

PERICA J. VASILJEVIĆ<sup>1</sup>  
STEVO J. NAJMAN<sup>2</sup>  
LJUBIŠA B. ĐORĐEVIĆ<sup>1</sup>  
VOJIN P. SAVIĆ<sup>2</sup>  
MARIJA Đ. VUKELIĆ<sup>2</sup>  
JELENA Z. ŽIVANOV-ČURLIS<sup>2</sup>  
NENAD L. IGNJATOVIĆ<sup>3</sup>  
DRAGAN P. USKOKOVIĆ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Odsek za biologiju i ekologiju,  
PMF, Niš, Srbija  
<sup>2</sup>Medicinski fakultet, Niš, Srbija  
<sup>3</sup>Institut tehničkih nauka SANU,  
Beograd, Srbija

NAUČNI RAD

UDK 678.83:57:616–089.843:612.419

DOI: 10.2298/HEMIND0904301V

## EKTOPIČNA OSTEOGENEZA I HEMATOPOEZA IZ IMPLANTIRANIH ČELIJA KOŠTANE SRŽI NA MATRICI OD BIOKOMPOZITA HAP/PLLA\*

Ispitivana je biofunktionalnost biokompozita hidroksiapatit/poli-L-laktida (HAp/PLLA) kao matrice za osteogenezu i hematopoezu posle subkutane implantacije singenim miševima Balb/c. HAp/PLLA oblikovan je u cevčice (15 mm×1,5 mm) koje su napunjene ćelijama koštane srži miša, a zatim implantirane. Kontrole su bile prokuvane tibije i femuri napunjene na isti način. Implantirani su ekstrahovani posle 2, 6 i 12 nedelja i analizirani patohistološki. Angiogeneza i osteogeneza se vide već posle dve nedelje na implantima, što je izraženije na kostima. Vrlo izražena hematopoeza u implantima oba tipa se vidi posle dvanaest nedelja. HAp/PLLA može poslužiti kao matrica za ektopičnu osteogenezu i hematopoezu.

Oštećenja koštanog tkiva nastaju pod različitim okolnostima, usled fraktura, trauma, infekcija ili tumora. Uravnoteženom aktivnošću osteoblasta i osteoklasta kontrolisana je resorpcija, obnavljanje, popravka i rast kostiju. Zahvaljujući njihovoj aktivnosti koštano tkivo može samostalno da reparira mala oštećenja. Međutim, pri nastanku većih oštećenja neophodno je da se potpomogne biološki potencijal za reparaciju. U regenerativnoj medicini oštećena koštano tkivo se nadoknađuju transplantatima i implantima. Samo se u SAD godišnje obavi preko milion nadoknada i reparacija koštanog tkiva [1].

Sintetički materijali na bazi trikalcijum-fosfata i hidroksiapatita koriste se kao imitatori mineralnog dela kosti zbog svoje biokompatibilnosti i osteoinduktivnosti [1–3]. Poboľšanje bioloških karakteristika ovih materijala postiže se dodavanjem različitih polimera kao što su poli-L-laktid, poli(DL-laktid-ko-glikolid) i bioaktivnih molekula kao što su TGF, IGF, BMP, leptin i patireoidni hormon [2–5].

U poslednjoj deceniji pojavilo se mnogo radova koji ukazuju na mogućnost korišćenja mezenhimskih matičnih ćelija koštane srži (engleski BMMSC) u reparaciji koštanog tkiva. Rezultati dobijeni korišćenjem matrice od ekstracelularnog matriksa, hidroksiapatita ili trikalcijum fosfata, zasejanih ćelijama koštane srži ukazuju na izuzetnu mogućnost remodeliranja koštanog tkiva [5–6].

U ovom radu je analizirana bioresorbilnost kompozita hidroksiapatit/poli-L-laktid (HAp/PLLA) posle subkutane implantacije mišu, njegov osteogeni potencijal i

njegovo delovanje na rast hematopoeznih ćelija. Implantirani su analizirani histopatološki primenom svetlosne mikroskopije.

### EKSPERIMENTALNI RAD

#### Eksperimentalne životinje

U eksperimentu su korišćeni singeni miševi Balb/c, starosti 3 meseca i telesne mase 25±1 g. Životinje su držane u standardnim laboratorijskim uslovima na temperaturi od 22±2 °C, svetlosnom režimu od 12 sati svetlosti i 12 sati mraka, a hranjenje su i pojene *ad libitum*.

#### Implantirani materijal

Biokompozitni materijal HAp/PLLA proizveden je kao visoko porozan kompozitni materijal prema specifikaciji Instituta za tehničke nauke SANU. Korišćen je kompozitni biomaterijal HAp/PLLA sa 80 mas% HAp-a i 20 mas% PLLA-a 430 000 D. HAp/PLLA je rastvoren u hloroformu tako da je dobijena pasta od koje su napravljene cevčice dimenzija 15 mm×1,5 mm.

