiva podrazumeva bilo koji pokušaj stimulanja obrazovanja kosti implantatima koji su napravljeni kombinujući biološke principe i inženjerstvo. U idealnom slučaju, tkivni inženjering 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 potpunosti zameniti autologu kost mogu joj se dodati, kako bi poboljšali njen kvalitet i umanjili količinu potrebne autologe kosti. Uopšte, implanti tkivnog inženjeringa su napravljeni od nosača i biološki aktivnih faktora. Ovi faktori mogu biti ćelije i proteini koji stimulišu ćelije domaćina (ili njihova kombinacija). Ovi materijali su dizajnirani da poseduju jednu ili više pomenutih osobina: osteokonduktivnost, osteoinduktivnost i osteogenezu. Zbog toga, svi segmenti u inženjeringu kostnog tkiva se u osnovi dele na tri grupe: nosači, faktori rasta i ćelije. Ova podela, naravno, nije tako jednostavna kao što izgleda.

Nosači za osteogene ćelije

Dobro dizajniran nosač u inženjerstvu kostnog tkiva ima višestruku ulogu. Jedna od njih je da obezbedi sredinu za prenos osteoinduktivnih molekula i/ili osteogenih ćelija. Dalje, nosač mora da popuni prazninu u koštanom defektu i olakša zarastanje. Da bi bilo efikasno, dobar noseći materijal mora imati nekoliko kvaliteta, kao što su biokompatibilnost, osteokonduktivnost, poroznost, biodegradabilnost, mehanički kvaliteti i intrinzična osteoinduktivnost (Habibovic i sar. 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.

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 produkti materijala, takođe, moraju biti biokompatibilni, uključujući i nereaktivne monomere, inicijatore, stabilizatore, povezujuće agense, emulgatore, rastvarače i otpuštene proizvode biorazlaganja unutar organizma (Temenoff i sar. 2000).

Kalcijum fosfatne (CaP) keramike, kao što su HA i TCP, vrlo su slične neorganskoj komponenti prirodnog kostnog tkiva. Zbog toga i nije iznenađujuće što CaP keramike pokazuju izvrsnu biokompatibilnost. Čak, vrlo je moguće i direktno vezivanje sa kostnim tkivom (Ruhé i sar. 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) i poli(DL-mlečna-co-glikolna kiselina) (PLGA) već se široko koriste. Dodatno, razni drugi polimeri kao što je poliortoestar (POE), polianhidridi i polipropilenfumarat (PPF) se proučavaju u tkivnom inženjeringu, i pokazuju poželjnu biokompatibilnost na životinjskim modelima (Mistry i Mikos 2005).

Osteokonduktivnost

Osteokonduktivnost je ključan uslov za uspešnu zamenu kosti. Nosač mora da obezbedi supstrat na kome se kostne ćelije mogu vezivati, deliti, migrirati i deponovati kost. CaP keramike obezbeđuju odličnu osteokonduktivnost, najverovatnije jer su hemijski slične neorganskoj komponenti kosti. Važna karakteristika keramika, koja značajno poboljšava osteokonduktivnost, jeste velika površinska oblast usled uvećane mikroporoznosti (Wilson i sar. 2006).

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

Poroznost

Još jedan bitan uslov za olakšan rast kosti unutar materijala je povezana porozna arhitektura u nosaču. Potreban je prazan (slobodan) prostor kako bi se omogućio rast krvnih sudova i okolne kosti u nosač, a i da bi se osiguralo urastanje kosti od strane ugrađenih i/ili migrirajućih ćelija. Dodatno, poroznost povećava dostupnu površinu, kao oblast za vezivanje ćelija, njihov rast i funkciju u zarastanju defekta (Temenoff i sar. 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 i sar. 2005b). Druge metode za pravljenje poroznog nosača uključuju hidrokarbonatno umrežavanje, gasno parenje i faznu separaciju (Hacker i sar. 2003). U novije vreme se koriste elektrospining i stereolitografija (3D printing), koja omogućava specifičniji vid kontrole geometrije nosača i arhitekture pora, kao i optimizaciju mehaničkih svojstava (Lin i sar. 2004).

