

UNIVERZITET U BEOGRADU

STOMATOLOŠKI FAKULTET

Milan B. Petrovi

BIOLOŠKA AKTIVNOST KOMPOZITNIH
ELIJSKIH NOSA A NA BAZI
VISOKOPOROZNIH HIDROKSIAPATITA
I NJIHOV UTICAJ NA TKIVNO
INŽENJERSTVO KOSTI

Doktorska disertacija

Beograd 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF DENTISTRY

Milan B. Petrovi

**BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE
COMPOUND SCAFFOLDS BASED ON
HIGHLY POROUS HYDROXYAPATITE
AND THEIR INFLUENCE ON BONE
TISSUE ENGINEERING**

Doctoral dissertation

Belgrade 2012.

Mentori:

Prof. dr Miroslav Vukadinovi ,

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,

Klinika za maksilofacijalnu hirirgiju

Prof. dr Dejan Markovi

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,

Klinika za de ju i preventivnu stomatologiju

lanovi komisije:

Prof. dr Miodrag Gavri ,

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,

Klinika za maksilofacijalnu hirirgiju

Doc. dr Jelena Sopta,

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet,

Insutut za patologiju

dr sc. Snežana Pašali ,

Ministarstvo prosvete i nauke

Datum odbrane_____

Doktorska disertacija je realizovana na Institutu Vin a, na Institutu za Medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu, na Institutu za fiziologiju Medicinskog fakulteta univerziteta u Beogradu, na Institutu za hirurgiju Veterinarskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Želeo bih da se zahvalim:

Svom mentoru Prof. dr Miroslavu Vukadinovi u, na podršci koju mi pruža od mog prvog dana susreta sa maksilofacijalnom hirurgijom, na prijateljskim, stru nim i ljudskim savetima i na pomo i koju mi je pružio u mom usavršavanju i napredovanju u hirurgiji. Velika mi je ast i privilegija što sam svoje prve ozbiljne samostalne hirurške intervencije uradio pod njegovim budnim nadzorom.

Ko-mentor Prof. dr Dejanu Markovi u, jer me je uveo u svet nauke o inženjerstvu tkiva i svojim znanjem, iskustvom i prijateljskim savetima inspirisao u izradi ove disertacije.

Dr Vukomanu Jokanovi u, na bezuslovnoj pomo i, entuzijazmu i optimizmu koji je preneo i na mene tokom ove studije.

Doc. dr Jeleni Sopti, na dragocenim idejama i pomo i u obradi histoloških preparata.

Dr Aleksandri Koni , na trudu i pomo i u izradi laboratorijskog dela doktorata.

Prof. dr Petru Milosavljevi u na prijateljskoj pomo i koju mi je pružio na Veterinarskom fakultetu u Beogradu.

Prof. dr Zvezdani Koji , na pomo i u izvo enju doktorata.

Dr Ivanu Soldatovi u, na stru nim i prijateljskim savetima i pomo i da se izborim sa statisti kim problemima.

Dr Nebojši Nikoli u, na drugarskim savetima i na re ima podrške kad mi je bilo najpotrebnije.

Jovanu, Branku i Jelisaveti na radosti koju mi donose svaki dan.

Jeleni na ljubavi, razumevanju i strpljenju.

A najve u zahvalnost dugujem svojim roditeljima, Branku i Dušanki, što su bili to što jesu u mom životu!

BIOLOŠKA AKTIVNOST KOMPOZITNIH ELIJSKIH NOSA A NA BAZI VISOKOPOROZNIH HIDROKSIAPATITA I NJIHOV UTICAJ NA TKIVNO INŽENJERSTVO KOSTI

Tkivno inženjerstvo koštanog tkiva se u ovom veku razvilo u jedno od glavnih polja istraživanja u regenerativnoj medicini. Ono predstavlja alternativni pristup u odnosu na konvencionalne koštane transplantate. Osnovni cilj ove vrste terapije je da popravi, regeneriše i rekonstruiše oštećeno ili bolesno tkivo. Osnovu tkivnog inženjerstva čine elijski nosa i koji predstavljaju razne vrste biomaterijala sposobnih da učestvuju u regeneraciji koštanog tkiva. Veliki broj materijala je istraživan i analiziran sa ciljem da se koristi kao elijski nosa na koji bi mogle da se zasejavaju ćelije. Elijanski nosa koji bi tim ćelijama omogućio rast, proliferaciju i njihovo unošenje u defekte kosti nakon čega bi novostvoreno tkivo preuzimalo strukturu i funkciju obolelog dela tkiva. Hidroksiapatiti i drugi kalcijum fosfatni materijali imali su široku upotrebu kao koštani zamenci više od dve decenije. Zbog loših mehaničkih osobina poroznih hidroksiapatita došlo je do ograničenja njihove primene. U slučaju kada se kombinuju u kompozitne materijale sa odgovarajućim polimer/biopolimer tankim filmovima, porozni hidroksiapatiti dobijaju optimalne osobine potrebne elijanskom nosa, koje mogu pružiti odlične uslove za infiltraciju, rast i aktivnost ćelija neophodnih u tkivnom inženjerstvu kosti.

Osnovni cilj doktorske disertacije bio je izvršiti karakterizaciju, ispitati biokompatibilnost i biofunktionalnost poroznog hidroksiapatita dobijenog modifikovanom hidrotermalnom metodom (pHAP), poroznog hidroksiapatita dobijenog modifikovanom hidrotermalnom metodom u kombinaciji sa PLGA (pHAP+PLGA) i poroznog hidroksiapatita dobijenog modifikovanom hidrotermalnom metodom u kombinaciji sa metforminom (pHAP+metformin).

Istraživanje je podrazumevalo karakterizaciju ispitivanih materijala uz pomoć Fourier transform infracrvene spektroskopije (FTIR), metodom rentgen difrakcije (XRD), metodom atomski forsirane mikroskopije (AFM), analizom skenirane elektronske mikroskopije (SEM) i BET metodom. Biokompatibilnost je ispitivana pomoću MTT testa (indirektni kontakt ispitivanih materijala sa elijanskom kulturom L 929 fibroblasta), LDH testa (direktni kontakt ispitivanih materijala sa elijanskom kulturom L 929 fibroblasta) i testom kutane iritacije. Biofunktionalnost ispitivanih materijala bila je istraživana njihovom implantacijom u defekte kritične veličine od 6 mm u predelu kalvarije kunića. Nakon 12 nedelja životinje su bile žrtvovane, a uzorci tkiva su obrađeni za patohistološku analizu. Optičkom mikroskopijom kvantitativno i kvalitativno obrađivani su sledeći parametri: veličina defekta, prisustvo džinovskih ćelija, prisustvo neoangiogeneze, prisustvo bazofila, postojanje znakova nespecifičnog zapaljenja u tkivu, pojava novostvorene kosti, prisustvo fibroplazije u tkivu i procenat mineralizacije.

Rezultati istraživanja pokazuju da su ispitivani elijski nosa i bili savršeno dizajnirani i da su imali idealnu morfologiju površine koja je uticala na na in deponovanja hidroksiapatita kao i na aktivnost površine materijala neophodne za elijske nosa e. Ispitivani materijali pokazali su postojanje citotoksi nosti u indirektnom kontaktu sa kulturom elija, ali i da su njihove površine u direktnom kontaktu sa kulturom elija pogodne za adheriranje elija i za njihovu proliferaciju i da se odlikuju karakteristikama koje omogu avaju rast elija. Rezultati testa kutane iritacije pokazali su da ni jedan od ispitivanih materijala ne izaziva iritaciju i da se mogu smatrati neiritiraju im pa su iz tog razlog pogodni za primenu u *in vivo* uslovima. Porozni hidroksiapatit i kompozitni elijski nosa pHAP sa PLGA doveo je do stvaranja nove kosti uz zna ajno prisustvo mineralizacije u defektima kriti ne veli ine kalvarije kuni a. pHAP sa PLGA se pokazao, na osnovu ovog istraživanja jednak, a po nekim parametrima i bolji od primenjenog zlatnog standarda BioOss-a. pHAP sa metforminom nije pokazao o ekivane rezultate.

Istraživanje je pokazalo da pHAP sa PLGA u daljim eksperimentima može da posluži kao osnova za dobijanje elijskog nosa a u tkivnom inženjerstvu kosti i da omogu i vezivanje osteoblasta ili nekog od prekursora osteoblasta, njihov rast i diferencijaciju.

Ključne reči: tkivno inženjerstvo kosti, elijski nosa i, porozni hidroksiapatit, polilaktidkoglikolid, metformin

Nau na oblast: Stomatološke nauke

Uža nau na oblast: elijski nosa i

UDK broj: 615.46:616.71-003.93(043.3)

BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE COMPOUND SCAFFOLDS BASED ON HIGHLY POROUS HYDROXYAPATITE AND THEIR INFLUENCE ON BONE TISSUE ENGINEERING

Since the beginning of this century the bone tissue engineering has developed into one of the essential research fields in reconstructive medicine, as an alternative approach compared with the conventional bone transplants. The main objective of this kind of therapy is to repair, regenerate and reconstruct the damaged or disease-stricken tissue. Tissue engineering is based on scaffolds which are of various biomaterials capable of participating in the process of bone tissue regeneration. A great number of materials has been researched and analyzed so as to be used as a scaffold for cell seeding. Therefore, the scaffold would enable those cells to grow, proliferate and penetrate the bone defects, whereupon the new tissue would take over the structure and function of the damaged tissue. Hydroxyapatites and other calcium phosphate materials were widely used as bone replacements for more than two decades. However, the poor mechanical features of porous hydroxyapatites led to their limited use. In case when they are combined into the compound materials together with polymer/biopolymer thin films, the porous hydroxyapatites acquire optimal characteristics required by scaffolds, which can offer excellent conditions for cell infiltration, growth and activity which is necessary in bone tissue engineering.

The main objective of the doctoral dissertation was to carry out the characterization, examine the biocompatibility and biofunctionality of porous hydroxyapatite created by the modified hydrothermal method (pHAP), porous hydroxyapatite created by the modified hydrothermal method in combination with PLGA (Phap + PLGA) and porous hydroxyapatite created by the modified hydrothermal method in combination with metformin (pHAP + metformin).

The research included the characterization of the tested materials by means of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction method (XRD), atomic force microscopy method (AFM), scanning electron microscopy analysis (SEM) and BET method. Biocompatibility was examined by MTT test (indirect contact of the tested materials with the cell culture L 929 fibroblasts), LDH test (direct contact of the tested materials with the cell culture L929 fibroblasts) and test of local effects on skin in rabbits. Biofunctionality of the examined materials was researched by their implantation into defects of critical size of 6mm in the region of parietal bone in rabbits. After 12 weeks the animals were sacrificed, and tissue samples were prepared for pathohistological analysis. By means of the optical microscopy the following parameters were determined both quantitatively and qualitatively: the size of the defect, the presence of giant cells, the presence of neoangiogenesis, the presence of basophils, the presence of nonspecific inflammation in the tissue, the appearance of the newly created bone, the presence of fibroplasia in the tissue and the percentage of mineralization.

The results showed that the examined scaffolds were perfectly designed and they had the ideal surface morphology which had an impact on how the hydroxyapatite deposit as well as on the material surface activity necessary for scaffolds. The examined materials indicated the presence of cytotoxicity in indirect contact with cell culture, but also showed that their surfaces, in direct contact with cell culture, are suitable for cell adhering and their proliferation, and furthermore, they have features which enable the cell growth. The results of the test of local effects on skin in rabbits, showed that none of the examined materials causes irritation and can be considered as non-irritating, so due to that fact they are suitable for *in vivo* application. The porous hydroxyapatite and compound scaffold pHAP with PLGA led to the creation of the new bone together with considerable presence of mineralization in critical sized defects. According to this research, pHAP with PLGA has proved to be equal, and to certain parameters, even better than the applied BioOss^R golden standard. pHAP with metformin did not show expected results.

The research has shown that, in further experiments, pHAP together with PLGA can be the basis for generating the scaffold in bone tissue engineering and provide settlement of osteoblasts or any of osteoblast precursors, their growth and differentiation.

Key words: bone tissue engineering, scaffolds, porous hydroxyapatite, poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), metformin

Scientific field: Dentistry

Scientific field Specialized: Scaffolds

UDC: 615.46:616.71-003.93(043.3)

SADRŽAJ

1.UVOD	1
2.PREGLED LITERATURE	3
2.1. KOŠTANO TKIVO	3
2.1.1. GRAĐA KOSTI	3
2.1.2. STRUKTURA KOŠTANOG TKIVA	3
2.1.3. SASTAV KOŠTANOG TKIVA	4
2.1.4. KOŠTANO ZARASTANJE	6
2.1.4.1.PRIMARNO ZARASTANJE KOŠTANOG TKIVA	6
2.1.4.2.SEKUNDARNO KOŠTANO ZARASTANJE	7
2.2.ZAMENICI KOŠTANOG TKIVA	7
2.2.1.AUTOGENI ZAMENICI KOSTI	9
2.2.2.ALOGENI ZAMENICI KOSTI	10
2.2.2.1. Zamrznuta kost	10
2.2.2.2. Zamrznuta sušena kost	10
2.2.2.3.Demineralizovana zamrznuta sušena kost	11
2.2.2.4.Deproteinizovana kost	11
2.2.3.KSENOGENI ZAMENICI KOSTI	11
2.2.4.ALOPLASTI NI ZAMENICI KOSTI	11
2.2.4.1.Biokeramike	12
2.2.4.2.Aloplasti ni materijali na bazi silicijuma	13
2.2.5.FAKTORI RASTA	13
2.2.6.SMEŠE	13
2.3.TKIVNO INŽENJERSTVO	14
2.3.1.DEFINICIJA	14

2.3.2.OSNOVNI PRINCIPI	14
2.3.3.TKIVNO INŽENJERSTVO KOSTI	16
2.3.3.1.KOMPONENTE TKIVNOG INŽENJERSTVA KOSTI	16
2.3.3.1.1.Osteogene elije	16
2.3.3.1.2.Osteoinduktivne susptance - faktori rasta	17
2.3.3.1.2.1..Metformin	19
2.3.3.1.3. elijski nosa i	20
2.3.3.2.MATERIJALI U TKIVNOM INŽENJERSTVU KOSTI	24
2.3.3.2.1.Podela biokerami kih materijala	25
2.3.3.2.2.Porozni hidroksiapatiti (pHAP)	25
2.3.3.2.3.Kompozitni materijali	37
2.3.3.4.SAVREMENI KONCEPTI KONSTRUKCIJE SKAFOLDA	32
3.CILJEVI ISTRAŽIVANJA	35
4.MATERIJAL I METODOLOGIJA	37
4.1.TESTIRANI MATERIJALI	37
4.1.1.Karakterizacija	38
4.2.ISPITIVANJE DIREKTNE I INDIREKTNE CITOTOKSI NOSTI	
ANALIZIRANIH JEDINJENJA	40
4.2.1.Ispitivanje indirektne citotoksi nosti	40
4.2.2.Ispitivanje direktne citotoksi nosti	43
4.3.ISPITIVANJE BOKOMPATIBILNOSTI: TEST PRIMARNE KUTANE	
IRITACIJE	44
4.3.1.Test materijali (Test uzorci):	44
4.3.2.Eksperimentalne životinje	44
4.3.3.Eksperimentalni protokol	45

4.3.4. Statisti ka analiza	47
4.4. ISPITIVANJE BIOFUNKCIONALNOSTI: IN VIVO PREDKLINI KI TESTOVI NA ANIMALNOM MODELU	48
4.4.1. Subjekti	48
4.4.2. Testirani materijali	49
4.4.3. Test procedura	49
4.4.3.1. Anestezija	49
4.4.3.2. Randomizacija	49
4.4.3.3. Hirurška procedura	50
4.4.4. Preparacija tkiva	51
4.4.5. Obrada tkiva za patohistološku analizu	51
4.4.6. Histološko ocenjivanje	52
4.4.7. Statisti ka analiza	53
5. REZULTATI	54
5.1. SINTEZA ESTICA HIDROKSIAPATITA, KERAMI KIH HIDROKSIAPATITNIH ELIJSKIH NOSA A I NOSA A SA INFILTRIRANIM TANKIM FILMOVIMA POLIMERA	54
5.1.1. Karakterizacija HA praha	56
5.1.1.1. XRD analiza	56
5.1.1.2. Infracrveni spektar hidrotermalno dobijenog HA	57
5.1.1.3. AFM analiza	58
5.1.1.4. SEM analiza	59
5.1.1.5. BET analiza	60
5.1.2. Karakterizacija HA skafolda	60
5.1.2.1. Makroskopska razmatranja	60

5.1.2.2. AFM i SEM analiza	60
5.1.2.3. FTIR analiza	64
5.1.2.4. XRD analiza	65
5.1.2.5. SEM analiza Phap sa PLGA	66
5.2. REZULTATI ISPITIVANJA DIREKTNE I INDIREKTNE CITOTOKSI NOSTI ANALIZIRANIH MATERIJALA	67
5.2.1. Ispitivanje citotoksi nosti – <i>indirektni kontakt</i> ispitivanog materijala sa elijskom kulturom - MTT test	67
5.2.2. Ispitivanje citotoksi nosti – <i>direktni kontakt</i> ispitivanog materijala sa elijskom kulturom - LDH test	81
5.3. TEST PRIMARNE KUTANE IRITACIJE	85
5.3.1. Sistemska reakcija podnošljivost - tolerancija	85
5.3.2. Lokalna reakcija	85
5.3.2.1. Efekat pHAP	85
5.3.2.2. Efekat pHAP + metformin	86
5.3.2.3. Efekat pHAP + PLGA	87
5.3.2.4. Efekat mle ne kiseline (98%) – pozitivna kontrola	88
5.4. ISPITIVANJE BIOFUNKCIONALNOSTI: IN VIVO PREDKLINI KI TESTOVI NA ANIMALNOM MODELU	91
5.4.1. Opis i karakteristike uzorka	91
5.4.2. Veli ina defekta	92
5.4.3. Prisustvo nespecifi nog zapaljenja	96
5.4.4. Prisustvo džinoviskih elija	101
5.4.5. Novostvorena kost	105
5.4.6. Prisustvo fibroplazije	110

5.4.7.Neoangiogeneza	114
5.4.8.Procenat mineralizacije	117
5.4.9.Prisustvo bazofila	122
6.DISKUSIJA	125
6.1. DISKUSIJA MATERIJALA	125
6.2.DISKUSIJA TESTOVA INDIREKTNE I DIREKTNE CITOTOKSICITETI ISPITIVANIH MATERIJALA	129
6.2.1.Diskusija indirektnog kontakta ispitivanih materijala sa elijskom kulturom	130
6.2.2.Diskusija direktnog kontakta ispitivanih materijala sa elijskom kulturom	132
6.3.DISKUSIJA TESTA IRITACIJE	134
6.4.DISKUSIJA TESTA BIOFUNKCIONALNOSTI NA ANIMALNOM MODELU	135
7.ZAKLJUČAK	143
8.LITERATURA	145

1.UVOD

Problem gubitka koštanog tkiva je predmet izuavanja razli itih oblasti medicinskih nauka, sa zajedni kim ciljem da se omogu i njegova nadoknada. U oblasti oralne i maksilofacijalne hirurgije, nadoknada koštanih defekata nastalih nakon operacija tumora, cista, kominutivnih fraktura kostiju lica i vilica, kao i nakon infekcija koštanog tkiva, predstavlja poseban izazov s obzirom da osim funkcionalnog ima i estetski zna aj za pacijenta. vrsti zamenici kosti koji se koriste u cilju nadoknade defekata koštanog tkiva su implantacioni ili transplantacioni materijali, humanog, životinjskog ili sintetskog porekla koji mehanski popunjavaju defekte kosti a sa svojim osteokonduktivnim, osteoinduktivnim i osteogenetskim karakterom omogu avaju bolje zarastanje. Zamenici kosti se dele na autogene, alogene, ksenogene, aloplasti ne zamenike, faktore rasta i kompozite, odnosno kombinacije više zamenika razli itih vrsta. Ni jedan od navedenih koštanih zamenika u funkciji nadoknade i regeneracije koštanog tkiva nije se pokazao kao idealan. U poslednjoj deceniji intenzivno se razvija nova grana medicine, tkivno inženjerstvo. Terapijski pristup trajne zamene obolelog tkiva sinteti kim materijalima, u mnogim poljima potisnut je elijskom ili genskom terapijom ili razli itim metodama tkivnog inženjerstva.

Tkivno inženjerstvo koštanog tkiva se u ovom veku razvilo u jedno od glavnih polja istraživanja u regenerativnoj medicini. Procenjuje se da svake godine u svetu oko milion pacijenata ima potrebu za razne tretmane koštanih defekata. Tkivno inženjerstvo kosti predstavlja alternativni pristup u odnosu na konvencionalne koštane transplantate. Osnovni cilj tkivnog inženjerstva je da popravi, regeneriše i rekonstruiše ošte eno ili boleš u zahva eno tkivo. Osnovu tkivnog inženjerstva ine elijski nosa i koji predstavljaju razne vrste biomaterijala sposobnih da u estvuju u regeneraciji koštanog tkiva.

Predmet doktorske disretacije je ispitivanje biološke aktivnosti kompozitnih elijskih nosa a na bazi visokoporoznog hidroksiapatita kao i njihov uticaj na tkivno inženjerstvo koštanog tkiva koriš enjem aktuelne i objektivne metodologije. U kratkoj ali bogatoj istoriji tkivnog inženjerstva kosti, veliki broj materijala je istraživan i analiziran sa ciljem da se koristi kao elijski nosa na koji bi mogle da se zasejavaju elije. elijski nosa koji bi tim elijama omogu io rast, proliferaciju i njihovo unošenje

u defekte kosti nakon čega bi novostvoreno tkivo preuzimalo strukturu i funkciju obolelog dela tkiva. Hidroksiapatiti i drugi kalcijum fosfatni materijali imali su široku upotrebu kao koštani zamenici više od dve decenije. Zbog loših mehaničkih osobina poroznih hidroksiapatita došlo je do ograničenja njihove primene. U slučaju kada se kombinuju u kompozitne materijale sa odgovarajućim polimer/biopolimer tankim filmovima, porozni hidroksiapatiti dobijaju optimalne osobine potrebne elastičnim nosačima, koje mogu pružiti odlične uslove za infiltraciju, rast i aktivnost elija neophodnih u tkivnom inženjerstvu kosti.

2.PREGLED LITERATURE

2.1.KOŠTANO TKIVO

Kost je dinamično visoko vaskularizovano tkivo sa jedinstvenom sposobnošću da zarasta i remodeluje se bez ostavljanja ožiljaka(1,2). Koštano tkivo obezbeđuje mehaničku stabilnost skeletu koja mu je potrebna zbog opterećenja, kretanja i zbog zaštite vitalnih organa. Kost služi i kao rezervoar mineralnih materija i ima važnu ulogu u homeostazi kalcijuma u organizmu. Koštana srž je mesto gde se stvaraju eritrociti, pojedine vrste leukocita i trombociti. Zahvaljujući svojoj složenoj građi kost je u stanju da odgovori na ovako različite funkcionalne zahteve koje ima u organizmu koji menjaju.

Dobro razumevanje strukture i fizičkih komponenti koštanog tkiva je preduslov za razumevanje procesa tkivnog inženjersva kosti.

2.1.1.GRAĐA KOSTI

Na makroskopskom nivou koštano tkivo je organizovano kao:

- trabekularna kost - sistem građine spongiozne kosti, visoko porozna, sa visokom koncentracijom krvnih sudova i krvotokom, niske gustine sa slabim mehaničkim osobinama
- kompaktna kost - sistem građine kortikalne kosti, vrlo malo porozna, sa malo krvnih sudova i krvotokom, visoke gustine, odličnih mehaničkih osobina

U zavisnosti od međusobnog odnosa spongiozne i kompaktne kosti kao i po njihovom spoljašnjem izgledu kosti koje sačinjavaju skelet dele se na:

- cevaste ili tubularne kosti
- kratke kosti
- pljosnate kosti
- duge kosti

2.1.2.STRUKTURA KOŠTANOG TKIVA

Kost se strukturno deli na periost, korteks, endost i medularni kanal.

Periost je membranozni omota spoljne površine kosti, slabo vezan za nju osim na mestima pripoja tetiva, miši a i zglobnih kapsula. Sastoji se od spoljašnjeg i unutrašnjeg sloja. Spoljašnji sloj je fibrozna, vrš i i bogat krvnim sudovima i nervnim završecima. Unutrašnji sloj sadrži veliki broj osteogenih elija koji obezbeuju apofizni rast kosti. Periost je vezan za korteks pomoću u Sherpey-evih vlakana.

Korteks predstavlja kompaktnu kost i čini ga osnovna jedinica osteon ili Haversov sistem. Osteon je cilindričnog oblika dijametra od 200 do 250 μm paralelno postavljen sa osovinom kosti i sastoji se od 5 do 20 koncentričnih porećnih koštanih lamela debljine 3 do 7 μm u njem se centru nalazi neuro-vaskularni kanal Havers-ov kanal(3). U osteonu se paralelno sa lamelama nalaze osteociti, tako e kružno postavljeni oko Havers-ovog kanala, međusobno povezani citoplazmatičnim produžecima. Iz periosta u Haversov kanal prodiru krvni sudovi kroz transverzalne nutritivne Volkmanove kanale.

Endost je tanak sloj elijsko-vezivnog tkiva koji učestvuje u procesima osteogeneze i hematopoeze.

Medularni kanal ograničava spongioznu kost, a samo spongiozno tkivo sa injavaju međusobno povezane i ukrštene trabekule koje ograničavaju sistem lakuna ispunjenih koštanom srći.

2.1.3.SASTAV KOŠTANOG TKIVA

Koštano tkivo se sastoji od:

- koštanih elija
- međusobno povezane elijske supstance kosti

Postoje tri tipa koštanih elija:

Osteoblasti - mononuklearne, specijalizovane, ne terminalno diferencirane elije porekla mezenhimalnih matičnih elija, sa naglašenom anaboličkom aktivnošću, veličine oko 30 μm i sa jedrom okruglog oblika koje je ekscentrično postavljeno(4). Produkuju osnovne sastojke organskog matriksa koštanoć tkiva: proteinske molekule, od kojih se u ekstracelularnom prostoru stvaraju kolageni fibrili, zatim mukopolisaharide, alkalnu fosfatazu, osteokalcin i osteonektin. Imaju uticaja na regulaciju aktivnosti osteoklasta.

Osteociti - najbrojnije elije u koštanom tkivu i predstavljaju terminalno diferentovane osteoblaste. To su okrugle i tamne elije koje se nalaze okružene koštanim lamelama koje me usobno i sa okolnom supstancom komuniciraju citoplazmatičnim produžecima. Njihova osnovna uloga je održavanje homeostatske regulacije minerala iz kosti, pre svih kalcijuma i fosfora. Smatra se da deluju kao mehanosenzorne elije koje upućuju osteoklaste gde i kada da resobuju kost i aktiviraju osteoblaste gde i kada da stvore kost(4).

Osteoklasti - mnogojedarne džinovske elije, porekla hematopoeznih matičnih elija, veličine do 100 μm, čiji je osnovni zadatak resorpcija kosti. Osteoklasti poseduju jedinstven i efikasan mehanizam razlaganja neorganskog dela matriksa kosti organskim kiselinama i organskog dela matriksa kosti proteolitičkim enzimima (5). Zajedno sa ostalim elijama učestvuje u održavanju homeostaze koštanog tkiva. Mesta aktivnosti osteoklasta karakteriše prisustvom koštanih lakuna - Howship-ove lakune.

Među elijska supstanca predstavlja kompleksan matriks koji se sastoji od:

Neorganska mineralizovana komponenta - sastoji se od mineralnih soli koje se u kostima javljaju u heksagonalnoj kristalnoj formi hidroksiapatita ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$) dimenzija 50 nm x 25 nm x 2,5 nm(6). Po sastavu mineralnu kost čini 85% kalcijum i fosfor, 10% kalcijum karbonat, 5% kalcijum hlorid i magnezijum sulfat i u neznatnim količinama soli natrijuma, kalijuma. Mineralna komponenta kosti odgovorna je za tvrdoću koju koštano tkivo poseduje.

Organska nemineralizovana komponenta - Najveći deo, oko 95% organskog sastava među elijske supstance, čine tip I kolagena vlakna. Makromolekule aminokiselina koje se stvaraju u osteoblastima izlaze u ekstralcelularni prostor gde se pod dejstvom enzima organizuju u kolagene fibrile(7). Na nanostrukturnom nivou kolageni fibrili sastoje od po tri međusobno u heliks uvijena kolagena molekula dužine 1000 aminokiselina. Organsku komponentu čine i glikoproteini, proteoglikani i sijaloproteini koji igraju važnu ulogu u rastu i diferencijaciji osteoblasta, osteocita i osteoklasta kao i u procesu remodelacije kosti(8). Organska komponenta kosti je odgovorna za elastična svojstva koštanog tkiva.

2.1.1.4.KOŠTANO ZARASTANJE

Koštano tkivo poseduje regenerativni kapacitet zahvaljujući i tome što se štiti od povreda koje mogu umanjiti funkciju skeleta. Tako je ovaj regenerativni kapacitet koštanog tkiva, kao sposobnost remodelovanja, aktivan je tokom razvoja skeleta kao i u odrasloj dobi vrši i njegovu stalnu adaptaciju neophodnu zbog konstantnih izmena uslova i novih zahteva koji se postavljaju ovom tkivu(9). Remodelovanje kosti predstavlja dobro organizovanu seriju bioloških događaja koji dovode do indukcije i kondukcije kosti, uključujući i veliki broj intra i ekstra elijskih molekularnih signala. Remodelovanje kosti je precizno prostorno i vremenski definisano a sve sa ciljem da se na optimalan način kost regeneriše i da se skeletu vrati željena funkcija(10). Za razliku od mekih tkiva koja zarastaju stvaraju i ožiljno tkivo, kost zarasta bez ožiljka stvarajući i novu kost.

Zarastanje koštanog tkiva, ili premošćavanje oštećenog dela koštanog tkiva do potpunog uspostavljanja anatomskog i funkcionalnog integriteta kosti odvija se na dva načina(1):

- primarno koštano zarastanje
- sekundarno koštano zarastanje

Način zarastanja oštećenog koštanog tkiva osim od vrste, težine i primenjenih terapijskih metoda zavisi i od individualnih faktora kao što su: starosna dob, poremećaji metabolizma, hronična oboljenja, lokalna prokrvljenost, ranije primenjena zračenja na terapiju, prisustvo osteoporoze i drugo.

2.1.4.1.Primarno zarastanje koštanog tkiva

Zarastanje na ovaj način moguće je jedino u posebnim uslovima, odnosno uz pomoć kompresivne osteosinteze, kada su koštani fragmenti egzaktno reponirani i spojeni pod aksijalnim pritiskom u stanju potpunog mirovanja. U navedenim uslovima mezenhimalne ćelije Haverzovih kanala ekspresuju dominantno osteoblastnu diferencijaciju što omogućava sintezu osteoidnog matriksa koji ispunjava frakturnu pukotinu.

2.1.4.2.Sekundarno zarastanje koštanog tkiva

Ovaj način zarastanja se najčešće sreće u kliničkoj praksi. U toku sekundarnog zarastanja, koštano tkivo prolazi putem ponovljene normalne fetalne osteogeneze, uključujući i intramembranoznu i enhondralnu osifikaciju. Isti molekularni i ćelijski mehanizmi koji regulišu hondrogenezu i osteogenezu, učestvuju i u koštanoj regeneraciji(12).

Sekundarno koštano zarastanje započinje neposredno nakon oštećenja koštanog tkiva pojavom hematoma u frakturnoj pukotini, subperiostalno i u okolini preloma. U koštanoj srži i u okolnom vaskularnom vezivnom tkivu nastaje aseptično zapaljenje koje dovodi do hiperemije i ćelijske migracije. Kao posledica reaktivne acidoze dolazi do demineralizacije u regiji frakturne linije, dok aktivni osteoklasti uklanjaju frakturne nekrotične ivice što rezultira proširenjem frakturne pukotine. U hematoma i frakturnu pukotinu prodiru mezenhimalne stem ćelije poreklom iz kambijalnog sloja periosta i iz koštane srži(13), koje premoštavaju pukotinu, umnožavaju se i diferenciraju kao odgovor na prisustvo faktora rasta i citokina iz trombocita, susednih ćelija i tkiva, stvaraju i hrskavičavi skafold ili predkalus. Stvoreni hondrociti prelaze iz proliferativne u hiperplastičnu fazu kao i u fetalnom razvoju. Najveći broj hiperplastičnih hondrocita neminovno podleže apoptozi što je praćeno remodelovanjem ekstracelularnog matriksa novostvorenim kolagenim vlaknima a nakon toga i stvaranjem nove kosti - osteoidni kalus. Funkcionalnim opterećenjem frakturnog dela, novostvorena kost dobija formu lamelarne kosti.

2.2.ZAMENICI KOŠTANOG TKIVA

Najveći broj povreda koštanog tkiva zaraste uz pomoć standardnih konzervativnih ili hirurških metoda. Veliki defekti kosti koji nastaju nakon operacija tumora, cista, kominutivnih preloma, infekcija ili usled nezarastanja fragmenata frakturirane kosti zahtevaju složene procedure nadoknade koštanog tkiva uz pomoć koštanih zamenika. Koštani zamenici koji se koriste u cilju nadoknade defekata koštanog tkiva su implantacioni ili transplantacioni materijali, humanog, životinjskog ili sintetskog porekla koji mehanički popunjavaju defekte.

Oni na kost doma ina mogu reagovati u vidu etiri razli ita mehanizma(14):

- Osteokondukcija - ozna va rast koštanog tkiva apozicijom sa i na kost doma ina u prisustvu zamenika kosti
- Osteoindukcija - ozna va stimulaciju i aktivaciju mezenhimalnih mati nih elija iz okolnog tkiva koje migriraju prema koštanom zameniku, proliferišu u njegovom prisustvu i diferenciraju se u pravcu hondroblasta i osteoblasta koji e obezbediti formiranje kosti. Ovaj proces se omogu va uz pomo niza kaskadnih signala i aktiviranjem ve eg broja ekstra i intracelularnih receptora.
- Osteogeneza - ozna va sposobnost da se kost stvori ak i u odsustvu lokalnih osteoprogenitornih elija. Osteoprogenitorne elije se nalaze unutar zamenika koštanog tkiva, sposobne su da prežive proceduru implantacije, mogu da migriraju i da se diferenciraju u pravcu osteoblasta.
- Osteointegracija – ozna va premoš avanje koštanim tkivom izmedju površine kosti doma ina i površine koštanog supstituenta.

Osteokondukcija, osteoindukcija i osteogeneza su tri elementa koštane regeneracije koji rezultiraju osteointegracijom ili kona nim spajanjem izmedju koštanog zamenika i kosti doma ina.

Zamenici koštanog tkiva trebalo bi da budu(14): osteokonduktivni, osteoinduktivni, biokompatibilni, bioresorptivni, strukturno sli ni koštanom tkivu, laki za koriš enje i jeftini. Najve i broj koštanih zamenika koji su komercijalno dostupni u klini koj praksi odlikuju se osteokonduktivnoš u, razlukuju se u mehani kim svojstvima i imaju malu sposobnost osteoindukcije.

Prema aktivnostima koje poseduju zamenici kosti mogu se podeliti na(15):

- Autogena kost – organska materija koja formira kost putem osteogeneze, osteokondukcije i osteoindukcije
- Alograft – npr.demineralizovana zamrznuta sušena kost(DFDB), karakteriše se osteokonduktivnos u i osteoindukcijom
- Aloplasti ni materijali – sintetskog ili prirodnog porekla koji izazivaju osteokonduktivnu reakciju kosti doma ina

Prema svom poreklu, materijali koji se koriste kao zamenici kosti mogu se svrstati u dve kategorije(16):

- Humanog ili životinjskog porekla:
 - Živa (autograftovi)
 - Neživa (alografotovi, ksenografotovi)
- Sintetske materije(kerami ke materije, bioglas, polimeri itd)

Na osnovu koriš ene literature zamenici kosti se po vrsti mogu podeliti na:

- Autogene
- Alogene (zamrznuta kost, zamrznuta suva kost, demineralizovana zamrznuta suva kost, deproteinizovana kost)
- Ksenogene(naj eš e bovinog porekla)
- Alopasti ne zamenike kosti(keramika, polimeri i kompoziti)
- Faktori rasta(TGF, rekombinantne forme BMP, PDGF)
- Smeše - kombinacije više zamenika razli ite vrste

2.2.1.AUTOGENI ZAMENICI KOSTI

Autogeni zamenici kosti sadrže u sebi neorganski matriks, kao i neke žive postosteogenetske osteocite, osteoklaste, osteoblaste i sržne organske proteine neophodne za indukciju mezenhimalnih matirnih elija. Predstavljaju zlatni standard u hirurgiji nadoknade koštanih defekata i poseduju optimalne osteokonduktivne, osteoinduktivne i osteogenetske karakteristike neophodne za adekvatno zarastanje kosti(17). Poseduju zna ajnu primarnu stabilnost, u zavisnosti od veli ine i oblika, kao i od mesta sa koga se uzimaju. Mogu se koristiti u kombinaciji sa drugim zamenicima kosti, ime se smanjuje koli ina koštanog tkiva koje je potrebno za rekonstrukciju. U poslednjoj deceniji ustanovila se i nova tehnika rekonstrukcije koštanih tkiva vaskularizovanim koštanim autogenim graftovima koji se uzimaju sa razli itih lokacija: fibule, skapule, ilija nog grebena. Nakon podizanja ovakvog koštanog grafta koštani defekti se rekonstruišu koriste i se mikrovaskularnim tehnikama ime se postiže dobra vaskularizacija grafta nakon u injene transplantacije. I pored svega klini ka upotreba autogenih koštanih transplantata je ograni ena postojanjem traume u predelu davaju e regije, koja se pove ava sa pove anjem dimenzija neophodnog koštanog grafta(18).

Naj eš e komplikacije koje se dešavaju na donorskom mestu ovakvih koštanih graftova su hematomi, gubitak krvi, povrede nerava, pojava hernija, infekcije, povrede velikih arterija, prelomi, nestabilnost preostalih koštanih struktura, vidljivi defekti tkiva, transplantacije tumora kao i hroni ni bolovi. Njihova primena je limitirana i kod starijih osoba i kod dece.

2.2.2.ALOGENI ZAMENICI KOSTI

Alogeni zamenici kosti su supstituenti nastali uzimanjem uzoraka sa iste vrste, ali razli itog genotipa. Neophodna je dodatna obrada ovako dobijenog koštanog materijala u cilju redukcije imunog odgovora doma ina, ime se smanjuju biološka (osteoindukcija) i mehani ka svojstva grafta. I pored procesa obrade mogu nost prenošenja virusnih infekcija (HIV, hepatitis B i C), bakterijskih infekcija, malignih bolesti, autoimunih bolesti i toksina, je prisutna (14).