#### Eksperimentalni postupak

Miševi su zbog neophodne sterilnosti okupani u 70% etanolu, preparirani su zadnji ekstremiteti koji su zatim preneti u sterilnu komoru za nastavak rada. Posle čišćenja kosti od miškulature i vezivnog tkiva, femuri i tibije su otvorene na krajevima. Pomoću insulinske igle (25 G) kosti su izduvane hladnim medijumom RPMI.

Ćelijske suspenzije su resuspendovane, a zatim ispirane dva puta na 1000 o/min tokom 10 min pri 4 °C. Dobijeni talog je resuspendovan u hranjivom medijumu, izbrojana je gustina ćelija u hemocitometarskoj komori, a zatim dolivanjem medijuma je podešena željena gustina na 10<sup>6</sup> vijabilnih ćelija po mililitru. Cevčice od HAp/PLLA napunjene su ovakvom ćelijskom suspenzijom i potom je izvršena njihova subkutana implantacija. Kao

\*Rad saopšten na skupu „Sedmi seminar mladih istraživača“, Beograd, 22–24. decembar 2008.

Autor za prepisku: S. Najman, Medicinski fakultet, Bulevar dr Zorana Đinđića 81, 18000 Niš.

E-pošta: snajman@eunet.rs

Rad primljen: 22. decembar 2008.

Rad prihvaćen: 23. mart 2009.

kontrola korišćene su kivanjem devitelinizirane tibije i femuri koji su napunjeni ćelijskom suspenzijom.

Po dva implanta su pomoću široke igle podkožno uneti u intraskapularni region miša.

### Patohistološka analiza

Implanti su ekstrahovani posle 2, 6 i 12 nedelja i fiksirani u 4% formalinu. Fiksirani implantati su dekalcinisani elektrolitički u vodenom rastvoru 8 vol% HCl i 10 vol% mravlje kiseline. Proces dekalcinacije je sproveden tokom dva sata pri naponu od 100 V i jačini struje 50 mA na uređaju za elektroforezu (EI, Niš). Tkivo je zatim dehidrirano u alkoholu i kalupljeno u paraplast. Preseci debljine 3–6  $\mu$ m su bojeni hematoksilin–eozin (HE) metodom i analizirani na svetlosnom mikroskopu (Leica).

## REZULTATI

### Implanti posle dve nedelje

#### Obdukcijski nalaz

Implanti su smešteni u tanku vezivnu kapsulu izgrađenu od kogenih vlakana. Kod nekih cevčica uočava se i početak vaskularizacije.

#### Patohistološki nalaz kosti napunjene suspenzijom ćelija koštane srži

Na histološkim preparatima uočava se proliferacija vezivnog tkiva oko implantirane kosti u vidu vezivne kapsule (slika 1). Kod svih preparata se uočava proces angiogeneze. Od ćelijskih elemenata prisutni su polimorfonuklearne ćelije, osteoklasti, osteoblasti, osteociti. Na nekim delovima preparata se vidi nastajanje nove kosti (slika 1).

#### Patohistološki nalaz cevčice od HAp/PLLA napunjene suspenzijom ćelija koštane srži

Posle dve nedelje od implantacije biokompozitnog materijala HAp/PLLA može se uočiti dobar ćelijski od-

govor. Na površini implanta dominiraju ćelije vezivnog tkiva i kolagena vlakna koja su organizovana u vidu tanke kapsule. Biokompozitni materijal je u vidu homogenih blede crvenih i svetlih gredica koje okružuju polja vezivnog tkiva od elastičnih kolagenih vlakana i mononuklearnih ćelija (slike 2A i 2B). Takođe, prisutna je ćelijska infiltracija mononuklearnih elemenata u partikule HAp/PLLA (slika 2B). Vidi se prostor između kolagenih vlakana i partikula HAp/PLLA, koji je verovatno posledica fagocitne aktivnosti mononuklearnih ćelija. Na slikama 2C i 2D vidi se degradacija HAp/PLLA delovanjem osteoklasta, gde azurni halo ukazuje na hidrolitičku aktivnost. Iza osteoklasta se uočavaju palisadno raspoređeni osteoblasti.

### Implanti posle šest nedelja

#### Obdukcijski nalaz

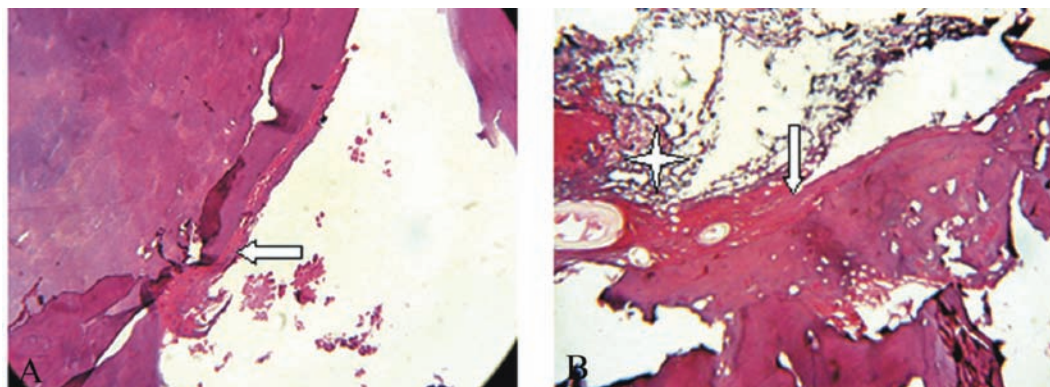
Svi implantati su vaskularizovani i inkapsulirani u dobro razvijenim vezivnim kapsulama.