Biorazgradivost

Trajni implantni materijali koji se u današnje vreme koriste, kao što su metali, često se povezuju sa pojavama, kao što su infekcije, korozija, zamor i otkaz, i svaka od njih zahteva zamenu implanta (Temenoff i sar. 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 inženjeru privremeno popunjavaju defekt i postepeno se razgrađuju kako se kost regeneriše. U idealnom slučaju, dok se biomaterijal razgrađuje, stvara se prostor za rast novog kostnog tkiva, 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 i sar. 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 i sar. 2007). Poli-metilmetakrilat (PMMA) polimer se smatra nerazgradivim, dok se polimeri PLGA, PCL i PPF razgrađuju hidrolizom estara. Stepenn degradacije PPF-baziranih sistema, na primer, može da varira u zavisnosti od sastava i uslova sinteze, omogućavajući usmeravanje dizajna nosača za specifične primene (Peter i sar. 1998). Dalje, mnogi materijali se mogu modifikovati određenim peptidnim sekvencama, što omogućava degradaciju proteaznim enzimima (Shin i sar. 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). Timer i saradnici (Timmer i sar. 2003b) pokazali su da ove pojedinačne degradacione komponente izazivaju *in vitro* citotoksičnost samo pri većim koncentracijama. Zbog toga, očekivano sporo oslobađanje ovih produkata iz sporo degradirajućeg polimera ne bi trebalo da značajno utiče na biokompatibilnost.

Mehanička svojstva

Interakcija čvrstih HA kristala i elastičnih kolagenih vlakana u nanostrukтури kosti daju joj jedinstvena mehanička svojstva, zbog čega je kost teško zameniti sintetičkim materijalima (Taton 2001). Metali, kao što su titanijum i nerđajući čelik, često se koriste u ortopediji zbog veće čvrstine u poređenju sa kosti. Ipak, kostno tkivo se oslanja na mehaničku stimulaciju pri regeneraciji i remodelovanju. Trajni metalni implantni apsorbuju veći deo ovih stimulišućih sila. Ova pojava je poznata kao zakasneli stresni efekat (eng. stress shielding) i rezultira u resorpciji kosti oko implanta (Bobyn i sar. 1992). U idealnom slučaju, nosač tkivnog inženjeringa 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 (Shi i sar. 2006).

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 i sar. 2006). Vinter (Winter 1969) je opisao ektopičnu osteoin-

dukciju sunderom 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) su otkrili da porozni CaP, takođe, može podstaknuti obrazovanje kosti kad se ugradi ekstraskeljno. Kasnije je pokazano da koštana indukcija biomaterijalima zahteva specifičnu 3D poroznu strukturu ugrađenog biomaterijala, ali i *in vivo* remineralizaciju porozne strukture (Habibovic i sar. 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.

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 opisao Fridenštajn (Friedenstein 1962) i intenzivno proučavao Urist (Urist 1965), koji je otkrio prisustvo BMP-a unutar ekstracelularnog kostnog matriksa. Tačna priroda ovih BMP-a ostala je enigma do pred kraj XX veka, 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 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).

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 (Vehof i sar. 2002; Borden i sar. 2004; Ruhé i sar. 2004; Jansen i sar. 2005). Koncentracija je ključni faktor i ona je *species* specifična. Na primer, kod ljudi, na žalost, potrebne su mnogo veće količine nego kod zečeva i pasa (Boden i sar. 1999). Ćelije koje su verovatno najosetljivije na indukciju su bliske osteogenoj liniji, kao što su mezenhimske progenitorske ćelije, iako je ustanovljena i osteoindukcija limfocita (Friedenstein i sar. 1970). Materijal nosača je krucijalan za optimalni profil otpuštanja, ali su važne i površinske karakteristike. Na primer, titanijumski nosači optoćeni CaP-om su pokazali bolje rezultate sa BMP od sličnih golih nosača (Vehof i sar. 2002).

