Regeneracija koštanoga tkiva uporabom bioaktivnih molekula i biomaterijala

Bukvić, Nikša

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:051400

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

NIKŠA BUKVIĆ

REGENERACIJA KOŠTANOGA TKIVA UPORABOM BIOAKTIVNIH MOLEKULA I BIOMATERIJALA

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2016.

Ovaj diplomski rad je izrađen na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom Doc. dr. sc. Ozren Smolec, dr. med. vet.

Predstojnik: Prof. dr. sc. Boris Pirkić

Mentor: Doc. dr. sc. Ozren Smolec, dr. med. vet.

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Josip Kos

2. Prof. dr. sc. Petar Dzaja

3. Doc. dr. sc. Ozren Smolec, dr.med.vet.

4. Prof. dr. sc. Damir Stanin (zamjena)

Zahvala

Veliku zahvalnost, prije svega, dugujem svojim roditeljma, koji su mi bili najveća podrška tijekom studiranja. Želim se zahvaliti na ogromnom strpljenju i vjeri u mene, i u najtežim trenutcima, bez njih ovo sve ne bi bilo moguće.

Također, želim se zahvaliti i svim ostalim članovima svoje obitelji koji su vjerovali u mene i bili mi podrška.

Zahvaljujem se svom mentoru, doc.dr.sc. Ozrenu Smolecu, na pomoći pri izradi ovog diplomskog rada, a i tijekom cijelog studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD....1

1. a) DOSADAŠNJE SPOZNAJE....2

2. CIJELJENJE KOŠTANOG TKIVA....2

2.1. PRIMARNO (ANGIOGENO) KOŠTANO CIJELJENJE....2

2.2. SEKUNDARNO KOŠTANO CIJELJENJE....3

2.3. STADIJ CIJELJENJA KOSTI....3

3. AKTIVNE BIOMOLEKULE....5

3.1. LOKALNI ČIMBENICI RASTA....5

3.1.1. FIBROBLASTIČNI ČIMBENIK RASTA....5

3.1.2. VASKULARNI ENDOTELIJALNI ČIMBENIK RASTA....5

3.1.3. PLAZMA BOGATA TROMBOCITIMA....6

3.1.4. ČIMBENIK RASTA SLIČAN INZULINU....6

3.1.5. TROMBOCITNI ČIMBENIK RASTA....6

3.1.6. KOŠTANI MORFOGENETSKI PROTEIN....7

3.1.7. INTERLEUKIN-1....7

3.1.8. INTERLEUKIN-6....8

3.2. SUSTAVNI ČIMBENICI....8

3.2.1. HORMON RASTA....8

3.2.2. INZULIN....8

3.2.3. KALCITONIN....8

3.2.4. HORMON ŠTITNJAČE....9

3.2.5. PARATIROIDNI HORMON....9

3.2.6. VITAMIN D....9

3.2.7. SPOLNI HORMONI....10

4. KOŠTANI GRAFTOVI 11
4.1. AUTOLOGNI KOŠTANI GRAFT 11
4.2. KOŠTANA SRŽ 12
4.3. ALOGRAFTOVI 12
4.3.1. DEMINERALIZIRANI KOŠTANI MATRIKS 12
4.3.2. KORTIKOSPONGIOZNI I KORTIKALNI GRAFT 13
4.4. SINTETSKI GRAFT 13
4.4.1. UMJETNA KOST 13
4.4.2. HIDROGELOVI 14
4.4.3. BIOAKTIVNA STAKLA 14
5. OMENTUM 15
6. MATIČNE STANICE 16
6.1. ADULTNE MATIČNE STANICE 16
6.2. EMBRIONALNE MATIČNE STANICE 17
6.3. EMBRIONALNE CIRKULIRAJUĆE MEZENHIMALNE STANICE 17
6.4. TKIVNO-SPECIFIČNE MATIČNE STANICE 17
7. RASPRAVA 18
8. ZAKLJUČCI 21
9. LITERATURA 22
10. SAŽETAK 27
11. SUMMARY 28
12. ŽIVOTOPIS 29

1. UVOD

Osnovni koncept regenerativne ortopedije temelji se na razumijevanju i preciznom usklađivanju međuodnosa tri osnovne sastavnice: stanica, okoline i nosača. Stanice su temeljne biološke jedinice koje upravljaju svim procesima regeneracije tkiva, okolina sadržava različite bioaktivne signale (faktore rasta, transkripcijske faktore, male molekule, mehaničku silu) koji moduliraju stanični odgovor, a trodimenzionalni nosači služe kao privremena skela koja sadržava i orijentira stanice na samom mijestu oštećenja. Radi se o iterdisciplinarnom području u kojem se koriste najsuvremenija dostignuća iz područja molekularne biologije, kemije, inženjeringa i znanosti o materijalima s ciljem uspostavljanja i kontroliranja prirodnih procesa cijeljenja koji u konačnici rezultiraju regeneracijom oštećenih tkiva i organa. Napredak u primjeni regenerativnih principa dramatično je utjecao na različita područja poput kardiologije i dijabetologije, no ortopedija se javlja kao jedna od najatraktivnijih grana za primjenu regenerativne medicine i tkivnog inženjeringa. Trauma bolesti i malformacije mišićno-koštanog sustava često dovode do strukturalnih oštećenja hrskavice, kostiju i mišića uzrokujući bol i nemogućnost kretanja ljudi i životinja. Kod složenih prijeloma vrlo često dolazi do znatnijeg gubitka koštane mase i slabije opskrbe krvlju te zbog toga dolazi do nekrobiotskih promjena u koštanom tkivu i priležećim strukturama. U sklopu tih procesa propada i dio osteogenih stanica potrebnih za reparatorne procese. Postoje brojne metode kojima se takva stanja nastoje poboljšati počevši od autolognog koštanog transplatata, vaskulariziranog koštanog implatata pa sve do korištenja koštanih morfogenetskih proteina te drugih čimbenika rasta. Za liječenje takvih prijeloma potrebno je pronaći metodu kojom bi se poboljšala krvna opskrba koštanog tkiva i povećala količina osteogenih stanica u zoni prijeloma. Poznato je da su izvori osteogenih stanica determinirane koštane stanice, preteče periosta, endoosta i koštane srži koje stvaraju koštano tkivo bez dodatnog stimulansa. Najveći dio induktibilnih koštanih stanica čine nediferencirane mezenhimalne stanice okolnih mišića i mišićnih ovojnica koje pod utjecajem lokalnih čimbenika rasta metaplaziraju u osteogene stanice, koje potom sudjeluju u izgradnji koštanog tkiva. U svom radu odlučio sam razmotriti najčešće biomaterijale i biomolekule koje se koriste u bioregenerativnoj medicini koštanog tkiva.

1a) DOSADAŠNJE SPOZNAJE

2. CIJELJENJE KOŠTANOG TKIVA

Koštano cijeljenje složeni je fiziološki proces koji podrazumijeva koordinirano djelovanje većeg broja stanica i njihovih prekursora kao odgovor na ozljedu, a rezultira potpunom obnovom jednakovrijednog koštanog tkiva te preuzimanjem fiziološke funkcije istog.U tijeku cijeljenja dolazi do reakcije četiri različita čimbenika: periosta, kosti, koštane srži i okolnog mekog tkiva.