#### Patohistološki nalaz kosti napunjene suspenzijom ćelija koštane srži

Na preparatima kosti jasno se uočava sloj dobro razvijenog vezivnog tkiva kroz koji prolaze krvni sudovi (slika 3). Ivica kosti okrenuta ka vezivu ima karakterističan nazubljen oblik i u njoj se zapažaju multinuklearne ćelije osteoklastnog fenotipa (slika 3A). Testerasti izgled koštane površine kao i pukotine ukazuju na resorpciju koštano materijala pod dejstvom osteoklasta. Vidljivi su znaci formiranja nove kosti. U novoformiranoj kosti mogu videti osteocitne komorice sa osteocitima, Haverzovi kanali i krvni sudovi (slika 3B).

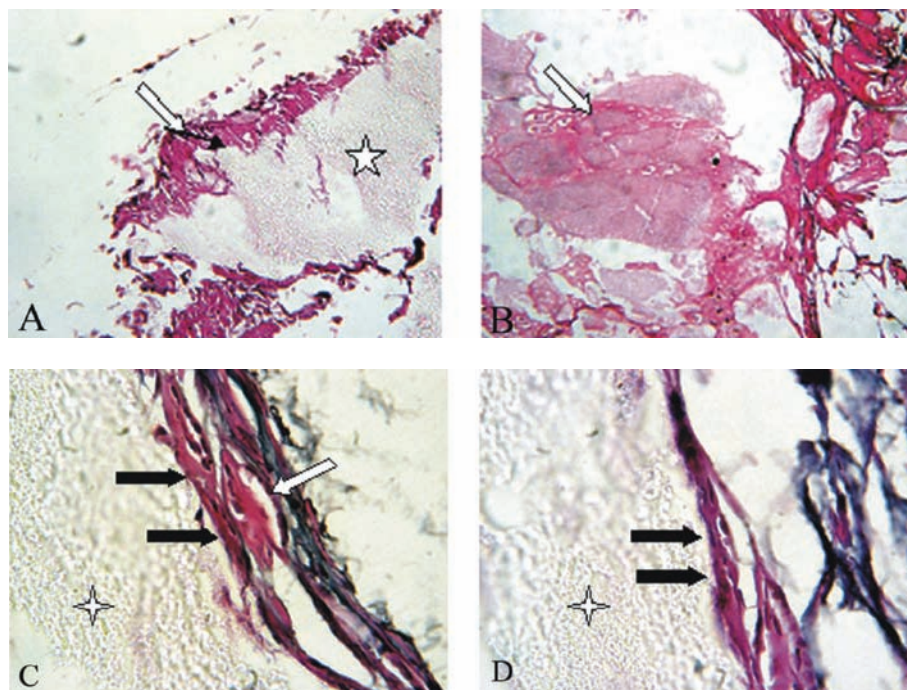
#### Patohistološki nalaz cevčice od HAp/PLLA napunjene suspenzijom ćelija koštane srži

Na preparatima implanta HAp/PLLA posle šest nedelja od implantacije uočava se dobro razvijeno vezivno tkivo izgrađeno od kolagenih vlakana. Na svim preparatima vidljiv je veliki broj šupljina, izmenjena boja i



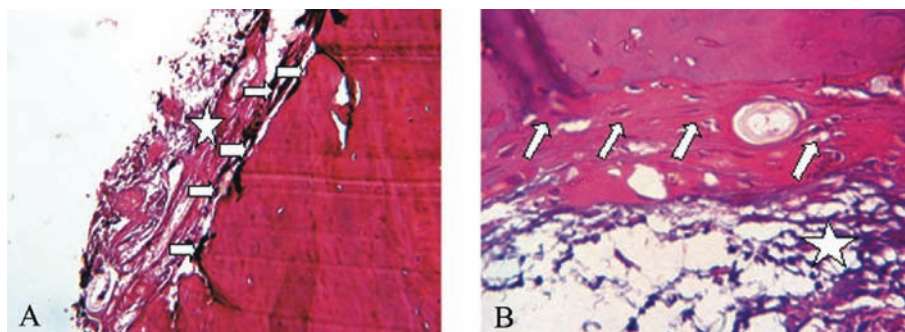
Slika 1. Implant kosti posle 2 nedelje. A) HE, 20 $\times$ . Strelica pokazuje novoformiranu kost; B) HE, 20 $\times$ . Strelica pokazuje novoformiranu kost, a zvezda označava vezivno tkivo.