Prečišćavanje i opisivanje BMP-a je urađeno kasnih osamdesetih godina XX veka, kada je ustanovljena njegova amino kiselinska sekvenca i DNK klonovi (Wozney 1992). Trenutno je identifikovano mnogo različitih tipova BMP-a, koji se razlikuju u funkcijama (Rengachary 2002). Iako je količina svežeg BMP-a koja se dobija iz kosti izuzetno mala (10 kg samlevene goveđe kosti daje oko 10 μ g 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.

Osteostimulirajući 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 inženjeru. Za razliku od BMP-a, koji mogu indukovati osteogenezu, oni nisu osteoinduktivni (Borden i sar. 2004). Ipak, TGF- β 1 je često proučavan i pokazano je da on stimuliše obrazovanje kosti na titanijumskim i razgradivim poliestarskim ortopedskim nosačima (Jansen i sar. 2005). FGF postoji u obliku kisele (FGF-1) i bazne (FGF-2) izoforme. Obe stimulišu deobu endotelnih ćelija, fibroblasta, hondroblasta i osteoblasta, prisutne su u kosti i deluju na nju. *In vivo* studije na životinjama su pokazale snažniji efekat FGF-2 (Chiou i sar. 2006) u poređenju sa FGF-1 (Nakajima i sar. 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 mezenhimskih ćelija (Nash i sar. 1994). IGF-1 pospešuje proliferaciju i diferencijaciju osteoprogenitornih ćelija (Thaller i sar. 1993), ali još uvek nema ubedljivog efekta u studijama zarastanja velikih kosti.

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.

Osteogene ćelije

Tkivni inženjering 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, koja samo tako može da obavlja funkciju hematopoeze. Ruski naučnik Fridenštajn je otkrio koje su ćelije odgovorne za ovaj fenomen. Ove ćelije su se vezivale za plastiku na kulturi i bile prisutne u maloj razmeri na ukupan broj jedarnih ćelija kostne srži. Pošto su formirale posebne kolonije koje su nalikovale fibroblastima, u početku su nazvane *colony-forming unit* fibroblasta (CFU-Fs) (Friedenstein i sar. 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 homogena ćelijska linija. Ovo se odražava razlikama u sposobnosti rasta (veličina kolonije), kao i u spontanom putovima diferencijacije unutar i između kolonija (Bianco i sar. 2001). Još jedno odstupanje od definicije mezenhimskih stem ćelija je i to što se od CFU-Fs ćelija ne mogu formirati svi tipovi mezenhimskih tkiva. Zbog toga, bolje je ove ćelije posmatrati kao stromalne ćelije preklom iz kostne srži (BMSC), što one u osnovi i jesu.

Izvori osteogenih ćelija

Sofisticiranim eksperimentima, sa subletalnim zračenjem, dokazano je da BMSC ćelije predstavljaju zasebnu mezenhimsku liniju unutar kostne srži koja je pretežno hematopoetska. 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 grade endotel vaskularne mreže, tzv. periciti (Bianco i sar. 2001). U tom kontekstu na njih se gleda kao na stromalne fibroblaste ili retikularne ćelije (Westen-Bainton (WB) ćelije) (Westen i Bainton 1979). WB ćelije aktivno proizvode veliki broj pre-osteogenih ćelija, što ih čini važnim u razvoju kosti. U kasnijem razvoju, WB ćelije održavaju hematopoetsku mikrosredinu. Kada se kostna srž povredi, ove ćelije se lako otpuštaju u krvotok. Drugi izvori progenitorskih ćelija se mogu naći u periosteumu, koji pokriva kost. Ćelijske 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 (Takushima i sar. 1998). Neke studije su pokazale i potencijal progenitorskih ćelija poreklom iz mišića (Sun i sar. 2005) ili adipoznog tkiva (Ogawa i sar. 2004). Očigledno, pluripotentne mezenhimske ćelije su prisutne u nekoliko tkiva čoveka koja poseduju regenerativni kapacitet.

