

JELENA M. JANIĆIJEVIĆ¹
STEVO J. NAJMAN¹
NENAD L. IGNJATOVIĆ³
VOJIN P. SAVIĆ²
JELENA S. KOCIĆ¹
PERICA J. VASILJEVIĆ⁴
MARIJA Đ. VUKELIĆ¹
DRAGAN P. USKOKOVIĆ³

¹Medicinski fakultet,
Institut za biologiju sa humanom
genetikom, Niš

²Medicinski fakultet, Institut
za biomedicinska istraživanja,
Niš

³Institut tehničkih nauka SANU,
Beograd

⁴Prirodno-matematički fakultet,
Odsek biologija i ekologija,
Niš

NAUČNI RAD

66.017:616-089.843:611.018.4/5

NANOMATERIJAL KALCIJUM-FOSFAT/POLI-DL-LAKTID-KO-GLIKOLID KAO POTENCIJALNA TKIVNA MATRICA U OSTEOREPARACIJI POMOĆU KOSTNE SRŽI NA MODELU SUBKUTANE IMPLANTACIJE*

Ispitivan je nanomaterijal (NPs) kalcijum-fosfat poli-dl-laktid-ko-glikolid (N-CP/DLPLG) kao potencijalna tkivna matrica za reparaciju kosti pri korišćenju kostne srži kao izvora osteogenih ćelija na modelu subkutane implantacije singenim miševima Balb/c. Implanti su napravljeni od NPs mešanjem sa razblaženom krvlju i kostnom srži, a ekstrahovani su nakon osam dana i osam nedelja. Implanti bez kostne srži su bili kontrola. Nakon osam dana se na periferiji implanta vide gusta polja sa ćelijama, a u materijalu se vidi lakunarna organizacija sa prisustvom ćelija. Uočljiva je vaskularizacija i registrovan je kolagen. Na kontrolnim implantima je celularnost vrlo slaba. Posle osam nedelja redukovana je površina NPs. N-CP/DLGLP pokazuje svojstva tkivne matrice i dobre mikrosredine za ćelije kostne srži.

Regeneracija koštanog tkiva predstavlja veliki izazov na polju ortopedske i kraniofacijalne hirurgije. Kod većine ovakvih zahvata postoji potreba za koštanim zamenicama [1]. Sintetski materijali, kao što je na primer kalcijum fosfatna biokeramika, igraju značajnu ulogu u rekonstrukciji kosti zbog svoje biokompatibilnosti i osteokonduktivnosti [2–4].

Od ranije je poznato da su centralni elementi u regeneraciji koštanog tkiva: osteoprogenitorne ćelije, osteoinduktivni agensi i osteokonduktivni materijali [5]. Kostna srž je izvor osteoprogenitornih ćelija koje su ključni element u procesima regeneracije koštanog tkiva, ali je i izvor faktora rasta [6]. Krvna plazma je takođe izvor različitih faktora rasta [7].

Kost predstavlja prirodno okruženje za ćelije kostne srži, pa je jako važno da biomaterijali koji se koriste kao koštani zamenici imaju takva biofunktionalna svojstva da podržavaju normalan razvoj i funkcionisanje ovih ćelija.

U poslednje vreme istraživanja su okrenuta ka NPs, pošto je i samo koštano tkivo izgrađeno od komponenti nano veličine [8]. Korišćena su biodegradabilna nanovlakna u kombinaciji sa ćelijama kostne srži kao vaskularni graft [9].

Pokazano je da je trodimenzionalna matrica od nanovlakana koja liče na vlakna kolagena sposobna da unapredi biološki odgovor zasađenih ćelija [10] i

da kolagen-apatitne nanokompozitne mikrosfere imaju visok osteogeni potencijal i mogu biti korisni u tkivnom inženjerstvu [11].

Prema dosadašnjim istraživanjima, sintetičke polimerne matrice, kao što su one izgrađene od mlečne i glikolne kiseline su biokompatibilne, mogu imati podesive mehaničke karakteristike i mogu biti lako modifikovani inkorporacijom proteina i peptida [9].

U našem istraživanju korišćen je materijal N-CP/DLPLG.

Cilj istraživanja bio je da se ispita da li N-CP/DLGLP ima svojstva matriksa za održavanje i rast ćelija kostne srži posle subkutane implantacije.