Prema na inu obrade postoje etiri vrste alogenih zamenika za kost:

- Zamrznuta kost
- Zamrznuta sušena kost
- Demineralizovana zamrznuta sušena kost
- Deproteinizovana kost

2.2.2.1. Zamrznuta kost

Uzima se sa kadavera i izlaže niskoj temperaturi na kojoj se uva do njegove primene. Osteogenetski potencijal je manji nego kod autogene kosti. Zra enjem zamrznute kosti redukuju se imunološke reakcije doma ina ali se time i smanjuje induktivni karakter ove kosti.

2.2.2.2.Zamrznuta sušena kost

Uzima se sa kadavera i sa živih osoba po striktno odre enim uslovima koje propisuje banka tkiva. Zamrzava se na -70C i suši se do 5% vode u tkivu uz prethodno ispiranje antibiotskim ratsvorima. Postoji manja opasnost od prenošenja virusnih infekcija nego kod zamrznute kosti, ali su osteoinduktivna i mehani ka svojstva mnogo manja u odnosu na zamrznutu kost.

2.2.2.3. Demineralizovana zamrznuta sušena kost

Ova vrsta zamenika za kost nastaje dekalifikacijom kortikalne kosti, kada se neorganski deo ukloni hemijskim putem, kiselinama, nakon čega se zamrzava. Takva obrada takođe redukuje mogućnost infekcije i potencijalne imunološke reakcije, ali pri tome ne eliminiše koštane faktore rasta, zbog čega je ova vrsta koštanog supstituenta više osteoinduktivna u odnosu na mineralizovane alogene materijale.

2.2.2.4. Deproteinizovana kost

U svojoj osnovnoj strukturi sadrži neorgansku komponentu kosti, mineralne soli u formi kristala hidroksiapatita. Postupak deproteinizacije podrazumeva termičku ili kombinaciju termičke i hemijske obrade. Ovi koštani supstituenti se karakterišu osteokonduktivnim načinom zarastanja kosti. Procesi dekalcinacije i deproteinizacije dovode do smrti ćelija jer je primarna osteogeneza smanjena.

2.2.3. KSENOGENI ZAMENICI KOSTI

To su zamenici nastali od druge vrste koji nakon obrade imaju osteokonduktivni karakter. U praksi se najčešće koriste ksenogeni zamenici kosti bovinog porekla. Zbog velikog antigenog potencijala neophodno je sprovesti postupak deproteinizacije termičkom obradom svežih materijala. U današnje vreme na ovim prostorima najčešće se koristi deproteinizovana bovina kost pod imenom "Bio-oss" Švajcarske firme Geistlich Pharme. To je materijal nastao deproteinizacijom bovine kosti poroznosti 75-80%. U zavisnosti od indikacija, ovaj materijal se može koristiti u vidu spongioznih ili kortikalnih granula dimenzija od 0,25 do 1 mm ili od 1 do 2 mm, kao spongiozni blok promera 1x1x2cm i kolageni blok sastavljen od 100mg spongioznih granula i 10% kolagena.

2.2.4. ALOPLASTI NI ZAMENICI KOSTI

Aloplasti ni zamenici kosti su sintetski materijali koji su pristupačni, biokompatibilni i bezbedni, tako da se mogu primeniti kao koštani supstituenti. Idealno sintetski koštani graftovi bi trebalo da budu kompatibilni, da pokazuju minimalnu fibroznu reakciju, da podležu remodelovanju i da podržavaju novostvorenu koštanu

formaciju(14). Sa stanovišta mehaničkih osobina sintetski zamenici kosti bi trebalo da imaju sličnu vrstu kao kortikalna ili spongiozna kost koju bi trebalo da zamenju. Nedostaci aloplastičnih materijala su: niska ili nepredvidiva resorpcija, teško rukovanje, povremeno izazivanje inflamatornih reakcija tipa "stranog tela"(19).

2.2.4.1. Biokeramike

Biokeramički materijali su sintetički zamenici za kost koji u svom sastavu imaju kalcijum fosfat. Trikalcijum fosfatna keramika ima stehiometrijske karakteristike slične amorfnim koštanim prekursorima dok je hidroksiapatit sličan mineralnom delu kosti. Pokazano je da izazivaju biološki odgovor sličan kao koštano tkivo i da su visoko biokompatibilni(20). Samostalno ne poseduju osteogene kao ni osteoinduktivne osobine. Osteoblasti intimno naležu na površinu ovih keramičkih materijala, formiraju koštano tkivo koje mineralizuje i koje je podložno kasnijoj remodelaciji. Obično se kombinuju sa drugim materijalima ili sa autogenom kosti, čime se postiže funkcionalnost i brža resorpcija.

Tečni kalcijum fosfat sastoji se od alfa trikalcijum fosfata koji se kombinuje sa kalcijum karbonatom i monokalcijum fosfatom. Priprema se u tečnoj formi i ubrizgava se u koštani defekt gde dobija vrstu formu bez oslobađanja toplote. Inicijalna vrsta ovih materijala po ubrizgavanju jednaka je vrsti i kortikalne kosti. Podležu remodelovanju i potpuno se zamenjuje novim koštanim tkivom.

Ultraporozni beta trikalcijum fosfat, je visokoporozni biokeramički materijal čija je poroznost preko 90% sa porama veličine od 1 do 1000 μm. Ima karakteristike trabekularne kosti koja omogućava fagocitnu aktivnost, resorpciju i infiltraciju osteoblastima i faktorima rasta. Visoka poroznost je neophodna za dobru vaskularizaciju i stvaranje novog koštanog tkiva. Kao i ostali keramički materijali ne poseduje osteoinduktivne i osteogenetske karakteristike.

Koralni hidroksiapatit je u osnovi hidroksiapatit dobijen iz prirodnih materijala, iz morskih koralata. Karakteriše se visokom poroznošću i sastoji se od hidroksiapatita koji je sličan humanoj kortikalnoj kosti(21). Mogu se koristiti i kao nosači za faktore rasta ili BMP(bone morphogenetic protein).

2.2.4.2. Aloplasti ni materijali na bazi silicijuma

Bioaktivno staklo je tvrd, solidan (neporozan) materijal koji se sastoji od kalcijuma, fosfora i silicijum dioksida. U zavisnosti da li dominira kalcijum oksid ili silicijum dioksid proizvodi se u te nam ili vrstom stanju. Posедуje osteokonduktivne i osteointegrativne karakteristike. Ima značajno veći udostinu od keramičkih materijala kao što je hidroksiapatit ali je sklon pucanju i teško ga je fiksirati za susednu kost. U novije vreme pojavila se bioaktivna keramika koja ima poboljšana mehanička svojstva u odnosu na bioaktivno staklo.

Glas jonomerni cementi (prvi put korišćeni u stomatologiji) sastoje se od kalcijum/aluminijum/fluorosilikatnog staklenog praha pomešanog sa polikarboksilnom kiselinom čime se stvara porozna cementna pasta. Pasta prelazi u vrsto stanje nakon 5 minuta nakon čega je nerastvorljiva u vodi. Nakon 24 sata ima karakteristike kortikalne kosti. Biokompatibilni su i osteointegrišu slično kao bioaktivno staklo. Porozna struktura obezbeđuje osteokondukciju i urastanje koštanih ćelija. Glas jonomer cementi su neresorptivi i ne zamenjuju se koštanim tkivom. Mogu se kombinovati sa antibioticima i visokomolekularnim proteinima koji se sporo oslobađaju u tkivima.

2.2.5. FAKTORI RASTA

Poseduju visoka osteoinduktivna svojstva i najčešće se koriste u kombinaciji sa nekim drugim zamenikom kosti u cilju rekonstrukcije koštanih defekata(22). Faktori rasta koji su najviše zastupljeni u rekonstrukciji koštanih defekata su: BMP (bone morphogenetic protein), TGF alfa i TGF beta (transforming growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), PRP (platelet rich plasma).

2.2.6. SMEŠE

Smeše predstavljaju kombinacije više zamenika različitih vrsta. Nastanak ovakvih kombinacija je rezultat potreba za korigovanjem nedostataka pojedinačnih zamenika sa ciljem da se iskoriste najbolje osobine svakog elementa u smeši ponaosob. Najčešće su stvarane smeše materijala sa osteokonduktivnim i osteointegrativnim svojstvima sa onima koji poseduju osteoinduktivna svojstva.

2.3.TKIVNO INŽENJERSTVO

2.3.1.DEFINICIJA

U poslednjoj deceniji intenzivno se razvija nova grana medicine, tkivno inženjerstvo. Terapijski pristup trajne zamene obolelog tkiva sinteti kim materijalima, u mnogim poljima potisnut je elijskom ili genskom terapijom ili razli itim metodama tkivnog inženjerstva. Na taj na in jedno od najvažnijih polja biomedicinskih istraživanja postaje regenerativna terapija.

Jednu od prvih definicija inženjerstva tkiva dali su Langer i Vacanti “ kao interdisciplinarnog polja koje primenjuje principe inženjerstva i nauke o životu na razvoj bioloških supstituenata koji restauriraju, održavaju i poboljšavaju funkcije tkiva i organa” (23). Tkivno inženjerstvo se zasniva na poznavanju procesa embriologije, sastava, funkcije i regeneracije tkiva.

Kombinacija živih elija, biološki aktivnih molekula i strukturiranih elijskih nosa a – skafolda koji formiraju konstrukciju za tkivno inženjerstvo u cilju obnove i regeneracije tkiva jeste naj eš i koncept kojim se danas objašnjava tkivno inženjerstvo(24). Tkivno inženjerstvo je neizostavni deo regenerativne medicine.

Inženjerstvo tkiva napredovalo je od koriš enja biomaterijala koji mogu popraviti ili zameniti obolelo ili ošte eno tkivo ka koriš enju 3D skafolda u kojima se elije zasejavaju pre implantacije. Sadašnji ciljevi inženjerstva tkiva su da kreira ili uvede formiranje specifi nog tkiva na specifi no mesto kroz selekciju i manipulaciju elijama, matricama i biološkim stimulansima. Ovi konstrukti živih elija mogu biti funkcionalno, strukturno i mehani ki uporedivi sa tkivima koje moraju da zamene.

2.3.2.OSNOVNI PRINCIPI

Tkivno inženjerstvo je zasnovano na postojanju tri osnovne komponente koje se ina e nalaze u osnovi svakog tkiva:

- elije
- ekstracelularni matriks i
- signalni sistem.

Funkcionalno tkivo može se razviti korišćenjem jedne ili više komponenti iz ove trijade. Kombinovanje postojećih znanja o interakciji molekula ekstracelularnog matriksa i postojećih saznanja o genskoj ekspresiji potrebnoj za indukovanje diferencijacije i specifičnog rasta određenih tkiva, pruža osnovu za prevođenje bazičnih naučnih saznanja u racionalni razvoj komponenti trijade tkivnog inženjerstva.

Dva osnovna pristupa su danas utvrđena u cilju proizvodnje tkiva metodom inženjerstva. Prvo, elijski nosači i skafoldi, mogu biti korišćeni kao potpora za elijsku kulturu, koja se zasejava na njima u *''in vitro''* uslovima. Elije se nakon toga stimulišu da se razmnožavaju i diferenciraju unutar matriksa elijskog nosača, formiraju i na taj način tkivo koje je spremno za transplantaciju. Drugi pristup podrazumeva korišćenje skafolda kao nosača faktora rasta ili lekova, tako da nakon implantacije u tkiva stimulišu elije iz tela domaćina da se umnožavaju i naseljavaju matriks skafolda formirajući novo tkivo na i unutar transplantiranog matriksa. Ova dva pristupa ne isključuju jedan drugog i mogu se međusobno kombinovati(26).

Nezavisno od tipa tkiva, elije, ekstracelularni matriks, krvni sudovi, nervi, mehanizmi elijske komunikacije i interakcija elija i matriksa između njih su samo neki od faktora koji utiču na rast i razvoj tkiva *''in vivo''*. Svaka od ovih komponenti ponaosob mora biti kombinovana u dobro koordinisanom sistemu i vremenski i prostorno. Pored toga, dobro razrađen hirurški plan implementacije, preduslov je za uspešnu *''in vivo''* aplikaciju koncepta tkivnog inženjerstva. Neophodno je pažljivo rukovanje kompleksnim tkivom dobijenim tkivnim inženjerstvom, zbog prevencije oštećenja osetljivih elija ili bioaktivnih supstanci tokom implantacije. U zavisnosti od tkiva koje se regeneriše, period *''in vitro''* gajenja novostvorenog tkiva varira od jednog dana do nekoliko meseci. Ovaj period se najčešće koristi za umnožavanje elija ili za indukovanje diferencijacije matičnih elija u specifična tkiva. U eksperimentalnim uslovima konceptom tkivnog inženjerstva uspešno su stvorena različita tkiva kao što su kost, hrskavica, jetra, mišić, koža i ostalo(25).

Korišćenje bioreaktora za dinamičko elijsko kultivisanje tkivnih inženjeriranih konstrukata treba da omogućiti razvoj strategije pogodnog i efikasnog zasejavanja elija da bi se postigla uniformna elijska distribucija unutar velikog skafolda, koja mehanički podržava elije i automatski kontroliše masu tkivne kulture.

2.3.3.TKIVNO INŽENJERSTVO KOSTI

Upotreba raznih koštanih zamenika u nadoknadi koštanih defekata sa različitim funkcionalno i estetski nedovoljno zadovoljavajućim rezultatima, nametnula je potrebu razvoja tkivnog inženjerstva kosti. U zavisnosti od toga koji deo koštano-skeletnog sistema se nadoknađuje koštano tkivo stvoreno tkivnim inženjerstvom može biti različitih karakteristika(18). Za nadoknadu defekata dugih cevastih kostiju primarno je postići i visoku mehaničku stabilnost dok inicijalno postignut oblik nije prioritet. Sa druge strane prilikom nadoknade defekata u kraniofacijalnoj regiji, primarno je postići i oblik kostiju koje se nadoknađuju, dok mehanička stabilnost, iako potrebna, nije tako neophodna kao u slučaju nadoknade cevastih kostiju. U zavisnosti od mesta implantacije, inicijalna vaskularizacija može biti ključna za prihvatanje novostvorenog koštanog tkiva i prevenciju pojave infekcije.

Mehanička stabilnost, osteokondukcija (sposobnost materijala da omogući uvođenje tkiva koje stvara kost u defekt), osteoindukcija (sposobnost da se indukuje stvaranje koštanog tkiva i da se stimulišu osteoblasti doma i ina za stvaranje kosti), osteogeneza (sposobnost da se stvara koštano tkivo *de novo*) i lako rukovanje moraju biti u ravnoteži sa ciljem da se ispune sve potrebe za kliničkom upotrebom tkivnog inženjerstva koštanog tkiva(18).

2.3.3.1.Komponente tkivnog inženjerstva kosti

2.3.3.1.1.Osteogene elije

Osteogene elije su obavezan deo svake strategije tkivnog inženjerstva kosti(18). Ove elije ne predstavljaju homogenu elijsku populaciju(27). Danas je još uvek nepoznato koji tip osteogenih elija bi bio najpogodniji za tkivno inženjerstvo kosti. Ove elije se ili transplantiraju sa odgovarajućim skafoldom u koštani defekt ili pomoću osteoinduktivnih faktora bivaju privučene iz lokalnog tkiva doma i ina i naseljavaju postavljeni skafold. Glavni uspeh na ovom polju postiže se pomoću primarnih elija uzetih od pacijenta i zatim umnoženih i diferenciranih u matriksu elijskog nosača, skafolda, čime se stvara tkivo spremno za reimplantaciju.

Mezenhimalne stem elije, stromalne elije koštane srži, periostalne elije i osteoblasti podjednako su uspešno korišćene u stvaranju koštanog tkiva(18,28,29). Izolacija osteogenih elija, njihovo efikasno umnožavanje, posedovanje stabilnosti u osteogenom fenotipu, moguće stvaranje koštanog tkiva u *''in vivo''* uslovima i sigurnost u dužem vremenskom periodu, osnovni su preduslovi koji se moraju ispuniti da bi bilo koji tip osteogenih elija bile uspešne u kliničkoj primeni.

Klinička primena tkivnog inženjerstva kosti je već opisana. Quatro i saradnici tretirali su tri pacijenta sa velikim defektima tibije, ulne i humerusa koristeći visokoporozni hidroksiapatitni skafold na koji su zasejane i u *''in vitro''* uslovima umnožene stromalne elije koštane srži fiksirane kolagenim gelom. Svi pacijenti su se uspešno oporavili bez većih komplikacija. Vacanti i saradnici rekonstruisali su palac pacijenta koristeći periostalne elije u skafoldu od hidroksiapatita na bazi korala(30). Funkcija šake kod ovog pacijenta se značajno popravila mada je histopatološkom analizom otkriveno da je samo 5 % implantiranog tkiva bilo kost. Mezenhimalne stem elije zajedno sa trombocitima bogatom plazmom koji su postavljeni u skafoldu od beta trikalcijum fosfata indukovali su stvaranje koštanog tkiva kod operacije podizanja sinusa(31). Ishod ovih početnih kliničkih studija nije se pokazao znatno boljim u odnosu na standardne hirurške rekonstruktivne metode.

2.3.3.1.2. Osteoinduktivne supstance - faktori rasta

Prisustvo osteoinduktivnih supstanci u tkivnom inženjerstvu imaju izuzetan značaj sa stanovišta boljeg i usmerenijeg transporta signala sa elije na eliju i elijske međusobne komunikacije tokom procesa proliferacije *''keramičkog-koštanog''* skafolda(39). Faktori rasta imaju dvojak značaj. S jedne strane, oni se mogu posmatrati kao faktori, njihovim uvođenjem u strukturu skafolda, moguće je dodatno aktivirati i usmeriti elije na određene vrste međusobne signalizacije i proliferacije, koja uključuje u sebe i moguće mehanizme uspostavljanja aktivnih struktura, koje omogućuju bržu angiogenezu i proliferaciju krvnih sudova i nutrijenata, te na taj način pospešuju brži proces elijske proliferacije i rasta. S druge strane, oni daju informacije o stanjima tkiva i veoma su značajni sa stanovišta dijagnostike vezane za promene na tkivima u kontaktu sa implantiranim materijalom.

Osteoinduktivne supstance se klinički već koriste samostalno za rekonstrukciju koštanih defekata ili za ubrzanje procesa zarastanja na mestu frakturnih pukotina. U osteoinduktivne faktore koji se koriste u tkivnom inženjerstvu kosti spada BMP (bone morphogenetic protein), TGF alfa i TGF beta (transforming growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), PRP (platelet rich plasma), DBM (demineralised bone matrix) (16).

BMP pogotovo tipovi 2, 4 i 7 uveliko se koriste u većini slučajeva kao osteoinduktivne supstance u tkivnom inženjerstvu kosti(34). Pripada grupi faktora rasta bitnih za stvaranje i regeneraciju koštanog tkiva i dostupan je u različitim formama za kliničku upotrebu. Jedan od ograničavajućih faktora za primenu BMPa u tkivnom inženjerstvu jeste dužina njegovog prisustva na mestu regeneracije. U poslednje vreme ovaj problem se rešava kombinovanjem BMPa sa odgovarajućim skafoldima koji regulišu brzinu njegovog oslobađanja. Postoji nekoliko objavljenih predkliničkih studija o korišćenju BMPa i rekombinovanog humanog BMPa u regeneraciji koštanog tkiva, koji su u koncentrovanom obliku aplikovani u kombinaciji sa skafoldima, kompozitnim materijalima i gelovima. Studije su obuhvatale regeneraciju koštanih tkiva na animalnim modelima ulne, tibije, radijusa, femura i defekata kalvarije(35). Danas je primena rhBMPa odobrena za kliničke studije za augmentaciju poda sinusa. U tim studijama otkriveno je da i pored podjednako uspešnih rezultata u odnosu na korišćenje autologne kosti za augmentaciju sinusa, u slučajevima kada je korišćen rhBMP, novoformirana kost bila je veće gustine(36). Pored toga nisu se javljale parestezije, bolovi, nelagodnosti na mestu davanja i regije, koji nastaju u postupcima kada se koriste autograftovi(37).

Trombocitima bogata plazma(PRP) sadrži pored PDGFa(platelet derived growth factor) u zavisnosti od načina procesuiranja i aplikacije, različite faktore rasta(32). Dokazano je indukovanje stvaranja koštanih formacija u prisustvu PRPa u eksperimentalnim i kliničkim studijama. Zajedno sa različitim skafoldima omogućavaju migraciju osteogenih ćelija prema matriksu ćelija nosača.

Ograničene kliničke studije postoje i kada se koriste druge osteoinduktivne supstance u tkivnom inženjerstvu kosti. Uglavnom se zasnivaju na malim serijama pacijenata bez jasne kontrole i to većinom u kraniofacijalnim rekonstrukcijama.

Aplikacija i indikacija za primenu pojedinih osteoinduktivnih supstanci još nije standardizovana.

2.3.3.1.2.1..Metformin

Metformin je već duže vreme u medicini poznat kao oralni antidijabetik koji se ordinira insulin rezistentnim pacijentima sa dijabetesom tip 2. Smatra se da je to insulin senzitivni lek, koji smanjuje nivo glikemije bez povećanja sekrecije insulina(39). Dokazano je da metformin ima još nekoliko korisnih efekata na kardiovaskularni sistem kao što su regulacija koncentracije lipida u krvi, smanjuje sklonost ka intravaskularnoj trombozi smanjenjem koncentracije i aktivnosti inhibitora aktivnosti plazminogena 1, smanjuje agregaciju i adheziju trombocita i povećava aktivnost tkivnog aktivatora plazminogena i pojačava endotelnu disfunkciju(40). Nekoliko studija, kako *in vivo* tako i *in vitro* pokazuje da metformin deluje kroz aktivaciju tirozin kinaze(41) i aktivaciju AMP protein kinaze(AMPK) (42,43). AMPK fosforiliše multiple enzime koji su uključeni u više biosintetičkih puteva, kao što su na primer acetyl-CoA karboksilaza, hidrosimetilglutaril-CoA reduktaza, glikogen sintetaza i endotelijalna azot monoksid sintetaza (eNOS). Metformin poboljšava metabolizam glukoze aktivirajući i AMP protein kinazu(AMPK), koji sa druge strane učestvuje u povećanju količine endotelijalne azot monoksid sintetaze (eNOS) kao i BMP-2 (bone morphogenetic protein 2) (44,45,46). BMP-2 i eNOS učestvuju u diferencijaciji i mineralizaciji osteoblasta čime se objašnjava direktni osteogenetski potencijal metformina kod pacijenata sa dijabetesom(46,47). U kliničkom okruženju dijabetesne osteopenije i osteoporoze, ovi efekti prezervacije kosti kod pacijenata koji su uzimali metformin mogu biti vrlo značajni. Tada se došlo na ideju da bi metformin bio koristan ne samo kao lek kod pacijenata sa dijabetesom tip 2, već i kod pacijenata sa osteoporozom zahvaljujući njegovoj osobini da stimuliše stvaranje koštanog tkiva.

U prvim istraživanjima, koja su sprovedena poslednjih godina, dokazano je da metformin u okviru kompozitnih elijskih nosača u “*in vitro*” uslovima stimuliše formiranje kosti (48,49). Kao osteoinduktivna supstanca koja se može kombinovati sa elijskim nosačem ima, metformin se pokazao kao perspektivan u tkivnom inženjerstvu kosti.

2.3.3.1.3. elijski nosa i

Svako vitalno tkivo sastoji se od matriksa i elija. Matriks funkcionira kao biološki trodimenzionalni skafold za elije unutar tkiva i omogućava elijama adekvatno okruženje i arhitekturu specifičnu za svako tkivo ponaosob(38). Fiziološki on služi kao rezervoar za vodu, hranjive materije, citokine, faktore rasta i omogućava elijama da ih koriste. Tri glavna svojstva karakteristična za ovu kompleksnu mrežu matriksa koji postoji u tkivima, mogu se iskoristiti u svrhe tkivnog inženjstva: mehanička podrška, adhezija elija i učestvovanje u komunikaciji između elija(18,24).

Osnova tkivnog inženjstva predstavlja zasejavanje i razvoj elija na različitim nosa ima od biomaterijala, nakon čega se stvara novo tkivo. Biomaterijal koji se koristi u tkivnom inženjstvu mora izazvati specifičnu reakciju elija na molekularnom nivou. Trebalo bi da bude u interakciji sa elijama, odnosno da omogućiti njihovo pripajanje na svoju površinu, proliferaciju, diferencijaciju, produkciju ekstracelularnog matriksa i njegovu organizaciju. Iz tog razloga je selekcija biomaterijala kao elijskog nosa a ključna u tkivnom inženjstvu. Obično, mada nije neophodno, poželjno je da dođe do razgradnje ili rastvaranja biomaterijala tokom formiranja novog tkiva. Osim toga, biokompatibilnost materijala je najvažnija kod ovih procesa. Ključni uspeha biokompatibilnosti, bilo kog materijala, je postizanje fizičke i mehaničke funkcije, a bez izazivanja bilo kakve nepoželjne reakcije tkiva domaćina. Od biomaterijala koji se koristi kao elijski nosa , u tkivnom inženjstvu, očekuje se da izazove željenu reakciju domaćina.

Od elijskih nosa a koji se koriste u tkivnom inženjstvu očekuje se da određuju oblik novostvorenog tkiva i olakšaju poželjno ponašanje elija, njihovu migraciju na željeno mesto, njihov rast i diferencijaciju. elije zasejane na nosa mogu i spontano regenerirati tkivo, bez smernica koje potiču od nosa a. Međutim, uglavnom nosa u okviru svoje molekulske strukture poseduje ligande (funkcionalne grupe za vezivanje elija) koji bivaju prepoznati od strane elija, u odgovarajućem vremenskom trajanju i u odgovarajućoj količini. Ako elijske nosa e uzmemo kao primer, skoro da više nema smisla koristiti potpuno inertne materijale ili materijale koji nemaju strogo određenu aktivnost.

Površinske modifikacije igraju važnu ulogu u biomedicinskim uređajima, biosenzorima, biomaterijalima i implantima(50). U većini biomedicinskih primena,

površina je primarni agens koji dolazi u kontakt sa biomolekulima, telesnim fluidima, elijama i tkivima. Ona deluje kao pasivni i aktivni modulator detekcije, biokompatibilnosti i elijske adhezije. Zato je jedan od najvažnijih uslova za njihovu uspešnu primenu u biomedicini dobra kontrola i manipulacija između biotskih i abiotskih komponenata. To je kompleksno polje, koje je predmet studiranja dinamike bioloških procesa koji se odvijaju između bioloških komponenata i implantiranih površina. Mnoge hemijske tehnike su razvijene za površinsku modifikaciju keramike, metala, i sintetičkih polimera. Ovim modifikacijama, najčešće se modifikuju samo fizičko-hemijske osobine materijala, pri čemu površina ima pasivnu ulogu, deluju i kao neka vrsta fizičke barijere između tela i materijala. Sada se centar istraživanja sve više pomera ka razvoju aktivnih biomaterijala koji su odgovorni za elijska ponašanja i promene mikrookoline. Zato materijali koji se koriste kao elijski nosači, skafoldi, treba da budu funkcionalizovani sa biološkim ligandima, kao što su peptidi ili proteini pri čemu njihovo prisustvo treba da bude i prostorno i vremenski kontrolisano(51).

Za uspešno korišćenje biomolekula na modifikovanoj površini skafolda potrebna je izuzetna pažnja tokom procesa modifikacije, posebno kada se koriste biopolimeri na bazi peptida, koji daju brojne prednosti u odnosu na konvencionalne tehnike modifikacije, jer su takvi polimeri:

- biokompatibilniji sa elijama i tkivima od sintetičkih materijala
- lako u sebe ugrađuju biološki korisne ligande
- obezbeđuju precizniju kontrolu strukture i funkcija biopolimera, i
- biodegradibilniji su od sintetičkih polimera u većini slučajeva (52,53).

Skafold kao osnovni element konstrukcije tkivnog inženjerstva kosti, zahteva da bude integrisan sa okolnim koštanim tkivima i da omogući inicijalnu 3D mrežu na koju mogu da adheriraju i proliferišu elije, proizvode i proteine ekstracelularnog matriksa-ECM. Da bi to moglo biti realno realizovano, nužno je kreirati takve konstrukcije skafolda koje će u što je moguće većoj meri podražavati strukturu i morfologiju prirodne kosti. Struktura skafolda treba da je biokompatibilna i da je bliska dizajnu prirodnog ECM, tj. da poseduje veoma visoku poroznost sa međusobno povezanim porama u svim pravcima, da bi mogla da omogući rast elija i njihovu reorganizaciju i da ima hemiju površine, koja pospešuje vezivanje elija i njihovu diferencijaciju i proliferaciju. Uz to, takva struktura treba da poseduje dobre mehaničke osobine, da bi

omogu ili naseljavanje i razmnožavanje ćelija bez nepotrebnog pritiska unutar skafolda u *in vitro* uslovima, kao i da bi izdržala statičku i dinamičku naprezanja i fiziološka opterećenja u uslovima *in vivo*. Generalno gledano, struktura skafolda mora biti zadovoljavajuće vrstine, ne samo da se odupire promeni oblika zbog činjenice da živim ćelijama urastaju i naseljavaju njegove pore, već i zbog sila trakcije koje se javljaju u toku procesa zarastanja nakon aplikacije materijala sa ćelijama unutar defekta koji se nastoji rekonstruisati procesom tkivnog inženjerstva kosti(24). Ipak u toku *in vivo* faze, zbog postojanja eksterne ili interne fiksacije koji smanjuju aktivnost pacijenta koja bi mogla ugroziti proces zarastanja u toku ranog perioda oporavka, potreba za takvim mehaničkim osobinama skafolda može biti redukovana. Skafold treba da poseduje i kontrolisanu brzinu biodegradacije, koja je optimalno podešena u odnosu na brzinu stvaranja novog koštanog tkiva, koje zamenjuje skafold novom kosti. Velika pora, distribucija i struktura treba da budu takvi da mogu zadovoljiti specifične zahteve u primeni, od kojih jako zavisi ćelijska adhezija, proliferacija, depozicija matriksa kao i formiranje krvnih sudova unutar skafolda da bi se potpomogao rast tkiva. Svi ovi faktori zavise, u osnovi, u najvećoj meri od hemijskih i bioloških svojstava materijala od koga je izgrađen skafold, koštanih ćelija koje naseljavaju njegovu strukturu u *in vitro* ili *in vivo* uslovima i efikasnosti transfera signala između ćelija(50).

Skafold podržava ćelijsku kolonizaciju, migraciju, rast i diferencijaciju i esto vodi razvoju traženih tkiva ili deluje na stanišnu kao vezikule za isporuku lekova. Skafold napravljen od polimera, keramike ili kompozita, mora posedovati specifične karakteristike uključujući i visoku poroznost, visoku specifičnu površinu, strukturnu vrstovinu, specifični 3D oblik i biodegradabilnost(54) Principi inženjerstva koštanih tkiva poivaju na konstrukciji dovoljno aktivnih poroznih keramičkih struktura, dobro definisane morfologije njihovih zidova koja je kombinovana sa tankim filmovima odgovarajućih polimera ili/i biopolimera da bi se obezbedila dovoljno kvalitetna podloga za iniciranje rasta koštanih ćelija i za njihova skladna međusobna balansiranja kinetike procesa resorpcije materijala i formiranja nove kosti. U *in vitro* uslovima manja poroznost stimuliše osteogenezu smanjujući ćelijsku proliferaciju ali omogućavaju i veću ćelijsku agregaciju. Nasuprot tome, u *in vivo* uslovima visoka poroznost i velika pora rezultiraju u boljem urastanju koštanog tkiva. Prema ranim radovima, zaključeno je da je potrebna velika pora od minimum 100 µm, neophodna

za naseljavanje elija, njihovu migraciju i transport. Zbog potrebe za vaskularizacijom, dokazano je da je veličina pora utična na proces osteogeneze. Pore male veličine favorizuju hipoksične uslove i indukuju formiranje osteohondralne formacije pre nego što osteogeneza započne. Suprotno tome, skafoldi koji obiluju porama velikog promera, vrlo brzo se vaskularizuju i vode direktnoj osteogenezi(24). Preživljavanje elija unutar većih elijskih nosa a uveliko zavisi od veličine pora u njima(55). Eksperimentalnim markiranjem elija otkriven je značajan gubitak elija u toku prve nedelje od transplantacije poroznog bovinog koštanog matriksa pomešanog sa autolognim osteoblastima(56). Iz ovih razloga indukcija vaskularizacije predstavlja integralni element svakog uspešnog koncepta tkivnog inženjerstva kosti. U skorijim "in vitro" i "in vivo" istraživanjima, preporučuje se da veličina pora skafolda bude jednaka ili veća od 300 μm, sa objašnjenjem da su to optimalne veličine pora za zadovoljavaju u revaskularizaciju grafta (57,58).

Kost ima sposobnost remodelacije u uslovima fiziološkog opterećenja "in vivo". Na osnovu ovog fiziološkog procesa koji se odvija u koštanim tkivima, postoji potreba za kontrolom degradacije i kinetike resorpcije skafolda na taj način što se bioresorptivni elijski nosa zadržati svoja mehanička svojstva 3 do 6 meseci(1 do 3 meseca u "in vitro" sredini i 1 do 3 meseca na mestu regeneracije. Iz tog razloga matriks skafolda može postati da gubi svoja mehanička svojstva i da se metaboliše u telu, bez postojanja reakcije organizma na prisustvo stranog tela posle 12 do 18 meseci(59). Mehanička svojstva bioresorptivnog 3D skafolda u momentu implantacije moraju odgovarati mehaničkim svojstvima tkiva doma ina što je više moguće. Ono bi moralo posedovati dovoljnu čvrstinu i snagu koju mora zadržati dovoljno dugo dok koštano tkivo koje urasta potpuno ne zameni matriks skafolda koji polako nestaje. Degradacija i kinetika resorpcije materijala skafolda mora biti podešena tako da se elijama koje ga naseljavaju i umnožavaju se, omogućiti sekrecija i stvaranje ekstracelularnog matriksa u početnoj i aktivnoj fazi naseljavanja elijama(1 do 4 nedelja "in vivo"), dok materijal postepeno nestaje ostavljajući dovoljno prostora za rast novih elija i tkiva. Mehanička potpora od strane 3D skafolda trebalo bi da postoji sve dok tkivnim inženjerstvom novostvorena kost ne stekne ista ta svojstva tako da omogućiti samostalnu potporu za svoj dalji rast i razvoj. Kako matriks skafolda polako nestaje, sile kontrakcije koje nastaju na mestu implantacije tkiva i stres koji izazivaju, dovode do

smanjenja zapremine implantiranog tkiva u odnosu na zapreminu originalno postavljenog skafolda(60). Iz svih tih razloga, neophodno je u ''*in vitro*'' uslovima stvoriti konstrukciju skafold- elije koja e imati mehani ka svojstva sli na koštanom tkivu iju regeneraciju nameravamo da sprovedemo.

Da bismo mogli sa uspehom da realizujemo takve strukture potrebno je duboko razumevanje, geometrije njihove strukturne hijerarhije i razumevanje hemijskih i bioloških uslova njihovog samoorganizovanja u strukturu prirodne kosti. Veoma bitnu ulogu ima, ne samo poroznost, njena distribucija i ukupan zapreminski udeo unutar kerami kih nosa a/skafolda, nego i njena nanotopologija, izgled strukturnih elemenata koji formiraju njene zidove i njihov me usobni raspored, razvijenost površine, udeli aktivnih grupa koje pripadaju tankim polimernim, biopolimernim ili koloidnim filmovima nanetim na takve strukture da bi ih funkcionalizovali u željenom pravcu i tako inicirali aktivnost koštanih elija(50).

2.3.3.2.MATERIJALI U TKIVNOM INŽENJERSTVU KOSTI

Svi materijali koji se koriste u inženjerstvu koštanih tkiva dele se u etiri osnovne grupe: biokeramike, biopolimere, metale i kompozite(50). Svi oni koriste se u konstrukcijama vešta kih nosa a-skafolda, koji imaju ulogu da preuzmu na sebe, privremeno ili stalno, funkcije ošte enih koštanih tkiva. Za svaki od navedenih materijala, me u najvažnijim biološkim osobinama su osobine resorpcije materijala, njihova površinska aktivnost i biokompatibilnost.

Biokerami ki materijali, prirodni ili sinteti ki, koriš eni samostalno ili u kombinaciji sa polimerima, najpogodniji su od svih biomaterijala za tkivni inženjering tvrdih i mekih tkiva. Biokerami ki materijali se smatraju biokompatibilnim, tvrdim, sa relativno slabom otpornoš u na naprezanje, odli nom kompresivnom snagom, visokom otpornoš u na trošenje i sa pogodnim niskim frikcionim osobinama pri artikulaciji(24). Biokerami ki materijali imaju najve i zna aj, zbog svoje visoke efikasnosti u proliferaciji elija i resorpciji tokom vremena, koja je pra ena formiranjem nove prirodne kosti. U takve materijale spadaju: hidroksiapatit pomerene stehiometrije, biostakla, apatit-volastonitni kompoziti i -trikalcijum fosfat, koji su svojim sastavom i funkcionalnim svojstvima najbliži sastavu prirodne kosti. Ovi materijali mogu da obezbede okolinu u kojoj e ECM proteini biti adsorbovani, rezultuju i adhezijom

osteoblasta i znatno bržom proliferacijom nego kod bilo kog drugog materijala, uključujući i titan.

2.3.3.2.1. Podela biokeramičkih materijala

Biokeramički materijali se dele na(62):

- a) bioinertnu keramiku
- b) poroznu keramiku
- c) bioaktivnu keramiku – obuhvata biostaklo, bioaktivnu staklokeramiku i hidroksiapatit
- d) bioresorptivnu keramiku

Nakon ugradivanja biokeramičkog implantata, u organizmu se mogu javiti četiri vrste reakcija na implantat:

1. ukoliko je materijal toksičan, dolazi do odumiranja okolnog tkiva;
2. ukoliko je materijal netoksičan i inertan, oko njega se formira vezivno tkivo;
3. ukoliko je materijal netoksičan i biološki aktivan, obrazuje se veza između prirodnog tkiva i implantata, na dodirnoj površini
4. ukoliko je materijal netoksičan i rastvorljiv, postepeno će ga zameniti okolno tkivo.

2.3.3.2.2. Porozni hidroksiapatiti (pHAP)

Kalcijum hidroksiapatit predstavlja najzastupljeniju so kalcijuma i fosfora. Sva jedinjenja kalcijum-fosfata mogu se javiti u tri glavna strukturna tipa: apatitni, glaserit i kalcijum fosfatni – npr. dikalcijum fosfat dihidrat, anhidrovani dikalcijum fosfat i monokalcijum fosfat.

Hidroksiapatit se javlja u tri modifikacije(63):

1. Stehiometrijski hidroksiapatit – može se predstaviti formulom $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Do odstupanja od stehiometrijskog hidroksiapatita, dolazi usled prisustva malih količina karbonata, kada se fosfatna grupa zameni karbonatom.

2. Kalcijum deficitarni HAP – isti je kao biološki koji čini mineralnu fazu u kostima, nastaje zamenom dvovalentnih kiseonikovih jona jednovalentnim hidroksilnim.