Uzimanje i transfer kostne srži

Danas se primenjuju dva različita pristupa za uzimanje kostne srži: *in vivo* uzimanje kostne srži (obično iz ilijačnog grebena) i uzimanje kostne srži iz šupljine femura i tibije kadavera, što se često primenjuje za istraživanje kod modela na singenim miševima i pacovima.

Što se tiče uzimanja kostne srži iz šupljine femura i tibije sa kadavera, vadi se kompletna stroma 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 (Westen i 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, 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 i sar. 1992).

Selekcija BMSC

Već u ranim radovima Fridenštajna sa kulturama BMSC ćelija, primećeno je da je glavni kriterijum za dobijanje mezenhimijskih 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 tipa) se mogu lako ukloniti ispiranjem (Friedenstein i sar. 1987). Ovo, ipak, rezultuje relativno heterogenim BMSC kulturama. Sa razvojem novih ćelijski 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, jeste monoklonalno antitelo poznato kao STRO-1 (Stewart i sar. 1999). Drugi markeri osteogenosti se mogu naći među nekolagenim proteinima kostnog 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 migraciju ćelija. Osteopontin, protein kostnog matriksa sa integrinskom (ćelijsko-vezujućom) aktivnošću, povezan je sa regulacijom mineralne proliferacije. Takođe, kod osteopontin deficijentnim modelima na miševima dokazana je njegova važna uloga u angiogenezi, obrazovanju kalusa i remodelovanju kosti (Duvall i sar. 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 i sar. 2001). Kod pozitivne selekcije BMSC ćelije se izdvajaju nakon obeležavanja antitelima usmerenim protiv membranskih molekula specifičnih za primordijalne mezenhimske ćelije, kao što je STRO-1 (Simmons i 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 i sar. 1994). Zbog toga, potrebno je dalje definisanje podgrupa ćelijskih markera specifičnih za primordijalne stromalne ćelije iz kostne srži.

Upotreba fluorescentno-aktivirajućeg sortiranja ćelija (FACS) čini se 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 vezivanje malih magnetnih zrna na antitela, što omogućava sortiranje ćelija magnetnim privlačenjem (Oyajobi i sar. 1999).

Metode kultivisanja ćelija

U poslednjih 20 godina, razvijene su opšte prihvaćene metode za selekciju i pravljenje kultura, pre svega humanih BMSC ćelija (Colter i sar. 2001). Često se cela kostna srž razdvaja u gradijentu gustine, kako bi se centrifugiranjem izdvojile mononuklearne ćelije. Ove ćelije se potom gaje u kulturi sa medijumom, koji sadrži fetalni teleći serum (FCS), L-glutamin i antibiotike. Ćelije se obično gaje u plastičnim posudama (često obloženim fibronektinom zbog optimalnog vezivanja ćelija) sa različitim površinama.

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

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 i Gheron Robey 1996). Ovo može biti posledica nedovoljnog broja ili potentnosti ćelija osteogene loze. Metod kojim se ovaj problem može prebroditi je stimulisanje ćelija deksametazonom (Walsh i sar. 2001) ili nekim efektivnijim faktorima, kao što je BMP. Još radikalnija mera je genetsko modifikovanje ćelija unošenjem gena za faktor rasta (Bianco i sar. 2001). Ovaj metod predstavlja napredak u ćelijski baziranom tkivnom inženjeru, ali i unapređenje tkivnog inženjeringa baziranog na faktorima rasta, u tom smislu, da je konačno pronađeno rešenje za regulisani transport faktora u mezenhimske ćelije.

Koraci u istraživanjima – od ideje do pacijenta

Tkivni inženjering kosti je obećavajuća tehnologija koja može smanjiti potrebu za autologim kostnim kalemovima u budućnosti. Na svetskom nivou naučnici istražuju mnoge njegove aspekte, od kojih su najpoznatiji inženjering 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 i sar. 2006). 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 i sar. 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.

Pretklinička 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 u modelima na malim životinjama, što je praćeno studijama izvodljivosti za klinički adekvatne situacije. Konačno, mogu biti potrebne i studije efikasnosti, koje imitiraju kliničke situacije, što su 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). U budućnosti treba razraditi različite modele studija, koje je potrebno sprovesti kako bi se tkivni inženjering kosti doveo do pacijenta.