Figure 1. Bone implants after 2 weeks. A) HE, 20 $\times$ . Arrow shows new bone; B) HE, 20 $\times$ . Arrow shows new bone, and star shows connective tissue.



Slika 2. Implant HAp/PLLA posle 2 nedelje. A) HE, 20 $\times$ . Zvezdica označava HAp/PLLA, a bela strelica vezivnu kapsulu; B) HE, 20 $\times$ . Bela strelica pokazuju infiltraciju mononuklearnih ćelija u HAp/PLLA; C, D) HE, 40 $\times$ . Crne strelice pokazuju osteoklaste, a bela strelica osteoblaste.

Figure 2. HAp/PLLA implants after 2 weeks. A) HE, 20 $\times$ . Star shows biocomposites HAp/PLLA, and white arrows show connective tissue; B) HE, 20 $\times$ . White arrows show mononuclear cells in HAp/PLLA; C, D) HE, 40 $\times$ . Black arrows show osteoclasts, white arrows show osteoblasts, and stars show HAp/PLLA.



Slika 3. Implant kosti posle 6 nedelja. A) HE, 20 $\times$ . Zvezdica označava vezivno-tkivnu kapsulu, a bele strelice pokazuju osteoklastnu aktivnost; B) HE, 40 $\times$ . Zvezdica označava vezivno-tkivnu kapsulu, a bele strelice pokazuju novoformiranu kost.

Figure 3. Bone implants after 6 weeks. A) HE, 20 $\times$ . Star shows connective tissue, and white arrows show osteoclastic activity; B) HE, 40 $\times$ . Star shows connective tissue, and white arrows show new bone.

granulacija biokompozita što ukazuje na intezivnu resorpciju i degradaciju. Eozinofilna boja biokompozitnog materijala je znak snižene vrednosti pH, koja je verovatno posledica enzimske aktivnosti osteoklasta (slika 4A). Na većini preparata je teško uočiti da li se radi o malom broju multinuklearnih džinovskih ćelija ili o više mononuklearnih ćelija (slika 4-A).

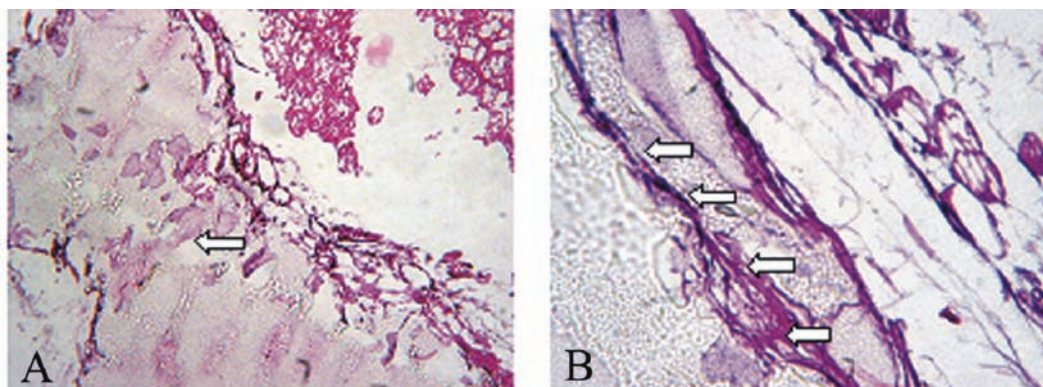
### Implanti posle dvanaest nedelja

#### Obdukcijski nalaz

Implanti se nalaze u dobro razvijenoj vezivnoj kapsuli koja je prožeta mnogobrojnim krvnim sudovima.

#### Patohistološki nalaz kosti napunjene suspenzijom ćelija koštane srži

Na svim histološkim preparatima kosti ispunjene ćelijskom suspenzijom koštane srži posle dvanaest nedelja jasno se uočava vezivna kapsula izgrađena od dobro usnopljenih kolagenih vlakana. Uz staro koštano tkivo vidljiv je i razvoj novog koštanog tkiva svetlije boje (slika 5B). Novo koštano tkivo u pojedinim delovima izgrađuje gredice na kojima se mogu videti hematopoezana ostrvca, kao *in situ* u kostima sa normalnom koštanom srži. Pored eritrocita, eritroblasta, megakariocita, masnih i adventicijskih ćelija, uočavaju se i osteoblasti (slika 5).



Slika 4. Implant HAp/PLLA posle 6 nedelja. HE, 20 $\times$ . A) Promenjena boja biokompozita; B) bele strelice pokazuju infiltraciju osreoklasta.

Figure 4. HAp/PLLA implants after 6 weeks. HE, 20 $\times$ . A) Changed color of biocomposite; B) white arrows show osteoclastic infiltration.