2.1 PRIMARNO (ANGIOGENO) KOŠTANO CIJELJENJE

Primarno koštano cijeljenje je moguće samo u uvjetima gotovo potpunog mirovanja ulomaka, što podrazumijeva odgovarajuću operacijsku tehniku i metodu koja će ostvariti anatomsku repoziciju i stabilnu osteosintezu s infragmentarnom kompresijom. Obzirom na razmaknutost lomne pukotine primarno koštano cijeljenje podijelili smo na kontaktno i pukotinasto cijeljenje. Pri kontaktnom cijeljenju mezenhimalni elementi ne urastaju niti od strane periosta, niti od strane endosta. Opisani proces nazivamo Haversovom pregradnjom, a ona podrazumijeva istodobno spajanje i rekonstrukciju kosti. Ukoliko na mjestu direktnog kontakta zaostaju pukotine govorimo o pukotinskom cijeljenju gdje osteoblasti deponiraju osteoid unutar pukotine tijekom prvih osam dana. U istom razdoblju u pukotinu urastaju krvne žile a lamelarna kost se stvara okomito na uzdužnu osovinu kosti. Zatim se poprečno postavljene lamele pregrađuju aksijalno usmjerenim osteonima po načelu Haversove pregradnje istim procesom kao i prilikom kontaktnog primarnog cijeljenja što objašnjava znatno duže vremensko trajanje pukotinastog cijeljenja. Značajka pukotinastog i kontaktnog primarnog koštanog cijeljenja je odsutnost stvaranja kalusa i primarna osifikacija bez stvaranja hrskavice i veziva, a brzina koštanog cijeljenja u ovom slučaju ovisit će o odnosu površine kontakta i širine pukotine između ulomaka (ŠIŠLJAGIĆ, 2000).

2.2 SEKUNDARNO KOŠTANO CIJELJENJE

Sekundarno koštano cijeljenje zasniva se na reakciji kosti, okolnog mekog tkiva te periosta kao vjerojato najvažnijeg čimbenika tog procesa (ONI 1997.). Međudjelovanje navedenih struktura predstavlja podlogu za urastanje kapilara i fibroblasta iz periosta, koštane srži i okolnog mekog tkiva, što nazivamo fibroblastična reparacija. U nastavku dolazi do migracije hondroblasta i osteoblasta iz periosta i endosta, ali i fibroblasta koji se pod utjecajem raznih čimbenika rasta mogu diferencirati u hondroblaste i osteoblaste. Krajem prvog tjedna novoumnožene stanice stvaraju privremenu koštanu vezu između ulomaka koju nazivamo hrskavični kalus, ili prokalus (ŠIŠLJAGIĆ, 2000). Taj mekani kalus nastao je enhondralnom osifikacijom i nalazimo ga unutar prijelomne pukotine za razliku od tvrdog kalusa koji je nastao intramembranoznom osifikacijom i nalazi se u perifernom dijelu prijeloma. Sekundarno koštano cijeljenje traje vremenski znatno duže od primarnoga. Stvaranje kalusa kod konzervativnog liječenja poželjna je pojava djelujući s jedne strane kao biološka udlaga, a sa druge strane predstavlja biološki potencijal za regeneraciju koštanog tkiva (ŠIŠLJAGIĆ, 2000).

2.3 STADIJI CIJELJENJA KOSTI

Neposredno poslije prijeloma dolazi do krvarenja iz prekinutih krvnih žila unutar kosti, oštećenog periosta i okolnog mekanog tkiva, a krvni ugrušak okružuje frakturirano koštano tkivo i okolne dijelove mekanog tkiva (ŠIŠLJAGIĆ, 2000). Novostvoreni fibrinski ugrušak predstavlja izvor molekula koje dovode do kaskade staničnih promjena važnih u cijeljenju koštanih prijeloma.Glavnu ulogu u početnoj fazi cijeljenja imaju citokini (IL-1, IL-6), trombociti, koštani morfogenetski proteini i mezenhimalne zametne stanice. Nakon toga, trombociti aktivirani trombinom i subendotelijalnim kolagenom secerniraju signalne molekule PDGF i TGF-β, koje su važne u regulaciji stanične proliferacije i diferencijacije te potiču procese kemotaksije i angiogeneze putem kojih se stvaraju nove krvne žile i uspostavlja cirkulacija kao osnovni preduvjet koštanog cijeljenja (ALINI 1996.). Proces stvaranja kalusa karakteriziran je daljnjom diferencijacijom i proliferacijom osteogenih i hrskavičnih stanica koje sintetiziraju ekstracelularni organski matriks koštanog i hrskavičnog tkiva. U koštanom cijeljenju važnu ulogu imaju kolageni. Tijekom početnih faza cijeljenja tip I kolagena zastupljen je u malim količinama no već četrnaestog dana od prijeloma postaje dominantni tip kolagena. Koloagen tipa II značajno je zastupljen u mekom kalusu i periostu do devetog dana

nakon prijeloma.Tip III kolagena nalazimo na periostu, s služi kao sredstvo za migraciju osteoprogenitorskih stanica i uspostavljanje kapilarne krvožilne opskrbe (KNIGHT, 2000). Uočeno je da kolageni tipa V i IX reguliraju rast i orijentaciju tipa I i II kolagenih vlakana u hrskavičnim i nehrskavičnim tkivima. Kolagen tip X izlučuju hipertrofirani hondrociti prije početka kalcifikacije te on ne spada u skupinu vlaknatih kolagena. Važnu ulogu u mineralizaciji kalusa imaju i nekolageni proteini ekstracelularnog matriksa: osteokalcin, osteopontin, osteonektin i fibronektin. Opisanim međudjelovanjm između staničnih i elemenata ekstracelularnog matriksa konačno dolazi do kalcifikacije hrskavice. Kalcifikaciji hrskavice prethodi programirana stanična smrt (apoptoza) hondroblasta. U takvo tkivo urastaju nove krvne žile koje se sobom donose osteoprogenitorske stanice. U sljedećem stadiju dolazi do resorpije kalcificirane hrskavice uz pomoć hondroklasta i osteoklasta te se ona zamijeni kosti koja je gotovo identična sekundarnoj spongiozi u zoni rasta. Sada je došlo do zacijeljenja rijeloma te slijedi proces remodeliranja. Remodeliranje ili pregradnja odnosi se na promjene unutarnje strukture kosti bez promjene vanjskog oblika. Formiranje i razgradnja kosti ne odvijaju se proizvoljno nego se izgradnja kosti odvija samo na mjestu gdje je prethodno nastupila razgradnja kosti.Pregradnja kosti uključije brojne stanične funkcije u smislu razgradnje i stvaranja nove kosti. Razgradnju kosti vrše osteoklasti a, osteoblasti kasnije dolaze na njihovo mjesto i izlučuju osteiod koji mineralizira u završnom dijelu procesa pregradnje. U fiziološkim uvjetima osteoklasti odumiru zbog apoptoze , te toliko traje i pregradnja kosti (RUSSELL, 2001). Ukoliko je aktivnost osteoblasta i osteoklasta usklađena govorimo o fiziološkom procesu pregradnje kosti. Fiziološko remodeliranje kosti služi zamjeni koštanog matriksa kod normalnih svakodnevnih oštećenja, te se na taj način spriječava prijelome zamora i održava homeostazu kalcija i fosfora u tijelu.

3. AKTIVNE BIOMOLEKULE

3.1 LOKALNI ČIMBENICI RASTA

Lokalni čimbenici rasta ili citokini predstavljaju veliki broj proteinskih molekula koji djeluju kao medijatori i regulatori staničnih komunikacija, kako u fiziološkim tako i u patološkim uvjetima. Odgovor stanice na čimbenike rasta odvija se u kaskadama, a svaka od njih ima precizno određenu ulogu. Put prenošenja signala potaknut čimbenicima rasta uključuje receptor, substrat, enzim, proteine staničnog skeleta, čimbenike transkripcije, proteina koji vežu DNA i konačno enzime koji usmjeravaju preteče deoksi- i ribonukleotida prema replikaciji DNA. Čimbenik rasta veže se na specifični receptor, koji se alosterički mijenja i preraspodjeljuje unutar membrane ili pak združuje s ostalim membranskim proteinima.