Ograničenja u kliničkoj primenljivosti

Ćelijski baziran inženjering kostnog tkiva, iako uspešan, očigledno zahteva dalja ispitivanja, pre nego što se počne široko primenjivati u kliničkoj praksi. Tokom poslednje deкаде, mnogi aspekti ove tehnike su unapređeni kada se govori o razvoju nosača i tehnika ćelijskih kultura. Dosta se istražuju mogućnosti, kao što je potencijal za korišćenje alogenih ćelija i ćelija koje su poreklom od drugih tkiva, kao što je masno tkivo (Liu i sar. 2007) ili čak periferna krv (Wan i sar. 2006). Ipak, neki aspekti ostaju težak izazov, koji se mora rešavati u budućnosti.

Prvo, problem svih tkiva ćelijski baziranog inženjeringa, uključujući i kost, predstavlja snabdevanje ćelija kiseonikom i nutrijentima, pošto se ugrade implantirani kliničkih dimenzija. Istraživanje prirode i mehanizama delovanja faktora rasta koji podstiču angiogenezu je jedan vid tretiranja ovog problema. Druga strategija je prevaskularizacija konstrukta dodavanjem endotelnih ćelija.

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 kostni kalem, oni moraju imati ulogu privremenog okvira za ćelije dok se ne obrazuje nova kost. Biokeramike građene od 100% HA poseduju veliku otpornost na mehanička opterećenja, ali se ne mogu resorbovati. Nasuprot tome, nosači napravljeni od prirodnog koralala ili trikalcijum fosfata se resorbuju, ali se resorpcija dešava previše brzo, tako da su oni suviše krhki da izdrže mehaničko opterećenje.

Uspešno 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 (Mastrogiacomo i sar. 2007).

Buduće smernice u istraživanjima

Kao što se očekuje, tkivni inženjering kosti je obećavajući, ali je potrebno prevazići mnoge prepreke, kako bi se mogao smatrati pravom alternativom za autologe kostne kalemove. Sa ćelijskog aspekta, da bi se postigla ubrzana vaskularizacija u cilju pospešivanja 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

poboljšanja perfuzionih osobina nosača i njegovog povezivanja sa vaskularnom mrežom domaćina.

Rešenje problema može biti dodavanje faktora rasta koji stimulišu rast krvnih sudova. Drugi pristup za zaobilazanje problema ćelijskog prehranjivanja i toksičnosti kalijuma, indukovane hematomima, može biti prethodno ugrađivanje nosača, koje je praćeno ubrizgavanjem BMSC ćelija u drugoj proceduri. U tom trenutku, u hematoma 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.

Svakako, 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 (Vacanti i sar. 2001). U ovom slučaju, očigledno, nedostaju dokazi preživljavanja transplantiranih ćelija. Nivo prisustva kosti u konstrukt bi mogao jednostavno da ukazuje na uspešnu osteokondukciju sa susedne kosti domaćina na implant. Ovaj koncept je prikazan i u sličnoj studiji (Meijer i sar. 2007), koja je rađena na ektopičnom modelu miša. Mejer je pokazao osteogeni potencijal ćelija, ali i naglasio ograničenja biopsija uzetih sa sklopova tkivnog inženjeringa, kod kojih se ne može utvrditi poreklo ćelija. Ove studije ukazuju da je ćelijski baziran tkivni inženjering još uvek daleko od odobrenja za kliničku primenu. 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.

Zaključak

Bitan izazov sa kojim se suočava inženjering kostnog 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, fokusiraju se na razumevanje bioloških procesa i osobina materijala na *nano* nivou. Detaljno proučavanje interakcije između biomolekula (faktora rasta ugrađenih u strukturu nosača) i ćelija, kao i novih metoda sinteze nosača, može u budućnosti dovesti do boljih i efikasnijih biomaterijala.