#### Patohistološki nalaz cevčice od HAp/PLLA napunjene suspenzijom ćelija koštane srži

Sa spoljašnje strane uzoraka dobro je uočljiva vezivna kapsula. Prisutna je obimna vaskularizacija, koja se ogleda kako u prisustvu kapilara tako i u prisustvu većih krvnih sudova tipa arteriola (slika 6A). Na svim preparatima se uočava resorpcija i degradacija biokompozitnog materijala pod delovanjem enzimskih sistema makrofaga i osteoklasta (slike 6B i 6C). Enzimski sistem fagocitnih ćelija menja pH sredine tako da on dopunski potpomaže degradaciju biokompozita što se ogleda u promeni njegove boje. Na slici 6 može se videti formiranje nove kosti. U unutrašnjosti cevčice od biokompozitnog materijala HAp/PLLA jasno se uočavaju elementi koštane srži i ektoپیčne hematopoeze, kao što su: eritrociti, eritroblasti, megakariociti, adventicijske ćelije, makrofagi (slika 6B).

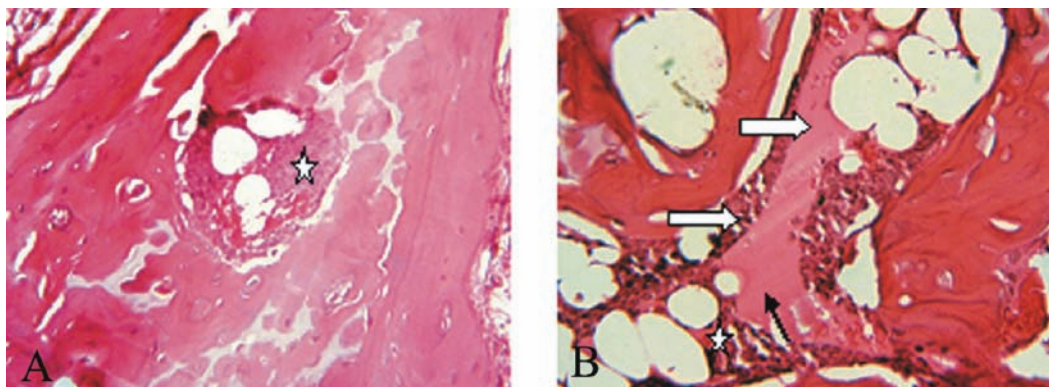
#### DISKUSIJA

Ispitivanja interakcija između ćelija i biomaterijala, kao i organizama i biomaterijala kroz različite biološke

modele su osnova za njihovu primenu u reparaciji tkiva. Hidroksiapatit predstavlja dobru matricu za adheziju, proliferaciju i diferencijaciju ćelija. Ohgushi i saradnici [7–9] ukazali su da HAp može da posluži kao matrica za kultivisanje mezenhimskih matičnih ćelija (engleski MSC) iz koštane srži, a koje bi se pod osteogenim uslovima diferencirale u osteoblaste. Takva matrica bi u *in vivo* uslovima posedovala potencijal za formiranje nove kosti [7,10,11].

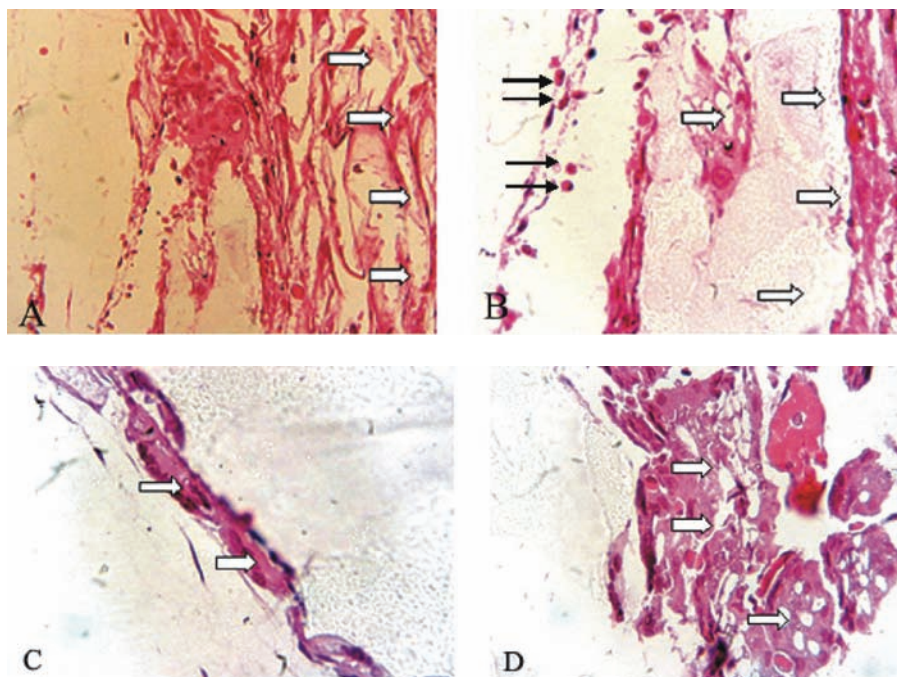
Formiranje kosti u *in vivo* uslovima predstavlja kompleksan proces na koji mogu uticati: 1) sam biomaterijal, 2) mnogi faktori sredine, kao npr. hormoni, faktori rasta i sl. i 3) i ćelije sa osteogenim potencijalom. Fizičko-hemijske karakteristike biomaterijala su od posebnog značaja za biomedicinsku upotrebu. Vrsta i forma biomaterijala, zatim veličina, distribucija i međusobna povezanost pora u biomaterijalu, kao i degradabilnost biomaterijala, u mnogome određuju osteogenezu [12–15].