3. Oksihidroksiapatit – dolazi do zamene hidroksilnih jona dvovalentnim kiseonikovim.

Struktura apatita je veoma pogodna za supstituciju drugim jonima. Zamenom Ca, PO₄ i OH jona drugim jonima, može do i do promene u parametrima – rešetke, morfologiji i rastvorljivosti.

Umesto kalcijuma, mogu se na i joni stroncijuma, magnezijuma, barijuma, olova. Fosfatne jone mogu zameniti vanadati, borati i manganati. Kod supstitucije, veli ina i koli ina supstituisanih jona, direktno uti e na razliku u parametrima rešetke, izme u supstituisanog i nesupstituisanog HAPa.

Biološki HAP, koji ulazi u sastav kostiju i zuba, razlikuje se od istog - po stehiometriji, sastavu, fizi kim i mehani kim osobinama. On je naj eš e kalcijumom deficitaran i uvek karbonatno supstituisan, što u velikoj meri uti e na mehani ke osobine ovog minerala. Biološki hidroksiapatit, u kombinaciji sa kolagenom, gradi matricu koja daje veliku vrsto u kostima. Mehani ke osobine sintetskog hidroksiapatita, uglavnom zavise od na ina njegove sinteze, koji uklju uju temperaturu, pritisak, pH, i uslova njegovog naknadnog termi kog tretmana (sinterovanja). Uglavnom HAP je krt i pokazuje malu otpornost na mehani ke stresove, što je usko povezano sa njegovom poroznoš u.

Po svojoj strukturi, on može biti neporozni i porozni. Tako e, može biti u granulama ili blokovima. Neporozni, preciznije re eno mikroporozni - sa maksimalnom poroznoš u do 5% zapremine i mikroporama od oko 1 µm, kristalima veli ine preko 2000 Å – ima široku primenu u medicini i stomatologiji.

Porozni HAP – ima pore od najmanje 100 µm – što dozvoljava prožimanje koštanim tkivom. Kalcijum HAP se može dobiti i u formi bifaznog kalcijum fosfata, gde je HAP u ve ini, u smesi sa trikalcijumfosfatom.

Hidroksiapatit i drugi kalcijum fosfatni materijali, smatraju se osteokonduktivnim i imali su široku upotrebu kao koštani zamenici, više od dve decenije. Nažalost, oni ne kombinuju dobre mehani ke osobine sa visokom poroznoš u, pa je došlo do ograni enja njihove primene. Takvo dizajniranje materijala nije na odgovaraju i na in rešeno, mada su koriš ene razli ite tehnike i pristupi, kao što su: sol-gel, termalno indukovana fazna separacija, kombinovane tehnike livenja i simultanog luženja i sinterovanje mikrosfera. Pored njih zna ajno mesto pripada tehnici templejta

raznih vrsta polimernih pena, elektroforetske depozicije, superkriti nog fluida, membranske laminacije, zatim tehnologija baziranih na visokim pritiscima. Takođe, prisutne su i tehnike sublimacionog sušenja, brzog štampanja, uz korišćenje lasera i biomimetske tehnike dobijanja skafolda. I pored svega toga, problemi dizajniranja idealnog skafolda još uvek su prisutni(64,64,66).

U osnovi, tkivno inženjerstvo zasniva se na postojanju aktivne porozne strukture, poznate kao skafold, koja ima dobro definisanu morfologiju unutrašnjih zidova. Ove strukture se najčešće prave od poroznog kalcijum hidroksiapatita umereno pomerenih stehiometrije. elijski nosa i na bazi poroznog kalcijum hidroksiapatita(pHAP) ve se nalaze u širokoj upotrebi u kliničkoj praksi u stomatologiji i u ortopediji i karakterišu se kao dobri biokompatibilni i ostekonduktivni materijali(67,68). Zahvaljujući svojoj strukturi, koja je slična strukturi prave kosti, pHAP se široko koristi u ortopedskoj i maksilofacijalnoj hirurgiji za reparaciju defekata kosti, u rekonstrukcijama srednjeg uha, kao prevlaka na dentalnim i ortopedskim implantima. U oralnoj hirurgiji, ima primenu za augmentaciju alveolarne kosti, uz metalne implante. U parodontologiji, primenjuje se u vidu regeneracije tkiva, terapiji infrakoštanih parodontalnih džepova.

U slučaju kada se kombinuje sa odgovarajućim polimer/biopolimer tankim filmovima (zbog njihove biokompatibilnosti, mehaničkih karakteristika i biodegradibilnosti), skafoldi na bazi pHAPa mogu pružiti odlične uslove za inicijaciju, rast i aktivnosti koštanih elija(69,70).

2.3.3.2.3. Kompozitni materijali

Kako bi se postigla što bolja kompatibilnost nosa a-skafolda i koštanih elija koje naseljavaju njihovu površinu, došlo je do kombinovanja tako formiranih poroznih keramičkih skafolda sa polimerima, i dobijene su različite nove formulacije kompozitnih materijala. Osnovni zadatak biomaterijala koji se koriste u tkivnom inženjerstvu jeste da obezbede biokompatibilnu površinu i zadovoljavaju mehaničke karakteristike. Konvencionalni jednokomponentni polimeri ne mogu ispuniti ovaj zadatak. Iz tog razloga se istražuju različiti višekomponentni polimeri kombinovani sa poroznim hidroksiapatitom u cilju stvaranja novog multifunkcionalnog biomaterijala. Polimeri koji su ugrađeni u dizajn skafolda poboljšavaju aktivnost i naglašavaju

nanotopologiju unutrašnjih zidova skafolda, omogući avaju i tako efikasniju aktivaciju elija uključenih u proces tkivnog inženjerstva, kao i njihov rast i razvoj. Jedna takva nova formulacija kompozitnih materijala primenjena je u okviru projekta osnovnih istraživanja 172026 iju realizaciju u aspektima biološke primene sledi program ove disertacije. Kao tanki filmovi na zidovima keramičkih skafolda, korišćeni su različiti prirodni rafinirani polimeri organizovani u dobro definisane polimerne strukture i egzaktne hemijske forme, poput alginata, modificiranog škroba, celuloze, i sintetičkih polimera kao što je familija alifatičnih poliestara koji se nazivaju poliglikolidi, polilaktidi i njihovi kopolimeri. Prednost obe korišćene vrste polimera je u mogućnosti njihove široke reprodukcije i dobre kontrole njihovih osobina: konformacije, brzine razgradnje i nanostrukture. Zbog svega toga, oni imaju potencijal da budu široko primenjeni kao nosači i prilikom transplantacije elija i kao elijski nosači u tkivnom inženjerstvu, obzirom da je poznato da kombinacija prirodnih ili veštačkih polimera sa hidroksiapatitom (kompozitni elijski nosači) predstavlja osnovu tkivnog inženjerstva kosti.

Pored skafolda kao keramičkih nosača a sa dobro prilagođenim osobinama degradacije i bioaktivnosti, sa mehaničkim osobinama koje mogu da služe kao potpora celom sistemu tokom procesa stvaranja novog koštanog tkiva u kombinaciji sa polimernim sistemima kao tankim filmovima, veoma su popularne i procesne tehnike konvencionalnih polimernih materijala (prilagođene su i proširene na ugradnju neorganskih bioaktivnih faza u poroznu 3D polimernu mrežu). Polimerni materijali, kao što su hidrogelovi, posebno u injektibilnoj formi, bude izuzetno interesovanje zbog svoje hidrofилности, pogodnosti za inkapsulaciju elija, slično prirodnom ECM u neinvazivnim primenama (50).

Jedna od najčešće korišćenih u poslednjoj deceniji je grupa sintetičkih polimera i kopolimera, koja pripada porodici poliestara. Među njima najznačajniji su: PLA-polilaktidna kiselina, PGA-poliglikolidna kiselina, i kopolimeri tipa PLGA- poli(laktid-ko-glikolidne) kiselina. Ovi materijali igraju veoma važnu ulogu i u oblikovanju različitih formi skafolda. Bitna osobina navedenih polimera je da njihova resorbilnost i mehaničke karakteristike mogu da zadovolje razne vrste primena u maksilofacijalnoj i ortopedskoj hirurgiji, na zbrinjavanju defekata kritične veličine i kao fiksatori za podršku srastanju koštanih tkiva bez naknadne hirurške intervencije njihovog

uklanjanja, posle srastanja (kod loma kostiju). Sposobnost degradacije, takve materijale ini veoma podobnim i za razne druge primene, koje obuhvataju i primene vezane za inkapsulaciju lekova sa kontrolisanim brzinama otpuštanja.

U idealnom slu aju, kad se koriste takvi materijali za funkcionalizovanje kerami kih struktura skafolda, brzina degradacije takvih polimera, kao i kerami kih nosa a na kojima se nalaze naneti kao tanki filmovi, treba da odgovara brzini formiranja novog koštanog tkiva. Skafold koji je inicijalno formiran, tokom procesa osteointegracije tokom primene unutar organizma degradira, pri emu njegove mehane ke osobine, tako e degradiraju skladno sa rastom mehane kih osobina novoformiranih koštanih tkiva koja preuzimaju na sebe ulogu nose ih elemenata u konstrukciji nove kosti. Pored PLA, PGA, PLGA polimera, veoma zna ajnu ulogu u formiranju kompozitne skafold strukture imaju i poli(metal-metakrilati, poli(e-kaprolaktonati), polihidroksibutarati, polietileni, polipropileni, poliuretani, poli(-etilen-tereftalati), polietarketoni i polisulfonski polimeri.

Glavna prednost sintetskih polimera iz grupe poliglikolida jeste u tome što se razgra uju hidroliti ki, što dovodi do razgradnje polimernih lanaca i osloba anja jedinjenja koja su prirodno prisutna u organizmu i zbog toga mogu biti metabolisana. Ovi polimeri imaju duga ku istoriju upotrebe kao resorptivni hirurški konci i resorptivni osteosintetski materijal. Estarske veze kod ovih polimera su hidroliti ki labilne i oni se razgra uju neenzimskom hidrolizom. Njihovi razgradni produkti su netoksi ni prirodni metaboliti i iz organizma se eliminišu kao ugljendioksid i voda. Stepem degradacije ovih polimera može biti podešavan da zadovolji zahteve, na period od nekoliko nedelja do nekoliko godina menjanjem hemijskog sastava, molekularne težine i njene distribucije, kao i kristalini nosti. Biodegradabilni polimer-neorganski bioaktivni kompoziti pokazuju bioaktivno ponašanje, podesivu kinetiku biodegradacije i mehane ke osobine pogodne za primenu u regeneraciji kosti (50).

Kompozitni nosa i moraju biti tako dizajnirani da se kerami ke estice ne samo ugrade u polimerni matriks, nego i da se nalaze na površini i tako ostvare osteokonduktivnu funkciju. Tako e, bazni produkti razgradnje hidroksiapatita i trikalcijumfosfata neutrališu kiselost polimernih jedinjenja.

Takozvana prva generacija kompozitnih nosa a je stvorena na Nacionalnom Univerzitetu Singapura. Koriš ena je metoda modelovanja fuzionom depozicijom (FDM), a koriš ena je kombinacija HA i PCL (59).

Druga generacija kompozitnih nosa a je proizvedena 2007 FDM metodom (71). Polimer - CaP kompozit je imao dobre mehani ke i biohemijske osobine, uklju uju i snagu koja poti e od keramike, vrstinu i plasti nost polimera, kao i dobru degradacionu i resorpcionu kinetiku.

Rekonstrukcija segmentnih defekata na dugim kostima predstavlja klini ki izazov. U cilju prevazilaženja problema upotrebe skafolda u podru jima velikog optere enja, razvijen je kompozitni nosa baziran na poli L,D lakti noj kiselinu. On se može koristiti kao nosa proteina i faktora rasta, uz istovremeno izdržavanje optere enja koje kost normalno podnosi. Cilj je bio poboljšanje postoje e FDM metode za proizvodnju materijala visoke snage, uz istovremeno pove anje poroznosti na 75-80%.

Upotreba sinteti kih ili prirodnih nosa a sa slabim mehani kih osobinama (visoka poroznost) i brza degradaciona kinetika su rezultirali u graftovima koji mogu biti koriš eni u oblastima niskog optere enja. Godine 2007. prvi put je objavljena upotreba jedinstvenog kompozitnog nosa a za tkivno inženjerstvo kosti, koji se sastojao od kombinacije biodegradabilnog PLGA i bioresorptivnog CaP cementa procesom fuzije estica i fazne separacije(72). Nosa se karakteriše visokom makroporoznoš u, sa makroporama od 0,8 – 1,8mm, poroznoš u od 81-91% i poboljšanim mehani kim osobinama, zahvaljuju i polimeru.

Novi pristup fomiranju kompozitnih nosa a na bazi polimera i CaP keramike predstavljen je 2004. godine(73). Kombinovan je degradabilni PLGA u obliku mikrosfera i slabo kristalni CaP koji je fuzionisan u te mikrosfere. Dobijen je trodimenzioni skafold za regeneraciju kosti koji je imao poroznu interkonekciju i mehani ke osobine u rangu trabekularne kosti.

Procesom sferoidizacije estice soli u plamenu i njihovim sinterovanjem, 2004. godine postignuta je interkonekcija slane osnove, koja je bila napunjena sa karbonizovanim fluoroapatitnim prahom i polilakti nim polimerom (74). Dobijen je kompozitni nosa i pokazano je da se upotrebom sferi nih i ve ih estica soli može dobiti ve i prostor pora.

Prime eno je da je indukcija hidroksiapatita poboljšala mehani ke osobine i adsorpciju proteina od strane kompozitnih nosa a sastavljenih od nanohidroksiapatita i PLLA. Oni poseduju visoku poroznost od preko 90% i dobro kontrolisanu arhitekturu pora. Dobijaju se TIPS (termi ki indukovana fazna separacija) metodom (75).

Preparacija i morfologija 3D poroznih kompozita od PLGA i PLLA od strane drugih autora su dali sli ne rezultate, pri emu su kompozitne pene pokazale zna ajno poboljšanje mehani kih osobina uprkos poroznosti od preko 95% (76). Sli ni, visokoporozni kompozitni nosa i, napravljeni od PLLA i HA TIPS tehikom, prilikom zasejavanja osteoblastnim elijama i kultivisanjem *in vitro*, pokazali su duboko prodiranje elija u unutrašnjost nosa a kao i njihovu ravnomernu distribuciju. Procenat preživljavanja elija na ovakvom nosa u je ve i nego na nosa u napravljenom od PLLA, kao i bolja proliferacija i ve a ekspresija kost-specifi nih markera. Na taj na in je demonstrirana dobra osteokonduktivnost (77).

Penasti nosa i, napravljeni od PLLA i PLLA i HA, pripremani su metodom vrsto/te ne fazne separacije. Rezultati su pokazali da isto polimerni nosa i podržavaju elijski rast samo na spoljašnjosti matriksa, dok je kod kompozitnih dolazilo do prodora elija kroz unutrašnju strukturu nosa a.

Istraživanja 3D hidroksiapatit-kolagen kompozitnih nosa a, napravljenih od biomimeti ki mineralizovanog kolagena, pokazala su interkonekcijsku strukturu pora i elasti ne mehani ke osobine. *In vivo* subkutana implantacija je pokazala resorpciju nakon dva meseca putem fagocitoze, kao i resorpciju i zamenu materijala novim koštanim tkivom posle implantacije u defekte dugih kostiju, nakon tri meseca.

Penasti kompozitni nosa i otvorenih elija, koji se sastoje od resorptivne PLA i kerami kih punioca, HA ili beta –trikalcijum fosfata, razvijeni su 2006. godine metodom površinske ugljen-dioksid penaste tehnike. Ovakvi nosa i su imali unutrašnju 3D strukturu koja je imala anizotropnu morfologiju (78).

Davis laboratorija je objavila razvoj njihove takozvane tre e generacija materijala za nosa a (72). Njihovi rezultati su pokazali da dodatak tankog Ca-P filma na površinu makroporoznog PLGA-CaP kompozitnog nosa a stvara osteokonduktivni nosa ve e kompresivne snage koji spre ava razvitak hroni nog inflamatornog odgovora. Ova trofazna konstrukcija prevazilazi i biološka i mehani ka ograni enja

koje su prethodni materijali pokazivali. Dobijen je jedinstven, potpuno resorptivan nosa kao zamena za graftove tarabekularne kosti(79).

U poslednjoj deceniji, jedan od naj eš e koriš enih polimera za izradu kompozitnih skafolda je PLGA(kopolimer PLA – polilaktidna kiselina i PGA – poliglikoli na kiselina), zbog svoje utvr ene biokompatibilnosti i stepena degradacije koji zavisi i može se regulisati me usobnim odnosom dveju komponenata koje se nalaze u njegovom sastavu(80,81,82). U najnovije vreme razvijaju se materijali na bazi kompozita HA/HDPE hidroksiapatit-polietilen visoke gustine i PLGA/HA kompozita, koji se odlikuju odli nom biokompatibilnoš u i mogu da oponašaju prirodnu kost, jer su njihove osobine sli ne osobinama kosti. Time takvi materijali, postaju obe avaju e matrice skafolda nosivih kosti, koje bi mogle da omogu e optimalnu elijsku diferencijaciju i mineralizaciju koštanih tkiva. elije se na takvim materijalima dobro adheriraju, posebno na hidroksiapatitnoj komponenti, što sve ima za rezultat dobru elijsku proliferaciju i integraciju-osteokonduktivnost koštanih implanta, izgradjenih od HA/HDPE i PLGA/HA kompozita.

2.3.3.4. SAVREMENI KONCEPTI KONSTRUKCIJE SKAFOLDA

Osnovne funkcionalne strukture elija i tkiva definisane su na nanometarskom nivou pa zbog toga razumevanje nanobiologije i primena nanotehnologije predstavljaju novi pravac u istraživanju tkivnog inženjerstva(83). Nanotehnologija omogu ava razvijanje novog sistema koji imitira složena, hijerarhijski organizovana prirodna tkiva(84). Nanotehnologija uklju uje materijale koji poseduju makar jednu dimenziju na nanometarskom nivou i pomo u kojih se mogu praviti strukture, ure aji i sistemi novih karakteristika. Uopšteno re eno polimerni nanokompoziti su rezultat kombinacije polimera i biomaterijala na nanometarskom nivou(85,86). Interakcija izme u nanostruktura i polimernog matriksa je osnova za poboljšanje mehani kih i funkcionalnih karakteristika nanokompozita u pore enju sa konvencionalnim mikrokompozitima. U poslednje dve decenije bilo je znatnog napretka u istraživanjima u cilju poboljšanja karakteristika materijala koriste i nanometarski stvorene strukture, pri emu se koristila prednost u visokom odnosu površina/zapremina nanomaterijala(87). Nanokompozitni materijali uvek pokazuju odli an balans izme u snage i vrstine i obi no imaju unapre ene karakteristike u odnosu na karakteristike

individualnih komponenti(88). Ako posmatramo prirodni koštani matriks kao kompozitni materijal sastavljen od kolagena i apatita, nanokompozitni materijali su savršena zamena kao skafoldi za tkivno inženjerstvo kosti(89). Loše mehaničke karakteristike koje su bile svojstvene polimernim poroznim skafoldima danas se ispravljaju mogu nositi u kombinovanju nanostrukturnih estica sa biodegradibilnim polimerima i time se značajno poboljšavaju i modeluju mehaničke, električne i degradibilna svojstva biomaterijala(90). Međusobna adhezija između nanopartikula i polimernog matriksa je glavni faktor koji utiče na karakteristike nanokompozita. U cilju boljeg vezivanja između dve komponente nanokompozita razvijene su različite tehnike.

Primarna struktura skafolda, koju je moguće realizovati na brojne načine, kao što su sol-gel postupak, termički indukovana fazna separacija, posebno je pogodna za proizvodnju 3D nanokompozitnog keramika-polimernog skafolda sa kontrolisanom mikrostrukturom i makrostrukturom za nesmetanu proliferaciju koštanog tkiva. Za dobijanje takvih skafolda koriste se raznolike tehnike proizvodnje skafolda, kao što su konvencionalne tehnike livenja u polimernoj matrici u dobro definisanim formama kalupa (uz naknadno uklanjanje polimera rastvaranjem u organskom rastvaraču), fazna separacija, luženje porogena, sinterovanje mikrosfera (koriste i u prvom koraku tehniku isparavanja, a potom sinterovanja u drugom koraku), kreiranje skafolda korišćenjem tehnike templejta od polimernih pena, tehnike proizvodnje skafolda primenom vlakana ili tehnika umakanja, elektroforetske depozicije, biomimetskim samoasembliranjem, koriste i tehnike superkritičnih pritisaka, kao kod pripreme skafolda iz kompozita PLGA i hidroksiapatita, tehnike membranske laminacije, tehnike visokih pritisaka, "freeze drying"-a i tehnika brzog štampanja različitih formi skafolda unapred kreiranih uz pomoć odgovarajućih kompjuterskih programa(50).

Proces izrade skafolda mora obezbediti visok nivo kontrole njihovih makro- i mikro-strukturnih osobina što je ključni zahtev za njihovu specifičnu primenu. Zavisno od materijala za skafold i strategije inženjerstva tkiva, od strane različitih istraživačkih timova, razvijene su i različite metodologije i uslovi procesiranja skafolda radi optimizacije performansi datog finalnog sistema za unapred određenu namenu. U saglasnosti sa tim, procesne procedure, u svakom od konkretnih slučajeva, treba da budu odabrane tako da ne menjaju hemijske i biokompatibilne osobine materijala, koje bi svojom promenom mogle ograničiti efekte njegove kliničke primene. Pored

navedenog opšteg uslova, neophodno je da materijal bude proizveden u preciznoj geometriji da bi se uklapao na mestu implantata, da ima me usobno povezane pore i dovoljno visoku gustinu pora sa pravilnom morfologijom, veli inom i distribucijom i da uz to njegov kvalitet bude visoko reproduktivan.

3.CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U okviru analize nau ne problematike postavljena je **radna hipoteza:**

- Porozni hidroksiapatit dobijen modifikovanom hidrotermalnom metodom, porozni hidroksiapatit dobijen modifikovanom hidrotermalnom metodom u kombinaciji sa PLGA i porozni hidroksiapatit dobijen modifikovanom hidrotermalnom metodom u kombinaciji sa metforminom poseduju dobru biokompatibilnost, ne ispoljavaju toksi na svojstva i štetne efekte po zdravlje i u direktnom kontaktu sa koštanim tkivom doma ina omogu avaju bolju vaskularizaciju i dublju infiltraciju novoformirane kosti u odnosu na standardne materijale.

Utvr ivanje istinitosti postavljene hipoteze obavi e se eksperimentalno.

Za potrebe nau nog ispitivanja definisan je slede i **cilj istraživanja doktorske disertacije:**

- Izvršiti karakterizaciju, ispitati biokompatibilnost i biofunkcionalnost poroznog hidroksiapatita dobijenog modifikovanom hidrotermalnom metodom, poroznog hidrosiapatita dobijenog modifikovanom hidrotermalnom metodom u kombinaciji sa PLGA i poroznog hidroksiapatita dobijenog modifikovanom hidrotermalnom metodom u kombinaciji sa metforminom

Za postizanje postavljenog cilja istraživanja doktorske disertacije, definisani su slede i zadaci:

- Izvršiti karakterizaciju ispitivanih materijala (poroznog hidroksiapatita dobijenog modifikovanom hidrotermalnom metodom, poroznog hidrosiapatita dobijenog modifikovanom hidrotermalnom metodom u kombinaciji sa PLGA i poroznog hidroksiapatita dobijenog modifikovanom hidrotermalnom metodom u kombinaciji sa metforminom)
- Utvrditi biokompatibilnost ispitivanih materijala u direktnom i indirektnom kontaktu sa elijama

- Utvrditi površinske karakteristike ispitivanih materijala u kontaktu sa elijama
- Utvrditi iritativni efekat ispitivanih materijala
- Utvrditi efikasnost ispitivanih materijala u popunjavanju koštanih defekata

4.MATERIJAL I METODOLOGIJA

4.1.Testirani materijali

Za potrebe ovog istraživanja, korišten je novi sintetički biomaterijal, porozni hidroksiapatit dobijen metodom templejta polimerne pene na bazi poliuretana. Sam proces sinteze estica hidroksiapatita izveden je modifikovanom metodom hidrotermalne sinteze asistirane delovanjem površinski aktivne supstance polietilen vinil acetat/versatata. Nakon dobijanja keramičkog konstrukta (nosača) na nosaču poroznog hidroksiapatita deponovan je tanki film metformina i polilaktidkoglikolida (PLGA). Kao pozitivan standard upotrebljen je deproteinizovani goveji i koštani materijal (Bio Oss R, cancellous granule 0,25 – 1,0 mm veličine, Geistlich AG, Wolhusen, Switzerland).

Postupak dobijanja kompozitnih keramičkih nosača poroznog hidroksiapatit-polimerni tanki film odvijao se u više faza. Prvo su dobijene estice hidroksiapatita primenom modifikovane metode hidrotermalne sinteze uz ulazak polietilen vinil acetat/versatatom u svojstvu površinski aktivne supstancije.

Postupak dobijanja poroznih granula podrazumevao je sintezu praha hidroksiapatita, koja je obavljena hidrotermalnim postupkom na 150⁰C, pod pritiskom od 15 bara, tokom 8h tretmana, uz prisustvo kopolimera polietilenvinilacetata/versatata, PEVA/PEVV. Na taj način su dobijene estice veličine ispod 200 nm sa veoma pravilnom geometrijom. Da bi se dobile estice što veće aktivnosti, veće specifične površine i stepena amorfizacije površine praha, prah je potom tretiran mehanohemijски, posle čega su dobijene estice bile nanometarskog reda veličine (ispod 20 nm). Takav red veličine estica odgovarao je redu veličine kristalnih domena (urećnih delova estice), pre mehanohemijskog tretmana (XRD analiza daje vrednosti oko 16 nm, ako se primeni Šerrer-ova formula). Mehanohemijски postupak se odvijao uz prisustvo kopolimera PEVA/PEVV. Radi dobijanja odgovarajuće suspenzije podešen je odnos tećine i vrste faze tako da suspenzija ima odgovarajuću konzistenciju i reologiju pogodnu za izlivanje. Kad je postignut optimum viskoznosti suspenzije, njome je natopljena poliuretanska pena dobro definisane poroznosti. Nakon toga je celi sistem podvrgnut procesu pirolize i sinterovanja na 800⁰C u prvom koraku, a potom na 1300⁰C

u drugom koraku da bi se dobili visokoporozni kompakti kalcijum hidroksiapatita (skafoldi).

Skafold je potom granulisan i deli i granula koji su manji od 300 μm koriš eni su za taloženje (depoziciju) tankog filma na staklenim plo ama, za eksperimente na elijskim linijama, dok su granulacije izme u 300 μm i 1 mm, koriš ene za tretman defekata kriti ne veli ine kalvarije zeca. Deponovanje granula na staklene plo ice za eksperimente na elijskim linijama izvedeno je uz pomo polistirenskog lepka, prema slede oj proceduri: fine granule reda veli ine 0-300 μm karbonatnog hidroksiapatita deponovane su na staklene plo ice debljine oko 1 mm, tako što su staklene plo ice premazane prethodno slojem polistirenskog lepka koji je omogu io lepljenje za površinu monosloja granula kalcijum hidroksiapatita. Nakon lepljenja jednog sloja granula na površini plo ice ostatak granula je uklonjen i potom je izvedena depozicija tankih filmova polimera PLGA i metformina.

Kod deponovanja tankih polimernih filmova metformin je rastvoren u vodi i PLGA u hloroformu (koncentrat od 1% w/w) pre deponovanja unutar pora granula CHA sloja. Debljina deponovanih polimernih filmova bila je prose ne veli ine 10 μm .

Biomimetski postupak je izveden tako što su granule (granule za istraživanja na elijskim kulturama i granule za kutanu i subkutanu implantaciju i za patohistološka istraživanja) potopljene u superzasi eni SBF pripremljen uz pomo modifikovane procedure (koncentrat (mol dm^{-3}) svakog jona: Cl^- - 0.054, Na^+ - 0.0542, Ca^{2+} - 0.0025, PO_4^{3-} - 0.001, Mg^{2+} - 0.0003, CO_3^{2-} - 0.0006 i K^+ - 0.0014; pH su podešene na 7.4) i ostavljene da stare 6 nedelja na temperaturi od 37 $^\circ\text{C}$ (u univerzalnim pe ima, MEMMERT UNB 400). Volumen SBF je kontrolisan i konstantan tako što se dodaje dejonizovana voda ija je pH vrednost podešena na 7.4. Koncentracija Ca^{2+} je periodi no verifikovana uz pomo atomske apsorpcione spektroskopije. Posle odležavanja, uzorci se sklanjaju sa medijuma, ispiraju se dejonizovanom vodom i odre uju se njihove karakteristike.

4.1.1.Karakterizacija

Faze koje su sakupljene na razli itim polimer filmovima su ispitane uz pomo Fourier transform infracrvene spektroskopije (Nicollet 380 FTIR, Thermo Electron

Corporation) u prigušenoj totalnoj refleksiji (ATR). FTIR spektar je zabeležen u spektralnom opsegu 4000-400 cm^{-1} .

Metod (Philips PW 1050) rentgen difrakcije (XRD) koriš en je za strukturnu analizu dobijenih faza. Podaci su analizirani u opsegu 2θ od 9 do 67 sa korakom skeniranja od 5 $^{\circ}$, i vremenom ekspozicije od 2 sekunde po koraku. Veli ina kristalita je izra unavana pomo u Šererove jedna ine, $d = K / B \cos \theta$, gde d (u nm) predstavlja prose an pre nik kristalita, K je faktor oblika, B širina difrakcije ($12l$) na polovini svoje maksimalne visine, λ je dužina talasa koriš enih rentgenskih zraka, θ je ugao Braggov ugao difrakcije.

HA, tanki polimerni filmovi i faze koje su biomimetskim procesom nastale na razli itim polimernim filmovima su ispitane uz pomo Fourier-ove transform infracrvene spektroskopije (Nicollet 380 FTIR, Thermo Electron Corporation) u prigušenoj totalnoj refleksiji (ATR). FTIR spektar je sniman u spektralnom opsegu 4000-400 cm^{-1} .

Skening elektronska mikroskopija je koriš ena da bi se ispitala morfologija i mikrostruktura svih uzorka, posebno hidrotermalno dobijenog HA, kerami kih nosa a nastalih iz njega i deponovanih faza biomimetskog HA na površini tankih filmova polimera deponovanih na HA nosa ima. Uzorci su prevu eni zlatom spaterovanjem, a potom je njihova morfologija i energetska disperzivna analiza (EDS) pra ena pomo u SEM JOEL mikroskopa. Za snimanje površine HA nosa a u 2D i 3D koriš ena je atomska mikroskopija sila (AFM), uređaj Quesant.

SBET: Za odre ivanje specifi ne površine HA praha i njegove mikro- i nanoporoznosti koriš ena je BET metoda, koja se zasniva na merenju adsorpcije azota na -196 $^{\circ}\text{C}$ na odgovaraju oj aparaturi opremljenoj sa TCD detektorom (Gas chromatograph Varian Aerograph, model 920). Specifi na površina se izra unava sa BET metodom u jednoj ta ki. Pri tome, prepostavlja se da su sintetizovane estice sferoidnog oblika što omogu uje odre ivanje njihovog srednjeg pre nika na osnovu formule: ($d_{BET} = 6 / S_w$) gde je S_w .specifi na površina, a teorijska gustina HA (3.156 g/cm^3).

4.2. ISPITIVANJE DIREKTNE I INDIREKTNE CITOTOKSICITETA ANALIZIRANIH JEDINJENJA

Drugi deo istraživanja sproveden je na Institutu za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu.

Laboratorijska in vitro studija uključivala je istraživanje biološkog odgovora ćelijske kulture na testirane materijale na osnovu preporuke međunarodnog standarda ISO/DIS 10993-5: Test for cytotoxicity: in vitro method; MEM Extraction Cytotoxicity Test T-7-2(91).

U ispitivanjima direktne i indirektne citotoksičnosti korišćena je kultura mišjih fibroblasta L929 (ATCC). Za postizanje optimalnih uslova ćelije su gajene u odgovarajućim posudama, u hranljivom medijumu (DMEM) uz dodatak 10% fetalnog seruma gove eta (FSG), L-glutamina (3mM), penicilina (100 IU/ml), streptomicina (100µg/ml). Nakon suplementacije pH rastvor hranljive podloge je rastvorom bikarbonatnog pufera doveden do vrednosti 7,2 i profiltriran kroz filter veličine pora od 0,22µm. Uslovi gajenja su podrazumevali temperaturu od 37°C, u atmosferi vazduha, sa 5% ugljen dioksida.

Optimizacija uslova gajenja ćelija podrazumevala je konstruisanje eksponencijalnih kriva rasta ćelija u zavisnosti od vremena gajenja, za različite koncentracije zasa ćelija u nultom vremenu. Broj ćelija, koji je srazmeran apsorbciji, proučen je nakon 2h, 24h, 48h, 72h i 96h. Ispitivane su krive rasta pri sadržaju 500, 1000, 2000, 4000 i 8000 ćelija. Na osnovu kriva rasta izračunato je vreme duplikacije ćelija i na osnovu toga određen optimalan broj ćelija korišćen u eksperimentima, koji je iznosio 6000 ćelija po bazenu ploče sa 96 bazena, kod ispitivanja indirektno toksičnosti, odnosno 100000 po bazenu ploče sa 6 bazena kod ispitivanja direktne toksičnosti.

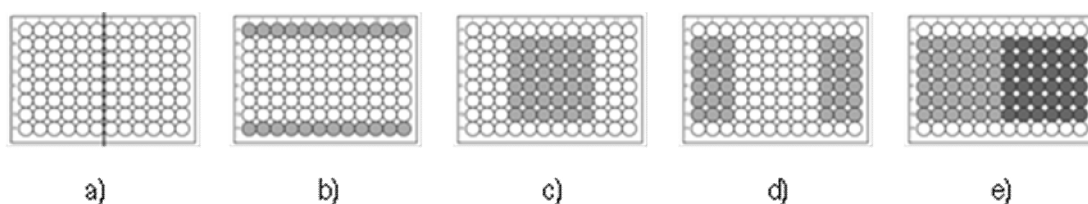
4.2.1. Ispitivanje indirektno toksičnosti

Ispitivanje indirektno toksičnosti podrazumeva ispitivanje toksičnosti ekstrakata ispitivanih jedinjenja, odnosno njihovih degradacionih proizvoda. Ispitivani ekstrakti dobijeni su suspendovanjem jedinjenja u podlozi za gajenje ćelija (DMEM sa 10% FCS) u koncentraciji od 0,2g/ml i inkubiranjem na 37°C u trajanju od 1h, 24h ili 72h, uz

konstantnu agitaciju. Nakon inkubacije, dobijene suspenzije su centrifugirane 10min na 2000 obrtaja u minuti, dekantovane, izmerena je pH vrednost dobijenih rastvora i rastvor je filtriran kroz filter dijametra pora 22 μ m. Ovako dobijeni ekstrakti su dalje korišteni za ispitivanje indirektno citotoksičnosti

Za ispitivanje delovanja ispitivanih ekstrakata, elije su nakon tripsinizacije resuspendovane u hranljivoj podlozi i u odgovarajućem broju zasejavane u mikroploču sa 96 bazena.

Protokol zasejavanja prikazan je na slici 4.1.

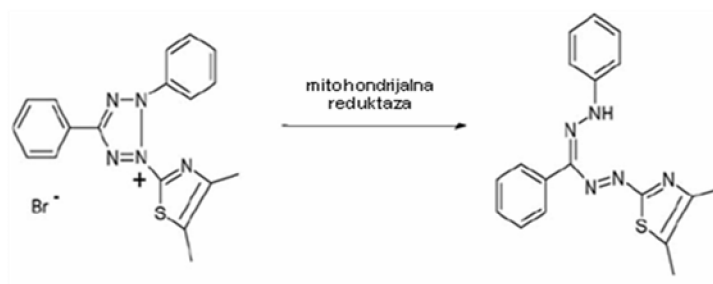


Slika 4.1. Faze u postavljanju eksperimenta na elije u kulturi

Na jednoj mikroploču sa 96 bazena moguće je ispitati delovanje 2 različita jedinjenja (a). U redove A i H mikrotitar ploče dodata je podloga, kako bi se zadržala dovoljna vlažnost u ploči prilikom inkubacije (b). U redove B-F, u kolonama 4-9 zasejan je optimalan broj elija (c), određen iz kriva eksponencijalnog rasta (6000 elija po bazenu). Elije su suspendovane u 100 μ l podloge. Samo 100 μ l podloge dodaje se u kolone 1-3 i 10-12, u svim redovima (d). Apsorbance u ovim bunarima korišćene su kao slepe probe. Nakon 24h od zasejavanja elija, elije su adherirale za dno ploče i ušle u fazu eksponencijalnog rasta. Iz ploče je aspiriranjem uklonjena podloga i dodate su serije razblaženja ispitivanih rastvora, odozgo na dole, od najmanje do najveće koncentracije (e) u ukupnoj zapremini od 150 μ l. Red B predstavlja kontrolu, tj. u bazene je dodato samo 150 μ l hranljive podloge. Mikroploča je nakon toga inkubirana 72h pri temperaturu od 37°C, u atmosferi vazduha, sa 5% ugljen dioksida.

MTT test u mikrokulturi je test za *In vitro* određivanje osetljivosti (hemosenzitivnosti) elija na delovanje različitih supstanci. MTT (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolijum bromid) je tetrazolijumska so žute boje koja se u metabolički aktivnim elijama, redukcijom u mitohondrijama, katalizovanom enzimom sukcinat dehidrogenaza, prevodi u kristale formazana. Ljubimasti kristali formazana, inače nerastvorni u vodenom rastvoru, postaju rastvorni dodavanjem SDS-a ili nekog

drugog rastvarača. Tako dobijen rastvoren formazanski produkt kvantifikuje se spektrofotometrijski na ELISA ita u na talasnoj dužini od 570nm.



Slika 4.2. Redukcija tetrazolijum-soli do formazana

Test je prvi put opisao Mosman 1983. godine, a u dalje opisanim eksperimentima primenjivana modifikacija metode Mosmana, koju su dali Ohno i Abe (92), a koja uključuje korišćenje natrijum dodecil sulfata (SDS) umesto dimetil sulfoksida (DMSO) za rastvaranje nastalog formazanskog proizvoda, time se povećava osetljivost testa i eliminiše korak odlivanja, usled koga može da dođe do gubitka elija koje su u mitozu.

Nakon inkubacije elija odgovarajućim agensom u bazene mikrotitar ploče dodaje se po 20 µl MTT rastvora, koncentracije 5 mg/ml u fosfatnom puferu. Mikrotitar ploče se inkubiraju 4h u inkubatoru na 37°C u sredini obogaenoj sa 5% CO₂, nakon čega se u bazene dodaje 100 µl 10% SDS-a u 0,01M HCl, a narednog dana optička gustina dobijenog obojenog proizvoda meri se na ita u mikroploči na talasnoj dužini od 570nm a rezultati se dalje obrađuju studentovim T testom.