EKSPERIMENTALNI RAD

U eksperimentu su korišćeni singeni miševi soja Balb/c, muškog pola, starosti od 10 do 12 nedelja. Oni su odgajani u standardnim uslovima (na temperaturi od $+22 \pm 2$ °C, svetlosnom režimu od 12 sati svetlosti i 12 sati mraka, hranjene i pojene *ad libitum*).

Ćelije kostne srži su dobijene iz femura miša, koji je prethodno žrtvovan cervikalnom dislokacijom i opran u 70% alkoholu. Femuri su očišćeni od okolnog tkiva u sterilnoj komori. Nakon presecanja epifiza, kostna srž je isprana iz femura hladnim medijumom RPMI 1640 (pH 7,2) pomoću tanke igle (26G). Suspenzija ćelija je, do upotrebe, držana u sterilnoj epruveti na ledu.

Krv je dobijena kompletnim iskrvavljenjem životinje iz retroorbitalnog sinusa, a zatim je razblažena fiziološkim rastvorom ili suspenzijom ćelija kostne srži u odnosu 1:4.

Napravljene su 2 vrste implanata:

*Rad saopšten na skupu "Šesti seminar mladih istraživača", Beograd, 24.-26. decembar 2007.

Adresa autora: S. Najman, Medicinski fakultet, 18000 Niš, Bulevar dr Zorana Đinđića br. 81

E-mail: snajman@eunet.yu

Rad primljen: Decembar 24, 2007.

Rad prihvaćen: Mart 26, 2008.

1. N-CP/DLPLG pomešan sa krvlju razblaženom suspenzijom ćelija kostne srži

2. N-CP/DLPLG pomešan sa krvlju razblaženom fiziološkim rastvorom, služio je kao kontrola.

Implanti su sadržavali 10 mg NPs koji je pomešan sa 30 μ l razblažene krvi, a oblikovani su kao lop-taste grudvice. Pripremljeno je po 10 implanata obe vrste.

Subkutana implantacija je izvršena na anesteziranim životinjama, tako što su implantati uneti kroz široku sterilnu biopsijsku iglu u intraskapularni deo miša. Svakom od 10 miševa je levo od uboda igle postavljen implant sa kostnom srži, a desno kontrolni implant.

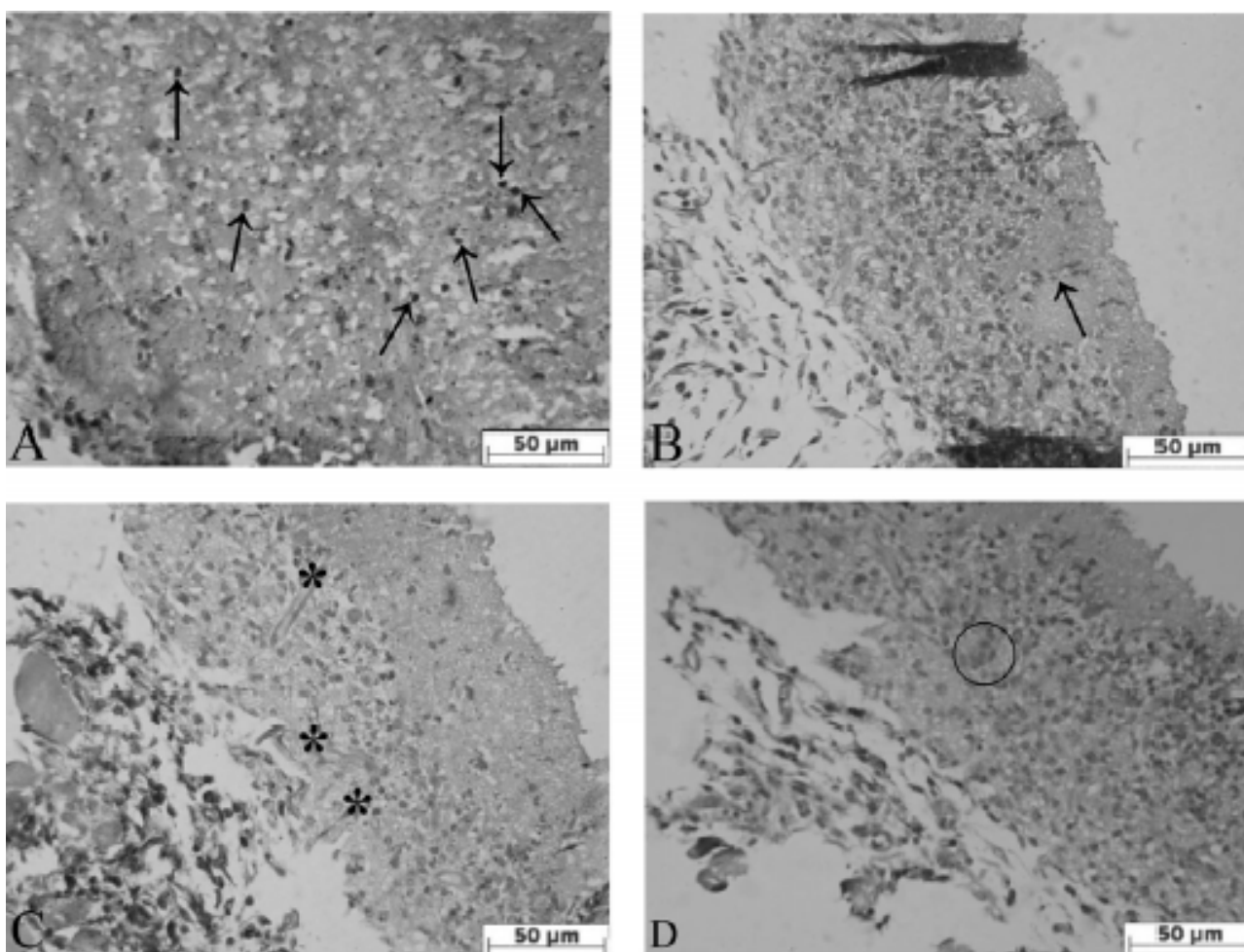
Nakon osam dana, iz polovine miševa, a nakon osam nedelja i iz ostalih miševa su ekstrahovani implantati, pošto su miševi žrtvovani cervikalnom dislokacijom. Implantati su fiksirani 10% neutralnim formalinom, a zatim je vršena dekalcinacija 10% mravljom kiselinom. Nakon dekalcinacije tkivo je dehidrirano kroz seriju alkohola, a zatim je kalupljeno u paraplatsu. Isečci debljine 2–2,5 μ m su bojeni tehni-