3.1.1 Fibroblastični čimbenik rasta (FGF)

Porodicu fibroblastičnih čimbenika rasta sačinjava devet strukturno sličnih polipeptida. U literaturi su opisivani pod različitim nazivima: astroglijalni čimbenik rasta, heparin vezajući čimbenik rasta, tumorski factor angiogeneze, hrskavični čimbenik rasta-1, endotelijalni čimbenik rasta, makrofagni čimbenik rasta (GOSPODAROWICZ, 1990). Potiču angiogenezu, diferencijaciju, kemotaksiju te djeluju mitogeno na brojne stanice. Stimulacija stvaranja koštanog tkiva in vivo posljedica je vjerojatne stimulacije uraštavanja kapilara i proliferacije nediferenciranih mezenhimalnih stanica ili utjecaja na još ranije procese u mehanizmu stvaranja kosti. (ASPENBERG, 1989).

3.1.2 Vaskularni endotelijalni čimbenik rasta Vascular endotelial growth factor-VEGF

VEGF je visoko specifičnan mitogen za endotelne stanice krvnih žila. Postoji 5 izoformi ovog čimbenika koje se međusobno razlikuju u molekularnoj masi i sposobnosti vezanja za proteoglikane stanične membrane.VEGF inducira proliferaciju endotelnih stanica, potiče staničnu migraciju i spriječava apoptozu stanica. Različite izoforme VEGF vezuju se na dva tipa tirozin-kinaza receptora VEGFR-1 i VEGFR-2 koje se gotovo isključivo nalaze ne endotelnim stanicama. VEGF pospješuje stvaranje novoga koštanog tkiva, potiče osifikaciju

kalusa fracture femura miša. Nadalje, pozitivno djeluje na premoštenje segmentalnog pukotinastog defekta radiusa kunića te pojačava osteoblastičnu i osteoklastičnu aktivnost (STREET, 2002).

3.1.3 Plazma bogata trombocitima (platlet rich plasma)

Prve upotrebe PRP u skeletnim rekonstruktivnim terapijama bilie su u maksilofacijalnoj kirurgiji za tretman mandibularnih i parodontnih defekata (ALSOUSOU i sur. 2009). Od tad se koristi u ortopediji kako bi se poboljšalo cijeljenje prijeloma (KITOH i sur. 2007b,) i spinalna fuzija (HARTMANN, 2010, INTTINI, 2009). Učinci cijeljenja koristeći PRP posredovani su aktivacijom kaskade koagulacije, što oslobađa čimbenike rasta iz alfa-granula trombocita (CENNI et al. 2010). Ti faktori rasta uključuju VEGF, TGF-b, IGF, PDGF i epidermalni čimbenik rasta (EGF).

3.1.4 Čimbenik rasta sličan inzulinu (Insulin- like growth factor- IGF)

IGF su o hormonu rasta ovisni polipeptidi molekularne težine 7.600 (CANALIS 1988.). Sintetiziraju ih brojna tkivau ključujući kosti i hrskavicu. IGF-1 i IGF-2 pojačavaju stvaranje koštanog kolagena i smanjuju razgradnju kolagena in vitro u kalvariji štakora te djeluju na umnažanje osteoblasta u kulturi ljudskih koštanih stanica. Nadalje, IGF-1 ubrzava cijeljenje umjetno izazvanih defekata mandibule, zigomatičnog luka, dijafize dugih kostiju te prijevremeno zatvaranje čeonih sutura u štakora (THALLER 1993.).

3.1.5 Trombocitni čimbenik rasta (Platelet- derived growth factor -PDGF)

PDGF je polipeptid molekularne težine 28 000- 35 000 a sintetiziraju ga trombociti, makrofagi, endotelne stanice kao i većina stanica mezodermalnog porijekla (CANALIS, 1992). Stimulira migraciju i proliferaciju mezenhimalnih stanica te sintezu DNK i bjelančevina u koštanim i hrskavičnim stanicama.

3.1.6 Koštani morfogenetski protein (Bone morphogenetic protein- BMP)

BMP jedini je poznat čimbenik koji inducira stvaranje heterotopne koštane tvari inducirajući diferencijaciju nediferenciranih mezenhimalnih stanica u osteoblaste.Izoliran je prvi puta 1965. godine iz demineraliziranog koštanog matriksa, a danas se može proizvesti i genetskim putem (URIST, 1965). Koštani morfogenetski proteini su multifunkcionalne molekule čije se djelovanje 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 ukjučeni su i u određene patološke procese jer mutacija njihovih gena može prouzročiti razvojne anomalije. Klinički učinci BMP-ova vidljivi su u mnogim biološkim procesima u stanicama kao što su kemotaksija i mitogeneza , stanična diferencijacija , regulacija staničnog 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 djelovanje u promociji koštanog cijeljenja u koštanim defektima ovce, kunićai pasa, te u modelima spinalne fuzije majmuna i pasa (COOK, 1998.).

3.1.7 Interleukin-1

Interleukin-1, je monokin sa različitim funkcijama u organizmu. Sudjeluje u pojačavanju imunosnog odgovora, aktivaciji B-limfocita, stimulaciji produkcije prostaglandina u stanicama vezivnog tkiva, uzrokuje vrućicu i neutrofiliju. Iz prije navedenoga razvidno je da ima IL-1 ima značajnu ulogu u metabolizmu mnogih tkiva uključujući i koštano tkivo. Mnoge in vivo i in vitro studije pokazale su da je IL-1 značajan čimbenik koštane resorpcije. Nadalje, IL-1 može spriječiti stvaranje koštanog tkiva, ali i potaknuti stvaranje istog pod određenim uvjetima. Osteoblastične stanice posjeduju receptore za IL-1. Djelovanje IL-1 na osteoblastične stanice očituje se sintezom prostaglandina i aktivacijm gena za sintezu enzima, matriksnih proteina i drugih citokina. Osteoblastične stanice i same izlučuju IL-1 što upućuje na autokrinu/parakrinu funkciju IL-1 u koštanom tkivu. Osim toga, složenim međudjelovanjima sa drugim lokalnim i sustavnim osteogenim čimbenicima utječe na fiziološke funkcije koštanog tkiva , ali sudjeluje i u patogenezi koštanih bolesti (TATAKIS, 1993).

3.1.8 Interleukin-6

Interleukin-6 je glikoprotein molekularne mase 26000 koji oslobađaju B i T limfociti, makrofagi, epitelne i endotelne stanice te fibroblasti (RUEF, 1990). Interleukin-6 stvara se i u stanicama koštanog tkiva, prvenstveno stanicama strome koštane srži te u osteoblastima , kao odgovor na samo na IL-1 I TNFα.

3.2 SUSTAVNI ČIMBENICI

3.2.1 Hormon rasta (somatotropin)

Hormon rasta je hipofizni polipeptid sa molekulskom težinom 21000. Stimulira diferencijaciju mezenhimalnih stanica u hodroblaste i osteoblaste stanica na epifiznoj hrskavičnoj liniji potičući tako uzdužni rast kosti. Osim toga posredno utječe na cijeljenje kosti jer stimulira proizvodnju IGF-1 (CANALIS, 1980).

3.2.2 Inzulin

Inzulin je polipeptid molekularne mase 6000 koji proizvode β-stanice u gušterači. Sudjeluje u regulaciji razgradnje kosti, ali stimulira i stvaranje izvanstaničnog matriksa hrskavice i kosti. Ima direktan stimulativni učinak na koštano tkivo, ali u fiziološkim koncentracujama ne djeluje na umnožavanje koštanih stanica (CANALIS,1980). In vitro, u kulturi fetalne štakorske kosti insulin pojačava ugradnju aminokiselina te sintezu kolagena (KREAM, 1985).

3.2.3 Kalcitonin

Kalcitonin je polipeptid sastavljen od 32 aminokiseline molekularne težine 3000. Djeluje inhibirajuće na umnožavanje i diferencijaciju prekursora osteoklasta te je snažan inhibitor osteoklastične funkcije. Spriječava razgranju kosti ali ne pokazuje ni osteogena svojstva (WENER, 1972).

3.2.4 Hormoni štitnjače

Zajedno sa IGF-1 uzrokuju stvaranje hrsavice te tako potiču normalan rast i razvoj. Hormoni štitnjače ne stimuliraju niti proizvodnju kolagena niti umnožavanje koštanih stanica, ali ipak stimuliraju razgradnju kosti što ih čini odgovornim za pojavu hiperkalcemije kod hipertireoidizma (MUNDY,1976).