Preživljavanje (S, od engl. *survival*-preživljavanje) je kvantifikovano korišćenjem formule za dobijanje indeksa preživljavanja S:

$$S = \frac{A_{uzorka} - A_{sl.proba}}{A_{kontrola} - A_{sl.proba}}$$

A_{uzorka} - srednja vrednost izmerene apsorbanse na 570 nm u otvoru sa tretiranim elijama

$A_{kontrola}$ - srednja vrednost izmerene apsorbanse na 570 nm u otvoru sa netretiranim elijama

$A_{sl,proba}$ - srednja vrednost izmerene apsorbance na 570 nm u otvoru bez elija a sa rastvorom ispitivane supstance

Množenjem indeksa preživljavanja (S) sa 100, dobija se procenat preživljavanja.

IC50 je koncentracija citotoksi nog agensa koja indukuje 50% inhibicije u preživljavanju ciljnih elija. Ova vrednost se koristi kao mera intenziteta antiproliferativnog dejstva nekog agensa.

Pokazana je korelacija rezultata MTT testa i rezultata $^3\text{H-Tdr}$ testa i ^{51}Cr testa i smatra se adekvatnom zamenom radioaktivnih tehnika.

4.2.2. Ispitivanje direktne citotoksi nosti

MTT test je kolorimetrijski test i osnovno ograni enje testa je da rastvor ija se apsorbancija na kraju meri bude bistar. Ovo onemogu ava primenu MTT testa za odre ivanje direktne citotoksi nosti, tj. nakon gajenja elija direktno na ispitivanom materijalu. Za ovo odre ivanje koristi se LDH test citotoksi nosti u kome se preživljavanje, odnosno vijabilnost elija procenjuje na osnovu procenta LDH (laktat dehidrogenaze) koji se na e u ekstra elijskoj sredini. LDH (laktat dehidrogenaza) je citoplazmatski enzim koji se nakon lize osloba a u ekstra elijsku sredinu i LDH test predstavlja meru integriteta elijske membrane. Nakon delovanja ispitivanih agenasa nivo LDH u supernatantu se odre uje oksidacijom laktata do piruvata koji zatim reaguju sa tetrazolijumskom soli pri emu nastaje formazan, u vodi rastvorna supstanca plave boje iji se intenzitet odre uje spektrofotometrijski.

Za odre ivanje direktne citotoksi nosti na mikroskopske ljuspice je nanošen tanak sloj ispitivanih materijala, koje su zatim lepljene u plo e sa 6 bazena i plo e nakon toga sterilisane x-zracima. U ovako pripremljene plo e se direktno na mikroskopsku plo icu, odnosno ispitivani materijal nanosi se optimalan broj L929 elije suspendovanih u hranljivom medijumu koje se dalje inkubiraju u trajanju od 1h, 24h i 72h, u inkubatoru na 37°C u sredini oboga enoj sa 5% CO_2 . Nakon završetka inkubacije, neposredno pre lize, elije su mikroskopirane i evaluirane u pogledu morfologije i odnosa prema ispitivanom materijalu.

Nakon inkubacije preživljavanje, odnosno broj elija, procenjuje se tako što se one izlažu fizi koj lizi, tj. plo e se u 3 ciklusa naizmeni no zamrzavaju na -20°C i odmrzavaju, zatim centrifugiraju, i nivo LDH se odre uje iz dobijenog supernatanta.

Broj elija se na osnovu nivoa LDH odre uje iz prethodno konstruisanje kalibracione krive, koja se formira nezavisno za svaki eksperiment, odnosno svaku koriš enu pasažu elija, uporedo sa izvo enjem eksperimenta.

4.3.ISPITIVANJE BIOKOMPATIBILNOSTI: TEST PRIMARNE KUTANE IRTACIJE

Tre i deo istraživanja sproveden je na Institutu za Fiziologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Iritacioni potencijal materijala ispitivan je prema me unarodnim standardima za ispitivanje biokompatibilnosti, ISO 10993-10:2002/ Amd 1: 2006, Biološka evaluacija medicinske opreme, Deo 10: Testovi iritacije i odložene reakcije hipersenzibilizacije(93).

4.3.1.Test materijali (Test uzorci):

Iritacioni potencijal ispitivan je za slede e materijale:

- pHAP
- pHAP + metformin
- pHAP + PLGA

Test materijal (u obliku praha pre nanošenja na kožu) pripreman je za aplikovanje putem mešanja praha (koli ine 1 gram) i destilovane vode.

Negativna kontrola: Kao negativna kontrola koriš en je materijal koji ne izaziva iritacionu reakciju, hipoalergijski elasti ni flaster za fiksiranje (SENSIFIKS).

Pozitivna kontrola: Kao pozitivna kontrola koriš en je preparat koji potvr eno dovodi do iritacionih promena, sterilni vodeni rastvor mle ne kiseline (IUPAC: 2-hydroxypropanoic acid koncentracije 98%, proizvo a Sigma), na sterilnom filter papiru Milipore, dijametra 5mm x 2mm.

4.3.2.Eksperimentalne životinje

Eksperimenti su ura eni na kuni ima muškog pola (Novozelanski beli kuni i, telesne mase 4.2 ± 0.4 kg) koji su odgajeni u vivarijumu Instituta za medicinsku fiziologiju. Do po etka eksperimenta životinje su držane pod kontrolisanim

laboratorijskim uslovima (temperature 22 ± 2 °C, 14 sati svetlo/10 sati mrak, pristup vodi i hrani *ad libitum*).

Eksperimenti su bili odobreni od strane Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama Stomatološkog fakulteta u Beogradu (br. 36/5 od 15.05.2009. godine), i sprovedeni su u saglasnosti sa principima Vodi a Nacionalnog Instituta za zdravlje, za brigu i korišćenje laboratorijskih životinja, kao i prema međunarodnim standardima ISO10993-2: zahtevi za blagostanje životinja(94).

3.3.3. Eksperimentalni protokol

Dvadeset etiri sata pre primene test materijala, krzno u predelu dorzalne strane trupa obrijano je električnim brijačem na svakom kuniću. Na svakom kuniću obrijana oblast kože leđa bila je podeljena u 4 polja iste površine (20 mm x 20 mm) i test material, primenjen je na samo dva od etiri polja. Na druga dva polja primenjeni su negativna kontrola (samo hipoalergijski adhezivni flaster, bez test materijala) i pozitivna kontrola (98% mlečna kiselina). Tri kunića su korišćena po grupi; kako je svaki kunić imao po dva mesta za aplikovanje test-materijala, to je ukupno šest oblasti kože bilo moguće analizirati, radi utvrđivanja iritativnih efekata test materijala i njihovih poređenja sa pozitivnom i negativnom kontrolom.

Svi ispitivani delovi kože kunića (tretirani i kontrolni) prekriveni su gazom i hipoalergijskim flasterom. Test-materijal je u direktnom kontaktu sa kožom bio tokom etiri sata. Nakon etiri sata uklonjeni su hipoalergijski flaster, gaza i test supstanca. Nakon jednog sata izvršeno je makro-patološko ispitivanje kože na znake iritacije (prisustvo eritema i edema). Ispitivanje je ponovljeno posle 24 sata, 48 sati i 72 sati (Draize et al. 1944)(95). U toku procene iritacije kože utvrđivano je prisustvo eritema i edema. Step en izraženosti eritema i edema gradiran je na skali od 0 do 4.

Klasifikacija eritema izvršena je na sledeći način: 0 – odsustvo eritema, 1 – veoma slab eritem, jedva uočljiv, 2 – dobro definisan eritem, 3 – umeren do težak eritem, 4 – veoma težak eritem (intenzivan, tamno crven), do povreda u dubini kože (Tabela 4.1.).

Klasifikacija edema izvršena je na sledeći način: 0 – odsustvo edema, 1 – veoma slab edem, jedva uočljiv, 2 – slab edem (granica polja dobro definisana,

uzdignuta - prsten), 3 – umeren edem (uzdiže se približno 1mm), 4 – težak edem (uzdiže se više od 1mm i širi se više, dalje od mesta izlaganja) (Tabela 4.2.).

Tabela 4.1.. Test primarne kutane iritacije: Klasifikacija eritema

Klasifikacija eritema	Gradiranje
Odsustvo eritema	0
Veoma slab eritem, jedva uo lživ	1
Dobro definisan eritem	2
Umeren do težak eritem	3
Veoma težak eritem (intenzivan)	4

Tabela 4.2. Test primarne kutane iritacije: Klasifikacija edema

Klasifikacija edema	Gradiranje
Odsustvo edema	0
Veoma slab edem, jedva uo lživ	1
Slab edem (granice polja uzdignute)	2
Umeren edem (uzdiže se 1 mm)	3
Težak edem (uzdiže se više od 1 mm)	4

Skor primarne kutane iritacije izra unavan je za svakog kuni a po formuli:

$$SPI = \left[\frac{\sum (Er + Ed)_{24h} + (Er + Ed)_{48h} + (Er + Ed)_{72h}}{\text{broj životinja}} \right]_T - \left[\frac{\sum (Er + Ed)_{24h} + (Er + Ed)_{48h} + (Er + Ed)_{72h}}{\text{broj životinja}} \right]_K$$

gde je Er - eritem; Ed- edem.

Indeks primarne kutane iritacije (PII) izra unavan je kao aritmeti ka sredina vrednosti SPI od tri testirane životinje. $PII = SPI / 3$.

Testirani materijal je, na osnovu vrednosti PII, ocenjivan kao: neiritiraju i, blago iritiraju i, umereno iritiraju i i veoma iritiraju i (Tabela 4.3.).

Tabela 4.3. Ocena test materijala na osnovu indeksa primarne kutane iritacije (PII)

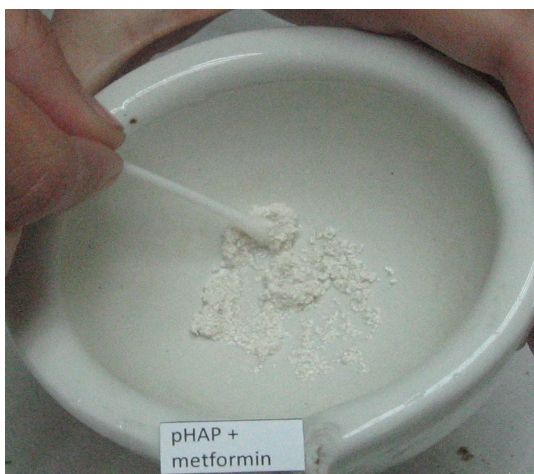
PII	Ocena test materijala
0.0 – 0.4	neiritiraju i
0.5 - 1.9	blago iritiraju i
2.0 - 4.9	umereno iritiraju i
5.0 – 8.0	veoma iritiraju i

4.3.4. Statisti ka analiza

Rezultati eritema i edema su prikazani kao pojedina na vrednost za svaku životinju i svako mesto aplikovanja test supstance. Rezultati skora primarne kutane iritacije i indeksa primarne kutane iritacije prikazani su kao srednja vrednost. Pore enje zna ajnosti razlika izme u srednjih vrednosti skora primarne kutane iritacije izme u eksperimentalnih grupa vršeno je uz pomo Student t-testa. Razlika je smatrana statisti ki zna ajnom na nivou $p < 0.05$.



Slika 4.3. Novozelandski beli kuni



Slika 4.4. Test primarne kutane iritacije



4.4.ISPITIVANJE BIOFUNKCIONALNOSTI: IN VIVO PREDKLINI KI TESTOVI NA ANIMALNOM MODELU

etvrti deo istraživanja sproveden je na Institutu za hirurgiju, Veterinarskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i na Institutu za patologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

4.4.1.Subjekti

Eksperimenti su odobreni od strane Eti kog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama Stomatološkog fakulteta u Beogradu (br. 36/12 od 23.11.2009. godine), i bi e sprovedeni u saglasnosti sa principima Vodi a Nacionalnog Instituta za zdravlje, za brigu i koriš enje laboratorijskih životinja, kao i prema me unarodnim standardima ISO10993-2: zahtevi za blagostanje životinja(96). Animalni model u ovom eksperimentalnom delu istraživanja bili su novozelandski beli kuni i, i to dvanaest životinja oba pola (6 muškog i 6 ženskog pola), iz razli itih legla, starosti oko 4

meseca, telesne težine oko 3 kilograma. Životinje su bile odgajene i smeštene u profesionalnoj odgajiva nici Novozelandskih belih kuni a, vlasnika Dragana Matovinovi a, ul.Obrenova ki put 224E u Bari u, lana Udruženja odgajiva a sitnih životinja „AVALA“ Beograd, registarski broj 45. Životnje su bile smeštene svaka u posebnom kavezu, u kontrolisanoj sredini, sa kontrolisanom ishranom (Veterinarski zavod Subotica, Srbija) i dnevnom profesionalnom negom.

4.4.2. Testirani materijali

Testirani materijali bili su porozni hidroksiapatit (pHAP), porozni hidroksiapatit(pHAP) u kombinaciji sa polilaktidkogliolidom(PLGA) i porozni hidroksiapatit(pHAP) u kombinaciji sa metforminom. Pozitivna i negativna kontrola bile su deproteinizovani gove i koštani mineral (Bio Oss^R, cancellous 0.25 - 1,0mm veli ine, Geistlich AG, Wolhusen, Switzerland)(DBBM) i “prazni prostori“ . Materijali su koriš eni prema uputstvima proizvo a a.

4.4.3. Test procedura

4.4.3.1. Anestezija

Opšta disocijativna anestezija sprovedena je za sve hirurške procedure(97) i sastojala se iz premedikacije Ksilazinom(2% Xylazin, 5mg/kg telesne težine, Cp pharma, Bergdorf, Germany) intramuskularnom injekcijom, a posle toga intramuskularnom injekcijom kombinacije Ketamina (Ketamin 500mg/ml, Laboratorio Sanderso S.A., Santiago, Chile) u dozi od 35mg/kg telesne težine, i Acepromazina (Acepromazine 50ml, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., St. Joseph, Mo 64506 U.s.a.) u dozi od 0,75mg/kg telesne težine(88). Dužina trajanja anestezije bila je prose no oko 100 minuta.

4.4.3.2. Randomizacija

Dizajn implantacije i randomizaciona šema bili su latin blok dizajna (Latin square block design, Statistical Analysis System, 1989). Modifikovani Latin blok dizajn (98) sastoji se u rotacionoj dodeli materijala defektima ime se balansirano distribuira svaki materijal i u anteriornu i u posteriornu regiju kalvarije.

Tabela 4.4..Distribucija testiranih materijala prema randomizacionoj šemi

Životinja	Koštani defekt			
	I	II	III	IV
1	A	B	C	D
2	B	C	D	A
3	C	D	A	B
4	D	A	B	C
5	A	B	C	D
6	B	C	D	A
7	C	D	A	B
8	D	A	B	C
9	A	B	C	D1
10	B	C	D1	A
11	C	D1	A	B
12	D1	A	B	C

A - pHAP,

B - pHAP + PLGA

C - pHAP + metformin

D - Bio Oss R, cancellous granule 0,25 – 1,0 mm veličine, Geistlich AG, Wolhusen, Switzerland (pozitivna kontrola)

D1- prazan prostor (negativna kontrola)

Uzorci su obeleženi posebnim kodovima tako da istraživač koji je vršio njihovu analizu nije bio upoznat kojoj grupi pripada ispitivani uzorak.

4.4.3.3.Hirurška procedura

Hirurška procedura je sprovedena pod aseptičkim uslovima i na način koji obezbeđuje minimalnu traumu. Koža glave preoperativno je obrijana i dezinfikovana rastvorom joda, a potom je izvedena incizija po sredini lobanje. Središnja incizija na glavi preoperativno protezala se od parijetalne kosti (Os parietale – Sutura coronalis) do čelone kosti (Os frontale – Incisura supraorbitalis caudalis). Musculus frontoscutularis i musculus frontalis preparisani su do parijetalne i čelone kosti.

Koža i periosteum pažljivo su preparisani i podignuti da bi se otkrile parijetalne kosti. Sa obe strane kalvarije po dva defekta pune debljine i kriti ne veli ine, 6,0 mm u pre niku, napravljena su pomo u trepan borera (AC Dental Implant system, 6,0mm trepan borer, ukupna dužina 32 mm, dužina se ivnog dela 15,8 mm, unutrašnji dijametar 6 mm, spoljašnji dijametar 6,95 mm, titanium legura) , pod konstantnim ispiranjem fiziološkim rastvorom (Natrii Chloridi Infundibile, rastvor za infuziju, Zdravlje A.D.Leskovac).

Oštrim ekskavatorom uklonjeno je koštano tkivo na injeno preparacijom trepan borerom. Randomizacija testiranih materijala izvršena je tako što su materijali postavljeni rotacionom tehnikom (u smeri kazaljke na satu, po prethodno navedenom modifikovanom Latin blok dizajnu), naizmeni no, da bi se obezbedila balansirana distribucija materijala izme u prednjih i zadnjih regiona kosti kalvarije(99).

Koža je potom ponovo vra ena na mesto da bi prekrila eksperimentalnu površinu i ušiveno suturama (SofsilikTM 4-0, Syneture^R, England) horizontalnim madrac šavom.

Postoperativno životinje su primile analgetike (Moradol, Galenika) u dozi od 0,1 do 2,0 mg/kg telesne težine kao subkutanu injekciju svakih 8 sati naredna tri dana. Antibiotik (Chloramphenicol, Galenika) u dozi od 60mg/kg telesne težine primenjen je jednom dnevno u narednih pet dana. Životinje su bile smeštene u pojedina nim kavezima do kraja eksperimenta. Period ocenjivanja trajao je dvanaest nedelja.

4.4.4.Preparacija tkiva

Eksperimentalne životinje su posle perioda ocenjivanja od 12 nedelja žrtvovane intravenskom injekcijom od 10ml rastvora Pentobarbitola (Pentobarbital sodium salt 100mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany). Nakon toga ispreparisane su parijetalne kosti i potopljene u 10% formalin.

4.4.5.Obrada tkiva za patohistološku analizu

Reprezentativni uzorci koštanog tkiva kalvarije koji su makroskopski odgovarali defektima pune debljine i kriti ne veli ine, 6,0mm u pre niku nakon hirurške intervencije fiksirani su u 10% formalinu.

Svi uzorci su dekalcinisani u rastvoru za dekalcinaciju: 8% HCl iz 37% (v/v) koncentrata i 10% HCOOH iz 89% (v/v) koncentrata u PBS-u tokom ~24h na 37°C. Nakon potpune dekalcinacije, procenjene subjektivnom metodom, iskustveno, uzorci su dehidrirani u alkoholu i ukalupljeni u parafinske kalupe. Iz parafinskih kalupa se eni su serijski tkivni preseki (po 4 sa svakog uzorka) standardne debljine 5µm. Rutinski su preparati bojeni hematoksilin eozin (H&E) bojenjem. Od histohemijskih metoda primenjena su: trihromno bojenje po Massonu (Massons trichrome stain) i bojenje von Kossa.

Mikroskopski preparati su analizirani opti kom mikroskopijom uz primenu programa za morfometriju Software "Cell-B" by Olympus, mikroskop Olympus 5. Uz navedeni softver patohistološki parametri su analizirani kvalitativno i semikvantitativno i kvanitativno.

4.4.6.Histološko ocenjivanje

I Opti kom mikroskopijom u biopti kom materijalu kvanitativno (merenje) su ocenjivani slede i parametri:

1. Veli ina defekta (u mm)
2. Prisustvo džinovskih elija (0/HPM, 1-3/HPM, 4,5/HPM, >5/HPM)
3. Prisustvo neoangiogeneze (0/HPM, 1,2/HPM, 3,4/HPM, >4/HPM)
4. Prisustvo bazofila (0/HPM, 1,2/HPM, 3-5/HPM, >5/HPM)

II Opti kom mikroskopijom u biopti kom materijalu kvalitativno (prisutno/odsutno) ocenjivani su slede i parametri:

1. Nespecifi no zapaljenje u tkivu
2. Novostvorena kost
3. Fibroplazija u tkivu

III Opti kom mikroskopijom u biopti kom materijalu semikvantitativno ocenjivani su slede i parametri:

1. Procenat mineralizacije (0, <25%, 26-50%, >50%)

4.4.7. Statisti ka analiza

U ovoj studiji koriš ene su deskriptivne i analiti ke statisti ke metode.

Od deskriptivnih, koriš eni su:

- Apsolutni i relativni brojevi (%)
- Mere centralne tendencije (aritmeti ka sredina, medijana)
- Mere disperzije (standardna devijacija, minimum, maksimum)

Od analiti kih metoda koriš eni su testovi razlike. Koriš eni testovi spadaju u grupu neparametarskih testova. Testovi su:

- Hi-kvadrat test
- Fišerov test ta ne verovatno e
- Mann-Whitney U test
- Kruskal-Wallis test

Pored testova razlike ra ena je i analiza povezanosti. U ove svrhe koriš ena je Spirmanova korelaciona analiza.

Rezultati su i grafi ki prikazani pomo u stubi astog i boxplot dijagrama.

Podaci su obra eni u SPSS 12.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, Illinois) softverskom paketu.

Sve analize u kojima je p vrednost manja od 0.05 su smatrane statisti ki zna ajne.

5.REZULTATI

5.1.SINTEZA ESTICA HIDROKSIAPATITA, KERAMI KIH HIDROKSIAPATITNIH ELIJSKIH NOSA A I NOSA A SA INFILTRIRANIM TANKIM FILMOVIMA POLIMERA

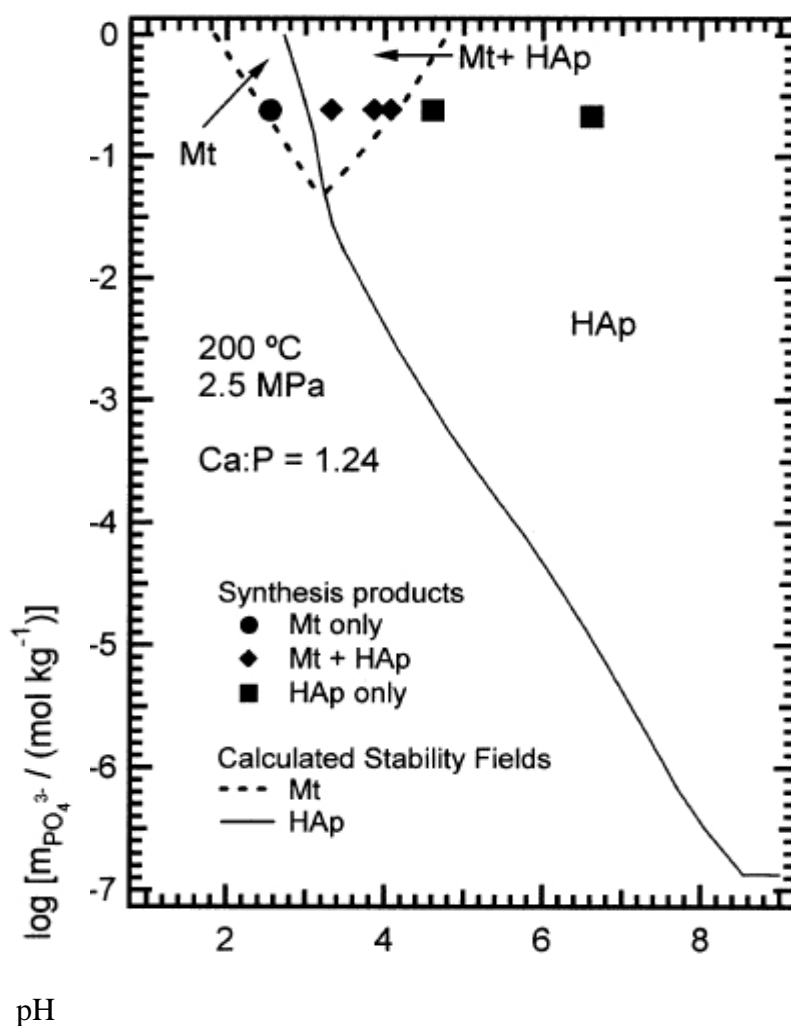
Dobijeni apatit je bio magnezijum supstituisani karbonatni kalcijum hidroksiapatit tipa B, kod koga su PO_4^{3-} joni u rešetki apatita zamenjeni sa jonima CO_3^{2-} . Detaljna razmatranja korišćenjem rendgenske difrakcije - XRD i Furrier transform infracrvene spektroskopije-FTIR publikovana u prethodnim referencama potvrdila su strukturu tog tipa hidroksiapatita. To je veoma važno, jer takav tip apatita preovlađuje u kostima mladih ljudi/dece i on je idealan sa stanovišta njegove kristaliničnosti i resorбилnosti, što je prvi uslov optimalne dinamičke ravnoteže između osteoblasta i osteoklasta, tokom formiranja novog koštanog tkiva.

Radi utvrđivanja optimalnih opsega svih datih procesnih parametara izvedeno je dodatno i termodinamičko modeliranje stabilnosti svih fosfatnih kristalnih struktura, posebno hidroksiapatita, pretpostavljajući i setove hemijskih jednačina datih u tabeli 5.1. koji pokazuju sve moguće reakcije, koje se mogu javiti tokom sinteze hidroksiapatita.

Tabela 5.1.1.Reakcije kao elementi termodinamičkih procesa

Table 1 Relevant equilibria for thermodynamic computations	
Solid dissolution reactions	Solution phase reactions
$\text{Ca}(\text{OH})_2 = \text{Ca}^{2+} + 2\text{OH}^-$	$\text{CaPO}_4^- = \text{Ca}^{2+} + \text{PO}_4^{3-}$
$\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3 = 5\text{Ca}^{2+} + \text{OH}^- + 3\text{PO}_4^{3-}$	$\text{CaH}_2\text{PO}_4^+ = \text{Ca}^{2+} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$
$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 = 3\text{Ca}^{2+} + 2\text{PO}_4^{3-}$	$\text{CaNO}_3^+ = \text{Ca}^{2+} + \text{NO}_3^-$
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = \text{Ca}^{2+} + \text{HPO}_4^{2-} + 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{CaOH}^+ = \text{Ca}^{2+} + \text{OH}^-$
$\text{CaHPO}_4 = \text{Ca}^{2+} + \text{HPO}_4^{2-}$	$\text{H}_2\text{O} = \text{H}^+ + \text{OH}^-$
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} = \text{Ca}^{2+} + 2\text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{H}_2\text{O}$	$\text{H}_3\text{PO}_{4,\text{aq}} = \text{H}^+ + \text{H}_2\text{PO}_4^-$
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 = \text{Ca}^{2+} + 2\text{H}_2\text{PO}_4^-$	$\text{H}_2\text{PO}_4^- = \text{H}^+ + \text{HPO}_4^{2-}$
	$\text{HPO}_4^{2-} = \text{H}^+ + \text{PO}_4^{3-}$
	$\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7,\text{aq} = \text{H}^+ + \text{H}_3\text{P}_2\text{O}_7^-$
	$\text{H}_3\text{P}_2\text{O}_7^- = \text{H}^+ + \text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7^{2-}$
	$\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7^{2-} = \text{H}^+ + \text{HP}_2\text{O}_7^{3-}$
	$\text{HP}_2\text{O}_7^{3-} = \text{H}^+ + \text{P}_2\text{O}_7^{4-}$
	$\text{HNO}_{3,\text{aq}} = \text{H}^+ + \text{NO}_3^-$
	$\text{NH}_{3,\text{aq}} + \text{H}_2\text{O} = \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$
	$\text{NH}_4\text{NO}_{3,\text{aq}} = \text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$
	$\text{P}_2\text{O}_7^{4-} + \text{H}_2\text{O} = 2\text{PO}_4^{3-} + 2\text{H}^+$

Dijagrami fazne stabilnosti hidroksiapatita dobijeni su na osnovu korišćenja termodinamičkih podataka, koji uključuju prvenstveno podatke o promeni slobodne energije za različite jonske vrste prisutne u rastvoru, saglasno setu datih reakcija, primenom modifikovanog termodinamičkog modela Helgeson–Kirkham–Flowers – HKF. Temperaturne funkcije zavisnosti toplotnog kapaciteta i entalpije formiranja, podešene su za sve moguće reakcije faze kao što su hidroksiapatit, monetit i brušit i utvrđene granice fazne stabilnosti, svake od njih, što je bilo odlučujuće za izbor polja mogućeg izbora pH vrednosti, kao i ostalih parametara sinteze hidroksiapatita.



Grafikon 5.1. Dijagram fazne stabilnosti hidroksiapatita

Grafikon fazne stabilnosti hidroksiapatita dobijen na osnovu istraživanja Veillard and Tardy bio je osnova i za naša praktična razmatranja i sinteze.

Proces sinteze asistiran je dalje micelarnom koncentracijom površinski aktivne supstance, da bi se ograničio rast čestica hidroksiapatita i da bi one dobile usmeren

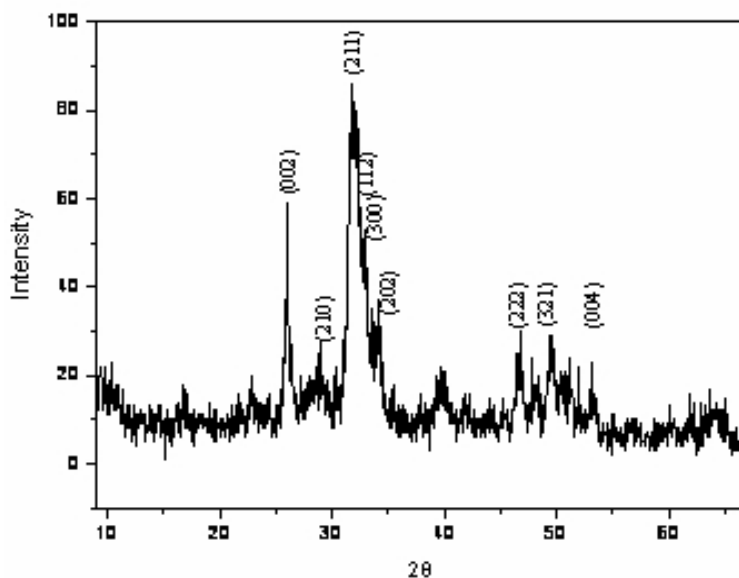
oblik, što je od izuzetnog značaja za mogućnost dirigovanog kreiranja površine skafolda.

Sam mehanizam uticaja etilen vinil acetat/verstata na mehanizam sinteze hidroksiapatita u osnovi povezan je sa nastajanjem brojnih naelektrisanih aktivnih centara koji su tipični za micelarne sisteme i koji simbolički u vodenim sistemima daju okruženje ekvivalentno prstenu u kome su naelektrisane glave površinski aktivne supstance-njihovi polarni delovi okrenute ka polarnom rastvaraču-u vodi, u našem slučaju negativno naelektrisane acetatne i versatne grupe, koje su okrenute ka vodi, nalaze i se u spoljašnjem delu prstena micela, uslovljavaju usmerenu nukleaciju hidroksiapatita kroz privlačenje i vezivanje Ca^{2+} jona, a potom i fosfatnih jona na Ca^{2+} jone u okviru tetraedarske simetrije, i tako redom dalje, sve dok se ne definiše u celosti veličina estice.

5.1.1. Karakterizacija HA praha

5.1.1.1. XRD analiza

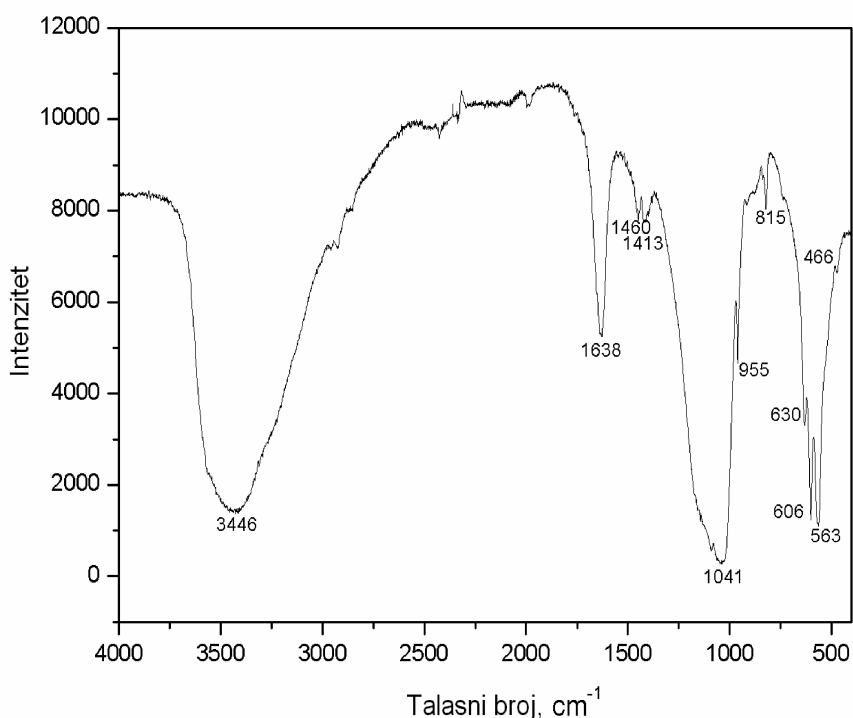
XRD analiza (Slika 5.4.1.) pokazuje da hidrotermalno sintetisani prah je zaista po svome sastavu kalcijum hidroksiapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (JCPDS 9-432). O tome svedoče i prisustvo svih karakterističnih kristalografskih ravni HA: (2 1 1) za $2\theta = 31.9$; (112) za $2\theta = 32.26$, (3 0 0) za $2\theta = 33.12$, (0 0 2) za $2\theta = 25.86$, (2 2 2) za $2\theta = 46.86$ i (2 1 3) za $2\theta = 49.58$.



Slika 5.1.1. XRD spektar hidrotermalno sintetisanog praha hidroksiapatita

5.1.1.2. Infracrveni spektar hidrotermalno dobijenog HA

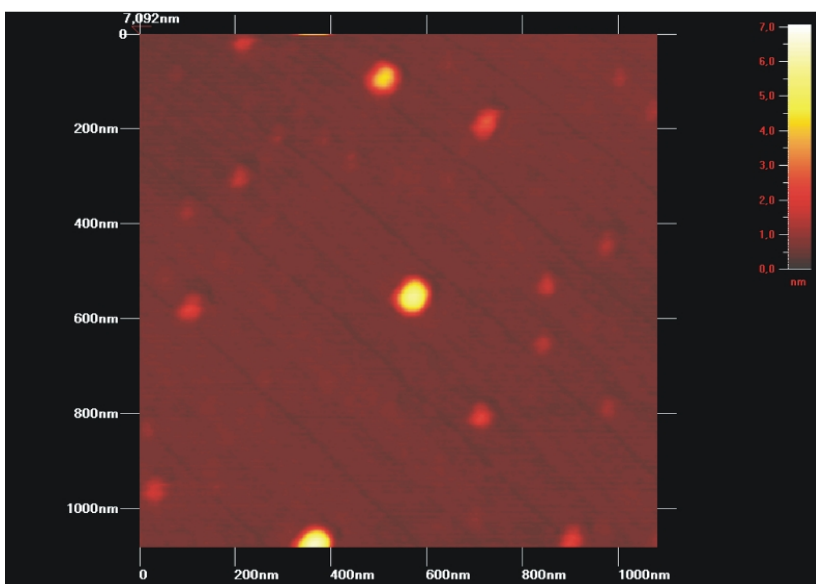
IC spektar sintetisanog praha (Slika 5.1.2.) pokazuje trake karakteristične za HAP. Trake na oko 1092 i 1042 cm^{-1} odgovaraju asimetričnim istežnim (ν_3), dok trake na oko 603 i 569 cm^{-1} odgovaraju savijajućim (ν_4) vibracijama PO_4^{3-} grupa. Trake na 957 i 473 cm^{-1} potiču od simetričnih istežnih vibracija (ν_1 and ν_2) PO_4^{3-} grupa. Oslobođene i istežne vibracije OH^- grupa detektovane su na oko 630 i 1626 cm^{-1} , redom. Istežne vibracije CO_3^{2-} grupe na 1442, 1406 i 875 cm^{-1} su takođe prisutne, što ukazuje na inkorporaciju karbonatnih grupa u strukturu apatita. Traka na 630 cm^{-1} se pripisuje oslobođenoj vibraciji OH^- grupa. Evidentno je da je dobijen karbonatni apatit B tipa i da zamena na položajima OH^- jona, uočena na osnovu promene oblika i položaja trake na 3658 cm^{-1} , nije dominantno prouzrokovana zamenu OH^- jona CO_3^{2-} jonima.



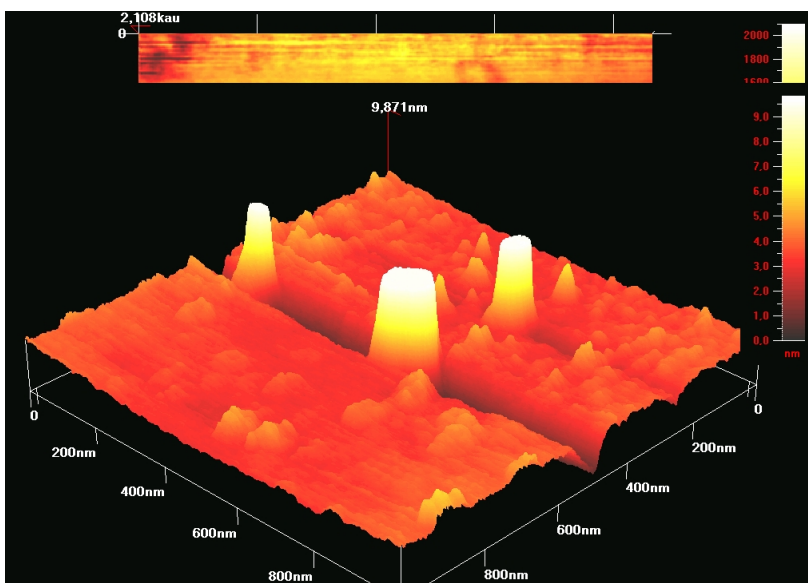
Slika 5.1.2.: Infracrveni spektar hidrotermalno dobijenog hidroksiapatita

5.1.1.3. AFM analiza

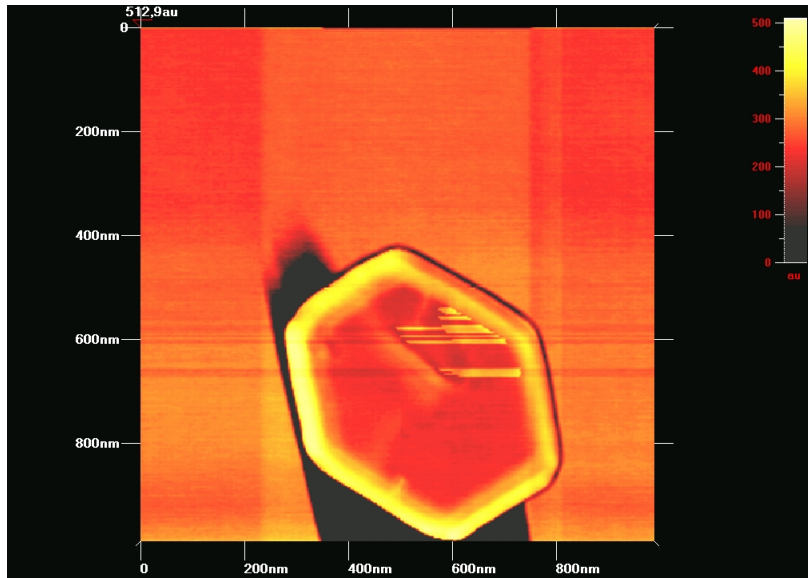
Morfologija površine pHAP-PEVA/PEVV jezgro-omota struktura hidroksiapatitne estice analizirane pomoću mikroskopije atomskih sila, AFM, uz korišćenje SPM softvera za izradu unavane raspodele estica pokazuje da su estice pretežno veličine oko 60 nm (slika 5.1.3.) i imaju sferoidan ili sasvim poligonalan (heksagonalan) oblik, kao što je prikazano na (slika 5.1.4. i 5.1.5.) pri čemu neke od estica dosežu vrednost i do oko 500 nm.