kama hematoksilin-eozin (HE) i Masson trichrom (MTH), a zatim analizirani na svetlosnom mikroskopu (Leica DMLS).

REZULTATI

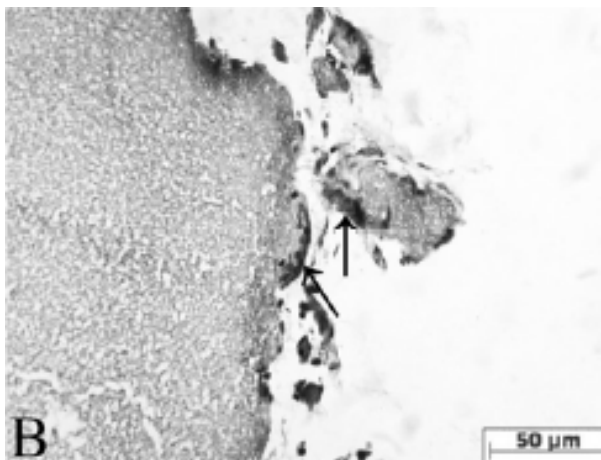
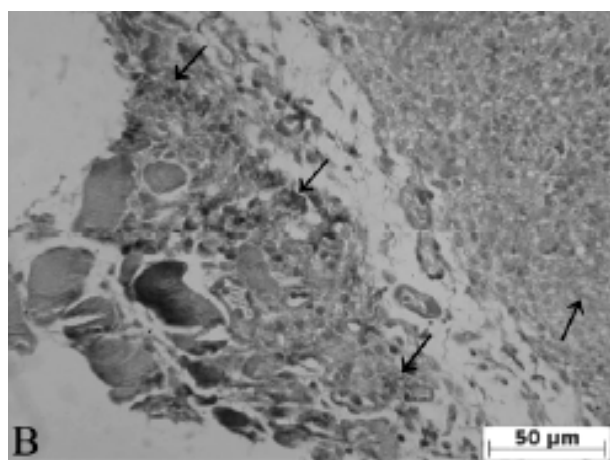
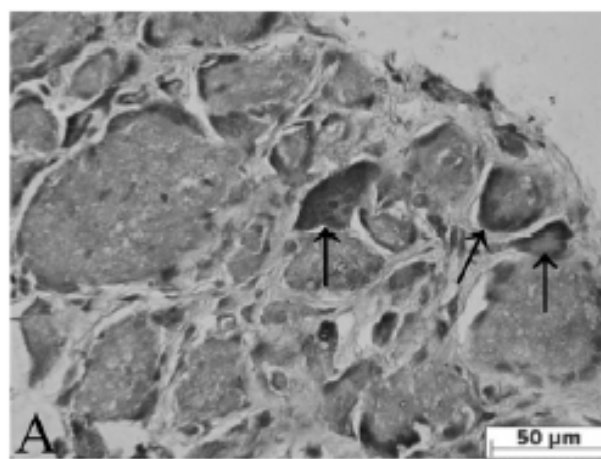
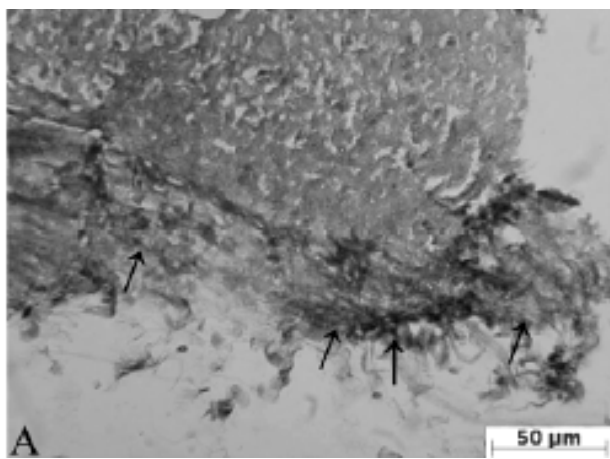
Nakon osam dana na histološkim preparatima kontrolnih implanata uočava se slaba vezivna kapsula građena od kolagena i krupnih ćelija epitelnog izgleda. Implant izgleda jako porozan, a u pojedinim šupljinama nalaze se sitne mononuklearne ćelije (slika 1–A). Nema znakova veće resorpcije materijala. U implantu nisu nađeni krvni sudovi. Bojenje na kolagen pokazalo je da je on zastupljen samo u vezivnoj kapsuli (slika 2–A).