Literatura

- Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P. G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001; 19: 180–192.
- Bobyn J. D., Mortimer E. S., Glassman A. H., Engh C. A., Miller J. E., Brooks C. E. Producing and avoiding stress shielding. Laboratory and clinical observations of noncemented total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*. 1992; 274: 79–96.
- Boden S. D., Martin G. J., Morone M. A., Ugbo J. L., Moskovitz P. A. Posterolateral lumbar intertransverse process spine arthrodesis with recombinant human bone morphogenetic protein 2/hydroxyapatite–tricalcium phosphate after laminectomy in the nonhuman primate. *Spine*. 1999; 24: 1179–1185.
- Borden M., Attawia M., Khan Y., El-Amin S. F., Laurencin C. T. Tissue-engineered bone formation *in vivo* using a novel sintered polymeric microsphere matrix. *J Bone Joint Surg Br*. 2004; 86: 1200–1208.
- Chiou M., Xu Y., Longaker M. T. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 343: 562–644.

- Colter D. C., Sekiya I., Prockop D. J. 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*. 2001; 98: 7841–7845.
- De Bruyn P. H. Bone formation by fresh and frozen autogenous and homogenous transplants of bone, bone marrow and periosteum. *Am J Anat*. 1955; 96: 375–417.
- Duvall C. L., Taylor W. R., Weiss D., Wojtowicz A. M., Guldborg R. E. Impaired angiogenesis, early callus formation, and late stage remodeling in fracture healing of osteopontin deficient mice. *J Bone Miner Res*. 2006; 22: 286–297.
- Friedenstein A. J. Humoral nature of osteogenic activity of transitional epithelium. *Nature*. 1962; 194: 698–699.
- Friedenstein A. J., Chailakhjan R. K., Lalykina K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970; 3: 393–403.
- Friedenstein A. J., Chailakhyan R. K., Gerasimov U. V. Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*. 1987; 20: 263–272.
- Friedenstein A. J., Ivanov-Smolenski A. A., Chajlakjan R. K., Gorskaya U. F., Kuralesova A. I., Latzinik N. W., Gerasimov U. W. Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants. *Exp Hematol*. 1978; 6: 440–444.
- Friedenstein A. J., Latzinik N. V., Gorskaya Y. U. F., Luria E. A., Moskvina I. L. Bone marrow stromal colony formation requires stimulation by haemopoietic cells. *Bone Miner*. 1992; 18: 199–213.
- Gronthos S., Graves S. E., Ohta S., Simmons P. J. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*. 1994; 84: 4164–4173.
- Habibovic P., Yuan H., Van Den Doel M., Sees T. M., Van Blitterswijk C. A., De Groot K. Relevance of osteoinductive biomaterials in critical-sized orthotopic defect. *J Orthop Res*. 2006; 24: 867–876.
- Habibovic P., Yuan H., Van Der Valk C M , Meijer G., Van Blitterswijk C A , De Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*. 2005; 26: 3565–3575.
- Hacker M., Tessmar J., Neubauer M., Blaimer A., Blunk T., Göpferich A., Schulz M. B. Towards biomimetic scaffolds: anhydrous scaffold fabrication from biodegradable amine-reactive diblock copolymers. *Biomaterials*. 2003; 24: 4459–4473.
- Hartgerink J. D., Beniash E., Stupp S. I. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Science*. 2001; 294: 1684–1688.
- Hedberg E. L., Kroese-Deutman H. C., Shih C. K., Crowther R. S., Carney D. H., Mikos A. G., Jansen J. A. 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*. 2005a; 72: 343–353.
- Hedberg E. L., Kroese-Deutman H. C., Shih C. K., Crowther R. S., Carney D. H., Mikos A. G., Jansen J. A. *In vivo* degradation of porous poly(propylene fumarate)/poly(DL-lactic-co-glycolic acid) composite scaffolds. *Biomaterials*. 2005b; 26: 3215–3225.
- Jansen J. A., Vehof J. W., Ruhé P. Q., Kroeze-Deutman H., Kuboki Y., Takita H., Hedberg E. L., Mikos A. G. Growth factor loaded scaffolds for bone engineering. *J Control Release*. 2005; 101(1–3): 127–136.
- Janssen F. W., Oostra J., Oorschot A., Van Blitterswijk C. A. A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: *in vivo* bone formation showing proof of concept. *Biomaterials*. 2006 ;27: 315–323.
- 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. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418(6893): 41–49.
- Kuznetsov S. and Gheron Robey P. Species differences in growth requirements for bone marrow stromal fibroblast colony formation *in vitro*. *Calcif Tissue Int*. 1996; 59: 265–270.
- Lin C. Y., Kikuchi N., Hollister S. J. A novel method for biomaterial scaffold internal architecture design to match bone elastic properties with desired porosity. *J Biomech*. 2004; 37: 623–636.