3.2.5 Paratiroidni hormon (PTH)

Paratiroidni hormon je polipeptid molekularne težine 9500. Pojačava tubularnu resorpciju kalcija u bubregu , stimulira sintezu aktivnog metabolite vitamina D i pojačava resorpciju košanog tkiva te na taj način povećava koncentracij kalcija u krvi. In vitro inhibira osteoblastičnu sintezu kolagena dok in vivo stimulira stvaranje kosti.Smatra se da je mitogeni učinak PTH-a pojačan djelovanjem lokalnih čimbenika jer pojačava vezanje TGF-β na receptore osteoblasta i sintezu IGF-a. PTH stimulira spajanje osteoklasta u zrele multinuklearne stanice i aktivira osteoklaste da razgrađuju kost. Osteoklasti nemaju receptore za PTH pa je za process razgradnje kosti neophodno prisustvo osteoblasta no mehanizam toga međudjelovanja je još uvijek nepoznat (CANALIS, 1988.).

3.2.6 Vitamin D

Vitamin D je skupni naziv za nekoliko steroidnih spojeva od kojih je najznačajniji njegov aktivni oblik 1,25 dihidroksikolekalciferol ili vitamin D3. Primarno se proizvodi u bubrezima ii ma sličnu funkciju kao PTH. Stimulira razgradnju kosti i inhibira proizvodnju kolagena. Pojačava sintezu osteokalcina te tako ispoljva izravno stimulatorno djelovanje na osteoblaste (LIAN, 1985). U kulturi osteoblasta , ovisno o koncentraciji hormona i stupnju zrelosti stanica povisuje ili smanjuje aktivnost alkalne fosfataze.

3.2.7 Spolni hormoni

Adrogeni i estrogeni su važni u sazrijevanju kostiju kod jedinki koje još rastu i razvijaju se, ali i u sprečavanju gubitka koštane mase povezanog sa starenjem. Estrogeni imaju važnu ulogu u procesima usklađivanja resorpcije i stvaranja nove kosti tijekom normalne koštane pregradnje. Tijekom cijeljenja prijeloma kod kunića, najveća koncentracija estrogenih receptora nađena je treći i šesnaesti dan poslije prijeloma iz čega je zaključeno da estrogeni utječu na diferencijaciju stanica u početnoj fazi, a u kasnijoj stimuliraju proces mineralizacije (MONAGHAN, 1992).

4. KOŠTANI GRAFTOVI

Pod koštanim graftom podrazumijeva se svaki implantirani material koji sam ili u u kombinaciji sa drugim materijalom pospješuje cijeljenje kosti te djeluje osteogeno, osteokonduktivno i osteoinduktivno na mjestu njegove aplikacije (MUSCHLER, 1992). Koštani graft sa osteogenim svojstvima sadržava osteoblastične stanice na različitom stupnju diferencijacije koje su sposobne stvoriti novu kost putem enhondralne osifikacije. Osteoindukivni koštani graftovi sadrže citokine koji su sposobni transformirati lokalne stanice u osteoblastične stanice. Osteokonduktivni materijali služe kao izvor biokompatibilne strukturalne osnove koja pospješuje stvaranje nove kosti (BERVEN, 2001). U širem smislu materijale koje koristimo za koštane graftove podijelili smo na: autograftove, alograftove, ksenograftove, sintetske materijale a, moguće su i kombinacije prije navedenih materijala. Autograft (autogeni graft) označava dio tkiva koji je uzet sa nekog dijela tijela jedinke te kasnije aplicran istoj jedinki. Alograft označava dio tkiva koje je presađeno sa jedne jedinke na drugu jedinku iste vrste. Ksenograft označava dio tkiva presađen sa jedinke jedne vrste na jedinku druge vrste pri čemu najčešće dolazi do jake imunološke reakcije na tkivo donora.

4.1. AUTOLOGNI KOŠTANI GRAFTOVI

Autologni koštani graftovi posjeduju značajan osteogeni, osteoinduktivni i osteokonduktivni potencijal. U njih svrstavamo spongiozni graft, vaskularizirani kortikalni i nevaskularizirani kortikalni graft te koštanu srž (AXHAUSEN, 1956). Autologni spongiozni graft pokazuje snažnu osteogenu aktivnost, brzo se revaskularizira i integrira na mjestu ugradnje. Spongiozni graft dobro ispunjava nastali koštani defekt ali, ne pridonosi mehaničkoj stabilnosti na mjestu ozljede. Zbog poroznosti spongioznog grafta krvne žile ,osteoblasti i preosteoblastične stanice počinju urastati u graft sa periferije prema centru grafta već drugog dana poslije operacije (RAY, 1972). Kako process napreduje rubni osteoblasti počinju odlagati osteoid koji sada okružuje nekrotičnu kost te dolazi do preoblikovanja grafta. Taj proces započinje resorpcijom nekrotične kosti od strane osteoklasta te posljedičnom zamjenom iste sa novom kosti koju stvaraju osteoblasti.U završnoj fazi dolazi do potpune integracije grafta u organiziranu koštanu strukturu (STEVENSON, 1998).

Kortikalni autograftovi mogu biti vaskularizirani i nevaskularizirani. Najznačajniji izvori kortikalnih graftova su fibula, crijevna kost i rebra. Vaskularizirani autograft ima prednost pred nevaskulariziranim jer održava vitalnost koštanih stanica. Osim toga u vaskularizirani autograft je uključeno nešto okolnog tkiva uključujući periost (SHAFFER, 1985). Nevaskularizirani kortikalni autograft pokazuje umjerenu osteogenu aktivnost, doprinosi mehaničkoj čvrstoći kosti te se sporo revaskularizira (STEVENSON, 1998). Za kompletnu revaskularizaciju kortikalnog grafta treba jedan do dva mjeseca dok u prvih šest dana uopće nema znakova revaskularizacije. Revaskularizacija sopngioznog grafta počinje nekoliko sati poslije operacije,a u potpunosti završi za dva tjedna (DELEN, 1965).

4.2 KOŠTANA SRŽ

Koštana srž koristi se za pomoć pri stimulaciji stvaranja nove kosti na mjestu koštanih lomova i kod pseudoartroza (SEITZ, 1992). 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 cijevne kosti. Uspješnost ove tehnike ovisi o broju i aktivnosti koštanih zametnih stanica u aspiratu koštane srži .Koštana srž je izvor osteogenih stanica koje mogu bez dodatnog stimulansa izravno stvarati novu kost (HAYENSWORTH, 1992). Kombinacijom koštane srži i demineraliziranog koštanog matriksa postižu se bolji rezultati pri cijeljenju pseudoartroza a, povećano je i stvaranje koštanog tkiva u odnosu prema samoj koštanoj srži (TIEDEMAN, 1991).

4.3 ALOGRAFTOVI

4.3.1 Demineralizirani koštani matriks

Demineralizirani koštani matriks pokazuje umjerena osteoinduktivna svojsva, brzo se revaskularizira ali ne pridonosi mehaničkoj stabilnosti na mjestu loma kosti. Na mjestu ugradnje demineraliziranog koštanog matriksa dolazi do upalne reakcije koja rezultira migracijom polimorfonuklarnih leukocita u transplantat. Kasnije, dolazi do proliferacije mezenhimalnih stanica i njihove interakcije sa matriksom. Ta reakcija dovodi do diferenciranja mezenhimalnih stanica u hondrocite koji luče hrskavični matriks. Biološka aktivnost demineraliziranog koštanog matriksa nedvojbeno ovisi prisutnosti proteina i raznih

čimbenika rasta prisutnih u vanstaničnom matriksu. Osteoinduktivni kapacitet demineraliziranog koštanog matriksa može se oslabiti u postupcima skladištenja, pripreme i sterilizacije. (MUNTING, 1988).