Slika 5.1.3. AFM: tipičan izgled hidrottermalno dobijenih estica hidroksiapatita



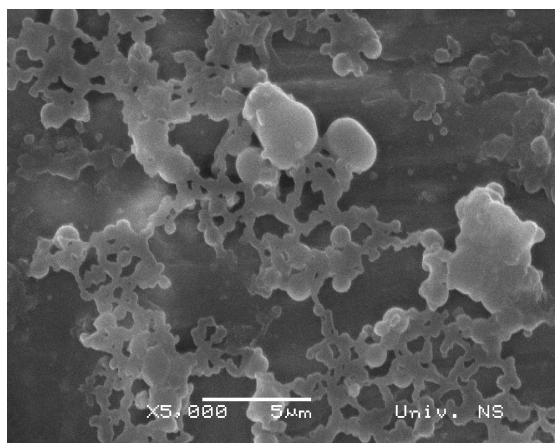
Slika 5.1.4. AFM: snimak estica hidroksiapatita



Slika 5.1.5. AFM: slika estica hidroksiapatita: jasno uo ljava heksagonalna forma hidroksiapatita

5.1.1.4. SEM analiza

Posmatraju i SEM mikrofotografije (Slika 5.1.6.) o igledno je da se HA prah sastoji od aglomerata, koji se sastoje od malih sfernih estica reda velicine od 200 nm. Ovi aglomerati imaju nepravilne forme i medjusobno vrlo su sli ni i po obliku i velicini (1 - 5 μ m).



Slika 5.1.6. SEM: Tipična morfologija aglomerata HA praha

5.1.1.5. BET analiza

BET analiza pokazuje podatke vezane za specifičnu površinu estica praha, ukupnu poroznost unutar estica praha i srednji prečnik pora koje se nalaze u tim esticama (tabela 5.1.2.).

Tabela 5.1.2. Parameteri specifične površine praha i njegove poroznosti određeni BET metodom

Uzorak	S_{BET} , m^2/g	Ukupna zapremina pora, cm^3/g	Srednji prečnik pora, nm	Udeo mezopora, %	Udeo makropora, %
HA prah	12	1.00	310	10	90

Srednji prečnik pora određen iz specifične površine koristeći i BET metodu iznosio je 160 nm.

5.1.2. Karakterizacija HA skafolda

5.1.2.1. Makroskopska razmatranja

Kao što se vidi na slici 5.1.7. HA skafold je izuzetno porozna 3D struktura. Pore su cilindrične, međusobno povezane i nalaze se u opsegu od 0.1 do 1 mm. Većina pora ima širinu (prečnik) 0.2 - 0.3 mm.

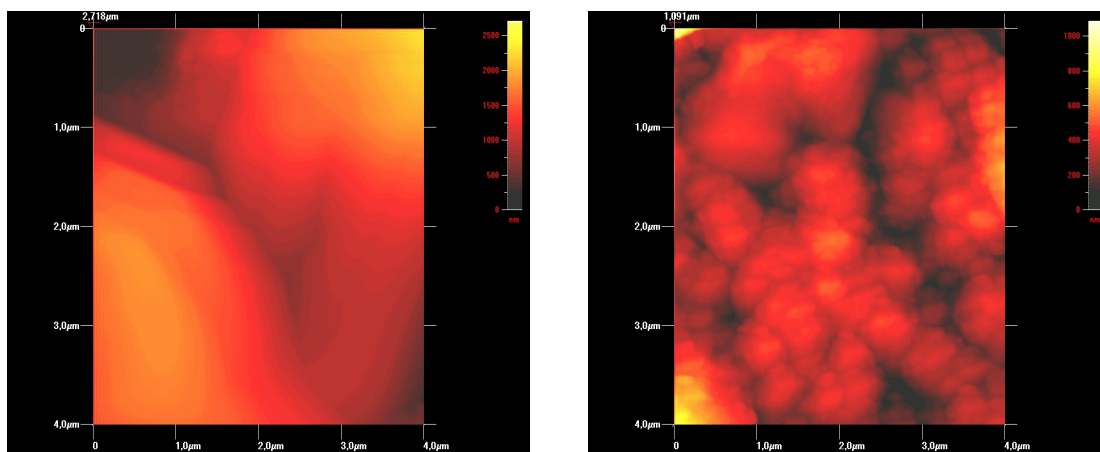


Slika 5.1.7. Hidroksiapatitni skafold

5.1.2.2. AFM i SEM analiza

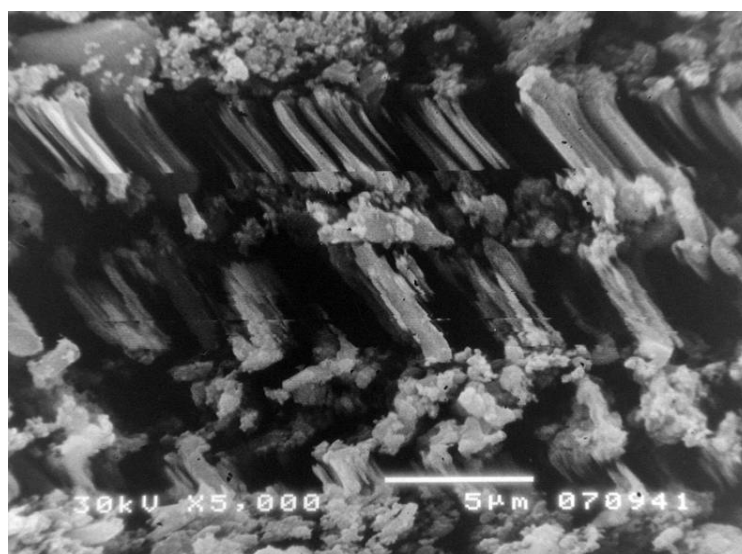
Dobijeni prah hidroksiapatita bio je osnova za dobijanje skafolda definisane unutrašnje geometrije-poroznosti, sa porama reda veličine 200 nm do 1 mm.

Trodimezionalni izgled estica samonukleisanog pHAP prikazan je na AFM snimcima, na sl.5.1.8., na kojoj se vrlo jasno uo avaju slojevi pHAP, koji rastu sloj po sloj nižu i se jedan na drugi, formiraju i prvo ostrvca, koja se me usobno potom spajaju u monolitne strukture kroz procese sekundarne nukleacije, koje prati proces erozije površine ostvaca usled dinami kih nestabilnosti unutar kanala izme u ostrvaca, izazvanih dejstvom kapilarnih sila unutar datog SBF fluida.

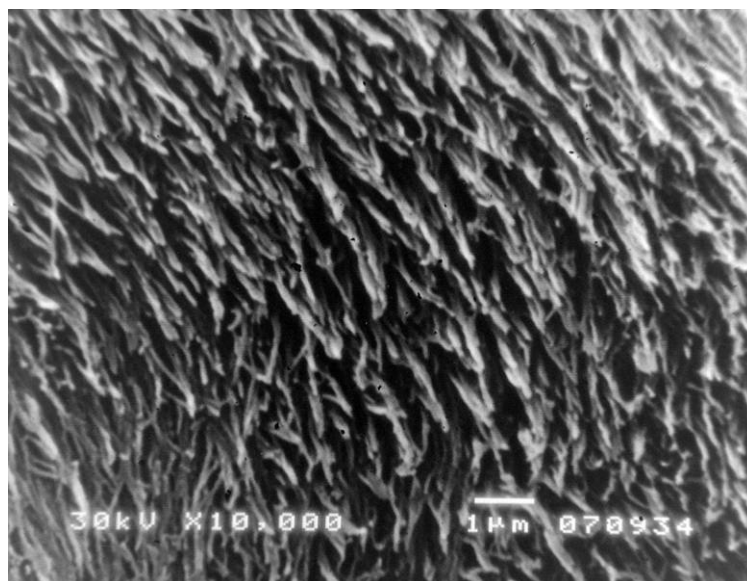


Slika 5.1.8. AFM. Tipičan trodimenzionalni izgled slojeva tankog filma samonukleiranog pHAP na površini polimera nanetog na površinu hidroksiapatitnog nosa (skafolda) Preuzeti iz knjige V. Jakanovi , Nanomedicina, najve i izazov 21 veka, DATA STATUS, Beograd, 2012, ISBN 978-86-7478-152-4

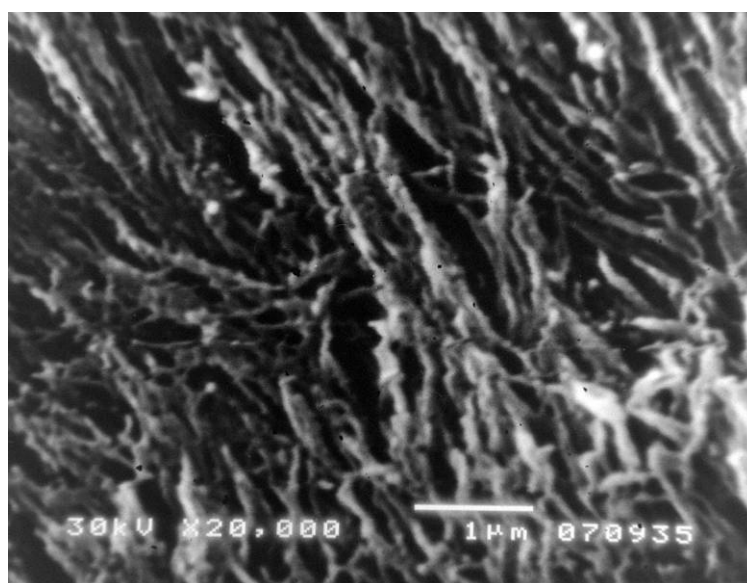
Nakon procesa izgaranja poliuretanske mreže i sinterovanja kerami ke faze na 800 °C, odnosno 1300°C dobijena je struktura skafolda data na sl. 5.1.9., 5.1.10. i 5.1.11.



Slika 5.1.9. Tipičan izgled zidova skafolda hidroksiapatita. SEM

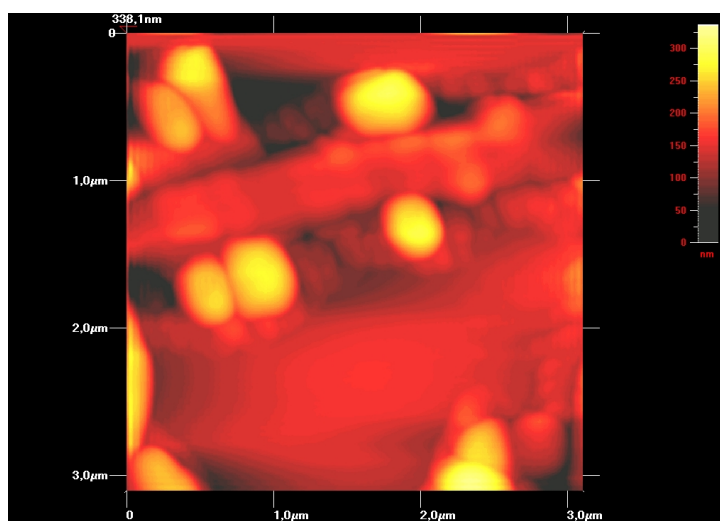


Slika 5.1.10. Tipičan izgled zidova skafolda hidroksiapatita. SEM

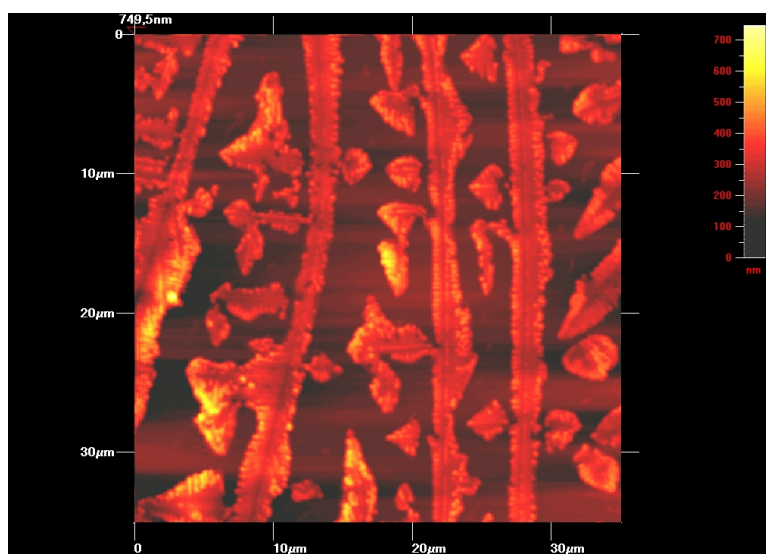


Slika 5.1.11. Tipičan izgled zidova skafolda hidroksiapatita. SEM

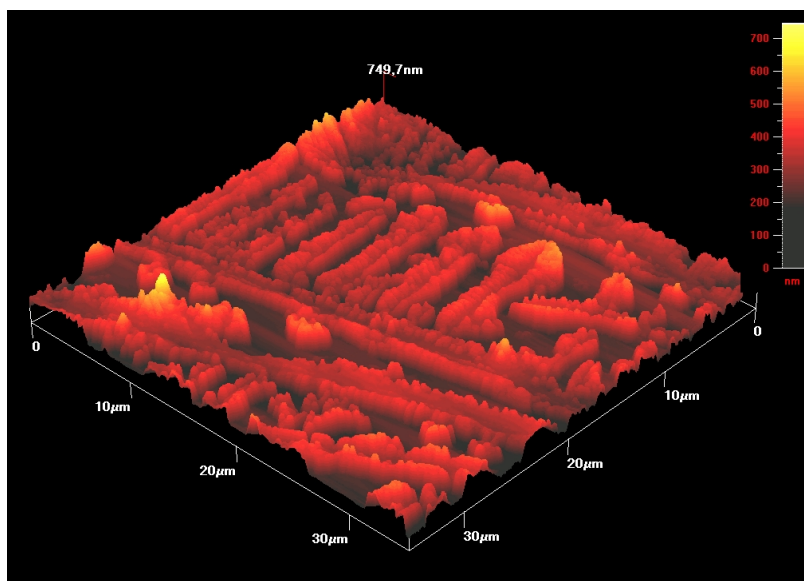
Na slici 5.1.9. jasno se uoči lamelaran izgled zidova skafolda, sa velikim brojem lamela dužine veće od 5 μm . Na slici 5.1.10. uoči se takodje, igličasta struktura keramičkih zidova, sa dužinom iglica 1 μm i prečnikom 50 nm, a na slici 5.1.11. jasno je uočljiva struktura koja podseća na paukovu mrežu, sa nitima dužine 5-10 μm i prečnika 40 nm.



Slika 5.1.12. AFM: Tipičan izgled strukture pHAP skafolda dobijenog metodom templejta polimerne pene



Slika 5.1.13. AFM: Tipičan izgled strukture pHAP skafolda dobijenog metodom templejta polimerne pene

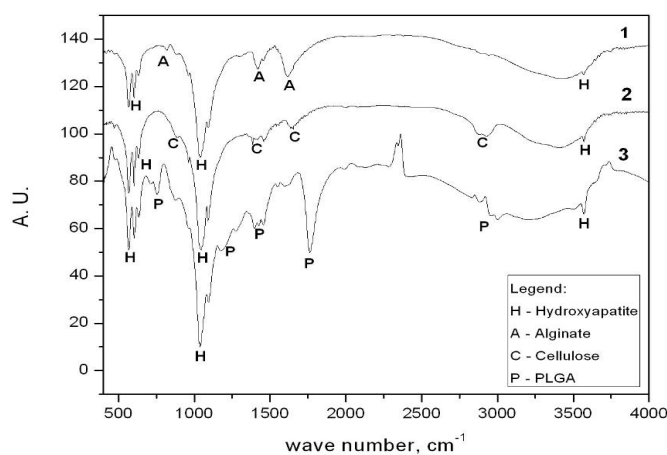


Slika 5.1.14. AFM: Tipičan izgled strukture pHAP skafolda dobijenog metodom templejta polimerne pene

Slika 5.1.14. pokazuje trodimenzionalnu strukturu, tzv. strukturu ešlja, koja je izuzetno bitna za dobro naleganje elija pri kontaktu sa skafoldom. Kanali koji definišu zajedno sa ispupenjima morfologiju unutrašnjih zidova skafolda, su dužine 30 μm, širine 3 μm, razgranati su i imaju debljinu zida 3-5 μm. Jasna je njihova izrazita geometrijska orijentacija, uslovljena samom formom estica i polimernog templejta.

5.1.2.3. FTIR analiza

Analiza FTIR spektra otkriva da, faza, koja je biometički samoansemblirana na površini pHAP /polimer kompozita, je pHAP blago pomerene stihometrije.



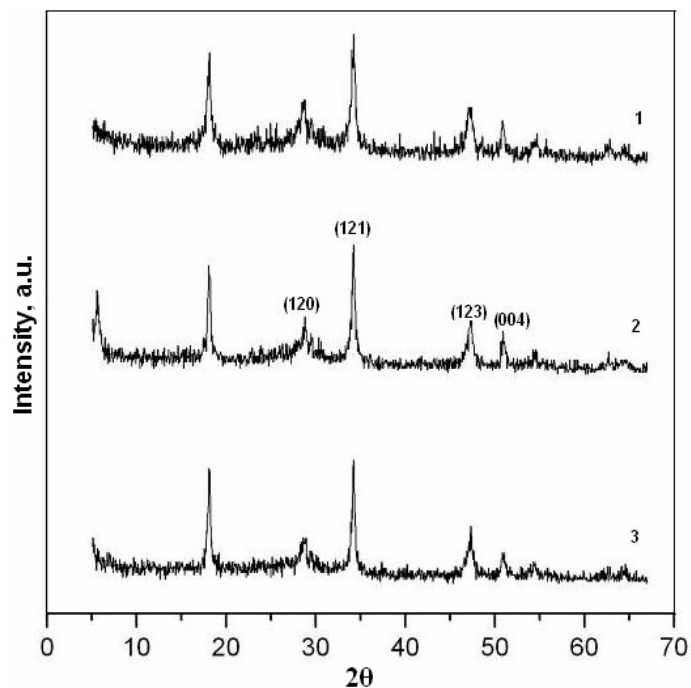
Slika 5.1.15. IR spektar samoansembliranog pHAP na različitim vrstama polimernih filmova: 1- alginat, 2 – celuloza, 3 - PLGA

Sva tri IR spektra na slici 5.1.15. pokazuju trake karakteristične za pHAP: traka malog intenziteta, koja odgovara istezanju hidoksilne grupe uoava se na oko 3570 cm^{-1} ; traka na oko 1640 cm^{-1} pripisuje se deformacionom modu OH grupa; trake locirane na 600 do 650 cm^{-1} se pripisuju slobodnom modu oscilovanja O-H vibracije; vibracija asimetričnog istezanja PO_4^{3-} uoava se na oko $970\text{--}1090\text{ cm}^{-1}$; a vibracija simetričnog istezanja PO_4^{3-} je prisutna na $550\text{--}640\text{ cm}^{-1}$, dok trake na oko $430\text{--}450\text{ cm}^{-1}$ delimično odgovaraju simetričnom modu istezanja PO_4^{3-} vibracije.

Karakteristike krivulja PLGA polimera su takodje vidljive u IR spektru: traka registrovana na 2995 cm^{-1} odgovara C-H asimetričnoj istežu vibraciji, dok trake na oko 2950 i 2880 cm^{-1} odgovaraju C-H simetričnom istežu vibraciji; izražena traka na 1760 cm^{-1} se pripisuje C=O istezanju; traka na oko $1100\text{--}1280\text{ cm}^{-1}$ se pripisuje istezanju alfatnog etra C–O–C; trake koje se nalaze u oblasti $1400\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ odgovaraju CH_2 , CH_3 , and CH deformacionim vibracijama; i traka koja se nalazi na oko 750 cm^{-1} pripisuje se uvrtnju dugačkog CH_2 lanca (65)

5.1.2.4.XRD analiza

Karakteristični difrakcioni vrhovi koji odgovaraju (121), (120), (123) i (004) ravni jasno pokazuju da su pHAP samostalno sastavljene na površini PLGA deponovane sa površine pHAP skafolda (slika. 5.1.16). Proračun veličine kristalita izveden primenom Šererove formule pokazuje male razlike u stepenu kristaliniteta između različitih uzoraka (prosečna veličina kristalita za celulozu je 7.9 nm , za alginat $8,7\text{ nm}$ i PLGA $9,7\text{ nm}$). Iako postoje najmanje vrednosti veličine kristalita za samoansamblirani pHAP na površini celuloznog tankog filma i najveće vrednosti za PLGA tanki film, te razlike su zanemarljive. Osim toga, semikvantitativne hemijske analize, izvedene metodom energetske disperzivne spektroskopije (EDS analize), pokazuju da su vrednosti Ca/P za sve tanke filmove bliske vrednostima stehometrijske pHAP (Ca/P za PLGA 1.65).

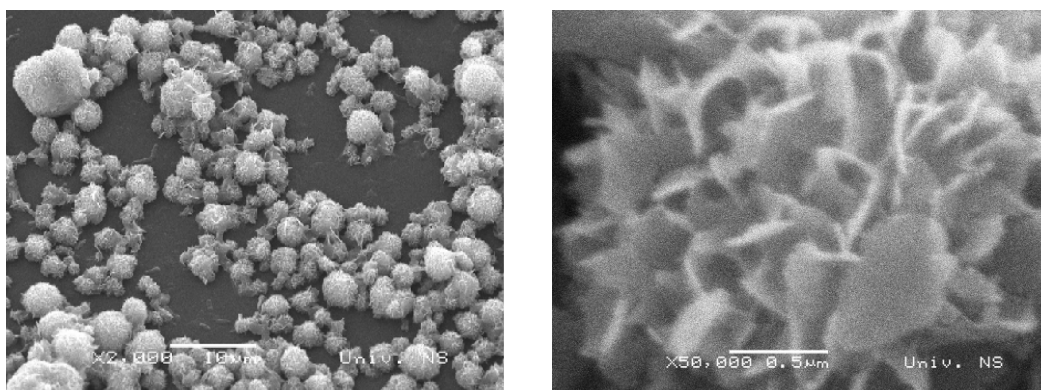


Slika 5.1.16 XRD spektar pHAP samostalno sastavljenog na razli itim polimer filmovima:

1- celuloza, 2-alginat, 3- PLGA

5.1.2.5.SEM analiza pHAP sa PLGA

SEM studija otkriva veoma razvijenu morfologiju pHAP estica.



(a)

(b)

Slika 5.1.17. pHAP sastavljen na PLGA tankom filmu: a) manje uve anje i b) ve e uve anje

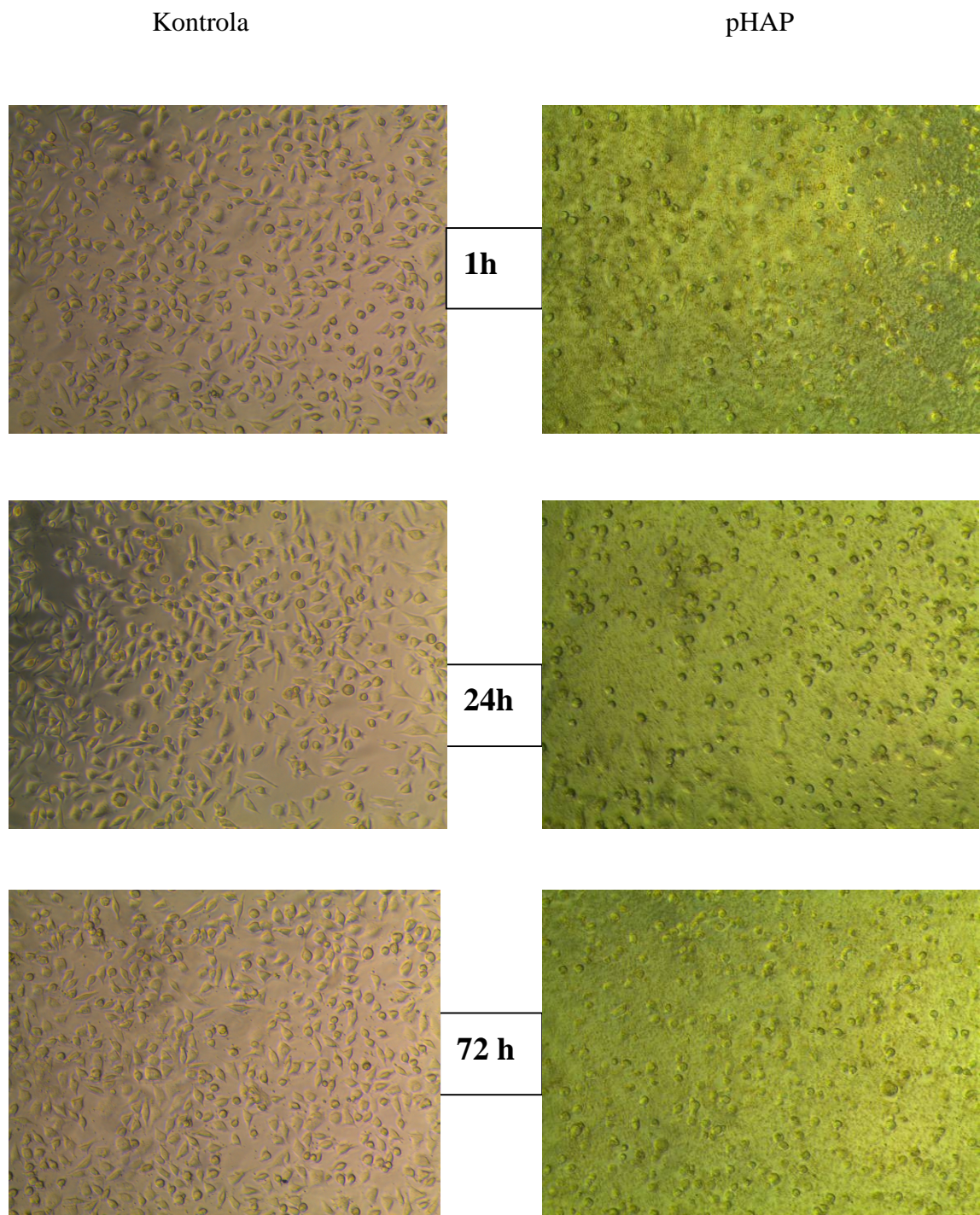
Samostalno sastavljena pHAP na površini PLGA tankog filma je prikazana na slici 5.1.17.: posmatrane loptaste estice pokazuju izuzetno razvijenu morfologiju sa

strukturama nalik laticama na datoj površini. Veli ina estice su uglavno kre e od 2.5 do 3.5 μm , me utim, prisutne su i neke manje (0.7 – 1.5 μm) i mali broj nešto ve ih estica (4.3 - 8.5 μm). Širina lati astih struktura na datoj površini je samo 15-20 nm. Udaljenost između estica je u rasponu od 900 nm do 1.8 μm .

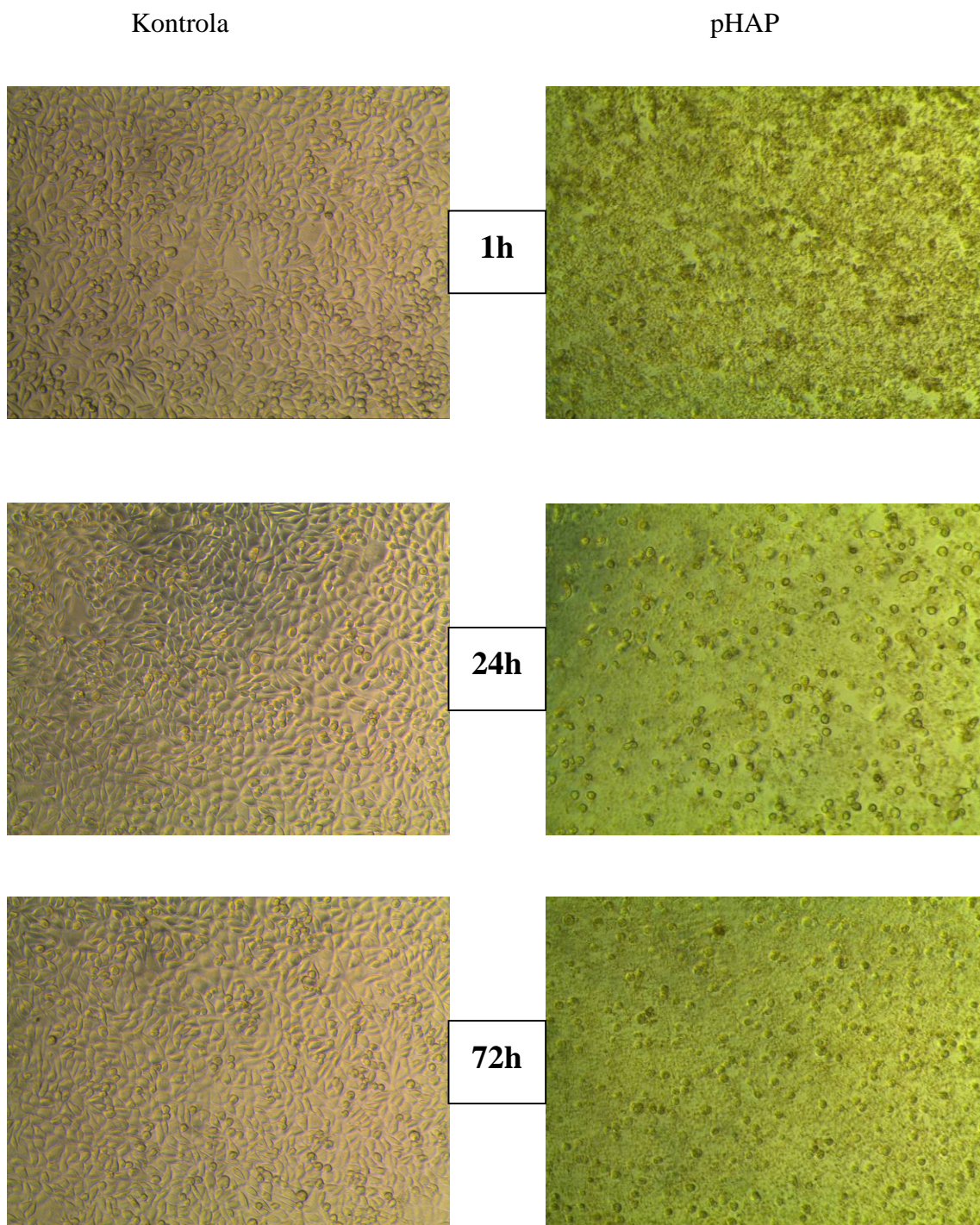
5.2.REZULTATI ISPITIVANJA DIREKTNE I INDIREKTNE CITOTOKSI NOSTI ANALIZIRANIH MATERIJALA

5.2.1.Ispitivanje citotoksi nosti – *indirektni kontakt* ispitivanog materijala sa elijskom kulturom - MTT test

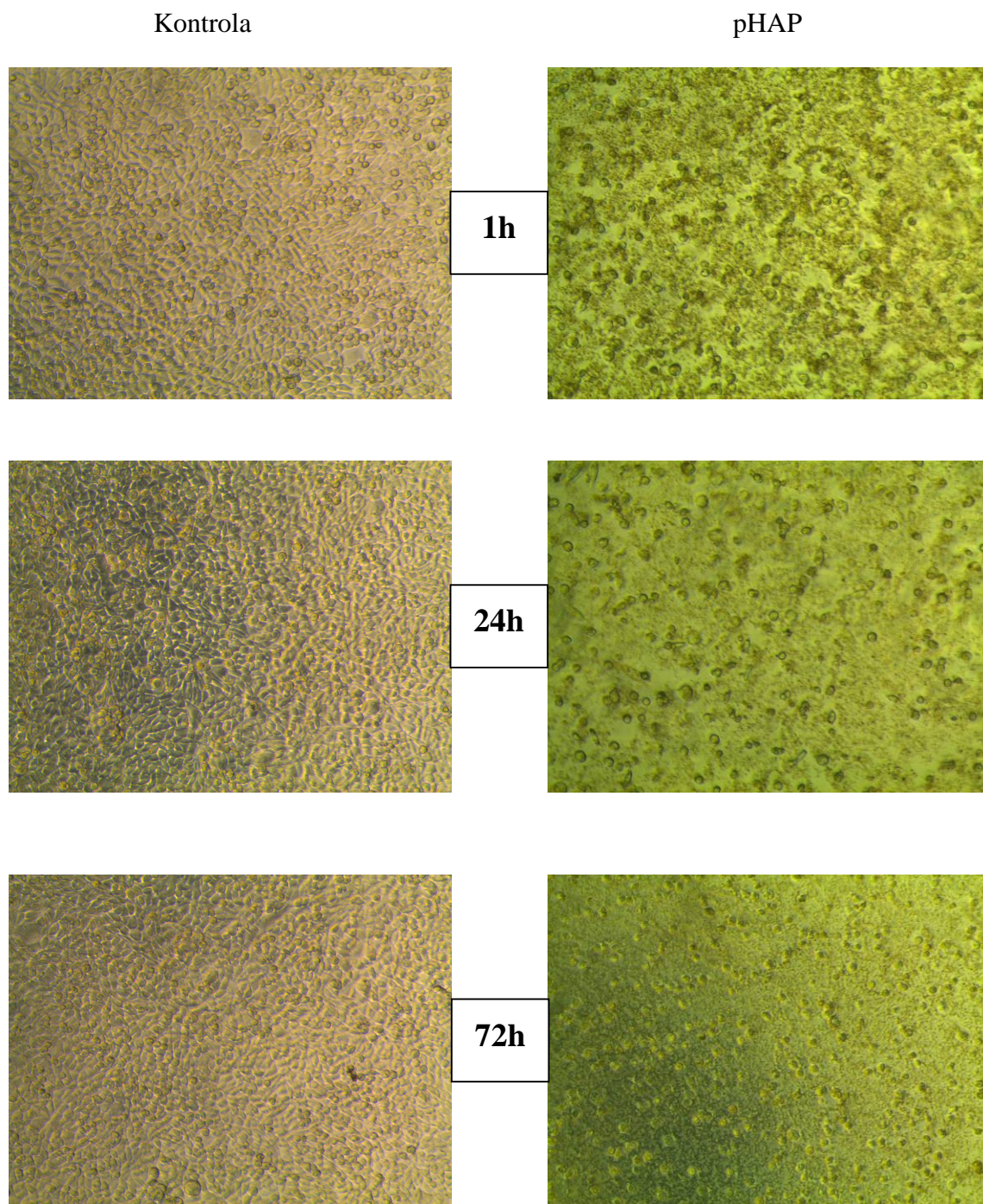
Rezultati MTT testa su izraženi kao procenat vijabilnih elija u odnosu na kontrolu – ista elijska kultura L929 fibroblasta bez ispitivanog materijala. Kontrolna grupa pokazuje preživljavanje 100 procenata elija. Pozitivnu kontrolu predstavljao je 4% fenol, koji je doveo do preživljavanja nešto više od 30% elija u kulturi, što je visoko statisti ki zna ajna razlika ($p < 0.005$) u odnosu na kontrolu. Rezultati MTT testa prikazani su na slici 5.2.1.



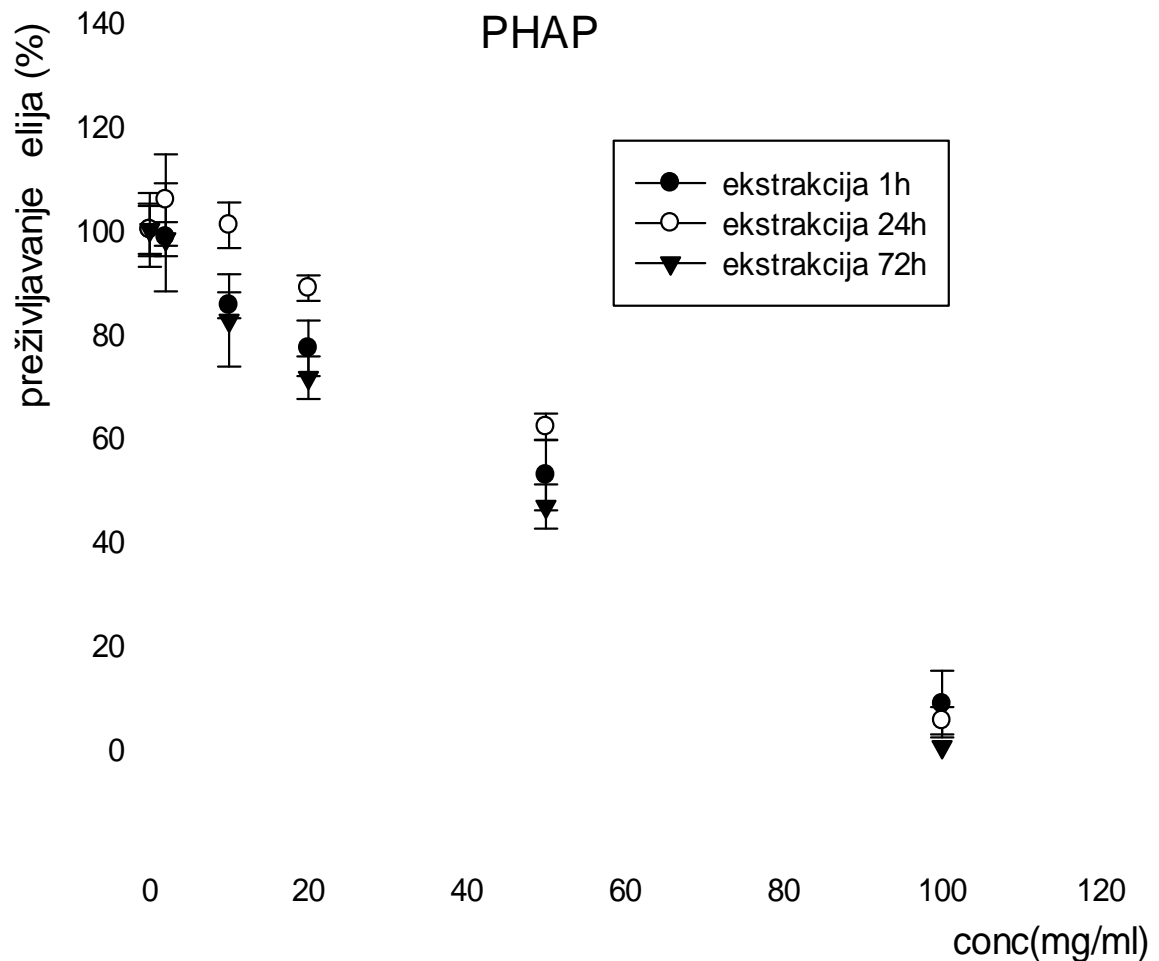
Slika 5.2.1.1. Mikroskopski prikaz mišjih fibroblasta u kulturi – L929 tretiranih **24sata** ekstraktima koji su nastali nakon izlaganja hranljive podloge pHAP-u 1, 24 i 72h. Uo av se pove anje citotoksi nosti sa pove anjem vremenskog perioda izlaganja hranljive podloge ekstraktu pHAP-a.