Mehaničke i degradacione karakteristike polilaktidne komponente u biokompozitnim materijalima tipa HAp/PLLA uslovljene su kombinovanim efektom kris-



Slika 5. Implant kosti posle 12 nedelja. A) HE, 20 $\times$ . Zvezdica pokazuje hematopoezu; B) HE, 40 $\times$ . Bele strelice pokazuju novoformiranu kost, a zvezdica označava hematopoezu.

Figure 5. Bone implants after 12 weeks. A) HE, 20 $\times$ . Star shows hematopoiesis, and arrows show osteoclastic activity; B) HE, 40 $\times$ . White arrows show new bone, and star show hematopoiesis.



Slika 6. Implant HAp/PLLA posle 12 nedelje. A) HE, 20 $\times$ . Strelice pokazuju krvne sudove; B,C) HE, 40 $\times$ . Bele strelice pokazuju degradaciju i resorpciju biokompozita delovanjem osteoklasta, a crne strelice pokazuju hematopoezne ćelije; D) HE, 20 $\times$ . Strelice pokazuju novoformiranu kost.

Figure 6. HAp/PLLA implants after 12 weeks. A) HE, 20 $\times$ . White arrows show blood vessels; B,C) HE, 40 $\times$ . White arrows show osteoclastic activity in biocomposites, and black arrows show hematopoietic cells; D) HE, 20 $\times$ . White arrows show new bone.

talne strukture i molekulske mase PLLA [16]. U degradaciji polilaktidne komponente učestvuju dva mehanizma: 1) lakša difuzija rastvorljivih oligomera sa površine u medijum i 2) neutralizacija karboksilnih grupa na površini. Posledica delovanja ovih mehanizama je smanjenje kiselosti površinskog sloja biomaterijala. Polilaktid se u unutrašnjosti biomaterijala brže degradira, zbog autokatalize, koja počinje sa terminalnih karboksilnih grupa. Utvrđeno je da uslovi sredine imaju znatan uticaj na brzinu razlaganja polilaktida [17,18].

U našim histopatološkim analizama implantiranih biokompozitnih cevčica je kao opšta karakteristika utvrđen proces hidrolitičke razgradnje PLLA. Na resorpciju i degradaciju biokompozita ukazuje sitnogradularni izgled, veliki broj šupljina u materijalu kao i njegova boja (slike 2A i 4A). Posle hidrolize PLLA komponente u unutrašnjost HAp partikule telesnim tečnostima doprevaju proteini što se ogleda kroz eozilnofilnost preparata. Ovo je u saglasnosti sa do sada objavljenim podacima o degradacionim procesima čistog PLLA i biokompozitnih materijala tipa HAp/PLLA [17–20]. Afinitet HAp-a prema vodi omogućava homogeniju hidrolizu HAp/PLLA, što nije odlika čistog PLLA, kod koga prvo dolazi do hidrolize površinskog sloja [17,18]. U *in vivo* uslovima proces degradacije se odvija zahvaljujući tkivnim enzimima, telesnim tečnostima i ćelijama koje okružuju implant. S obzirom na ove činjenice, degradacija biokompozita HAp/PLLA kompleksan je multifaktorijalni pro-

ces. Stanje implanta je posledica interakcije između biokompozita i tkiva.

Naša istraživanja su pokazala da i posle dva meseca postoji resorptivna aktivnost ćelija, koja se morfološki manifestuje jasnim znacima biodegradacije poli-L-laktida. Resorpcija i degradacija koštanih implanata je slabije izražena, zbog njihove kompaktne strukture.

Potvrđeno je da prilikom implantacije HAp i PLLA može indukovati inflamatorna reakcija [13,20]. Inflamatorni odgovor se mogao očekivati zato što je uneto strano telo u organizam. U našim istraživanjima svi implantati su prožeti vezivnim tkivom i smešteni su u fibrinoznu kapsulu. Proboj kolagenih vlakana se uočava u obe vrste implanata. Kolagena vlakana se kod koštanih implanata provlače kroz sistem koštanih kanala, dok je kod HAp implanata proboj kolagenih vlakana uslovljen aktivnošću mononuklearno-fagocitnog ćelijskog sistema (slika 2B). Infiltracija mononuklearnih ćelijskih elemenata je izraženija kod implanata biokompozitnog materijala, nego kod implanata kosti (slike 2B i 4B). Ćelijske elemente mononuklearno-fagocitnog sistema prate retikularne ćelije i fibroblasti koji proizvode kolagena vlakna.