4.3.2 Kortikospongiozni i kortikalni alograftovi

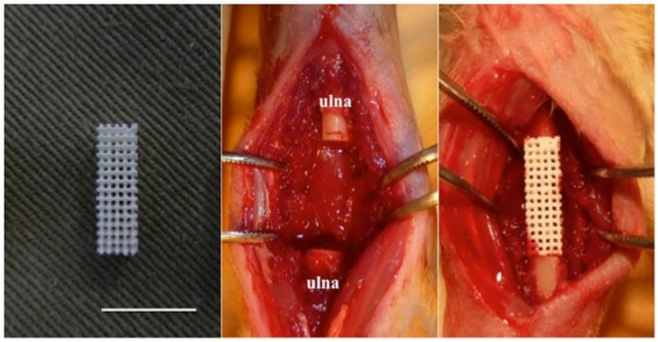
Ovi koštani graftovi pridonose mehaničkoj stabilnosti na mjestu loma kosti a, osteoinduktivni kapcitet im je ograničen. Najčešći izvori ovih graftova su crijevna kost, distalna bedrena i proksimalna goljenična kost (PELKER, 1983). Zbog razlika u glavnom sustavu tkivne podudarnosti dolazi do senzibilizacije primaoca grafta te posljedične imunološke reakcije. Svježi alograft izaziva humoralnu i staničnu imunološku reakciju u domaćina, a intenzitet imunološke reakcije proporcionalan je koncentraciji antigena. Klinička istraživanja na životinjama potvrdila su utjecaj specifične imunološke reakcije na smanjenu vaskularizaciju i remodeliranje kortikalnog grafta. Stoga kortikalni alograftovi pokazuju znatno slabija svojstva od kortikalnih autograftova u istom vremenskom periodu nakon transplantacije (BURCHARDT, 1978).

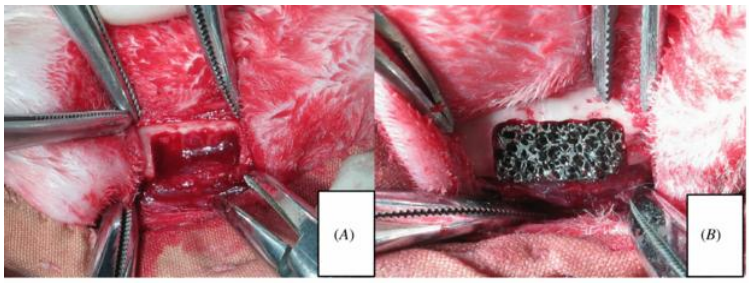
4.4 SINTETSKI NOSAČI

4.4.1 Umjetna kost (porous ceramics)

Sintetska, porozna kost najčešće se sastoji od hidroksiapatita ili od mješavine hidroksiapatita i trikalciumfosfata. Ima slabu osteokonduktivnu sposobnost. Nije toksična i ne uzrokuje imunolšku reakciju. Sintetska kost osigurava površinu koja stimulira urastanje mezenhimalnog tkiva, služi kao izvor minerala ili služi kao matriks koji pomaže orijentaciju stanica u prostoru. U kombinaciji sa koštanom srži ubrzava cijeljenje koštanog defeka u eksperimentalnih životinja. Također, u kombinaciji sa alogenim demineraliziranim koštanim matriksom ubrzava sraštavanje kralježaka (ŠEBEČIĆ, 1995).

Slika 1. i 2. Nosači (scaffold)





4.4.2. Hidrogelovi

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

4.4.3 Bioaktivna stakla

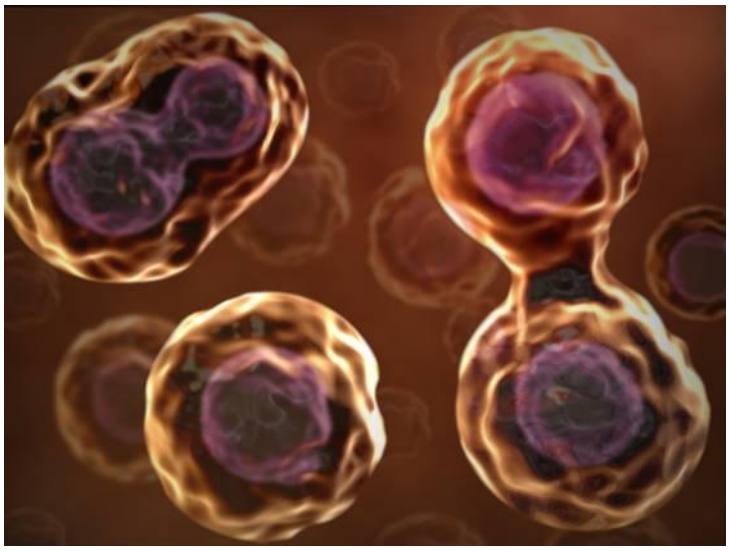
Komercijalna bioaktivna stakla (e.g. Bioglass®), koja se sastoje od silikata i fosfata, u kliničkoj upotrebi su preko 20 godina (YANG, 2006.). Ova stakla ragiraju sa fizioloskim tekućinama i formiraju snažne veze sa tkivima kroz staničnu aktivnost te se sigurno razgrađuju u fizioloskoj okolini. Kako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

5. OMENTUM

Omentum predstavlja specifičnu anatomsku strukturu koja se sastoji od dvije mezotelijalne ovojnice između kojih su smještene masne stanice, limfne kapilare, vezivno tkivo te nakupine mononuklearnih stanica. Omentum je bogat krvnim žilama i brojnim karakterističnim kapilarnim pletežima koji se nazivaju omentalni glomeruli. U osnovi, omentum je dobro prokrvljen organ bogat čimbenicima rasta krvnih žila te kao takav uzrokuje stvaranje novih krvnih žila u tkivima u koje je inkorporiran. Razgranati limfni sustav omentuma može absorbirati velike količine edemske tekućine, otpadnih metabolita i toksičnih tvari te korpuskularnih elemenata. Novija istraživanja pokazala su da omentum može poslužiti kao izvor različitih čimbenika rasta, neurotransmitera ,upalnih medijatora te multipotentnih zametnih stanica koje se mogu diferencirati u različite tipove tkivnih stanica (ALAGUMUTHU i sur, 2006). Uzimajući u obzir prije navedene činjenice, omentum postaje tkivo izbora kod složenijih kirurških zahvata gdje su moguće komplikacije u cijeljenju i povećena mogućnost od infekcije.Slobodni presadak omentuma utječe na brže zaraštavanje koštanog defekta u kunića (KOS i sur 2006), te kao pomoć pri liječenju osteoradionekroze mandibule u čovjeka gdje potiče stvaranje novih krvnih žila i služi kao izvor stanica za regeneraciju oštećenog tkiva (KOBAYASHI i sur, 2000). Iz svega prije navedenog proizlazi da omentum ima značajnu ulogu u području plastične i rekonstruktivne kirurgije a sve njegove kliničke potencijale i moguće aplikacije valja istraživati i u budućim vremenima.

6. MATIČNE STANICE

Matičnu stanicu definiraju tri osnovna kriterija: samoobnavljanje, sposobnost diferencijacije u višetruke stanične tipove, te sposobnost *in vivo* rekonstitucije tkiva. Matične stanice su općenito definirane kao nediferencirane stanice koje su sposobne za samoobnavljanje kroz replikaciju te diferencijaciju u specifične stanične linije. Totipotentne matične stanice sposobne su kreirati cjelokupan organizam, što je svojstveno za rani stadij zigote, odnosno osmog stadija razvoja morule (WOBUS, 2005.). Pluripotentne stanice sposobne su kreirati tkiva iz svih slojeva germinativnih listića (endoderm, mezoderm, ektoderm), dok multipotentne stanice mogu dati nešto manji broj staničnih linija. Matične stanice možemo podijeliti na embrionalne ili adultne, ovisno o razvojnom stadiju od kojega potječu. Adultne stanice potječu od bilo kojeg odraslog organizma, te ih razlikujemo od onih embrionalnog podrijetla. Za matične stanice odraslih životinja smatra se da su važne za održavanje mnoštva tkiva i organa. (BLAU, 2001.).