Slika 5.2.1.2. Mikroskopski prikaz mišjih fibroblasta u kulturi – L929 tretiranih **48 sati** ekstraktima koji su nastali nakon izlaganja hranljive podloge pHAP-u 1, 24 i 72h. Uo ava se pove anje citotoksi nosti sa pove anjem vremenskog perioda izlaganja hranljive podloge ekstraktu pHAP-a.

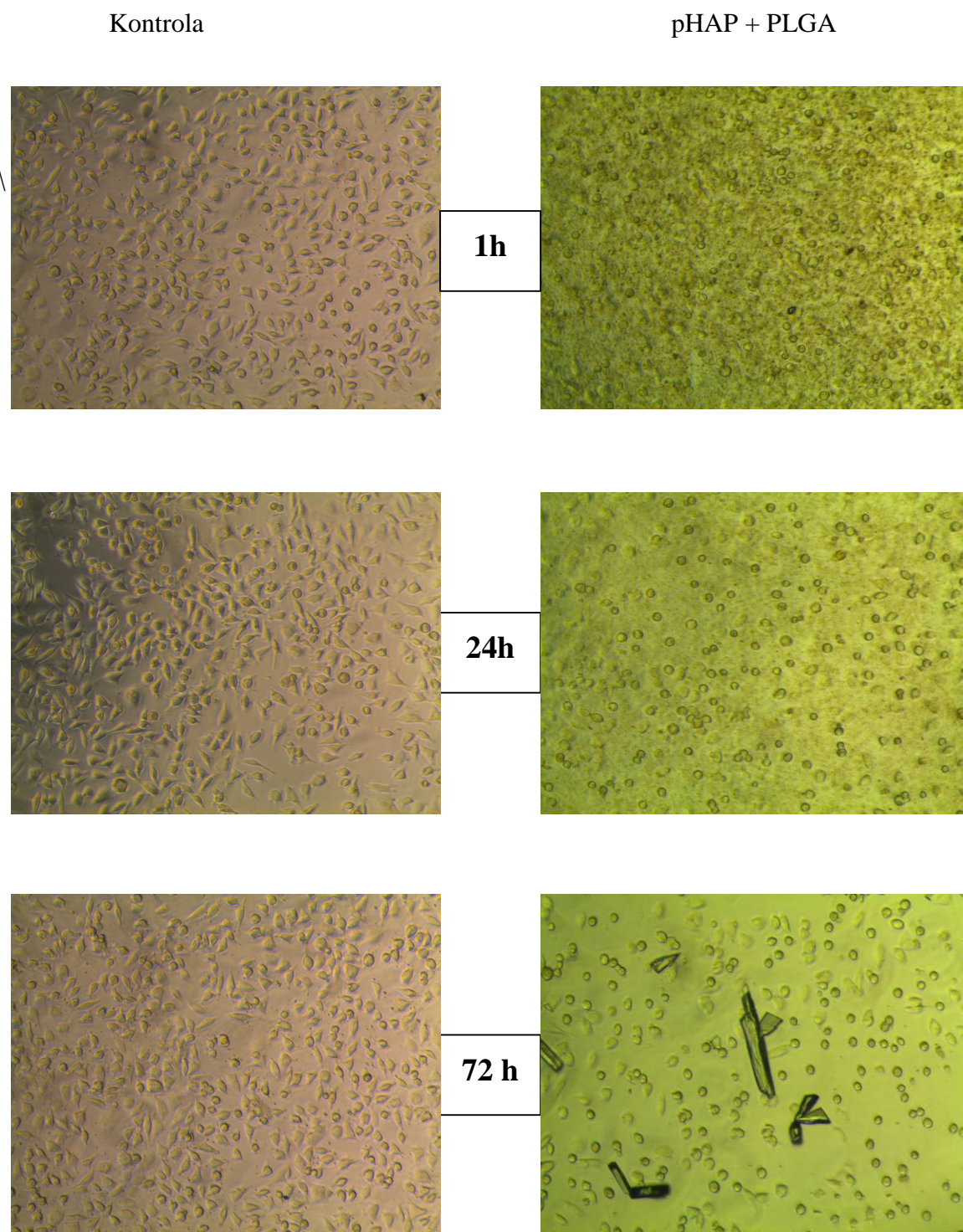


Slika 5.2.1.3. Mikroskopski prikaz mišjih fibroblasta u kulturi – L929 tretiranih **72 sata** ekstraktima koji su nastali nakon izlaganja hranljive podloge pHAP-u 1, 24 i 72h. Uo av se pove anje citotoksi nosti sa pove anjem vremenskog perioda izlaganja hranljive podloge ekstraktu pHAP-a.

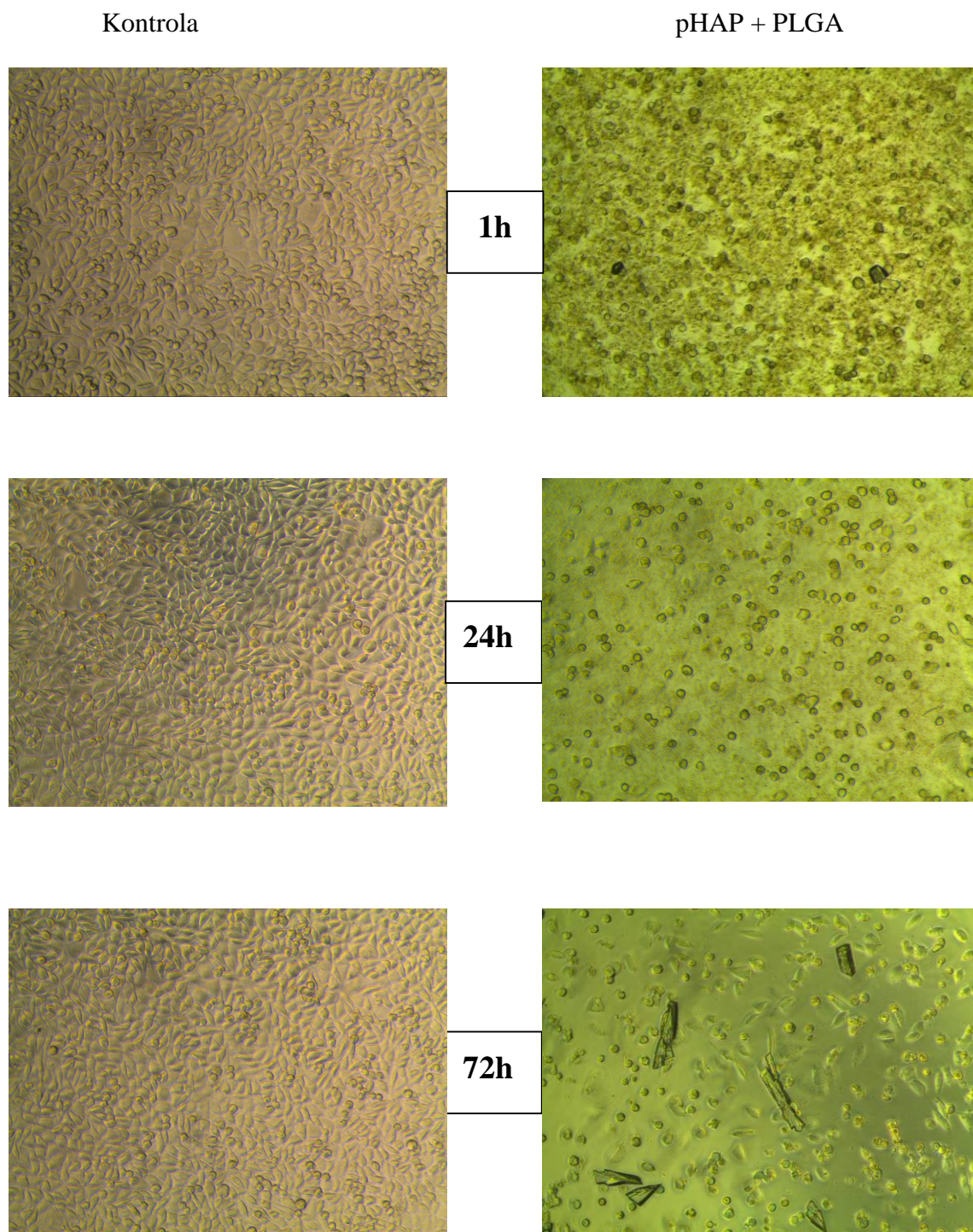


Grafikon 5.2.1.1. Preživljavanje elijske kulture L929 fibroblasta miša u prisustvu ekstrakta pHAP u različitim koncentracijama nastalim nakon izlaganja hranljive podloge materijalu nakon 1, 24 i 72 sata.

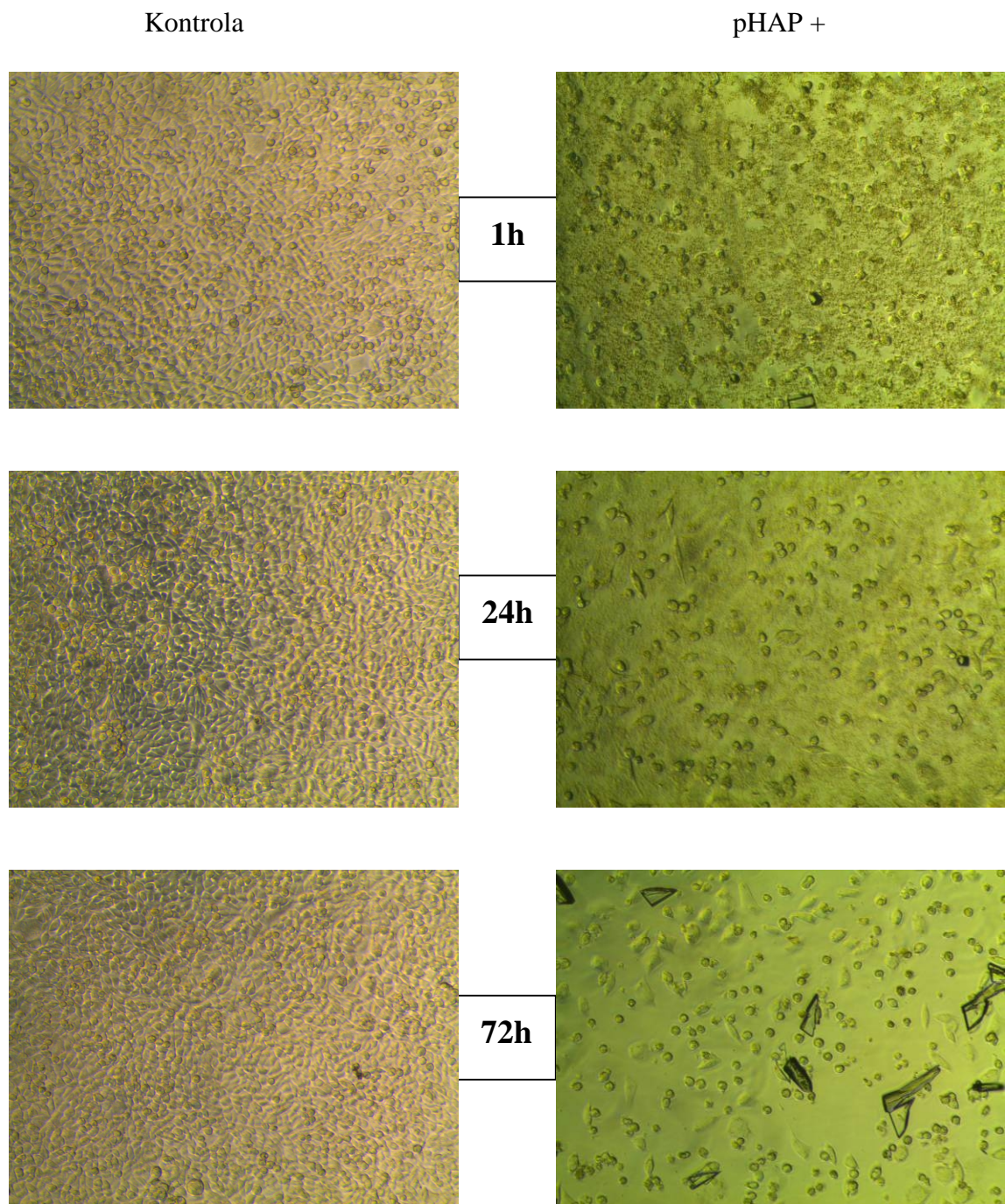
Broj vijabilnih elija L929 fibroblasta eksponencijalno se smanjuje pri njihovom izlaganju produktima degradacije u vremenskom periodu od 24h, 48h i 72h, odnosno citotoksičnost se povećava sa povećanjem vremena kojem su elije izložene ekstraktima pHAP-a (grafikon 5.2.1.1.). Citotoksičnost je najviše izražena kod ekstrakta pHAP-a koji je nastao izlaganjem hranljive podloge materijalu u najdužem vremenskom periodu, u ovom eksperimentu 72 sata. Ispitivani materijal pHAP nije doveo do potpunog citotoksičnog efekta na kulturu fibroblasta L929.



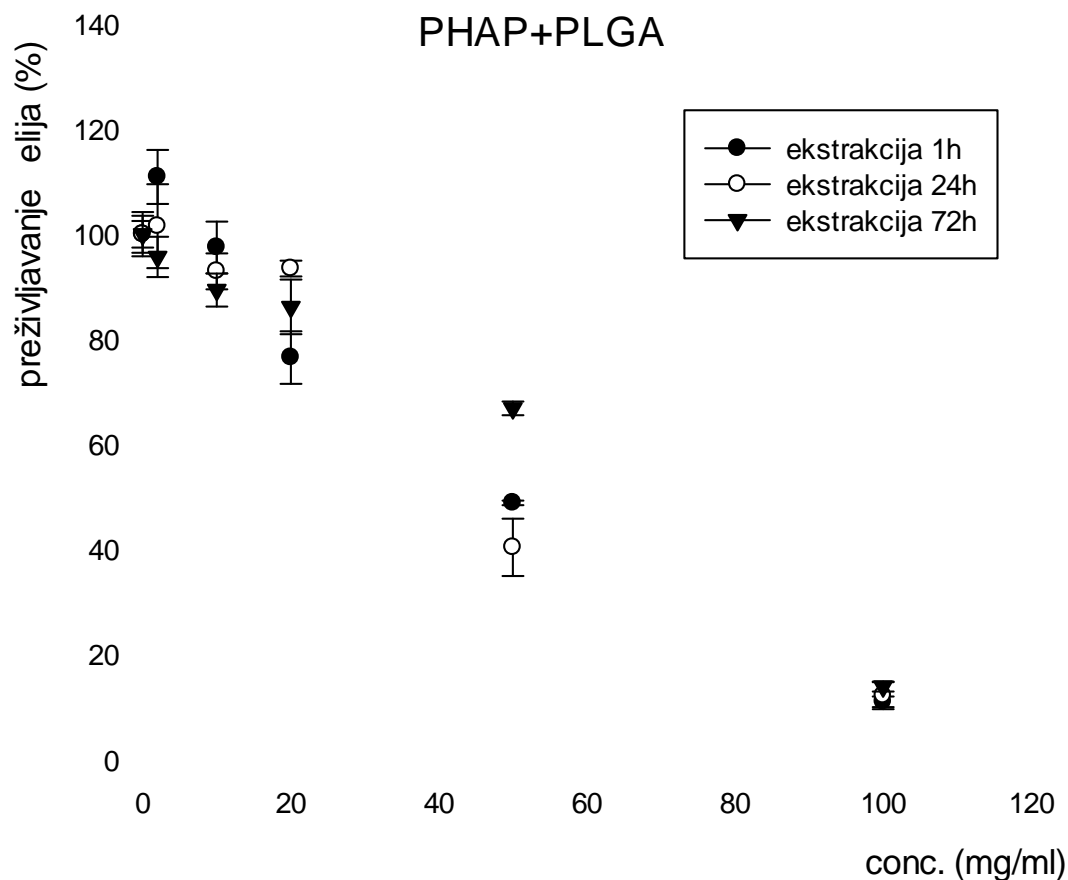
Slika 5.2.1.4. Mikroskopski prikaz mišjih fibroblasta u kulturi – L929 tretiranih **24sata** ekstraktima koji su nastali nakon izlaganja hranljive podloge pHAP + PLGA 1, 24 i 72h. Uo ava se pove anje citotoksi nosti sa pove anjem vremenskog perioda izlaganja hranljive podloge ekstraktu pHAP-a i PLGA.



Slika 5.2.1.5.. Mikroskopski prikaz mišjih fibroblasta u kulturi – L929 tretiranih **48 sati** ekstraktima koji su nastali nakon izlaganja hranljive podloge pHAP + PLGA 1, 24 i 72h. Uo čega se povećava citotoksičnost sa povećanjem vremenskog perioda izlaganja hranljive podloge ekstraktu pHAP-a i PLGA.

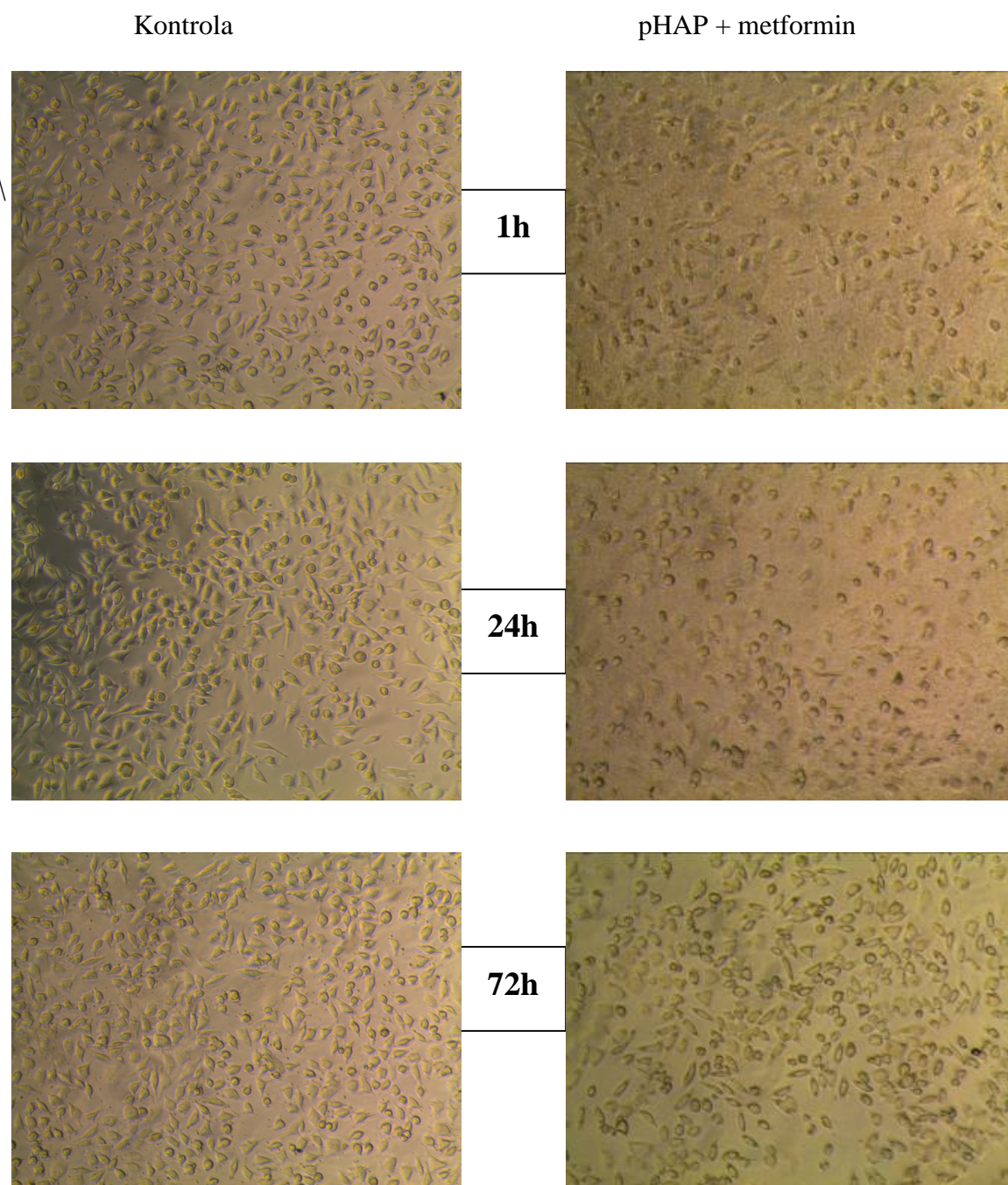


Slika 5.2.1.6. Mikroskopski prikaz mišjih fibroblasta u kulturi – L929 tretiranih **72 sata** ekstraktima koji su nastali nakon izlaganja hranljive podloge pHAP + PLGA 1, 24 i 72h. Uo ča se pove ćanje citotoksi nosti sa pove ćanjem vremenskog perioda izlaganja hranljive podloge ekstraktu pHAP-a i PLGA.

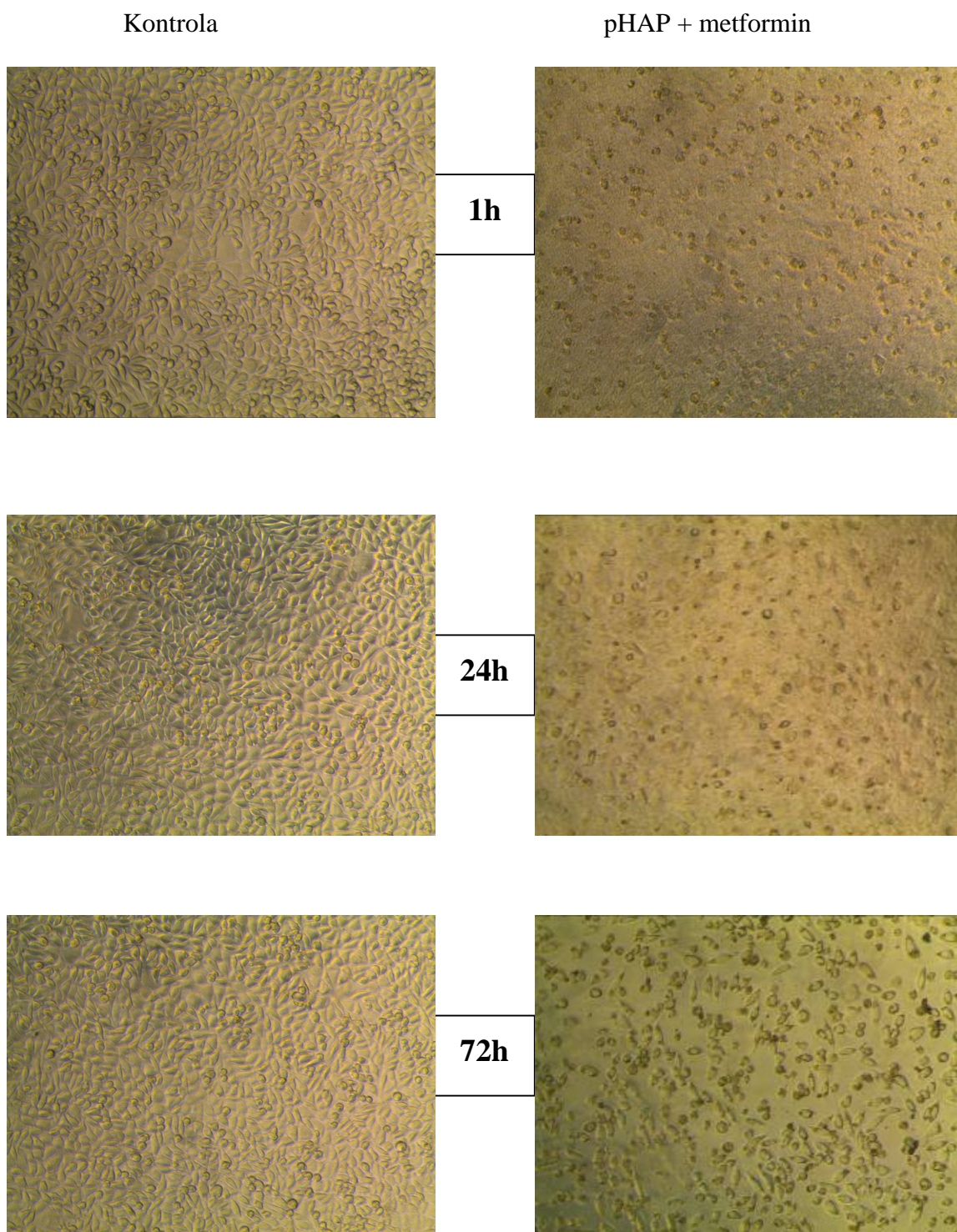


Grafikon 5.2.1.2. Preživljavanje elijske kulture L929 fibroblasta miša u prisustvu ekstrakta pHAP sa PLGA u različitim koncentracijama nastalim nakon izlaganja hranjive podloge materijalu nakon 1, 24 i 72 sata.

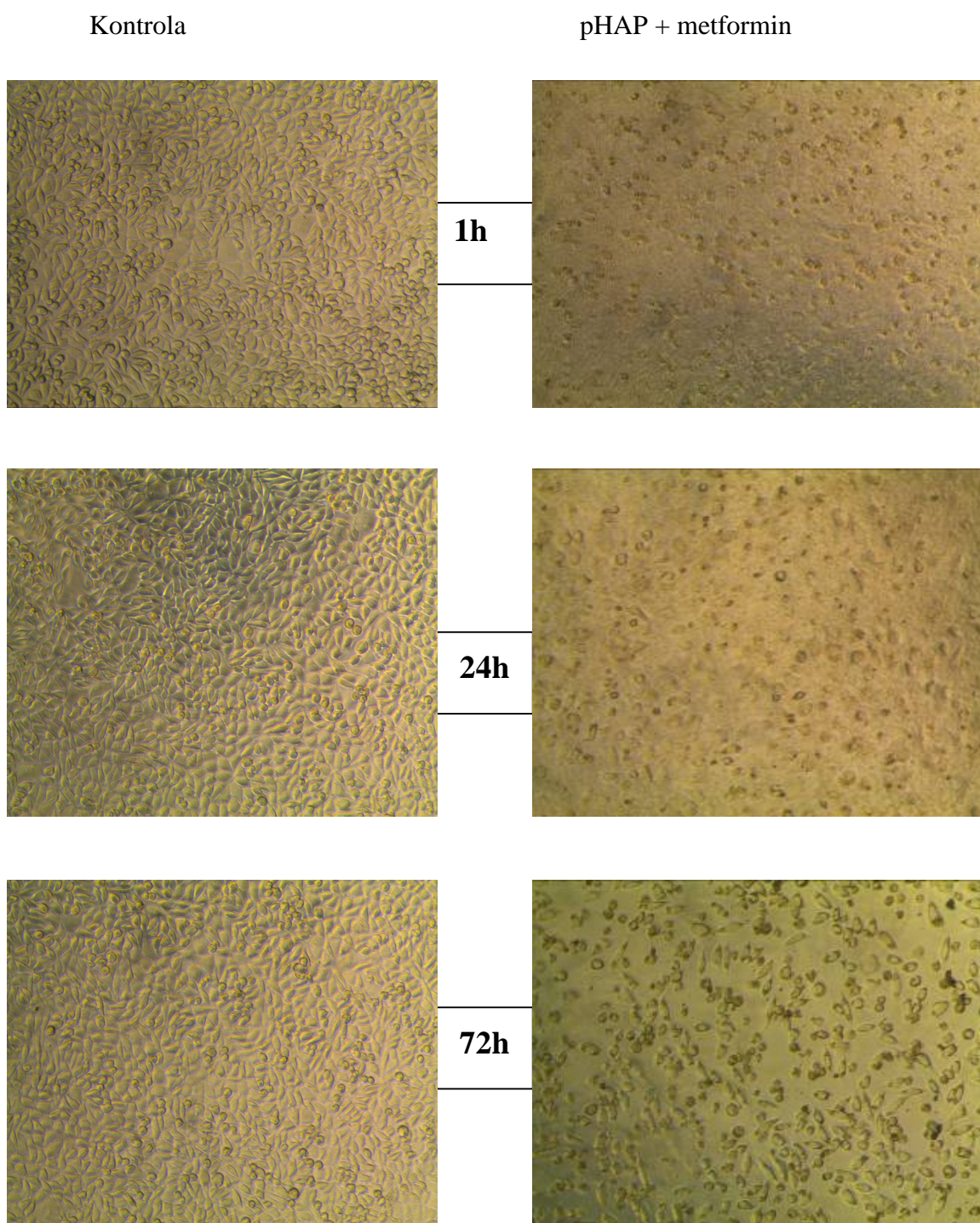
Broj vijabilnih elija L929 fibroblasta smanjuje se pri njihovom izlaganju produktima degradacije u vremenskom periodu od 24h, 48h i 72h, odnosno citotoksičnost se povećava sa povećanjem vremena kojem su elije izložene ekstraktima pHAP sa PLGA (Grafikon 5.2.1.2.). Citotoksičnost je najviše izražena kod ekstrakta pHAP-a koji je nastao izlaganjem hranjive podloge materijalu u najdužem vremenskom periodu, u ovom eksperimentu 24 sata. Ispitivani materijal pHAP sa PLGA nije doveo do potpunog citotoksičnog efekta na kulturu fibroblasta L929.



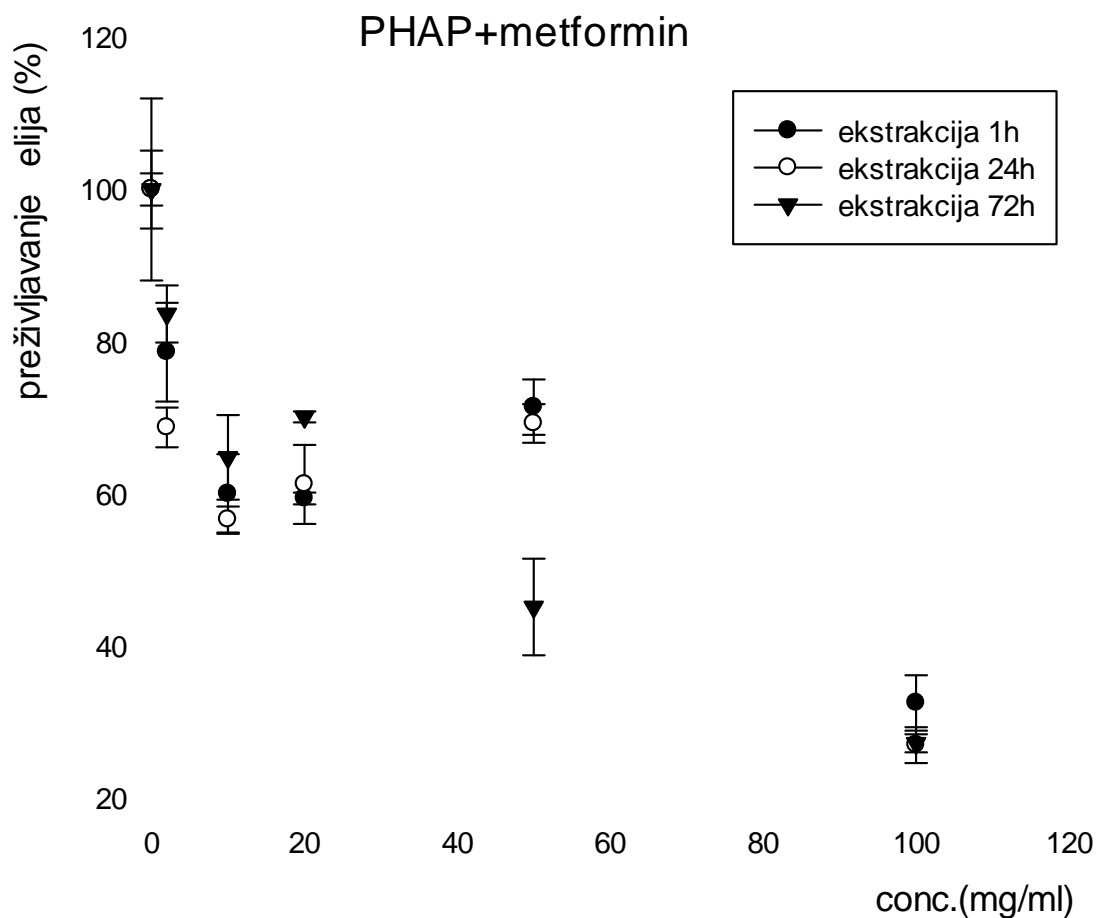
Slika 5.2.1.7. Mikroskopski prikaz mišjih fibroblasta u kulturi – L929 tretiranih **24sata** ekstraktima koji su nastali nakon izlaganja hranjive podloge pHAP + metformin 1, 24 i 72h. Uočava se po etna izražena citotoksičnost nakon 72h dolazi do povećanja broja vijabilnih ćelija (nakon 72h).



Slika 5.2.1.8. Mikroskopski prikaz mišjih fibroblasta u kulturi – L929 tretiranih **48 sati** ekstraktima koji su nastali nakon izlaganja hranljive podloge pHAP + metformin 1, 24 i 72h. Uo čega se po etna izražena citotoksi nost nakon ega dolazi do pove anja broja vijabilnih elija (nakon 72h).



Slika 5.2.1.9. Mikroskopski prikaz mišjih fibroblasta u kulturi – L929 tretiranih **72 sati** ekstraktima koji su nastali nakon izlaganja hranjive podloge pHAP + metformin 1, 24 i 72h. Uočava se po etna izražena citotoksičnost nakon čega dolazi do povećanja broja vijabilnih ćelija (nakon 72h).

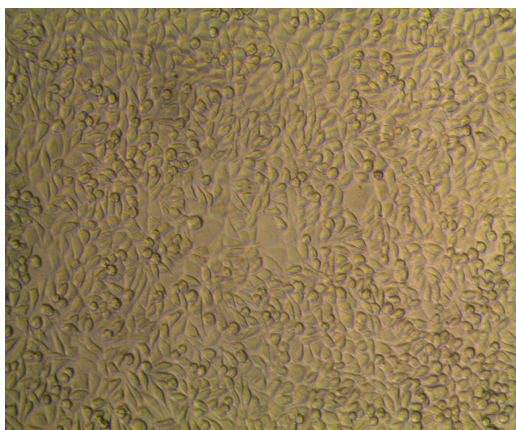


Grafikon 5.2.1.3. Preživljavanje elijske kulture L929 fibroblasta miša u prisustvu ekstrakta pHAP sa metforminom u različitim koncentracijama nastalim nakon izlaganja hranjive podloge materijalu nakon 1, 24 i 72 sata.

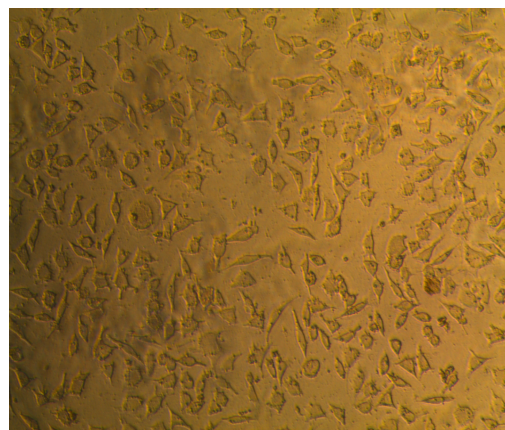
Broj vijabilnih elija L929 fibroblasta smanjuje se pri njihovom izlaganju produktima degradacije u vremenskom periodu od 24h, 48h i 72h, odnosno citotoksičnost se povećava sa povećanjem vremena kojem su elije izložene ekstraktima pHAP sa metforminom (Grafikon 5.2.1.3.). Za razliku od drugih ispitivanih materijala pHAP u kombinaciji sa metforminom pokazuje izrazitu citotoksičnost u niskim koncentracijama (do 10mg/ml) bez obzira na vremenski period izloženosti hranjive podloge ovom materijalu. Nakon toga dolazi do oporavka i čak porasta broja elijske populacije fibroblasta L929, da bi pri koncentracijama većim od 60 mg/ml došlo do pojave ravnomernog povećanja citotoksičnosti sa porastom koncentracije produkata degradacije, kao kod ostalih ispitivanih materijala. Ispitivani materijal pHAP sa

metforminom nije doveo do kompletnog citotoksičnog efekta na kulturu fibroblasta L929.