Prisustvo intenzivne fagocitoze u toku celog ispitivanog perioda verovatno je posledica dugotrajne razgradnje PLLA biokompozitnih implanata, dok je dugotrajna fagocitoza koštanih implanata uslovljena tvrdoćom koštanog tkiva. Na proces intenzivnije fagocitoze biokompozita HAp/PLLA ukazuje veliki broj šupljina u materijalu, testerast izgled kontaktnih površina između

ćelija i materijala, kao i eozinofilnost materijala koja može biti posledica delovanja lizozomskih enzima (slika 4B).

Hemato-poetski ćelijski elementi nisu uočeni u implantima posle dve i šest nedelje od implantacije, ali se posle dvanaest nedelja uočavaju elementi crvene i bele loze i strome koštane srži (slika 5). Kod implanata HAp/PLLA posle dvanaest nedelja od implantacije zapažaju se makrofagi, proeritroblasti, eritroblasti i retikuloцити koji izgrađuju hematopoezana ostrva (slika 6). Ovi nalazi ukazuju na nastanak ektopične hematopoeze kako u koštanim, tako i u HAp/PLLA implantima. Paralelno uz proces ektopične hematopoeze odvija se i intenzivna angiogeneza (slika 6). Mnogi istraživači su u dosadašnjim istraživanjima pokazali da neki od proteina koji nastaju u angiogenezi, kao što su osteogeni proteini (OP-1), BMP i TGF- $\beta$  mobilisu mezenhimske matične ćelije na osteodiferencijaciju, a samim tim indukuju formiranje nove kosti [3,6,21–24].

## ZAKLJUČAK

Znaci angiogeneze i osteogeneze se vide već posle dve nedelje u implantima oba tipa, što je izraženije u implantiranoj deviteliniziranoj kosti napunjenoj ćelijama koštane srži. Vrlo izražena hematopoeza u implantima oba tipa se vidi posle dvanaest nedelja. Pokazano je da se subkutano implantirani biokompozit HAp/PLLA 430 000 D ponaša kao dobar tkivni matriks za ektopičnu osteogenezu i hematopoezu što mu daje svojstva uspešnog zamenika kosti.

## Zahvalnica

Ovaj rad je rađen u okviru projekta ON145072, koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

## LITERATURA

- [1] V. Olivier, N. Fauchoux, P. Hardouin, Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery, *Drug Discov. Today* **9** (2004) 803–811.
- [2] K. Dee, D. Puleo, R. Bizionis, *Tissue-biomaterial Interactions*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2002, p. 228.
- [3] M. Yaszemski, R. Payne, W. Hayes, R. Langer, G. Mikos, Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone, *Biomaterials* **17** (1996) 175–185.
- [4] A. Ignatius, E. Claes, In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly (L, dl-lactide) and poly(l-lactide-co-glycolide), *Biomaterials* **17** (1996) 831–839.
- [5] C. Jorgensen, J. Gordeladze, D. Noel, Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells, *Curr. Opin. Biotechnol.* **15** (2004) 406–410.
- [6] S.P. Bruder, N. Jaiswal, N.S. Ricalton, J.D. Mosca, K.H. Kraus, S. Kadiyala, Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **355** (1998) 247–256.
- [7] H. Ohgushi and I.A. Caplan, Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering, *J. Biomed. Mater. Res.* **48** (1999) 913–927.
- [8] H. Ohgushi, M.V. Goldberg and I.A. Caplan, Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells, *J. Orthop. Res.* **7** (1989) 568–578.
- [9] H. Ohgushi, M.V. Goldberg and I.A. Caplan, Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop, Scand.* **60** (1989) 334–339.
- [10] C.S. Mendes, I. Van Den Brink, J.D. De Bruijn and A.C. Van Blitterswijk, In vivo bone formation by human bone marrow cells: effect of osteogenic culture supplements and cell densities, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **9** (1998) 855–858.
- [11] S. Najman, Lj. Đorđević, V. Savić, N. Ignjatović, M. Plavšić and D. Uskoković, Changes of HAp/PLLA biocomposites and tissue reaction after subcutaneous implantation, *Facta Universitatis, series Medicine and Biology* **10** (2003) 131-134.
- [12] P. Habibovic, H. Yuan, M.C. Van Der Valk, G. Meijer, A.C. Van Blitterswijk, K. De Groot, 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials, *Biomaterials* **26** (2005) 3565–3575.
- [13] P. Kasten, J. Vogel, R. Luginbuhl, P. Niemeyer, M. Tonak, H. Lorenz, L. Helbig, S. Weiss, J. Fellenberg, A. Leo, G.H. Simank, W. Richter, Ectopic bone formation associated with mesenchymal stem cells in a resorbable calcium deficient hydroxyapatite carrier, *Biomaterials* **26** (2005) 5879–5889.
- [14] A.S. Kuznetsov, H.P. Krebsbach, K. Satomura, J. Kerr, M. Riminucci, D. Benayahu and G.P. Robey, Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo, *J. Bone Miner. Res.* **12** (1997) 1335–1347.
- [15] A.S. Kuznetsov, H.M. Mankani, S. Gronthos, K. Satomura, P. Bianco, G.P. Robey, Circulating skeletal stem cells, *J. Cell Biol.* **153** (2001) 1133–1140.
- [16] N. Ignjatović, V. Savić, S. Najman, M. Plavšić, D. Uskoković, A study of HAp/PLLA composite as a substitute for bone powder using FT-IR spectroscopy, *Biomaterials* **22** (2001) 571–575.
- [17] L.G. Griffith, Polymeric biomaterials, *Acta Mater.* **48** (2000) 263–277.
- [18] Y. Shikinami, Y. Matsusue, T. Nakamura, The complete process of bioresorption and bone replacement using devices made of forged composites of raw hydroxyapatite particles/poly l-lactide (F-u-HA/PLLA), *Biomaterials* **26** (2005) 5542–5551.
- [19] S. Najman, V. Savić, Lj. Đorđević, N. Ignjatović, D. Uskoković, Biological evaluation of hydroxyapatite/poly-L-lactide (HAp/PLLA) composite biomaterials with poly-L-lactide of different molecular weights intraperitoneally implanted into mice, *Biomed. Mater. Eng.* **14** (2004) 61–70.
- [20] P. Kasten, R. Luginbuhl, M. Van Griensven, T. Barkhausen, C.M. Bohner, U. Bosch, Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and demineralized bone matrix, *Biomaterials* **24** (2003) 2593–2603.