Slika 3. Matične stanice

6.1 ADULTNE MATIČNE STANICE

Mnoštvo je izvora matičnih stanica koje se potencijalno mogu koristiti u reparaciji i regeneraciji tkiva. Jedan od izvora matičnih stanica je u našem tijelu. Takozvane „adultne“ matične stanice su stanice koje se nalaze u specifičnim odjeljcima tkiva i važne su u održavanju integriteta tkiva poput kože, kosti i krvi. (WATT, 2000.). Od svih, najbolje su opisane matične stanice iz koštane srži. Koštana srž sadrži 2 tipa matičnih stanica; hematopoetske matične stanice koje su preteče cijele linije krvnih stanica, i mezenhimalne matične stanice srži koje su preteče vezivnih tkiva kao što je to kost i masno tkivo (BIANCHO, 2000.)

6.2 EMBRIONALNE MATIČNE STANICE

Embrionalne matične stanice izolirane su iz nakupine stanica blastociste koja se nije još implantirala i potječu od miša, ne-humanih primata i ljudi. To su pluripotentne stanice koje su zadržale sposobnost da generiraju sve fetalne i adultne tipove stanice *in vivo* i *in vitro* (MARTIN, 1981., THOMPSON, 1998.). Mišje embrionalne matične stanice korištene su za stvaranje niza različitih fenotipova uključujući hematopoetske prekursore, neuralne stanice, adipocite, mišićne stanice, miocite, hondrocite, otočiće gušterače i osteoblaste (LUMELSKY, 2001., BUTTERLY, 2001.).

6.3 EMBRIONALNE CIRKULIRAJUĆE MEZENHIMALNE STANICE

Cirkulirajuće fetalne stanice prekursori mezenhima sposobne su stvarati osteogene, hondrogene i adipogene linije stanica. Potencijal diferencijacije, kao i morfologija i imunofenotip bili su slični njihovim zrelim inačicama. Protočnom citometrijom i imunocitokemijom in situ utvrđen je imunofenotip tih stanica, CD45-, CD34-, CD14-; SH2+, SH3+, SH4+, i CD44+. Poput adultnih stanica prekursora mezenhima, fetalne MSC bile su sposobne za dugoročnu hematopoezu *in vitro*. (DIGIROLAMO i sur., 2001.).

6.4 TKIVNO-SPECIFIČNE MATIČNE STANICE

Nedavna istraživanja pridonijela su novim spoznajama u populaciju matičnih stanica, mobilizaciju i različitost adultnih matičnih stanica. Uz koštanu srž, izvori matičnih stanica mezenhimalnog potencijala nalaze se u periostu, (FUKUMOTO i sur., 2003.) trabekularnoj kosti (NOTH i sur., 2002.), masnom tkivu (De UGARTE i sur., 2003.) U svim slučajevima stanice su pokazale mogućnost diferencijacije u različitim smjerovima. Dokazano je da su mezenhimalne matične stanice izolirane iz sinovije sposobne diferencirati u hondrocite, osteocite i adipocite. Dokazano je da su te iste stanice sposobne doprinijeti regeneraciji mišičnih stanica u miša. Za matične stanice iz masnog tkiva dokazano je da posjeduju slični diferencijacijski potencijal.

7. RASPRAVA

Kosti pružaju oblik, fizičku potporu i zaštitu mekim tkivima i ubrzavaju kretanje, a isto tako sudjeluju u održavanju homeostaze kalcija i fosfora. Tijekom 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 novostvorenu kost. Cijeljenje loma kompleksan je proces koji uključuje različite duljine i vremenske skale, stanične i biofizičke fenomene i mehaničke zahtjeve (DOBLARE i sur., 2004.). Visokosložen proces cijeljenja prijeloma još uvijek nije proniknut u potpunosti, međutim istraživanja su posljednjih godina utvrdila povezanost između različitih faktora (GIANNOUDIS i sur., 2007.) kao što su stanična aktivnost, angiogeneza, proliferacija i diferencijacija tijekom cijeljenja loma. Sveobuhvatni proces razumijevanja koštanoga tkiva mora biti usmjeren prema detaljnom definiranju događanja na molekularnoj i staničnoj razini. Razvijen je cijeli niz terapijskih postupaka i bioaktivnih molekula kako bi se poboljšao odgovor organizma i ubrzalo cijeljenje kosti. Neki od primjera su različiti tipovi glukozaminoglikana, faktori rasta, matične stanice, prirodni presadci (auto-, alo- ili ksenograftovi) te nosači (eng. scaffold) s biološkom i sintetskom bazom nastale na temelju tkivnog inženjerstva. Ovi biomaterijali i bioaktivne molekule imaju neka značajna ograničenja, i još uvijek ne postoje općeprihvaćene terapijske metode koje bi zadovoljile sve očekivane zahtjeve u smislu poboljšanja cijeljenja koštanog tkiva. Inženjering koštanog tkiva, kao skup novih terapijskih metoda, mogla bi prevladati mnoga ograničenja uporabe koštanih presadaka. Dobro poznata ograničenja vezana uz kliničku uporabu autograftova i alograftova i dalje su razlog nastojanja da se razviju nadomjesci koštanih presadaka temeljenih na biomaterijalima i tkivnom inženjerstvu (HEALY i sur., 2007.). Takvi materijali trebali bi imati osteoinduktivna i osteokonduktivna svojstva te biti biološki i imunološki inertni. Idealan koštani presadak ne postoji i ovisno o kliničkom problemu potrebne su različite kombinacije biomaterijala i bioaktivnih molekula. Kombiniranje matičnih stanica s nedavno razvijenim biomaterijalima omogućuje bolje izvođenje različitih tipova osteoregenerativne terapije. Nosači (eng.scaffold) predstavljaju trodimenzionalne biokompatibilne strukture čija je osnovna funkcija omogućiti prijanjanje stanica koje sintetiziraju ekstracelularni matriks. Idealan nosač mora biti porozan kako bi se stanice mogle rasporediti unutar samoga nosača te kako bi se nesmetano mogla odvijati difuzija hranjivih tvari. Osnovna podjela nosača u ortopediji je na: prirodne, sintetske i mješovite. U prirodne

materijale za izradu nosača spadaju kolagen, hijaluronska kiselina, fibrin, kitosan. Odlikuje ih odlična biokompatibilnost te slabije biomehaničke osobine. Sintetski materijali poput polilaktičke kiseline ili hidroksiapatita imaju jako dobre biomehaničke osobine no nešto slabiju biokompatibilnost. Stoga je dizajn nosača potrebno prilagoditi biološkim i strukturalnim osobinama tkiva koje regeneriramo. Umjetni materijali nemogu upotpunosti obnoviti biološku funkciju niti mogu stvoriti prirodno biološko okružje oštećenog tkiva. Vodeći se načelima prirodne regenerativne medicine, danas je uporaba prirodnih materijala mnogo češća nego sintetskih. U usporedbi s prirodnim materijalima, sintetski materijali mogu se prilagoditi na različite kemijske i fizikalne stimulanse. Te značajke pridonose boljoj kontroli mehaničkih svojstava potke, uključujući vlačnu čvrstoću, otpornost i brzinu razgradnje te 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 zahtijeva dodatnu modifikaciju prije upotrebe. Prirodni materijali primijenjeni za inženjering koštanog tkiva uključuju biološke polimere (poput kolagena i hijaluronske kiseline) te anorganske materijale (poput hidroksiapatita i trikalcij fosfata). Preferiraju se materijali koji se prirodno nalaze u nativnoj kosti, poput kolagena, budući da posjeduju urođene biološke signale koji pospješuju migraciju stanica i promiču kemotaksijski odgovor kad se implantiraju in vivo (STEVENS, 2008.). Glavni minerali u koštanom matriksu, hidroksiapatit i trikalcij fosfat daljnji su kandidati za koštane nosače. Njihova mehanička svojstva imaju sposobnost pružiti mehanički potporanj na području defekta nakon transplantacije. Međutim, ovi su minerali krhki i mogu se pokazati slabima na mehaničke podražaje. Obično kombiniraju s polimernim materijalima koji su otporniji na lom kako bi se postigle optimalne performanse u primjeni na inženjering koštanog tkiva (RAMAY i sur., 2004.). U usporedbi s prirodnim materijalima, sintetski materijali mogu se prilagoditi za različite kemijske i fizikalne stimulanse. Te značajke pridonose boljoj kontroli mehaničkih svojstava nosača, uključujući vlačnu čvrstoću, otpornost i brzinu razgradnje te 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 zahtijeva dodatnu modifikaciju prije upotrebe. Terapija matičnim stanicama mjestu loma u kombinaciji sa čimbenicima rasta i nosačima omogućuje revaskularizaciju i diferenciranje osteogenih stanica.