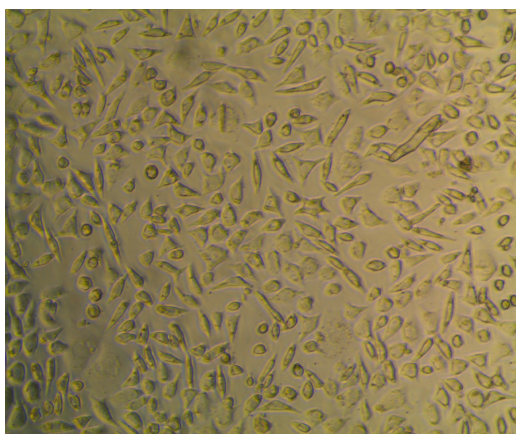
Kontrola



Fenol 4% nakon 24 h



Fenol 4% nakon 48 h

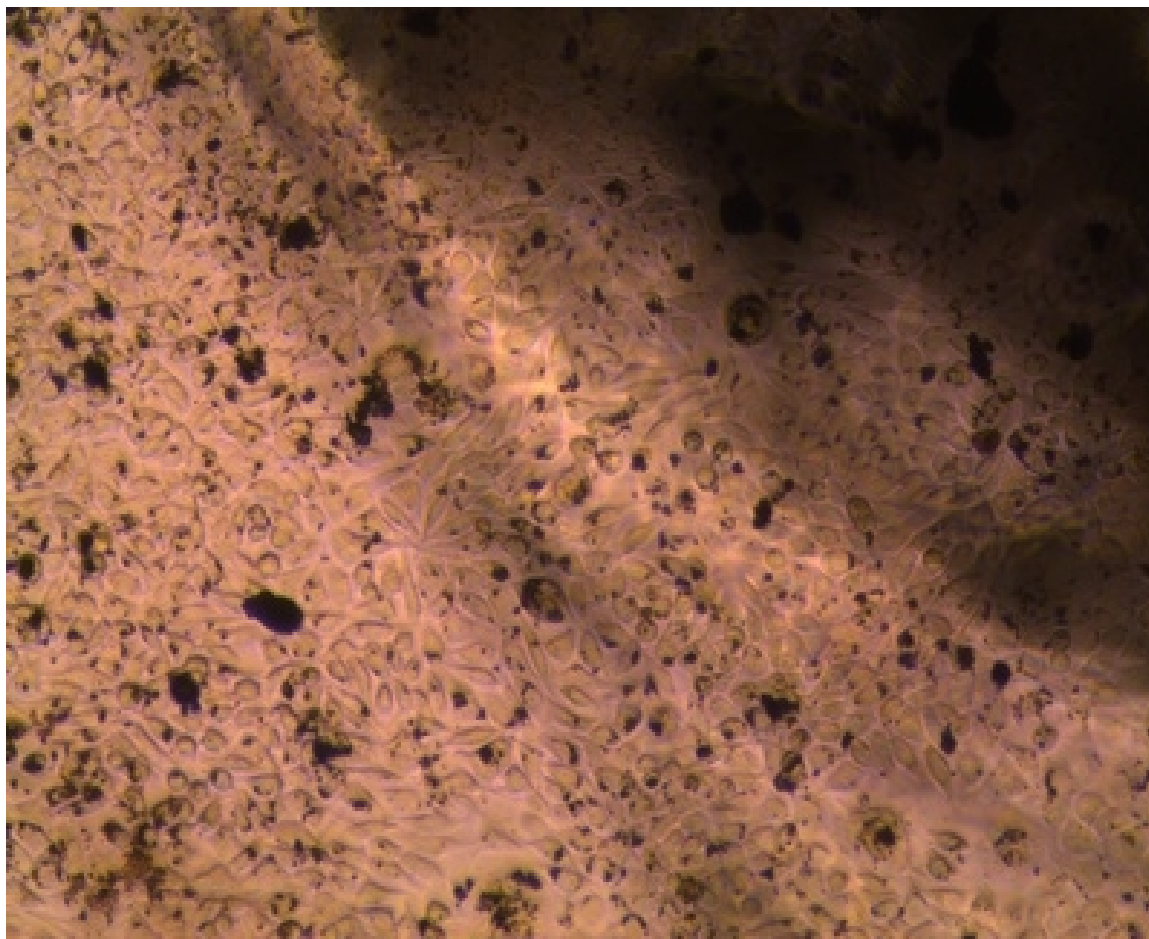


Fenol 4% nakon 24 h

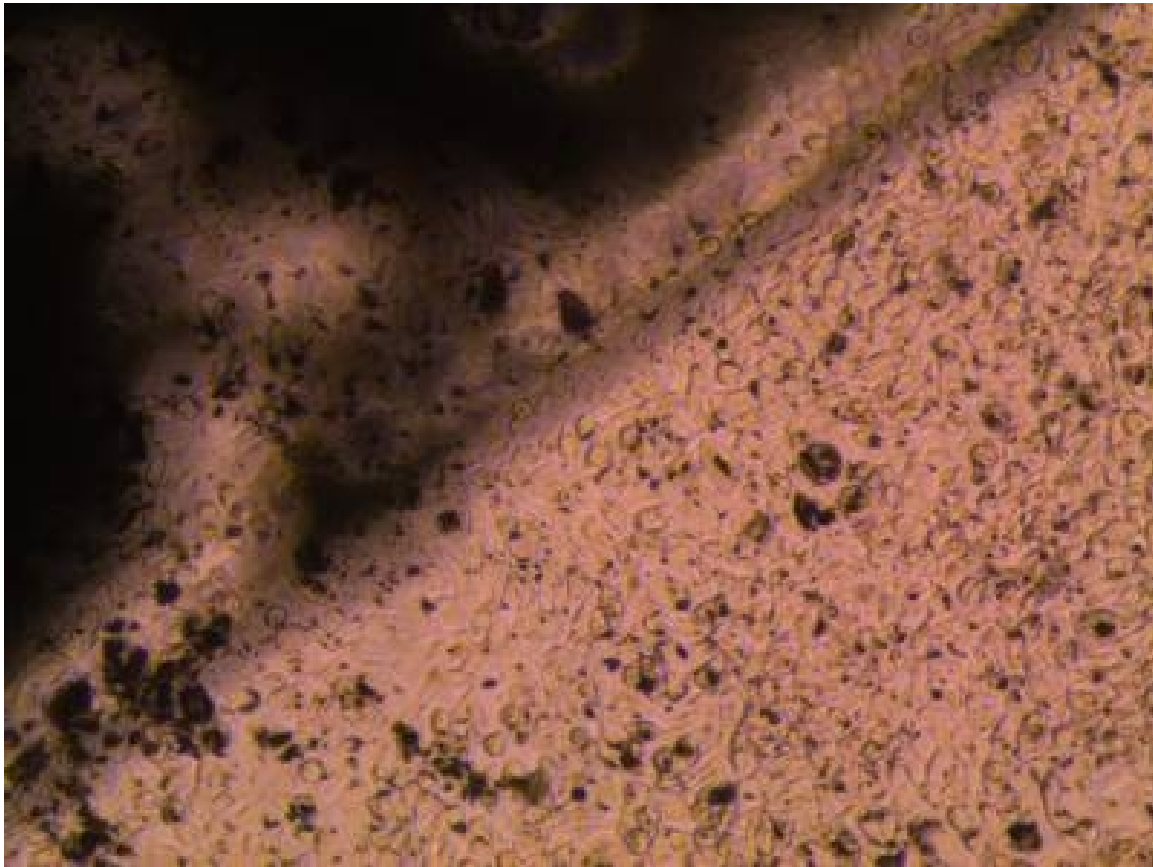


Slika 5.2.1.10. Pozitivnu kontrolu predstavljao je 4% fenol, koji je doveo do preživljavanja nešto više od 30% elija u kulturi.

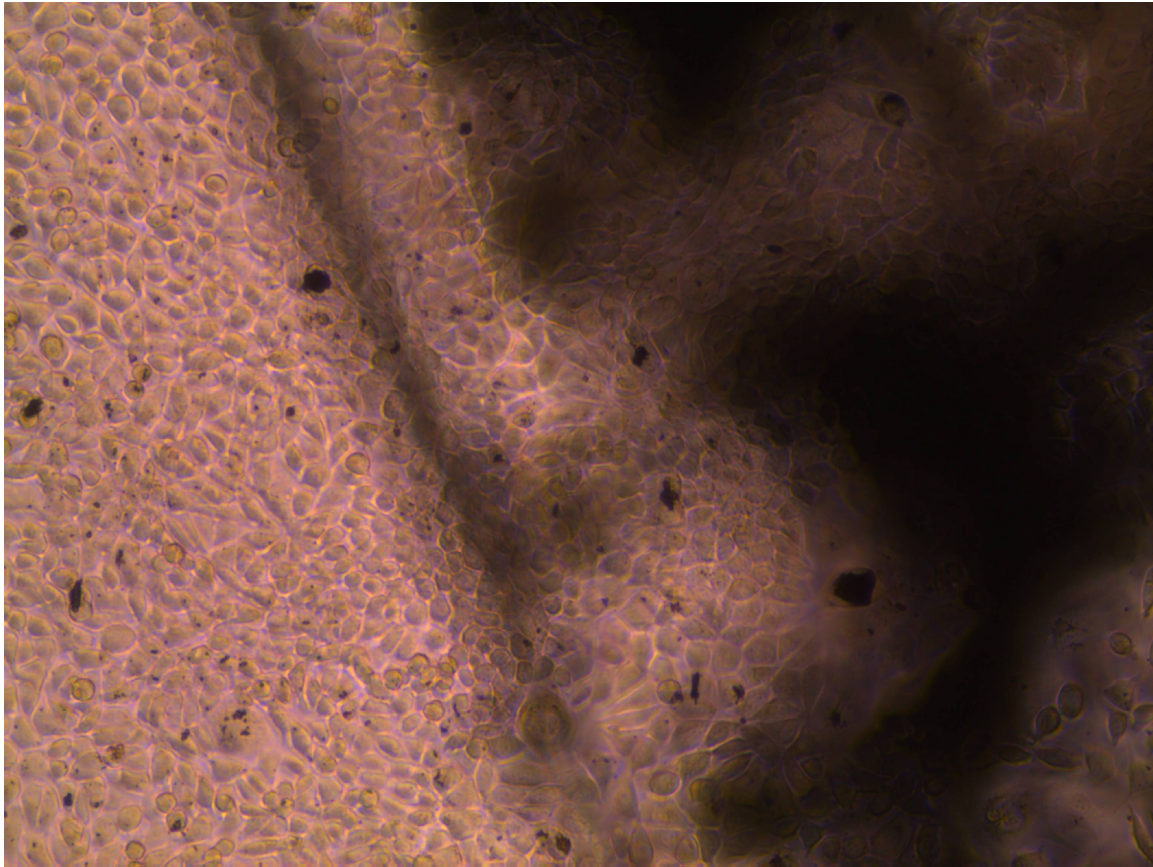
**5.2.2. Ispitivanje citotoksičnosti – *direktni kontakt* ispitivanog materijala sa
celijskom kulturom - LDH test**



Slika 5.2.2.1. Ispitivanje citotoksičnosti – *direktni kontakt* ispitivanog materijala sa
celijskom kulturom - LDH test sa pHAP - om. Vidi se veliki broj celija fibroblasta L929
normalne morfologije koje su u bliskom kontaktu sa pHAP-om.

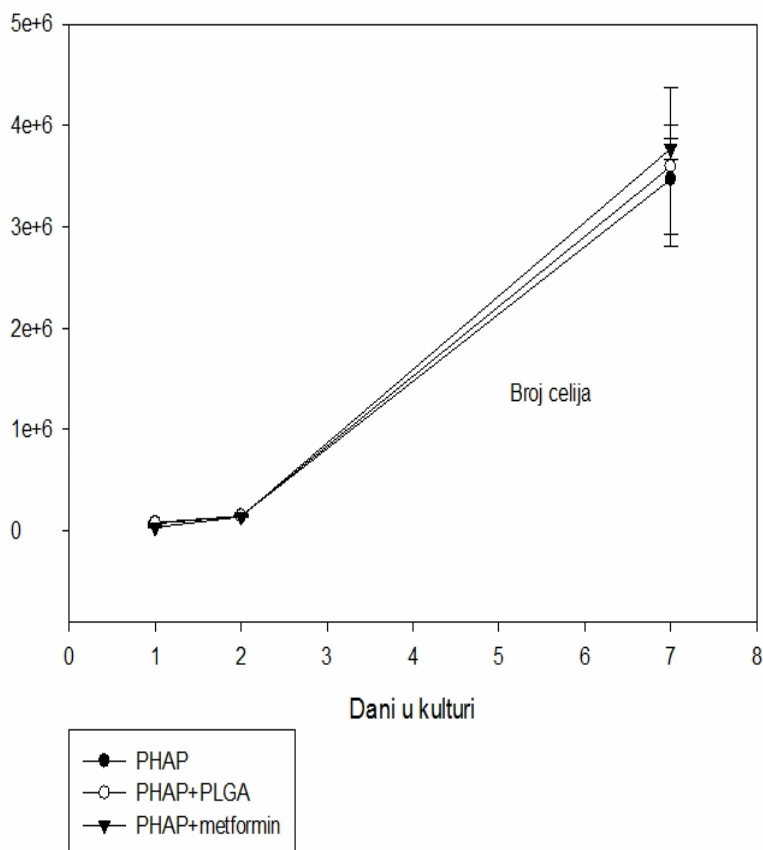


Slika 5.2.2.2. Ispitivanje citotoksi nosti – *direktni kontakt* ispitivanog materijala sa elijskom kulturom - LDH test sa pHAP +PLGA. Vidi se veliki broj elija fibroblasta L929 normalne morfologije koje su u bliskom kontaktu sa pHAP-om. Na slici se vidi da su umnožene elije naselile i mikroskopsku plo čicu sa fiksiranim pHAP + PLGA.



Slika 5.2.2.3. Ispitivanje citotoksi nosti – *direktni kontakt* ispitivanog materijala sa ćelijskom kulturom - LDH test sa pHAP +metformin. Gusto naseljene ćelije prekrivaju ivice mikroskopske ploče i ispitivani materijal koji je fiksiran na ploči.

Broj celija adheriranih na materijalu nakon određenog broja dana u kulturi



Grafikon 5.2.2.1. Broj elija adheriran na pHAP, pHAP sa PLGA i pHAP sa metforminom.

Kao što se vidi na Grafikonu 5.2.2.1. značajna elijska proliferacija i adhezija nadjena je kod svih ispitivanih materijala. U ovom eksperimentu, pHAP, pHAP sa PLGA i pHAP sa metforminom nisu pokazali citotoksičnost u direktnom kontaktu sa elijskom kulturom fibroblasta L929. Prvog dana eksperimenta, broj elija u prisustvu svakog od ispitivanih materijala nije se značajno povećao. Od drugog dana eksperimenta elije su se umnožavale i njihov broj je eksponencijalno rastao. Na kraju eksperimenta, sedmog dana, elije fibroblasta L929 su bile u bliskom kontaktu sa svakim od ispitivanih materijala u velikom broju i neizmenjene morfologije.

5.3.REZULTATI ISPITIVANJA TESTA PRIMARNE KUTANE IRITACIJE

5.3.1.Sistemska reakcija podnošljivost - tolerancija

Nakon jednokratnog aplikovanja test materijala svi kuni i su se dobro oporavili i nisu pokazivali znake bolesti u naredna 72 sata.

5.3.2. Lokalna reakcija

5.3.2.1.Efekat pHAP

Eritem i edem nisu bili prisutni posle 24, 48 i 72 sata na tretiranim mestima ni kod jedne od ispitivanih životinja. Skor primarne kutane iritacije pojedina nih životinja prikazan je u Tabeli 5.3.1. Nije bilo statistički značajne razlike u vrednosti SPI između tretiranih mesta i kontrolnih mesta (negativna kontrola) ($p>0.05$). Indeks primarne kutane iritacije za pHAP bio je 0 na skali od 0.00 do 8.00. Na osnovu ovog indeksa primarne kutane iritacije, zaključeno je da pHAP nema iritirajuće osobine.

Tabela 5.3.1.. Skor eritema i edema posle primene pHAP

Kuni (red.broj)		24 s.		48 s.		72 s.		SPI	PII
		T ^a	K ^b	T	K	T	K		
1	Eritem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0/6-0/6=0	
	Edem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0		
2	Eritem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0/6-0/6=0	0
	Edem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0		
3	Eritem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0/6-0/6=0	
	Edem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0		

a Tretirano mesto

b Kontrolno mesto

SPI – Skor primarne iritacije

PII – Indeks primarne kutane iritacije

5.3.2.2. Efekat pHAP + metformin

Eritem i edem nisu bili prisutni posle 24, 48 i 72 sata na tretiranim i kontrolnim mestima ni kod jedne od tretiranih životinja. Skor primarne kutane iritacije pojedina njih životinja prikazan je u Tabeli 5.3.2. Nije bilo statistički značajne razlike u vrednosti SPI između tretiranih mesta i kontrolnih mesta (negativna kontrola) ($p > 0.05$). Indeks primarne kutane iritacije za pHAP + celuloza bio je 0 na skali od 0.00 do 8.00. Na osnovu ovog indeksa primarne kutane iritacije, zaključeno je da pHAP + metformin nema iritirajuće osobine.

Tabela 5.3.2.. Skor eritema i edema posle primene pHAP + metformin

Kuni (red.broj)		24 c		48 c		72 c		SPI	PII
		T ^a	K ^b	T	K	T	K		
1	Eritem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0/6-0/6=0	
	Edem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0		
2	Eritem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0/6-0/6=0	0
	Edem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0		
3	Eritem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0/6-0/6=0	
	Edem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0		

a Tretirano mesto

b Kontrolno mesto

SPI – Skor primarne iritacije

PII – Indeks primarne kutane iritacije

5.3.2.3. Efekat pHAP + PLGA

Eritem i edem nisu bili prisutni posle 24, 48 i 72 sata na tretiranim i kontrolnim mestima ni kod jedne od tretiranih životinja. Skor primarne kutane iritacije pojedina nih životinja prikazan je u Tabeli 5.3.3. Nije bilo statisti ki zna ajne razlike u vrednosti SPI izme u tretiranih mesta i kontrolnih mesta (negativna kontrola) ($p>0.05$). Indeks primarne kutane iritacije za pHAP + PLGA bio je 0 na skali od 0.00 do 8.00. Na osnovu ovog indeksa primarne kutane iritacije, zaklju eno je da pHAP + PLGA nema iritiraju e osobine.

Tabela 5.3.3. Skor eritema i edema posle primene pHAP + PLGA

Kuni (red.broj)		24 c		48 c		72 c		SPI	PII
		T ^a	K ^b	T	K	T	K		
1	Eritem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0/6-0/6=0	
	Edem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0		
2	Eritem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0/6-0/6=0	0
	Edem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0		
3	Eritem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0/6-0/6=0	
	Edem	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0		

a Tretirano mesto

b Kontrolno mesto

SPI – Skor primarne iritacije

PII – Indeks primarne kutane iritacije

5.3.2.4. Efekat mle ne kiseline (98%) – pozitivna kontrola

U prvom vremenskom periodu analize reakcije kože (24 sata nakon uklanjanja flastera sa mle nom kiselinom, 98%) dobro definisan eritem (skor 2) uo en je kod dve od tri testirane životinje. Kod tre e životinje uo en je slab eritem (skor 1). Tako e, u ovom vremenskom periodu uo en je slab edem kod dve životinje (skor 1). U drugom vremenskom periodu analize reakcije kože (48 sati nakon uklanjanja flastera sa mle nom kiselinom, 98%) uo en je slab eritem (skor 1) kod sve tri životinje i slab edem (skor 1) kod dve od tri životinje. U tre em vremenskom periodu analize reakcije kože (72 sata nakon uklanjanja flastera sa mle nom kiselinom, 98%) iritacija kože je bila povu ena, smanjena i slab eritem (skor 1) ostao je kod jedne životinje, a kod druge dve životinje nije uo eno prisustvo eritema (skor 0). U ovom vremenskom periodu edem je uo en kod jedne od tri životinje. Skor primarne kutane iritacije pojedina nih životinja prikazan je u Tabeli 5.3.4. Postojala je statisti ki zna ajna razlika u vrednosti SPI izme u mesta tretiranih mle nom kiselinom (98%) i kontrolnih mesta (negativna kontrola) ($p < 0.05$). Indeks primarne kutane iritacije za mle nu kiselinu (98%), koja je koriš ena kao pozitivna kontrola bio je 0.84 na skali od 0.00 do 8.00. Na osnovu ovog indeksa primarne kutane iritacije, mle na kiselina (98%) ima blago iritiraju e osobine.

Tabela 5.3.4. Skor eritema i edema posle primene mle ne kiseline 98% (pozitivna kontrola)

Kuni (red.broj)		24 c		48 c		72 c		SPI	PII
		T ^a	K ^b	T	K	T	K		
1	Eritem	2	0	1	0	0	0	6/6-0/6=1.00	
	Edem	1	0	1	0	1	0		
2	Eritem	2	0	1	0	0	0	6/6-0/6=1.00	0.84
	Edem	1	0	1	0	1	0		
3	Eritem	1	0	1	0	1	0	3/6-0/6=0.50	
	Edem	0	0	0	0	0	0		

a Tretirano mesto

b Kontrolno mesto

SPI – Skor primarne iritacije

PII – Indeks primarne kutane iritacije



Slika 5.3.1. Fotografija prikazuje test primarne kutane iritacije nakon postavljanja test uzoraka. (test material primenjen na kožu).



Slika 5.3.2. Fotografija prikazuje test primarne kutane iritacije nakon fiksiranja postavljenih test uzoraka. (test material primenjen na kožu).



Slika 5.3.3. Fotografija prikazuju test primarne kutane iritacije. Rezultati testa nakon direktnog jednokratnog kontakta uzorka test materijala i kože u trajanju od 4 sata.

U testu primarne kutane iritacije za tri ispitivana test materijala (pHAP, pHAP + metformin i pHAP + PLGA) srednja vrednost indeksa primarne kutane iritacije je bila nula.

U direktnom, jednokratnom kontaktu sa kožom ni jedan od tri ispitivana test materijala (pHAP; pHAP + metformin i pHAP + PLGA) nije ispoljio iritirajuća svojstva, i mogu se smatrati neiritirajućim materijalima. Usled toga, pogodni su za primenu u *in vivo* uslovima.

5.4. ISPITIVANJE BIOFUNKCIONALNOSTI: IN VIVO PREDKLINIČKI TESTOVI NA ANIMALNOM MODELU

5.4.1. Opis i karakteristike uzorka

U ovoj studiji bilo je uključeno dvanaest novozelandskih belih kuni (oba pola (6 muškog i 6 ženskog pola), iz različitih legla, starosti oko 4 meseca, telesne težine oko 3 kilograma).

Sve životinje dobro su se oporavile posle opšte anestezije i hirurške intervencije, a rane na koži zarasle su *per primam intentionem*. Nakon evolucionog perioda od dvanaest nedelja uzorci od svih dvanaest operisanih životinja bili su na raspolaganju za analizu. Ni jedna životinja nije pokazala znakove infekcije. Tokom histološke pripreme uzoraka jedan uzorak iz grupe ispitivanog materijala pHAP sa metforminom i jedan uzorak iz grupe pozitivne kontrole BioOss^R bili su oštećeni i nisu mogli da se koriste u analizi.

Tabela 5.4.1. Distribucija ispitivanih materijala

	Broj uzoraka	%	Kumulativno %
Valid bez materijala	4	8.7	8.7
pHAP+PLGA	12	26.1	34.8
BioOss	7	15.2	50.0
pHAP+MTF	11	23.9	73.9
pHAP	12	26.1	100.0
Total	46	100.0	

Ukupno je analizirano 46 uzoraka sa ispitivanim materijalom. Od toga bilo je 12 uzoraka iz grupe pHAP sa PLGA, 12 uzoraka pHAP, 11 pHAP sa metforminom, 4 negativne kontrole i 7 uzoraka iz grupe pozitivne kontrole BioOss^R.

5.4.2. Veli ina defekta

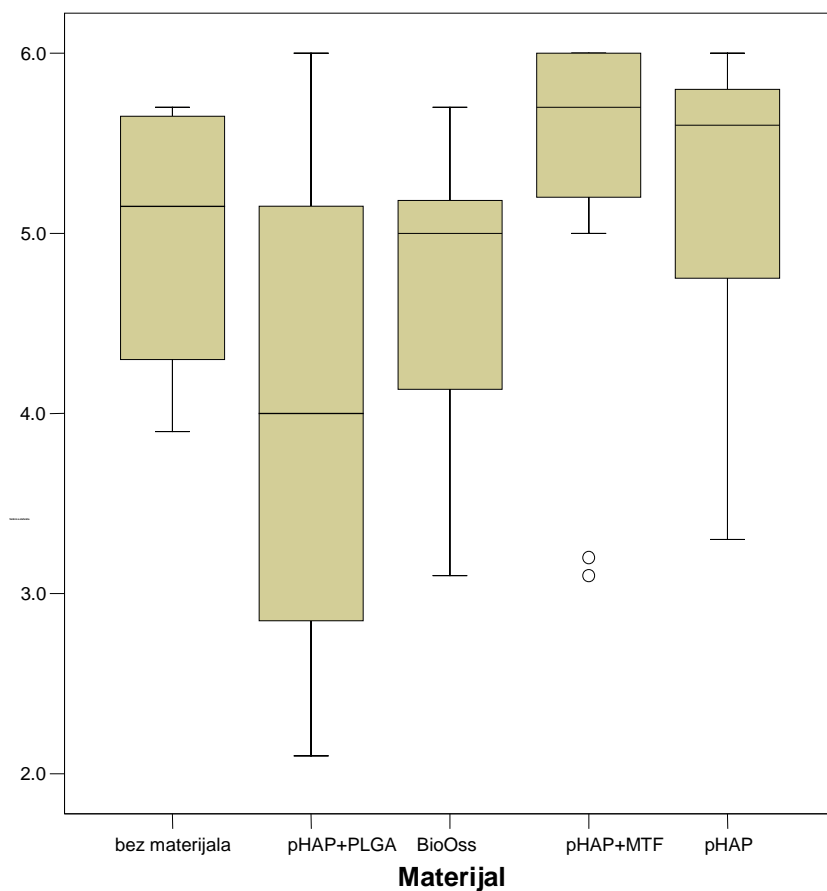
Tabela 5.4.2. Distribucija veli ine defekta u mm 12 nedelja nakon ugradnje ispitivanih materijala

Materijal	N	Aritmeti ka sredina	Median	Minimum	Maximum	Raspon	SD
bez materijala	4	4.975	5.150	3.9	5.7	1.8	.8461
pHAP+PLGA	12	3.967	4.000	2.1	6.0	3.9	1.2978
BioOss	7	4.614	5.000	3.1	5.7	2.6	.8934
pHAP+MTF	11	5.236	5.700	3.1	6.0	2.9	1.0782
pHAP	12	5.200	5.600	3.3	6.0	2.7	.8749
Total	46	4.778	5.150	2.1	6.0	3.9	1.1372

Iz tabele se vidi da je najmanja prose na vrednost defekta u grupi PLGA. Ali, iz iste tabele se vidi da je najve i varijabilitet bio u pomenutoj grupi, odnosno raspon vrednosti je daleko ve i od ostalih grupa.

Analiziraju i podatke, Kruskal-Wallis testom utvr eno je da postoji statisti ki zna ajna razlika izme u 5 ispitivanih grupa po veli ini defekta ($X^2=9.686$; $df=4$; $p=0.040$).

Rezultati su i grafi ki prikazani na grafikonu 5.4.1.



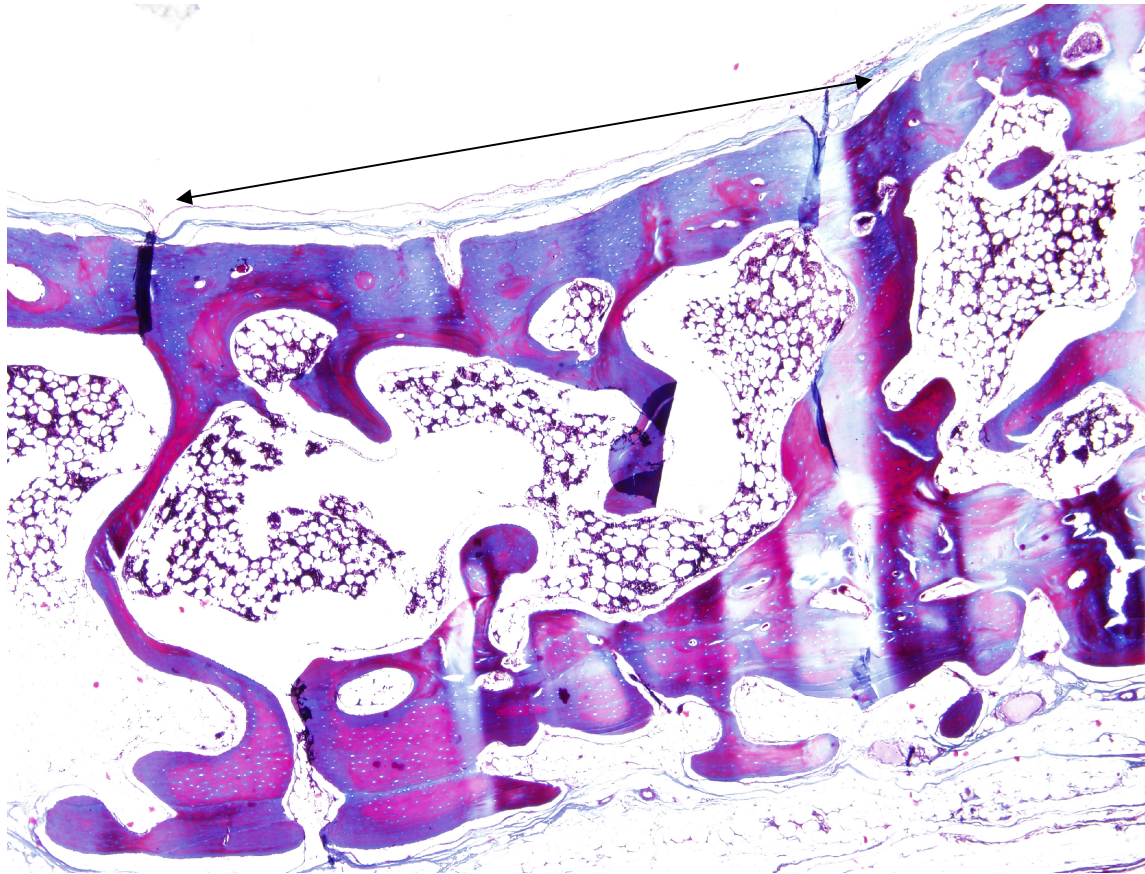
Grafikon 5.4.1. Prose ne vrednosti defekta kod ispitivanih materijala 12 nedelja nakon implantacije.

Upoređuju i pHAP sa PLGA, koji je pokazao postojanje najmanje prose ne vrednosti defekta, sa pozitivnom kontrolom gde je bio postavljen BioOss koji se koristi kao zlatni standard, utvr eno je da je veli ina defekta bila manja u grupi koja sadrži pHAP sa PLGA.

Tabela 5.4.3. Prose ne vrednosti defekta uporedno kod pHAP sa PLGA i kod BioOsa

	Materijal	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Velicina defekta	pHAP + PLGA	12	9.00	108.00
	BioOss	7	11.71	82.00
	Total	19		

Analiziraju i ove podatke Mann-Whitney U testom utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između u ove dve grupe po veličini defekta ($Z=-1.016$; $p=0.326$).

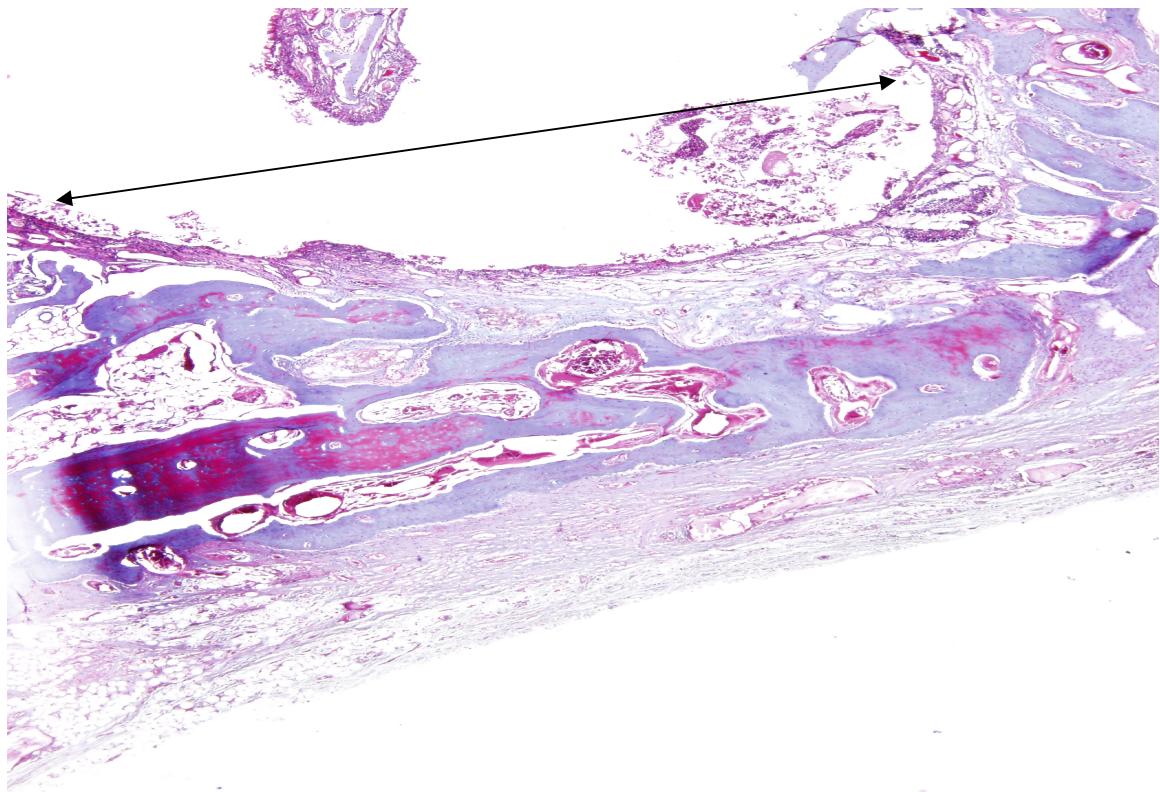


Slika 5.4.1.: U kosti prisutna potpuna nadoknada defekta novostvorenim koštanim tkivom sa elementima mineralizacije (strelica). Materijal pHAP+PLGA (Trijhromno bojenje Masson, 40x)

Tabela 5.4.4. Prosečne vrednosti defekta uporedno kod pHAP sa PLGA i kod pHAP-a

	Materijal	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Velicina defekta	pHAP + PLGA	12	9.08	109.00
	pHAP	12	15.92	191.00
	Total	24		

Analizirana je i veličina defekta u grupi implantiranih materijala istog pHAP-a sa pHAP-om i PLGA. Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika kod ove dve grupe materijala, odnosno da je pHAP sa PLGA pokazao manju prosečnu veličinu defekta u odnosu na isti pHAP ($Z=-2.373$; $p=0.016$).



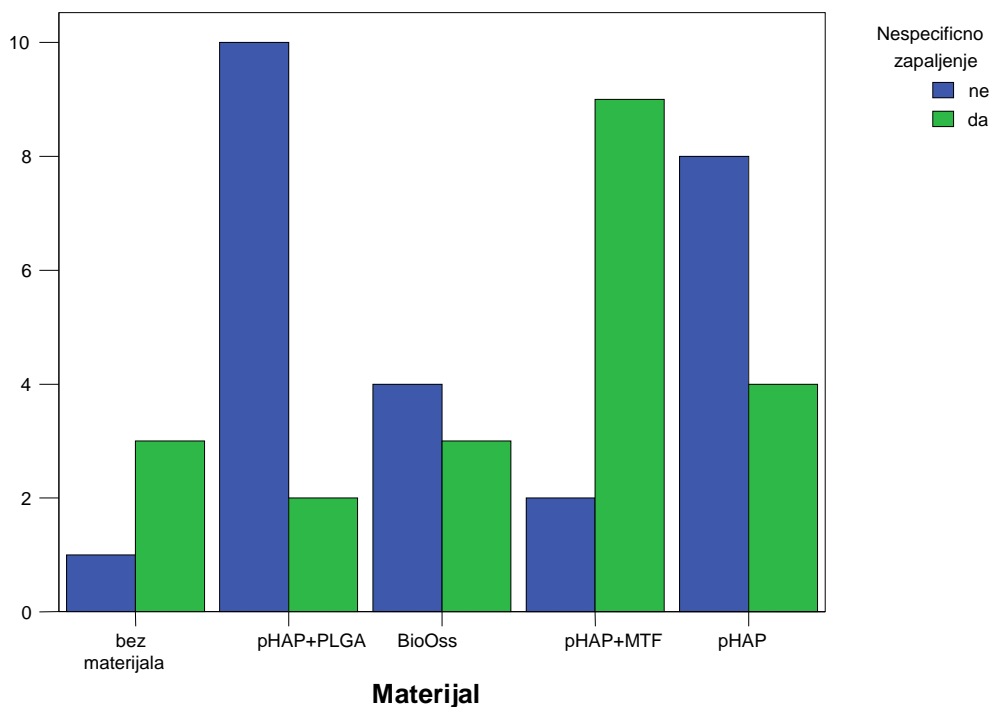
Slika 5.4.2.: U kosti prisutan defekt ispunjen granulacionim tkivom sa elementima inflamacije (strelica). Materijal pHAP (Trihromno bojenje Masson, 40x)

5.4.3. Prisustvo nespecifi nog zapaljenja

Tabela 5.4.5. Prisustvo nespecifi nog zapaljenja u defektima ispunjenim ispitivanim materijalima.

			Nespecificno zapaljenje		Total
			ne	da	
Materijal	bez materijala	broj	1	3	4
		%	25.0%	75.0%	100.0%
	pHAP + PLGA	broj	10	2	12
		%	83.3%	16.7%	100.0%
	BioOss	broj	4	3	7
		%	57.1%	42.9%	100.0%
	pHAP + MTF	broj	2	9	11
		%	18.2%	81.8%	100.0%
	pHAP	broj	8	4	12
		%	66.7%	33.3%	100.0%
Total	broj		25	21	46
	%		54.3%	45.7%	100.0%

Iz tabele 5.4.5. vidi se da je nespecifi no zapaljenje naj eš e bilo prisutno u negativnoj kontroli i u defektima ispunjenih sa pHAP + metforminom, dok su defekti koji su bili ispunjeni istim pHAP - om i kombinacijom pHAP - a sa PLGA pokazali prisustvo nespecifi nih znakova zapaljenja u najmanjem broju slu ajeva.



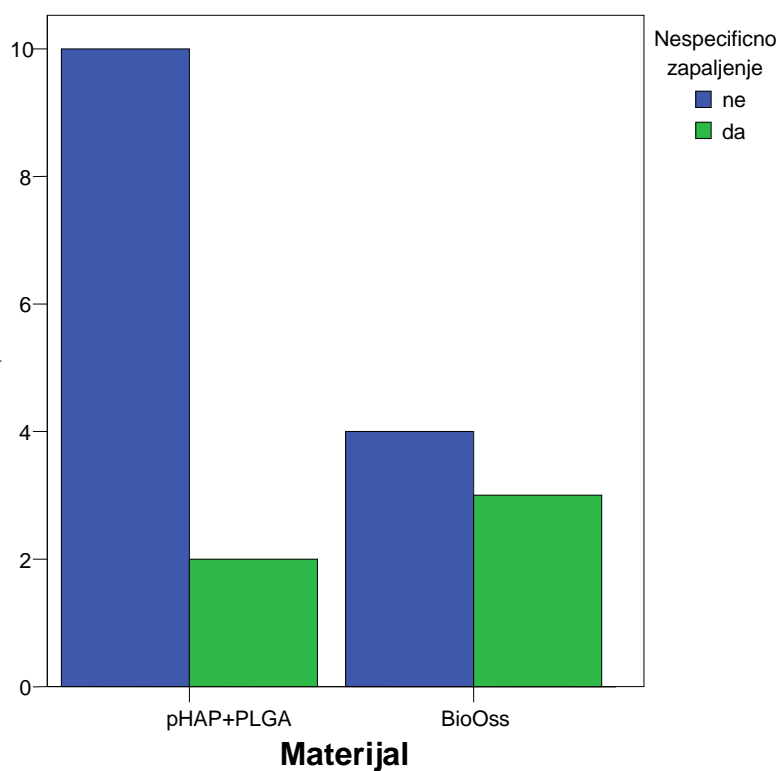
Grafikon 5.4.2. Prisustvo znakova nespecifi nog zapaljenja u prisustvu razli itih materijala.

Tabela 5.4.6. Prisustvo nespecifi nog zapaljenja u defektima ispunjenim sa pHAP+PLGA i BioOss.