Na histološkim preparatima implanata sa kostnom srži uočava se rastresita kolagena kapsula koja je jako celularna i sa brojnim kapilarima i sitnijim krvnim sudovima. Ovaj tip implanta izgleda jako porozan sa porama vrlo različitih dimenzija i oblika. Za razliku od kontrole, u šupljinama ovih implanata su



Slika 1. Implantati nakon osam dana: (A) kontrolni implantati, (B, C, D) implantati sa kostnom srži. Strelice (\uparrow) pokazuju ćelije, zvezdice (*) pokazuju krvne sudove, a multinuklearna ćelija je uokvirena; HE, 40 \times

Figure 1. Implants after eight days: (A) control implants, (B, C, D) implants with bone marrow cells. Arrows (\uparrow) show cells, stars (*) show blood vessels, and multinuclear cell is encircled; HE, 40 \times

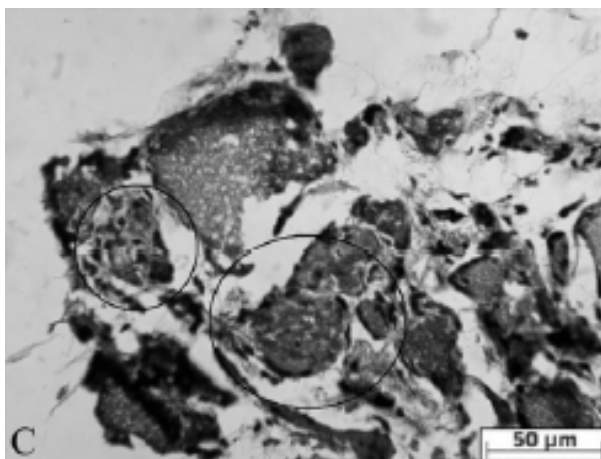


Slika 2. Implanti nakon osam dana: (A) kontrolni implant, (B) implant sa kostnom srži. Strelice (↑) ukazuju na kolagen; MTH, 40×

Figure 2. Implants after eight days: (A) control implant, (B) implant with bone marrow cells. Arrows (↑) point to collagen; MTH, 40×

brojne ćelije, među kojima su i multinuklearne ćelije koje karakteriše fagocitna aktivnost. Na nekim mestima se može uočiti kako su ćelije raspoređene kao pregrade koje parcelišu implant ili su uklinjene u besćelijski deo materijala. Na nekim mestima vidi se kako su se ćelije rasporedile na površini materijala. U implantu se primećuju ćelije koje su u deobi. Značajna razlika u odnosu na kontrolu je prisustvo krvnih sudova (slika 1–B, C, D). Bojenje na kolagen pokazalo je da je on zastupljen u vezivnoj kapsuli, ali i u samim implantima (slika 2–B).