- Liu T. M., Martina M., Hutmacher D. W., Hui J. H., Lee E. H., Lim B. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow and adipose tissues derived human mesenchymal stem cells (MSCs) into three mesenchymal lineages. *Stem Cells*. 2007; 25: 750–760.
- Mastrogiacomo M., Papadimitropoulos A., Cedola A., Peyrin F., Giannoni P., Pearce S. G., Alini M., Giannini C., Guagliardi A., Cancedda R.. 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*. 2007; 28: 1376–1384.
- Meijer G. J., De Bruijn J. D., Koole R., Van Blitterswijk C. A. Cell-based bone tissue engineering. *PLoS Med*. 2007; 4: e9.
- Mistry AS. and Mikos AG. Tissue engineering strategies for bone regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2005; 94: 1–22.
- Nakajima F., Ogasawara A., Goto K., Moriya H., Ninomiya Y., Einhorn T. A., Yamazaki M. Spatial and temporal gene expression in chondrogenesis during fracture healing and the effects of basic fibroblast growth factor. *J Orthop Res*. 2001; 19: 935–944.
- Nash T. J., Howlett C. R., Martin C., Steele J., Johnson K. A., Hicklin D. J. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone*. 1994; 15: 203–208.
- Osborn J. F. *Dynamic Aspects of the Implant–Bone Interface*. Munchen: Carl Hansen Verlach. 1980.
- Oyajobi B. O., Lomri A., Hott M., Marie P. J. Isolation and characterization of human clonogenic osteoblast progenitors immunoselected from fetal bone marrow stroma using STRO-1 monoclonal antibody. *J Bone Miner Res*. 1999; 14: 351–361.
- Peter S. J., Miller S. T., Zhu G., Yasko A. W., Mikos A. G. *In vivo* degradation of a poly(propylene fumarate)/beta-tricalcium phosphate injectable composite scaffold. *J Biomed Mater Res*. 1998; 41: 1–7.
- Rengachary S. S. Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurg Focus*. 2002; 13: e2.
- Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie C. M. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 2001; 98: 2615–2625.
- Ripamonti U. Bone induction in nonhuman primates. An experimental study on the baboon. *Clin Orthop Relat Res*. 1991; 269: 284–294.
- Ruhé P. Q., Kroese-Deutman H. C., Wolke J. G., Spauwen P. H., Jansen J. A. Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in cranial defects in rabbits. *Biomaterials*. 2004; 25: 2123–2132.
- Ruhé P. Q., Wolke J. G. *Calcium Phosphate Ceramics for Bone Tissue Engineering*. Boca Raton, FL: CRC Press. 2006.
- Shi X., Hudson J. L., Spicer P. P., Tour J. M., Krishnamoorti R., Mikos A. G. Injectable nanocomposites of single-walled carbon nanotubes and biodegradable polymers for bone tissue engineering. *Biomacromolecules*. 2006; 7: 2237–2242.
- Shin H., Jo S., Mikos A. G. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*. 2003; 24: 4353–4364.
- Simmons P. J. and Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*, 1991; 78: 55–62.
- Stewart K., Walsh S., Screen J., Jefferiss C. M., Chainey J., Jordan G. R., Beresford J. N. Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*. 1999; 14: 1345–1356.
- Taton T. A. Nanotechnology. Boning up on biology. *Nature*. 2001; 412: 491–492.
- Temenoff J. S., Lu L. *Bone-Tissue Engineering Using Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds*. Toronto: EM Squared. 2000.
- Thaller S. R., Dart A., Tesluk H. The effects of insulinlike growth factor-1 on critical-size calvarial defects in Sprague-Dawley rats. *Ann Plast Surg*. 1993; 31: 429–433.
- Timmer M. D., Ambrose C. G., Mikos A. G. *In vitro* degradation of polymeric networks of poly(propylene fumarate) and the crosslinking macromer poly(propylene fumarate)-diacrylate. *Biomaterials*. 2003a; 24: 571–577.
- Timmer M. D., Shin H., Horch R. A., Ambrose C. G., Mikos A. G. *In vitro* cytotoxicity of injectable and biodegradable poly(propylene fumarate)-based networks: unreacted macromers, cross-linked networks, and degradation products. *Biomacromolecules*. 2003b; 4: 1026–1033.