U regenerativnoj ortopediji koristimo dvije osnovne vrste stanica: diferencirane i matične stanice. Matične su nespecijalizirane stanice koje imaju sposobnost samoobnavljanja te koje se pod određenim uvjetima mogu diferencirati u terminalne stanice specifične za određeni organ ili tkivo. Zbog tih svojstava matične stanice predstavljaju idealnu platformu za razvoj i primjenu metoda regenerativne medicine i tkivnog inženjeringa. Tkivni inženjering za cilj ima kombiniranje progenitornih ili zrelih matičnih stanica s biokompatibilnim materijalima ili nosačima, sa ili bez odgovarajućih činbenika rasta kako bi se potaknula reparacija i regeneracija (ROSE i sur., 2002.). Budući da je razumijevanje molekularnih i staničnih događanja tijekom cjelidbene kaskade postupno povećava, istražuju se nove strategije za poboljšavanje procesa cijeljenja (DIMITRIOU i sur., 2005.). Bioaktivni signali moduliraju stanični odgovor i na taj način kontroliraju regenerativne procese. Najčešće korišteni bioaktivni signali spadaju u grupu čimbenika rasta pa tako za stimulaciju koštane regeneracije koristimo koštane morfogenetske proteine (BMP), dočim se za regeneraciju hrskavice često koriste TGF-beta ili IGF-1. Od ostalih važnih bioaktivnih signala valja izdvojiti djelovanje mehaničke sile te primjenu malih molekula (steroida). Budući da je većina ovih materijala pojedinačno pokazala neki nedostatak, znanstvenici uglavnom dizajniraju i konstruiraju kompozitne materijale koji kombiniraju polimere i anorganske materijale,a koji omogućuju da se različita svojstva materijala međusobno dopunjuju i postignu optimalnu brzinu razgradnje i mehanička svojstva, koje je moguće kontrolirati. Zasada je ostvaren veliki napredak u poznavanju biologije kosti, međutim treba poduzeti daljnje korake kako bi se bolje razumjelo što je potrebno da se razvije komercijalna kost koja je proizvod tkivnog inženjerstva (SALGADO i sur., 2007). Za regeneraciju koštanog tkiva za upotrebu u kliničkoj praksi odobrene su dvije biomolekule (BMP-2 i BMP-7). Ohrabrujući rezultati postignuti su prilikom kliničkih studija kojima je testirana primjena hidroksiapatitnog nosača u kombinaciji s mezenhimalnim matičnim stanicama za cijeljenje oštećenja dugih cijevastih kostiju. Veliki napredak temeljnih znanosti u području regenerativne medicine i tkivnog inženjeringa otvara velike mogućnosti za adekvatno riješavanje čitavog niza izazova iz kliničke prakse.

8. ZAKLJUČCI

Tkivni inžinjering u humanoj i veterinarskoj ortopediji zauzima značajno mjesto u liječenju bolesti koštanog i hrskavičnog tkiva. Biomaterijali i bioaktivne molekule imaju neka značajna ograničenja, i još uvijek ne postoje općeprihvaćene terapijske metode koje bi zadovoljile sve očekivane zahtjeve u smislu poboljšanja cijeljenja koštanog tkiva. Za regeneraciju koštanog tkiva za upotrebu u kliničkoj praksi odobrene su dvije biomolekule (BMP-2 i BMP-7). Ohrabrujući rezultati postignuti su prilikom kliničkih studija kojima je testirana primjena hidroksiapatitnog nosača u kombinaciji s mezenhimalnim matičnim stanicama za cijeljenje oštećenja dugih cijevastih kostiju. Na kraju treba istaknuti kako regenerativna medicina i tkivni inženjering postaju sastavni dio moderne veterinarske ortopedije.

9. LITERATURA

1. ALAGUMUTHU, M., B. DAS BHUPATI, P. PATTANAYAK SIBA, R. MANGUAL (2006): The omentum: A unique organ of exceptional versatility. Indian J. Surg. 68, 136-141.

2. ALINI, M., A. MARRIOTT, T. CHEN (1996): A novel angiogenic molecule produced at the time of chondrocyte hypertrophy during endochondral bone formation. Dev. Biol. 176, 124-132.

3. 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

4. ASPENBERG P., L.S. LOHMANDER(1989): Fibroblast growth factor stimulates bone formation. Acta Orthop Scand 60, 473.

5. AXHAUSEN, W.(1956): The osteogenic phases of regeneration of bone. A historical and experimental study. J. Bone Joint Surg. Am. 38, 593-600.

6. BERVEN, S., K.B. TAY, F.S. KLEINSTUECK, D.S. BRADFORD (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.

7. BIANCHO, P., P. GEHRON ROBEY (2000): Marrow stromal stem cells. J. Clin. Invest. 105, 1663–1668.

8. BLAU, H.M., T.R. BRAZELTON, J.M. WEIMANN (2001): The evolving concept of a stem cell: entity or function? Cell, 105, 829–841.

9. BURCHARDT, H., H. JONES, F. GLOWCZEWSKIE i sur. (1978): Freeze-dried allogenic segmental cortical-bone grafts in dogs. J. Bone Joint Surg. 60A, 1082-1090.

10. BUTTERY, L..D., S. BOURNE, J.D. XYNOS et al. (2001): Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. Tissue Eng. 7, 89–99.

11. CANALIS E (1980): Effect of insuline growth factor 1 on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. J. Clin Invest 66, 709-719.

12. CANALIS E (1993): Insulin like growth factor and the local regulation of bone formation. Bone 14, 273 COOK, D.S., S.L. SALKELD, M.R. BRINKER, M.W. WOLFE, D.C.

RUGGER (1998): Use of osteoinduktive biomaterial (RhOP-1) in healing large segmental bone defects. J. Orthop Trauma. 12, 407-412.

13. 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 NS, Simone AF, Schultheis LW (2005) From the FDA: what's in a label? A guide for the anesthesia practitioner. Anesthesiology 103:179-185.

14. DE UGARTE, D. A., K. MORIZONO, A. ELBARBARY, Z. ALFONSO, P.A. ZUK, M. ZHU, J.L. DRAGOO, P. ASHJIAN, B. THOMAS, P. BENHAIM, I. CHEN, J. FRASER, M.H. HENDRICK (2003): Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. Cells Tissues Organs, 174, 101–109.

15. DIGIROLAMO, C. M., D. STOKES, D. COLTER, D.G. PHINNEY, R. CLASS, D.J. PROCKOP (1999): Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: A simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. British Journal of Haematology, 107(2), 275–281.

16. DOBLARE, M., GOMEZ, M.J., (2004): Modelling bone tissue fracture and healing: a review. Engineering Fracture Mechanics, 71, 1809-40.

17. FUKUMOTO, T., J. W. SPERLING, A. SANYAL, J. S. FITZSIMMONS, G. G. REINHOLZ, C.A. CONOVER, S. W. O'DRISCOLL (2003): Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. Osteoarthritis Cartilage, 11, 55–64.