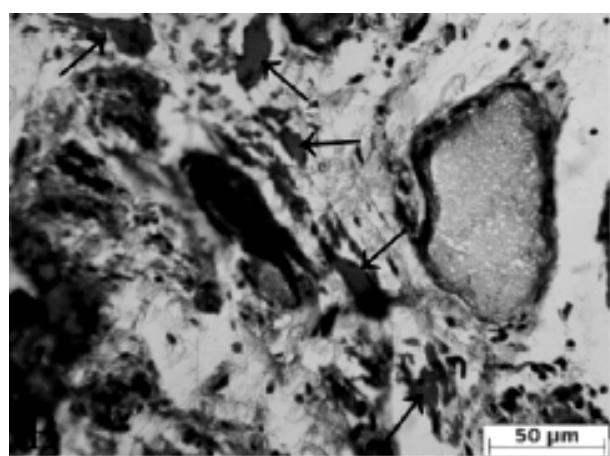
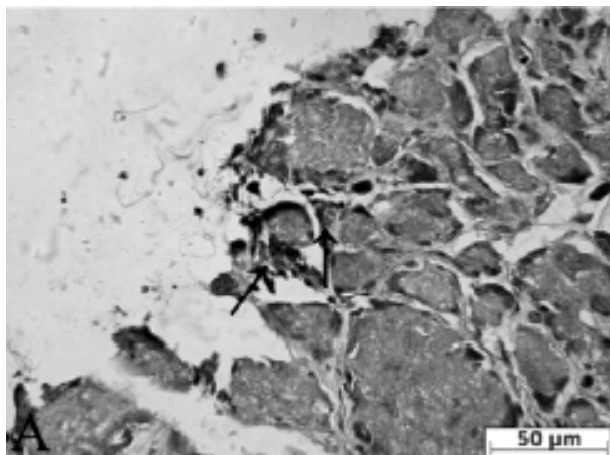
Nakon osam nedelja na histološkim preparatima kontrolnih implanata postoji i dalje vezivna kapsula izgrađena od kolagenih vlakana. Implant izgleda fragmentisan u komade vrlo različitih veličina i oblika. Brojne krupne, višejedarne fagocitne ćelije na površini fragmenata implanta ukazuju na resorpciju materijala. Ponegde se vide jednojedarne ćelije prizmatičnog oblika i palisadnog rasporeda po obodu fragmenata što podseća na raspored osteoblasta. Materijal u fragmentima kontrolnih implanata izgleda



Slika 3. Resorpcija materijala nakon osam nedelja: (A) kontrolni implant, (B, C) implanti sa kostnom srži. Strelice (↑) pokazuju fagocitne ćelije, a polja materijala sa usadenim ćelijama su zaokružena; HE, 40×

Figure 3. Material resorption after eight weeks: (A) control implant, (B, C) implant with bone marrow cells. Arrows (↑) show phagocyte cells, and material fields with incorporated cells are circled; HE, 40×

kompaktno, tako da se vide tek retke ćelije koje su se naselile u materijal (slika 3–A). Između fragmenata materijala mogu se videti malobrojni i sitni krvni su-



Slika 4. Vaskularizacija implanata nakon osam nedelja: (A) kontrolni implant, (B) implant sa kostnom srži. Strelica (↑) pokazuje krvne sudove; HE, 40×