- Urist M. R. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965;150: 893–899.
- Vacanti C. A., Bonassar L. J., Vacanti M. P., Shufflebarger J. Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone. *N Engl J Med*. 2001; 344: 1511–1514.
- Vasiljević P. *Karakterizacija ćelija kostne srži regrutovanih za reparaciju kostnog tkiva potpomognutog tkivnim matricama*. Doktorska disertacija. PMF, Niš. 2010.
- Vehof J. W., Takita H., Kuboki Y., Spauwen P. H., Jansen J. A. Histological characterization of the early stages of bone morphogenetic protein-induced osteogenesis. *J Biomed Mater Res*. 2002; 61: 440–449.
- Walsh S., Jordan G. R., Jefferiss C., Stewart K., Beresford J. N. 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*. 2001; 40: 74–83.
- Wan C., He Q., Li G. Allogenic peripheral blood derived mesenchymal stem cells (MSCs) enhance bone regeneration in rabbit ulna critical-sized bone defect model. *J Orthop Res*. 2006; 24: 610–618.
- Warnke P. H., Wiltfang J., Springer I., Acil Y., Bolte H., Kosmahl M., Russo P. A., Sherry E., Lützen U., Wolfart S., Terheyden H. Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissueengineered mandible. *Biomaterials*. 2006; 27: 3163–3167.
- Westen H. and Bainton D. F. Association of alkalinephosphatase-positive reticulum cells in bone marrow with granulocytic precursors. *J Exp Med*. 1979; 150: 919–937.
- Wilson C. E., Kruyt M. C., De Bruijn J. D., Van Blitterswijk C. A., Oner F. C., Verbout A. J., Dhert W. J. A new *in vivo* screening model for posterior spinal bone formation: comparison of ten calcium phosphate ceramic material treatments. *Biomaterials*. 2006; 27: 302–314.
- Winter G. D. and Simpson B. J. Heterotopic bone formed in a synthetic sponge in the skin of young pigs. *Nature*. 1969; 223(201): 88–90.
- Wozney J. M. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev*. 1992; 32: 160–167.
- Yuan J., Cui L., Zhang W. J., Liu W., Cao Y. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials*. 2007; 28: 1005–1013.

CONCEPT AND STRATEGIES OF BONE TISSUE ENGINEERING

Ljubiša B. Đorđević, Perica J. Vasiljević, Stevo J. Najman

Summary. In contemporary clinical practice bone substitutes such as implants are used in reconstructive orthopedics and maxillofacial surgery. Judging from physical and chemical properties each implant has some advantages and disadvantages. The idea of bone tissue engineering is to simulate the formation of bone to implants as carriers in combination with osteogenic cells and osteo-stimulative factors (osteinduction). The design of the implant itself in terms of the chosen carrier with its own characteristics, the type of cells that have been implanted, the type and combination of stimulative factors play an important role in the behavior of the implanted material within a body. Tissue engineering looks promising, however a lot of obstacles have to be surmounted in order to consider it a proper alternative.

Key words: bone tissue, osteoblasts, osteinduction, osteoconduction, growth factors.