- [21] M. Samee, S. Kasugai, H. Kondo, K. Ohya, H. Shimokawa, S. Kuroda, Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Transfection to Human Periosteal Cells Enhances Osteoblast Differentiation and Bone Formation, *Pharmacol. Sci.* **108** (2008) 18–31.
- [22] F. Ng, S. Boucher, S. Koh, K.S. Sastry, L. Chase, U. Lakshminpathy, C. Choong, Z. Yang, M.C. Vemuri, M.S. Rao and V. Tanavde, PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages, *Blood* **15** (2008) 295–307.
- [23] H.M. Mankani, A.S. Kuznetsov, B. Fowler, A. Kingman and G.P. Robey, In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape, *Biotechnol. Bioeng.* **72** (2001) 96-107.
- [24] B.X. Yang, J.M. Whitaker, W. Sebald, N. Clarke, M.S. Howdle, M.K. Shakesheff, R.O. Oreffo, Human osteo-pro-genitor bone formation using encapsulated bone morpho-genetic protein 2 in porous polymer scaffolds, *Tissue Eng.* **10** (2004) 1037–1045.

## SUMMARY

### ECTOPIC OSTEOGENESIS AND HEMATOPOIESIS AFTER IMPLANTATION OF BONE MARROW CELLS SEEDS ON HAP/PLLA SCAFFOLD

Perica J. Vasiljević<sup>1</sup>, Stevo J. Najman<sup>2</sup>, Ljubiša B. Đorđević<sup>1</sup>, Vojn P. Savić<sup>2</sup>, Marija Đ. Vukelić<sup>2</sup>, Jelena Z. Živanov-Čurlis<sup>2</sup>, Nenad L. Ignjatović<sup>3</sup>, Dragan P. Uskoković<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Nis, Serbia

<sup>2</sup>Medical Faculty, University of Nis, Serbia

<sup>3</sup>Institute of technical Sciences of SASA, Belgrade, Serbia

(Scientific paper)

Bone tissue reconstruction and repair is a big challenge in medicine. Biocomposite materials based on hydroxyapatite are widely used in repair of bone defects. Adult bone marrow-derived stem cells may be considered in two categories: hematopoietic stem cells (HSC) from the bone marrow and mesenchymal stem cells from the bone marrow stroma (BMSC). HSC and BMSC do not only coexist in one organ, but functionally cooperate. BMSC have a critical role in the formation of hematopoietic microenvironment (HME). The aim of this study was to investigate the interactions between bone marrow cells and biocomposites based on HAp/PLLA (hydroxyapatite/poly-L-lactide) after subcutaneous implantation in Balb/c mice. In that purpose, bone marrow cells of Balb/c mice were seeded in HAp/PLLA tubes (15 mm×1,5 mm). The HAp/PLLA tubes with BMC were subcutaneously implanted with a needle into the intrascapular region of the mouse. Implants were extracted after 2, 6 and 12 weeks. In implants after 2 and 6 weeks we found angiogenesis, collagenogenesis and new bone. Ectopic hematopoiesis was seen in implants after 12 weeks from implantation. As a good scaffold in the role of supporting osteogenesis and hematopoiesis, biocomposites HAp/PLLA can be good bone substitute materials in the bone repair process. These results showed that the HAp/PLLA scaffold owned biological properties comparable to natural bone.

Ključne reči: Čelije koštane srži • HAP/PLLA • Implant • Osteogeneza • Hematopoeza  
Key words: Bone marrow cells • HAP/PLLA • Implant • Osteogenesis • Hematopoiesis