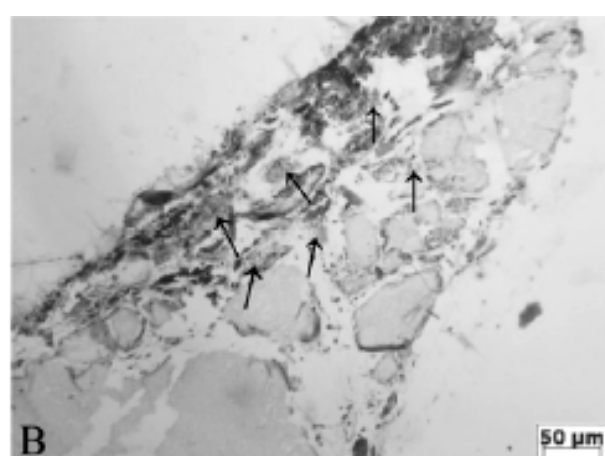
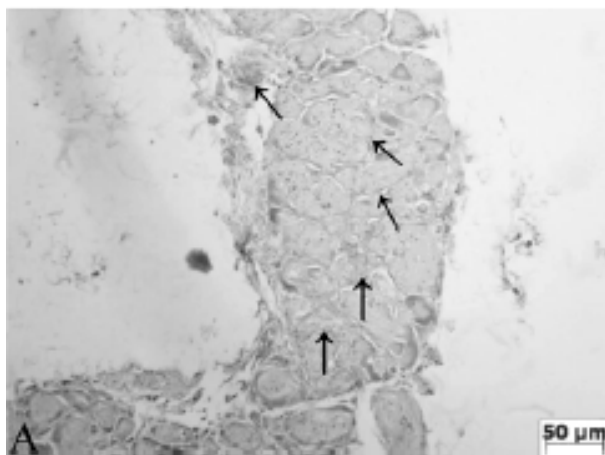
Figure 4. Implants vascularization after eight weeks: (A) control implant, (B) implant with bone marrow cells. Arrows (↑) show blood vessels; HE, 40×

dovi (slika 4–A). Dosta kolagena se može videti da prožima implante pružajući se između fragmenata (slika 5–A).

Na histološkim preparatima implanata sa kostnom srži preostali delovi implanata su jako porozni, što ukazuje na prethodnu intenzivnu resorpciju materijala. Prisutne su ćelije fagocitnog fenotipa, ali u manjem broju nego u kontrolnim implantima. U nekim delovima implanta primećuju se ćelije koje su oko neresorbovanog materijala raspoređene u jednom sloju što liči na raspored osteoblasta. Na mnogo mesta vide se ćelije koje su usađene u materijal (slika 3–B, C). Detektovan je veliki broj krvnih sudova (slika 4–B). Kolagen je u vezivnoj kapsuli i u manjoj meri prožima implante (slika 5–B).

DISKUSIJA

Vezivna kapsula je prisutna oko oba tipa implanata i nakon osam dana i nakon osam nedelja. Ovo se može smatrati normalnom reakcijom organizma, jer



Slika 5. Implanata nakon osam nedelja: (A) kontrolni implant, (B) implant sa kostnom srži. Strelice (↑) ukazuju na kolagen; MTH, 20×

Figure 5. Implants after eight weeks: (A) control implant, (B) implant with bone marrow cells. Arrows (↑) point to collagen; MTH, 20×

je u njega uneto strano telo. I sama priprema subkutanog džepa za implantaciju je invazivna metodom kojom se oštećuje meko tkivo, što je stimulus za različite ćelije da migriraju ka mestu povrede [12,13].

Nakon osam dana slaba fagocitna aktivnost učljiva je samo u implantima sa kostnom srži, a nakon osam nedelja ona je jasno uočljiva u implantima oba tipa. Fagocitnih ćelija je više u kontrolnim implantima od osam nedelja, ali je resorpcija više odmakla u implantima sa ćelijama kostne srži. Imajući u vidu da su fagocitne ćelije nađene već nakon osam dana u implantima sa kostnom srži, verovatno je ta rana fagocitna aktivnost rezultovala intenzivnijom fagocitozom i resorpcijom materijala u ranijem periodu, što je bilo praćeno smirivanjem procesa, vidljivog na osmone-deljnim implantima. Ranija fagocitna aktivnost i resorpcija materijala u odnosu na kontrolne implante je verovatno rezultat većeg broja fagocitnih ćelija u startu, među kojima su: makrofagi kostne srži, monociti iz krvi koji se transformišu u fagocitne ćelije, progeni-

torne ćelije kostne srži koje su se pod uticajem citokina iz krvi diferencirale u fagocitne ćelije, fagocitne ćelije vezivne strome i fagocitne ćelije krvi. U kontrolnim implantima tipovi fagocitnih ćelija su mogli biti samo monociti krvi, fagocitne ćelije vezivne kapsule i fagocitne ćelije krvi.