18. GIANNOUDIS, P., TZIOUPIS, C., ALMALKI, T, (2007): et al. Fracture healing in osteoporotic fractures: is it really different? A basic science perspective. Injury, 38, 90-9.

19. HADDAD (1992): Estrogen receptors in fracture healing. Clin. Orthop. 280, 277-280.

20. 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

21. HAYNESWORTH, S.E., J. GOSHIMA, V.M. GOLDBERG, A.I. CAPLAN (1992): Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. Bone. 13(1), 81-88.

22. HEALY, K.E., GULDBERG, R.E.,(2007): Bone tissue engineering. J Musculoskelet Neuronal Interact, 7, 328.

23. INTINI, G., (2009): The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. Biomaterials 30:4956-4966

24. 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

25. KNIGHT,D.P.(2000): Unconventional Collagens. J. Cell. Sci. 113(pt23), 4141-4142.

26. KOBAYASHI, W., M. KOBAYASHI, K. NAKAYAMA, W. HIROTA, H. KIMURA (2000): Free omental transfer for osteoradionecrosis of the mandibule. Int. J. Orl. Maxillofac. Surg. 29,201-206.

27. KOS, J., V. NADINIĆ, D. HULJEV, J. TURČIĆ, D. KOŠUTA, T. ANIĆ, T. BABIĆ, M. KRESZINGER, O. SMOLEC (2006): Healing of bone by application of free of greater omentum .Vet. arhiv 76(5),367-379.

28. KREAM B.E., M.D. SMITH, E. CANALIS (1985): Characterisation of the effect of insulin on collagen synthesis in fetal rat bone. Endocrinology. 116, 296-302.

29. LIAN J.B., M. COUTTS, E. CANALIS (1985): Studies of hormonal regulation of osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvariae. J. Biol. Chem. 260, 8706-8710.

30. LUMELSKY, N., O. BLONDEL, P. LAENG et al. (2001): Differentiation of embryonic stem cells to insulin secreting structures similar to pancreatic islets. Science, 292, 1389–1393

31. MONAGHAN B.A., F.S. KAPLAN, C.R. LYTTLE, M.D. FALLON, S.D. BODEN, J.G. MUNDY G.R.,J.L. SHAPIRO, J.G. BANDELIN, E.M. CANALIS, L.G. RAISZ (1976): Direct stimulation of bone resorption by thyroid hormones. J.Clin. Invest. 58, 529-534.

32. MUNTING, E., J.F. WILMART, A. WIJNE, P. HENNEBERT, C. DELLOYE (1988): Effect of sterilitation on osteoinduction. Comparasion of five methods in demineralized rat bone. Acta Orthop. Scand. 59, 34-38

33. MUSCHLER, G.F., J.M. LANE (1992): Orthopaedic surgery.(HABAL, M.B., A.H. REDDI urednici). Bone grafts and bone substitutes. Saunders. Philadelphia. pp. 375-407.

34. NOTH, U., A.M. OSYCZKA, R. TULI, N.J. HOCKOK, K.G. DANIELSON, R.S. TUAN (2002): Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. Journal of Orthopaedic Research, 20, 1060–1069.

35. ONI, O.O.(1997): The early stages of the repair of adult human diaphyseal fractures. 28(8), 521-525.

36. PELKER, R.R., G.E. FRIEDLAENDER, T.C. MARKHAM (1983): Biomehanical properities of bone allografts. Clin. Orthop. 174, 54-57.

37. RAY, R.D. (1972): Vascularization of bone graft and implants. Clin. Orthop. 87, 43-48.

38. RUEF C., K. BUDDLE, J. LACY, W. NORTHEMANN, M. BAUMANN, R.B. STERZEL (1990): Interleukin-6 is an autocrine growth factor for mesangial cells. Kidney Int. 38, 249-257.

39. RAMAY, H.R.R., ZHANG, M.(2004): Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering. Biomaterials, 25, 5171-80

40. ROSE; F.R.A.J., OREFFO, R.O.C.(2002): Bone tissue engineering: hope vs hype. Biochemical and biophysical research communications, 292, 1-7.

41. RUSSELL, G., G. MUELLER, C. SHIPMAN, P. CROUCHER(2001): Clinical disorders of bone resorption. Novartis. Foun. Symp. 232, 251-267.

42. SHAFFER, J.W., G.A. FIELD, V.M. GOLDBERG, D.T. DAVY (1985): Fate of vascularized and non-vascularized autografts. Clin. Orthop. 197, 32-43.

43. STEVENSON, S (1998): Enhancement of fracture healing with autogenous and allogenic bone grafts. Clinical Orthop. and Related Research. 355S, pp S239-S246.

44. STEVENS, M.M. (2008): Biomaterials for bone tissue engineering. Materials Today, 11, 18-25.

45. STREET J., B. MIN, L. deGUZMAN i sur 2002: Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by p TATAKIS D.N.(1993): Interleukin-1 and bone metabolism: a review. J. Periodontol. 64(5 Suppl), 416-431.

46. ŠIŠLJAGIĆ, V (2000): Cijeljenje kosti. Med .Vjesn.32(1-4), 105-109.

47. THALLER S.R., A. DART, H. TESLUK(1993): The effects of insuline growth factor 1 on critical-size defects in Sprague-Dawley rats. Ann Plast Surg 31, 429-433.

48. TIEDEMAN, J.J., J.F. CONNOLLY, S.B. STRATES, L. LIPPIELLO (1991): Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix. Clin. Orthop. 268, 294-302.

49. URIST, M.R. (1965): Bone: formation by autoinduction.Science 150, 893-899.

50. WATT, F.M., B.L.M. HOGAN (2000): Out of Eden: stem cells and their niches. Science , 287, 1427–1430.

51. WENER, J.A., S.J. GORTON, L.G. RAISZ (1972): Escape from inhibition of resorption in cultures of fetal bone treated with calcitonin and parathyroid hormone. Endocrinology. 90, 752-759.

52. WOBUS, A.M., K.R. BOHELER (2005): Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. Physiol Rev. 85,635–678.

10. SAŽETAK

Napredak u primjeni regenerativnih principa dramatično je utjecao kako na humanu tako i na veterinarsku ortopediju, no ortopedija se javlja kao jedna od najatraktivnijih grana za primjenu regenerativne medicine i tkivnog inženjeringa. Osnovni koncept regenerativne ortopedije temelji se na razumijevanju i preciznom usklađivanju međuodnosa tri osnovne sastavnice: stanica, okoline i nosača. Tkivni inženjering za cilj ima kombiniranje progenitornih ili zrelih matičnih stanica s biokompatibilnim materijalima ili nosačima, sa ili bez odgovarajućih činbenika rasta kako bi se potaknula reparacija i regeneracija. Budući da je razumijevanje molekularnih i staničnih događanja tijekom cjelidbene kaskade postupno povećava, istražuju se nove strategije za poboljšavanje procesa cijeljenja. Razvijen je cijeli niz terapijskih postupaka i bioaktivnih molekula kako bi se poboljšao odgovor organizma i ubrzalo cijeljenje kosti. Neki od primjera su različiti tipovi glukozaminoglikana, faktori rasta, matične stanice, prirodni presadci (auto-, alo- ili ksenograftovi) te nosači s biološkom i sintetskom bazom nastale na temelju tkivnog inženjerstva. Ovi biomaterijali i bioaktivne molekule imaju neka značajna ograničenja, i još uvijek ne postoje općeprihvaćene terapijske metode koje bi zadovoljile sve očekivane zahtjeve u smislu poboljšanja cijeljenja koštanog tkiva. Inženjering koštanog tkiva, kao skup novih terapijskih metoda, mogla bi prevladati mnoga ograničenja uporabe koštanih presadaka.

11. SUMMARY

Regeneration of bone tissue using bioactive molecules and biomaterials

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.

12. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 27. kolovoza 1985. godine u Metkoviću, gdje sam završio Osnovnu školu Stjepana Radića te srednju školu Gimnazija Metković. Veterinarski fakultet upisao sam 2004. godine.