Angiogeneza i vaskulogeneza su ključni procesi u mehanizmima tkivne regeneracije i reparacije, kao i osteogeneze. Putem krvi dospevaju joni kalcijuma i fosfora, hranljive supstance i kiseonik, kao i različiti tipovi ćelija. Zato se osteogeneza odvija u blizini krvnih sudova. Izrazite razlike u vaskularizaciji između dva tipa implanata, koje su naročito uočljive nakon osam nedelja, ukazuju da su verovatno neke ćelijske ili proteinske komponente kostne srži stimulišu angiogenezu. Stimulatorni efekat bi mogao poticati od stromalnih ćelije kostne srži za koje je pokazano da indukuju neovaskularizaciju i oslobađaju angiogene faktore [14,15].

Na histološkim preparatima kontrolnih implanata od osam dana, kolagen se uočava samo u vezivnoj kapsuli, a u implantima sa kostnom srži bojenje na kolagen pokazalo je da on postoji u vezivnoj kapsuli, ali i u samim implantima. Kolagen u implantima sa kostnom srži verovatno je produkt fibroblasta koji vode poreklo iz strome kostne srži. Nakon osam nedelja kolagen je detektovan kako u vezivnoj kapsuli, tako i u implantima. Međutim, kolagen u implantima sa kostnom srži je vrlo malo prisutan, što pokazuje da je uporedo sa resorpcijom materijala mogla da se vrši i razgradnja kolagena fagocitnim ćelijama i fibroblastima, za koje je to karakteristično [16–18].

Celularnost implanata oba tipa je znatno smanjena nakon osam nedelja, što je najverovatnije posledica njihove izolovanosti od organizma formiranom vezivnom kapsulom.

Raspored i oblik ćelija na fragmentima implanata je karakteristika osteoplastnog ćelijskog fenotipa. Prisustvo osteoplastnog fenotipa, nađen kolagen u implantima, uz videnu angiogenu aktivnost i vaskularizaciju, ukazuju na to da N-CP/DLGLP sa biološkim aditivima kao što su razblažena krv i kostna srž, pokazuje osteogenu aktivnost. Ovakva aktivnost je ranije izrađena sa dodatkom kostne srži i krvi zajedno, nego samo uz dodatak krvi. Naši eksperimenti su pokazali da N-CP/DLGLP može biti korišćen kao tkivna matrica i pogodna mikrosredina za ćelije kostne srži, što je uporedivo sa fiziološkom ulogom kosti. Dobijeni rezultati upućuju da N-CP/DLGLP u kombinaciji sa krvi i kostnom srži može biti dobar kandidat za primenu u tkivnom inženjerstvu i regenerativnoj medicini za potrebe osteoreparacije i osteoregeneracije.

ZAKLJUČAK

N-CP/DLGLP pokazuje svojstva tkivne matrice i dobre mikrosredine za ćelije kostne srži. Time što omogućuje održavanje ćelija kostne srži i produkciju

kolagenih vlakana, ukazuje na njegovu biofunkcionalnost zamenika kosti. Ovaj rezultat predstavlja dobar put za dalja ispitivanja N-CP/DLPLG kao potencijalne tkivne matrice u osteoreparaciji.

ZAHVALNICA

Ovaj rad raden je u okviru projekta broj 145072, koji finansira Ministarstvo nauke Republike Srbije.

LITERATURA

- [1] P. Habibović, K. De Groot, Osteoinductive biomaterials—properties and relevance in bone repair, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **1** (2007) 25–32.
- [2] G. Daculsi, N. Passuti, S. Martin, C. Deudon, R.Z. Legeros, S. Raheer, Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study, *J. Biomed. Mater. Res.* **24** (1990) 379–396.
- [3] P. Frayssinet, J.L. Trouillet, N. Rouquet, E. Azimus, A. Autefage, Osseointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition, *Biomaterials* **14** (1993) 423–429.
- [4] N. Passuti, G. Daculsi, J.M. Rogez, S. Martin, J. V. Bainvel, Macroporous calcium phosphate ceramic performance in human spine fusion, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **248** (1989) 169–176.
- [5] M.R. Urist, Bone formation by autoinduction, *Science* **150** (1965) 893–899.
- [6] S. Srouji, E. Livne, Bone marrow stem cells and biological scaffold for bone repair in aging and disease, *Mech. Ageing Dev.* **126** (2005) 281–287.
- [7] Z. Ajduković, S. Najman, Lj. Đorđević, V. Savić, D. Mihailović, D. Petrović, N. Ignjatović, D. Uskoković, Repair of bone tissue affected by osteoporosis with hydroxyapatite–poly–L–lactide (HAp–PLLA) with and without blood plasma, *J. Biomater. Appl.* **20** (2005) 179–190.
- [8] T. J. Webster, E.L. Hellenmeyer, R.L. Price, Increased osteoblast functions on theta + delta nanofiber alumina, *Biomaterials* **26** (2005) 953–960.
- [9] C. K. Hashi, Y. Zhu, G.Y. Yang, W.L. Young, B.S. Hsiao, K. Wang, B. Chu, S. Li, Antithrombotic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104** (2007) 11915–11920.
- [10] W.J. Li, R. Tuli, X. Huang, P. Laquerriere, R.S. Tuan, Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold, *Biomaterials* **26** (2005) 5158–5166.
- [11] H.W. Kim, H.J. Gu, H.H. Lee, Microspheres of collagen–apatite nanocomposites with osteogenic potential for tissue engineering, *Tissue Eng.* **13** (2007) 965–973.
- [12] K. Dee, D. Puleo, R. Bizios, *Tissue–Biomaterial Interactions*, John Wiley & Sons., Hoboken, New Jersey, 2002, p. 138–142.
- [13] D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenti, I. Jakoniuk, S. M. Anderson, B. Li, J. Pickel, R. McKay, B. Nadal-Ginard, D. M. Bodine, A. Leri, P. Anversa, Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium, *Nature* **410** (2001) 701–705.
- [14] K. Hamano, T.S. Li, T. Kobayashi, S. Kobayashi, M. Matsuzaki, K. Esato, Angiogenesis induced by the im-

- plantation of self-bone marrow cells: a new material for therapeutic angiogenesis, *Cell Transplant.* **9** (2000) 439-443.
- [15] S.L. Teitelbaum, M.M. Tondravi, F.P. Ross, Osteoclasts, macrophages, and the molecular mechanisms of bone resorption, *J. Leukoc. Biol.* **61** (1997) 381-388.
- [16] T. Yajima, Acid phosphatase activity and intracellular collagen degradation by fibroblasts *in vitro*, *Cell Tissue Res.* **245** (1986) 253-260.
- [17] G. Vaes, Cell-to-cell interactions in the secretion of enzymes of connective tissue breakdown, collagenase and proteoglycan-degrading neutral proteases. A review, *Agents Actions* **10** (1980) 474-485.
- [18] G. Huybrechts-Godin, P. Hauser, G. Vaes, Macrophage-fibroblast interactions in collagenase production and cartilage degradation, *Biochem. J.* **184** (1979) 643-650.

SUMMARY

NANOMATERIAL NP-CP/DLPLG AS POTENTIAL TISSUE GRAFT IN OSTEOREPARATION IN COMBINATION WITH BONE MARROW CELLS ON SUBCUTANEOUS IMPLANTATION MODEL

(Scientific paper)

Jelena M. Janićijević¹, Stevo J. Najman¹, Nenad L. Ignjatović³, Vojin P. Savić², Jelena S. Kocić¹, Perica J. Vasiljević⁴, Marija Đ. Vukelić¹, Dragan P. Uskoković³

¹Faculty of Medicine, Institute for Biology with Human Genetic, Niš

²Faculty of Medicine, Institute for Biomedical Research, Niš

³Institute of Technical Sciences of SASA, Beograd

⁴Faculty of Science and Mathematics, Department of Biology and Ecology, Niš

The need for bone graft materials in osteoreparation is tremendous. Many researches have shown that calcium-phosphate bioceramics have good biocompatibility and osteoconductivity. We used nanocomposite biomaterial calcium phosphate coated with poly (dl-lactide-co-glycolide) or N-CP/DLPLG. The goal of this investigation was to examine whether N-CP/DLPLG has ability to sustain growth of bone marrow cells after subcutaneous implantation in Balb/c mice. For that purpose N-CP/DLPLG implants with and without bone marrow cells (control) were made. Implants were extracted after eight days and eight weeks. In implants loaded with bone marrow cells after eight days and eight weeks we observed fields rich in cells, angiogenesis and collagenogenesis. These results showed that N-CP/DLPLG has property of tissue scaffold which sustain bone marrow cells growth and collagen production. This represents a good way for further examination of N-CP/DLPLG as potential tissue scaffold in osteoreparation.

Key words: Subcutaneous implantation • Nanomaterial • Scaffold • Bone marrow • Blood •

Ključne reči: Subkutana implantacija • Nanomaterijal • Zamenik kosti • Kostna srž • Krv •