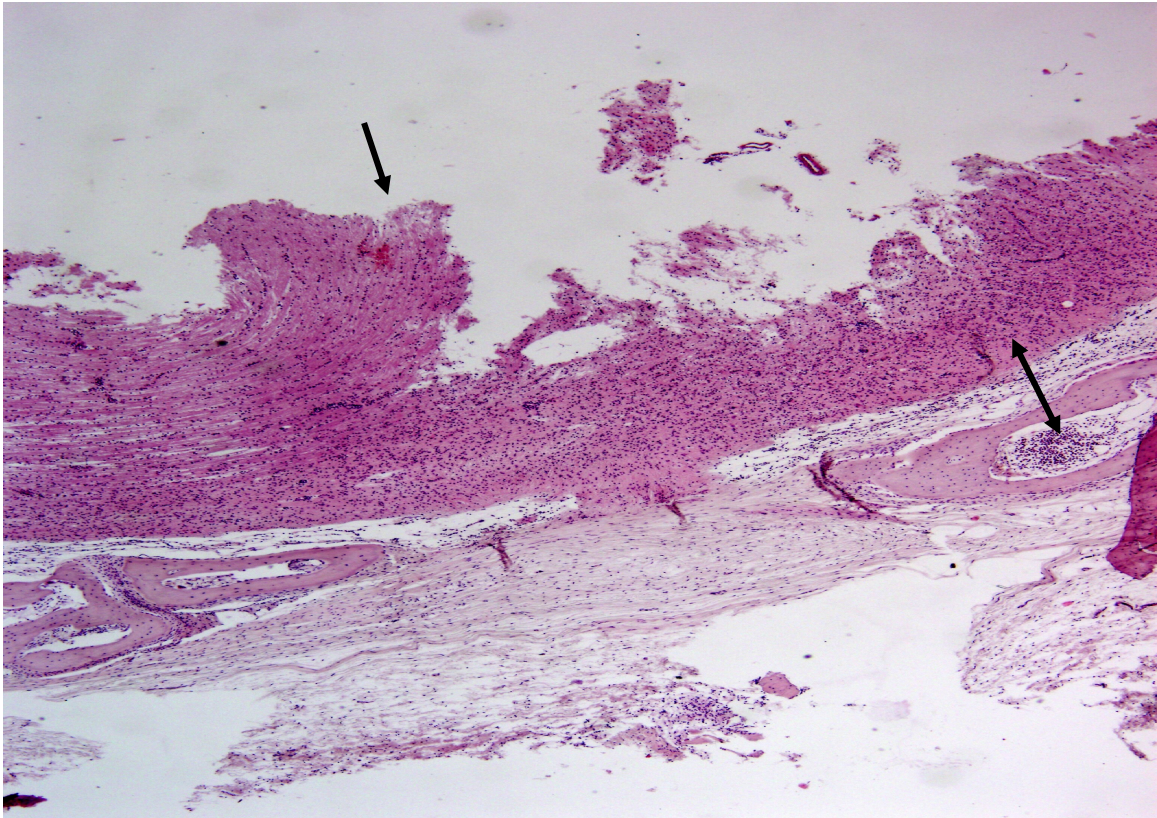
		Nespecifično zapaljenje		Total
		ne	da	
Materijal	pHAP+PLGA broj	10	2	12
	%	83.3%	16.7%	100.0%
BioOss	broj	4	3	7
	%	57.1%	42.9%	100.0%
Total	broj	14	5	19
	%	73.7%	26.3%	100.0%

Iz tabele 5.4.6., kada se uzmu u obzir samo pHAP sa PLGA i BioOss vidi se da je ve i broj defekata imao nespecifi no zapaljenje u grupi BioOss u odnosu na grupu

pHAP sa PLGA. Analiziraju i razliku ove dve grupe u odnosu na pojavu nespecificnog zapaljenja, utvrđeno je da nema značajne razlike između primenjenih materijala u odnosu na pojavu zapaljenja (Fisher's Exact Test $p=0.305$).



Grafikon 5.4.3. Prisustvo nespecificnog zapaljenja u defektima ispunjenim sa pHAP+PLGA i BioOss.

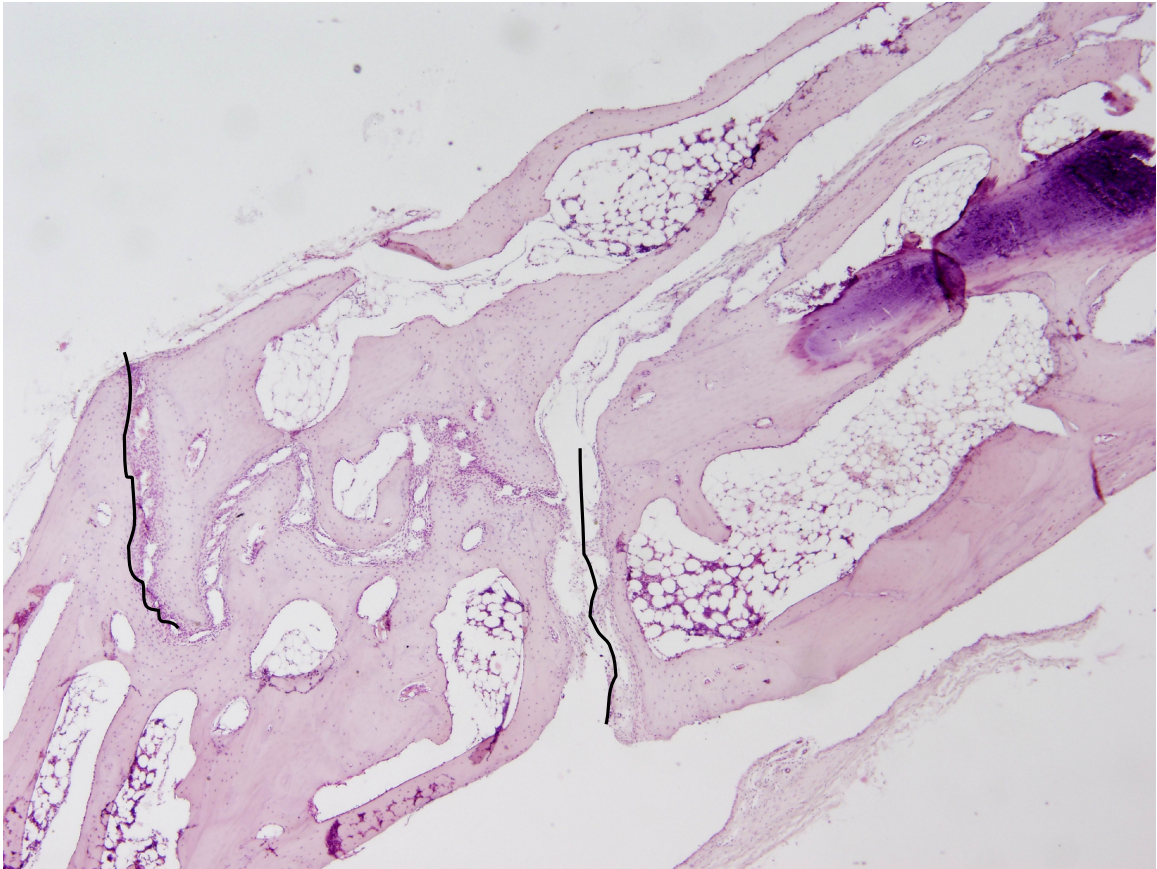


Slika 5.4.3: U kosti prisutan defekt ispunjen granulacionim tkivom sa elementima hroni nog zapaljenja. Uo av a se mešoviti mono i polimorfonuklearni infiltrat. (strelice). Materijal BioOss (HE, 40x)

Tabela 5.4.7. Prisustvo nespecifi nog zapaljenja u defektima ispunjenim sa pHAP+PLGA i pHAP.

			Nespecifno zapaljenje		Total
			ne	da	
Materijal	pHAP+PLGA	broj	10	2	12
		%	83.3%	16.7%	100.0%
	pHAP	broj	8	4	12
		%	66.7%	33.3%	100.0%
Total	broj		18	6	24
	%		75.0%	25.0%	100.0%

Uzimaju i u obzir PLGA i pHAP vidi se da je nespecifi no zapaljenje prisutno u ve em broju kod defekata ispunjenih sa pHAP ali tako e bez statisti ki zna ajne razlike(Fisher's Exact Test $p=0.640$).



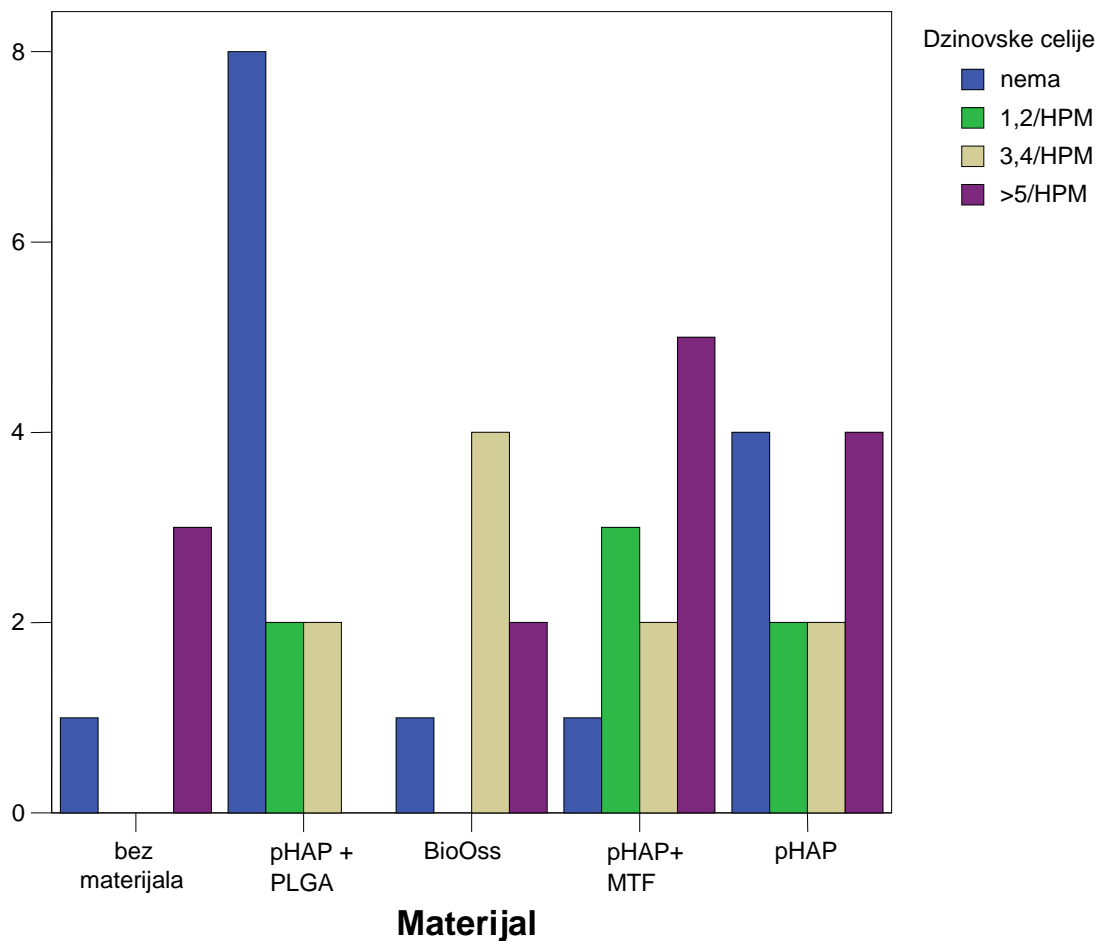
Slika 5.4.4.: Novostvoreno koštano tkivo koje je lako celularno pokazuje iregularnu gra u gredica. Koštani defekt ispunjen u celosti. Nema elemenata inflamacije. Diskretna, teško uo ljava granica izmedju kosti doma ina i novostvorene kosti. (crne linije). Materijal pHAP+PLGA (HE, 40x)

5.4.4. Prisustvo džinovskih elija

Tabela 5.4.8. Prisustvo džinovskih elija u defektima ispunjenim ispitivanim materijalima.

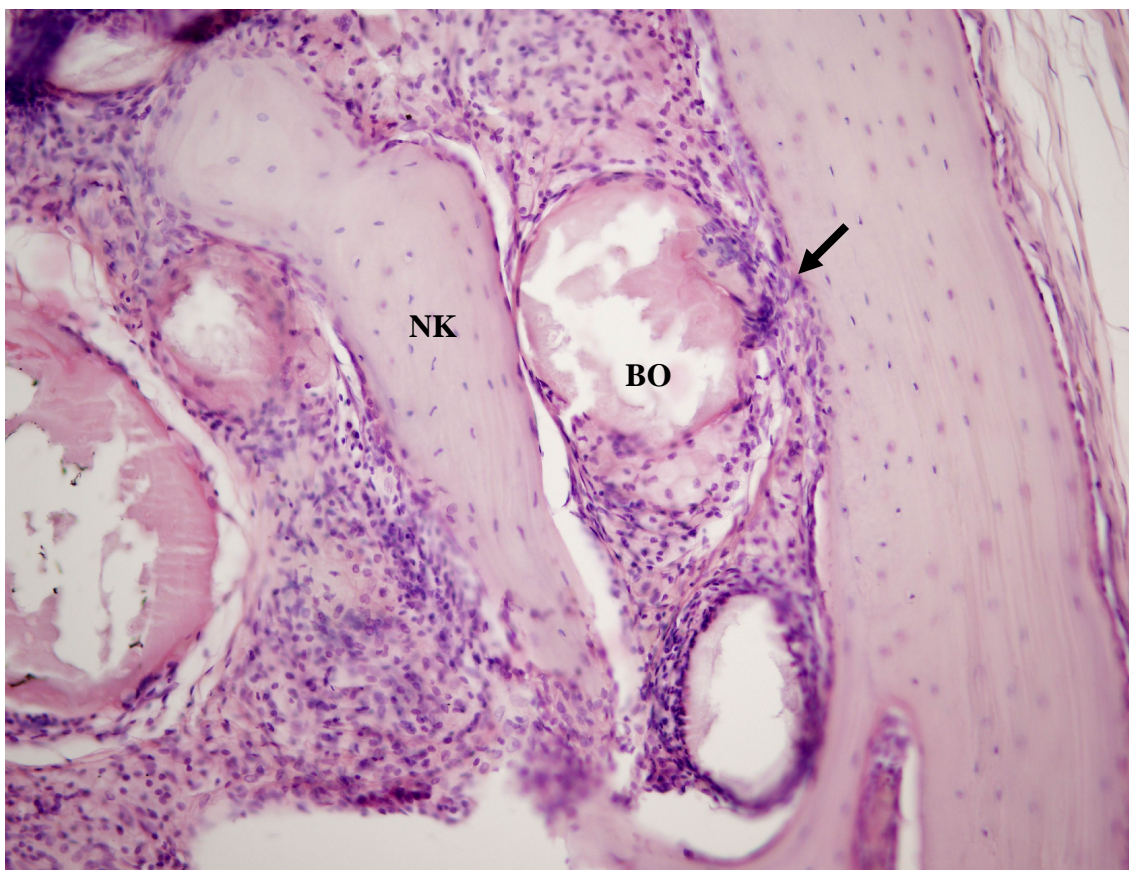
		Dzinovske celije				Total
		nema	1,2/HPM	3,4/HPM	>5/HPM	
Materijal bez materijala	broj	1	0	0	3	4
	%	25.0%	.0%	.0%	75.0%	100.0%
pHAP+PLGA	broj	8	2	2	0	12
	%	66.7%	16.7%	16.7%	.0%	100.0%
BioOss	broj	1	0	4	2	7
	%	14.3%	.0%	57.1%	28.6%	100.0%
pHAP+MTF	broj	1	3	2	5	11
	%	9.1%	27.3%	18.2%	45.5%	100.0%
pHAP	broj	4	2	2	4	12
	%	33.3%	16.7%	16.7%	33.3%	100.0%
Total	broj	15	7	10	14	46
	%	32.6%	15.2%	21.7%	30.4%	100.0%

Analiziraju i prisustvo džinovskih elija u defektima koji su ispunjeni ispitivanim materijalom, iz tabele 5.4.8. vidi se da su u negativnoj kontroli(75%) kao i u defektima ispunjenim sa pHAP + metforminom(45%) na ene džinovske elije u najvećem broju. Bez prisustva džinovskih elija najčešće su bili defekti ispunjeni sa pHAP+PLGA(66,7%).



Grafikon 5.4.4. Prisustvo džinovskih elija u defektima ispunjenim ispitivanim materijalima.

Analiziraju i podatke, Kruskal-Wallis testom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između u 5 ispitivanih grupa prema prisustvu džinovskih elija u defektima ($X^2=12.219$; $df=4$; $p=0.011$).

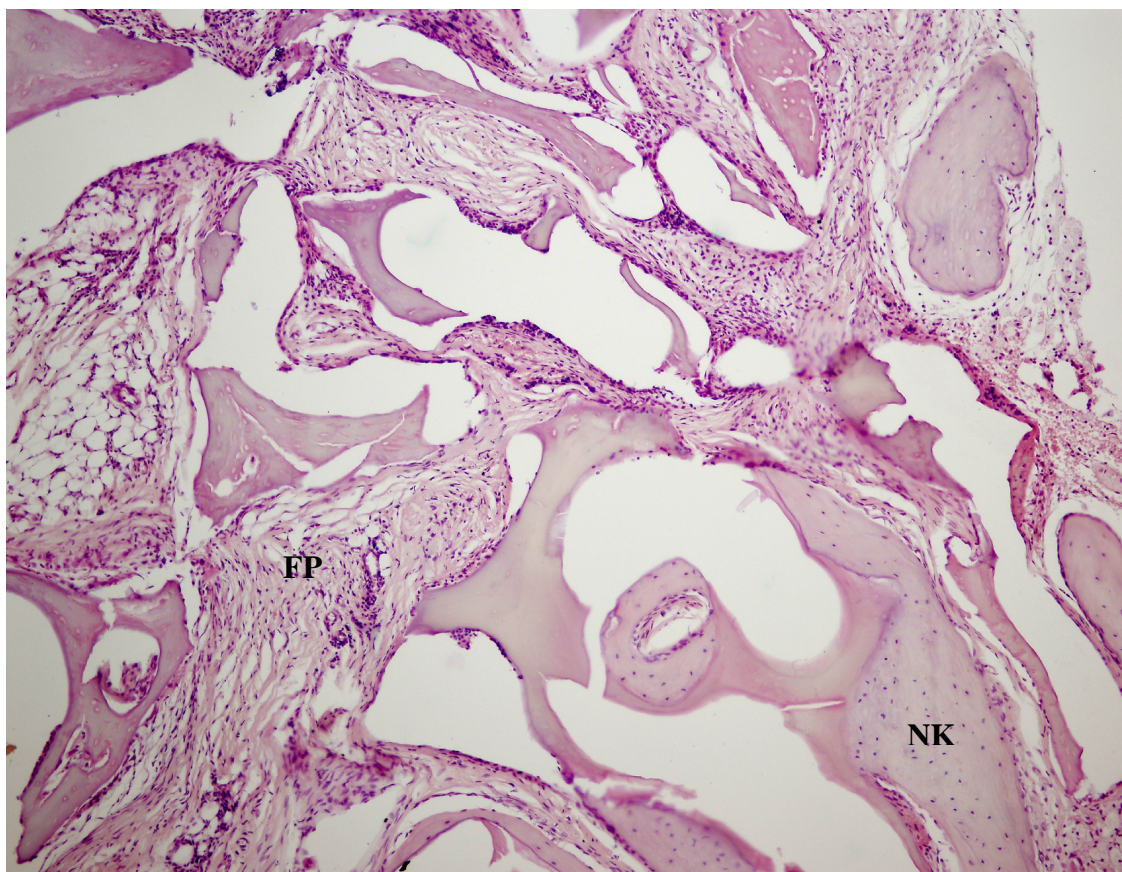


Slika 5.4.5.: Koštani defekt delom ispunjen novostvorenom kosti (NK) a delom partikulama materijala (BO) oko koga se nalaze džinovske elije tipa oko stranog tela (strelica). Materijal BioOss (HE, 200x)

Tabela 5.4.9. Prisustvo džinovskih elija u defektima ispunjenim sa pHAP+PLGA i BioOss.

	Materijal	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Džinovske celije	pHAP+PLGA	12	7.50	90.00
	BioOss	7	14.29	100.00
	Total	19		

Dodatnim testiranjem defekata ispunjenih sa pHAP+PLGA i BioOss materijalima, i analiziranjem ovih podataka Mann-Whitney U testom, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u prisustvu džinovskih elija između ove dve grupe ($Z=-2.730$; $p=0.005$).



Slika 5.4.6.: Novostvorena kost (NK) remodelira defekt. Pored kosti prisutne i trake umnoženog veziva koje odgovaraju fibroplaziji (FP). Bez prisustva džinovskih elija. Materijal pHAP+PLGA (HE, 200x)

Tabela 5.4.10. Prisustvo džinovskih elija u defektima ispunjenim sa pHAP+PLGA i pHAP.

	Materijal	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Džinovske celije	pHAP+PLGA	12	9.83	118.00
	pHAP	12	15.17	182.00
	Total	24		

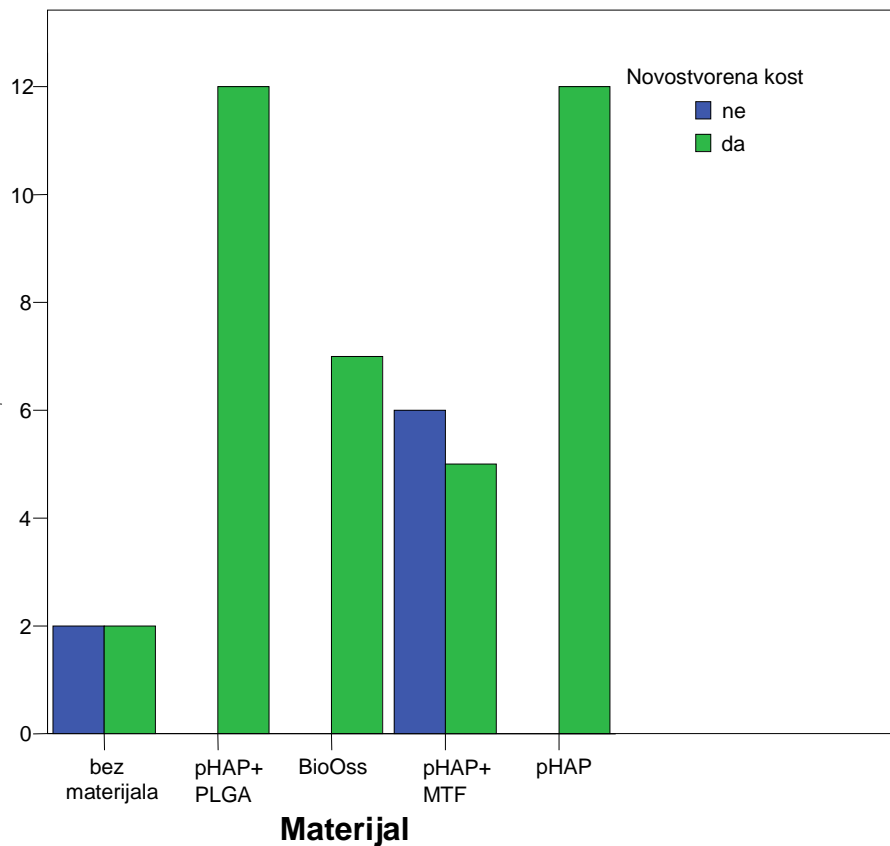
Tako e, analiziranjem podataka dobijenih za pHAP+PLGA i pHAP Mann-Whitney U testom, utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u prisustvu džinovskih elija između ove dve grupe ($Z=-1.989$; $p=0.061$).

5.4.5. Novostvorena kost

Tabela 5.4.11. Prisustvo novostvorene kosti u defektima ispunjenim ispitivanim materijalima.

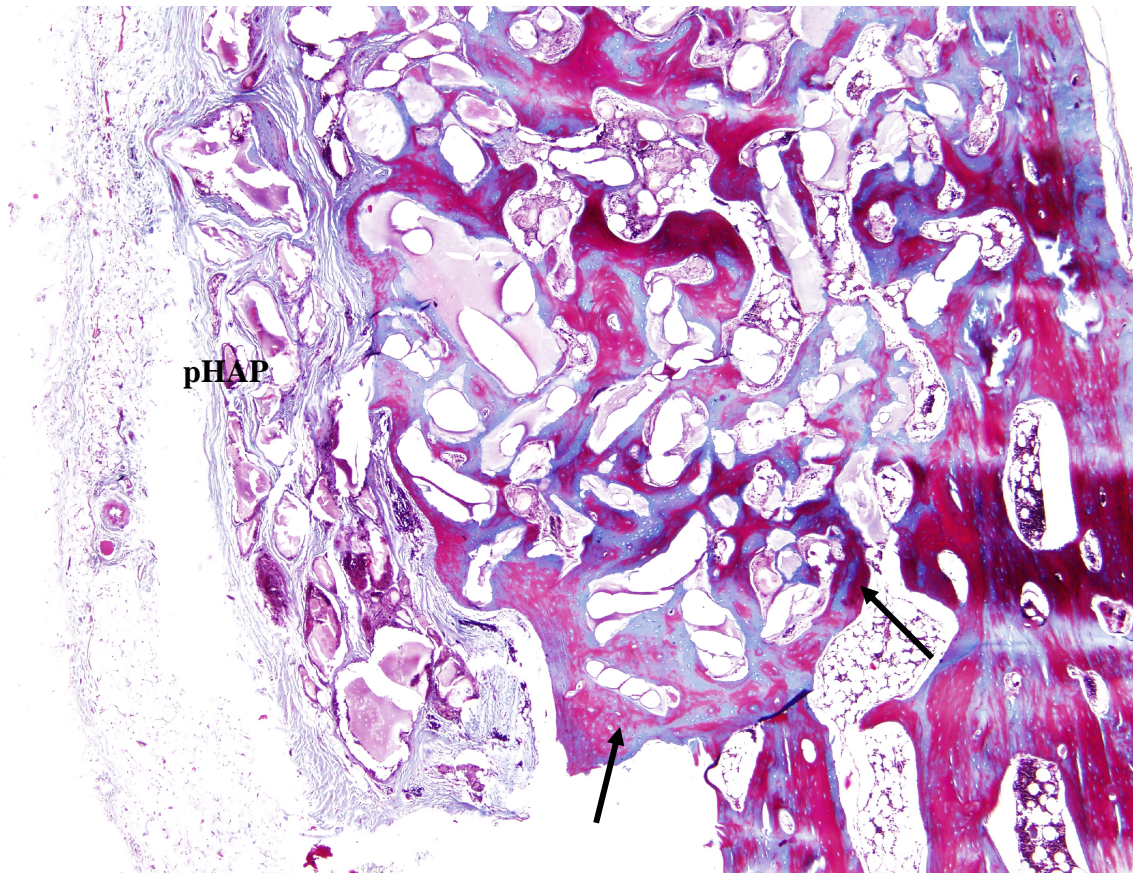
			Novostvorena kost		
			ne	da	Total
Materijal	bez materijala	broj	2	2	4
		%	50.0%	50.0%	100.0%
	pHAP+PLGA	broj	0	12	12
		%	.0%	100.0%	100.0%
	BioOss	broj	0	7	7
		%	.0%	100.0%	100.0%
	pHAP+MTF	broj	6	5	11
			54.5%	45.5%	100.0%
	pHAP	broj	0	12	12
		%	.0%	100.0%	100.0%
Total		broj	8	38	46
		%	17.4%	82.6%	100.0%

U odnosu na novostvorenu kost, analiza je pokazala da je kod defekata ispunjenih sa pHAP+PLGA, pHAP i Biooss novostvorena kost je bila formirana u svim slu ajevima. Kod defekata ispunjenih sa pHAP+metforminom novostvorena kost bila stvorena u 5(45,5%) slu ajeva dok se u 6 (55,5%) slu ajeva nije formirala, dok se u negativnoj kontrolnoj grupi (prazan defekt) novostvorena kost pojavila u 50% a nije je bilo u drugih 50% slu ajeva.

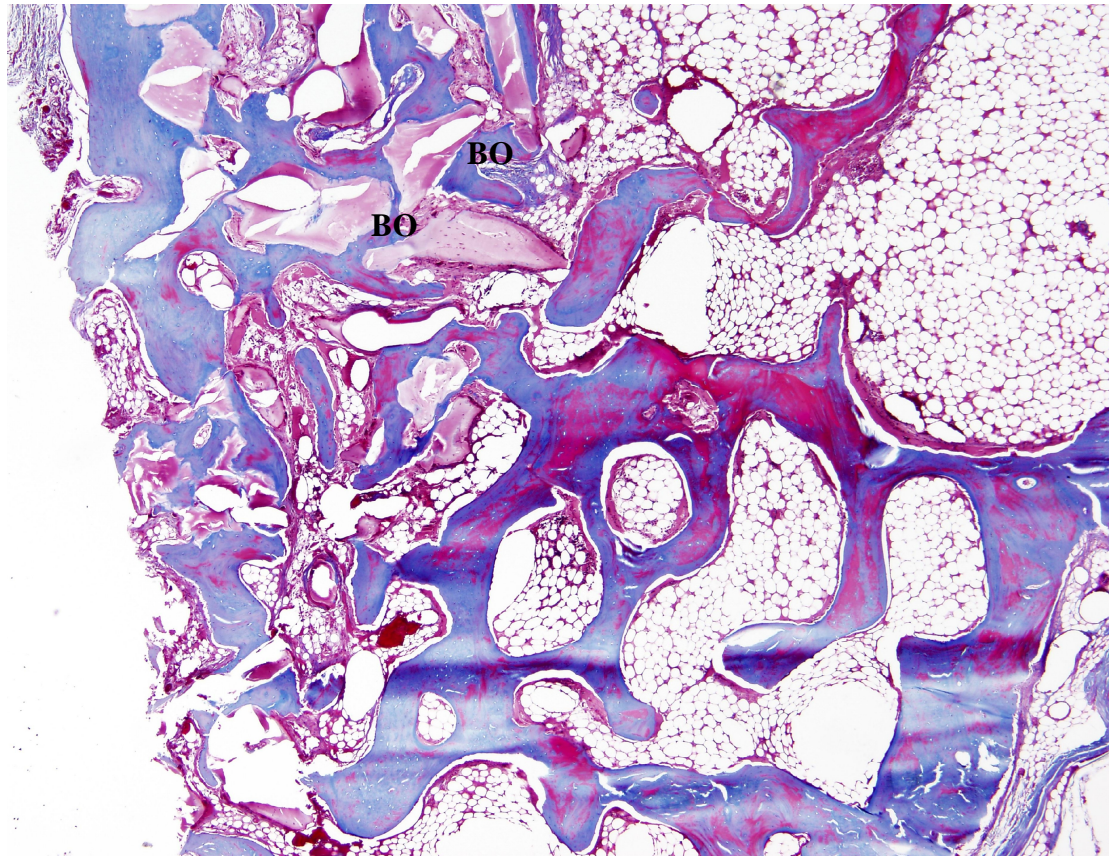


Grafikon 5.4.5. Postojanje novostvorene kosti u defektima ispunjenim ispitivanim materijalima.

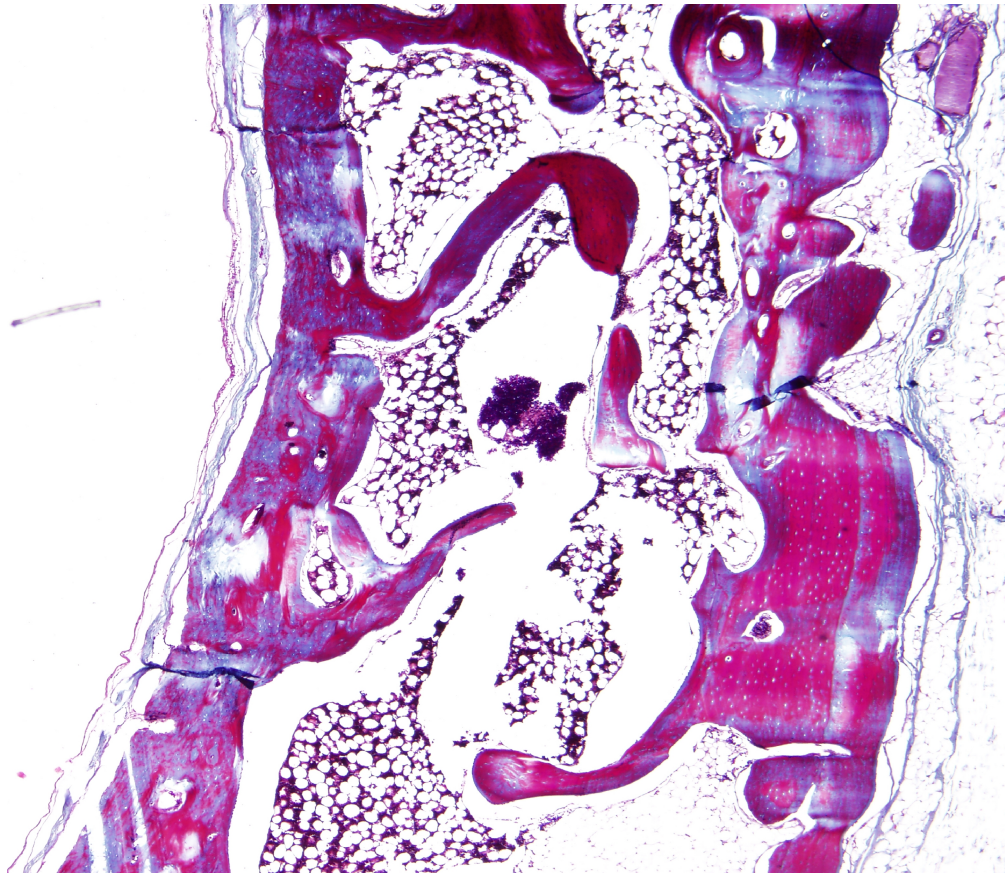
Novostvorena kost se u 100% slu ajeva stvorila u defektima ispunjenim sa istim pHAP-om kao i u defektima ispunjenim sa pHAP-om u kombinaciji sa PLGA i sa pozitivnom kontrolom, defektom ispunjenim sa BioOss-om. Defekti ispunjeni sa pHAP-om u kombinaciji sa metforminom pokazali da je stvaranje nove kosti bilo isto kao i u negativnoj kontrolnoj grupi.



Slika 5.4.7.: Koštano tkivo mestimi no ispunjava defekt (strelice). Iregularne zone mineralizacije u gredicama sa dominantnim prisustvom organskog, nemineralizovanog matriksa. Prisutne partikule materijala (pHAP). Materijal pHAP (Trihromno bojenje Masson, 40x)



Slika 5.4.8.: Novostvorene koštane gredice u iregularnom aranžmanu popunjavaju defekt. U gredicama prisutna približno jednaka koli ina nemineralizovanog i mineralizovanog osteoida. Fokalno vidljive sitne partikule materijala (BO). Materijal Bio Oss (Trihromno bojenje Masson, 40x)



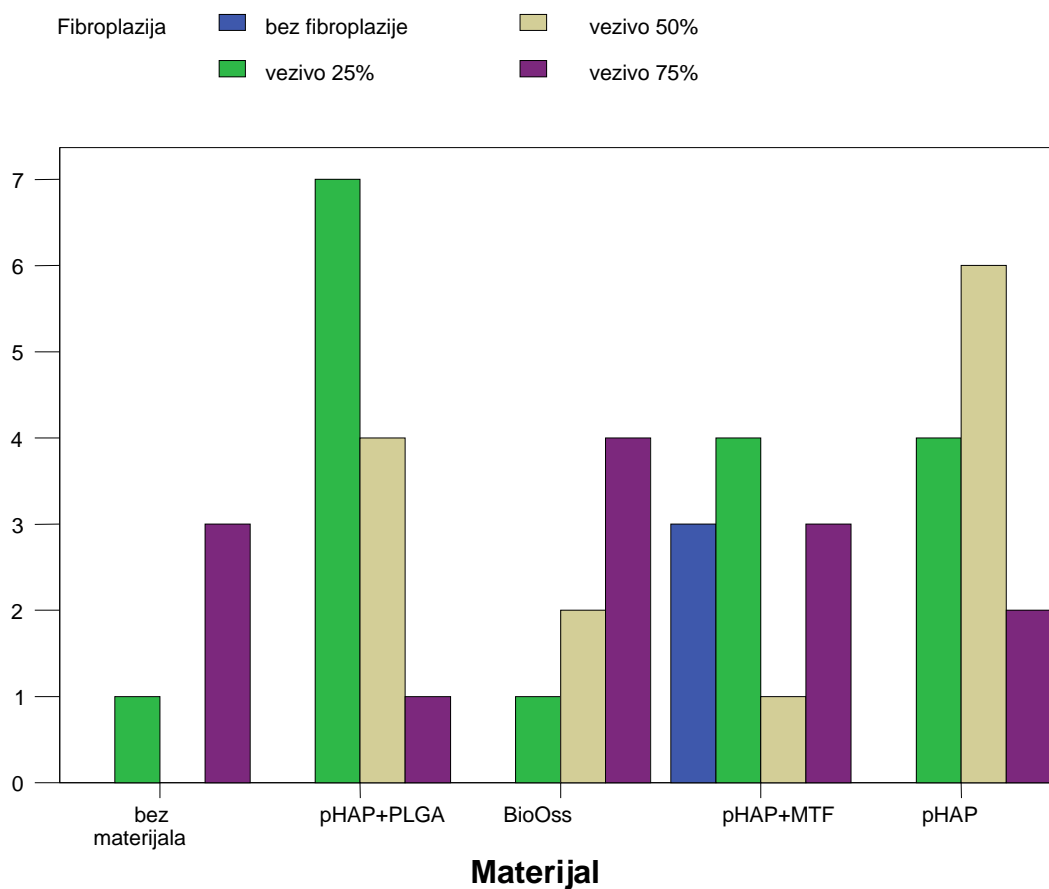
Slika 5.4.9.: Regularna gra a koštanih gredica u novostvorenoj kosti. Dominantno je prisustvo mineralizovanog osteoida. Koštano tkivo pokazuje lamelarnu gra u. Materijal pHAP+PLGA. (Trihromno bojenje Masson, 40x)

5.4.6. Prisustvo fibroplazije

Tabela 5.4.12. Prisustvo vezivnog tkiva u defektima ispunjenim ispitivanim materijalima.

		Fibroplazija				Total
		bez fibroplazije	vezivo 25%	vezivo 50%	vezivo 75%	
Materijal bez materijala	broj	0	1	0	3	4
	%	.0%	25.0%	.0%	75.0%	100.0%
pHAP+PLGA	broj	0	7	4	1	12
	%	.0%	58.3%	33.3%	8.3%	100.0%
BioOss	broj	0	1	2	4	7
	%	.0%	14.3%	28.6%	57.1%	100.0%
pHAP+MTF	broj	3	4	1	3	11
	%	27.3%	36.4%	9.1%	27.3%	100.0%
pHAP	broj	0	4	6	2	12
	%	.0%	33.3%	50.0%	16.7%	100.0%
Total	broj	3	17	13	13	46
	%	6.5%	37.0%	28.3%	28.3%	100.0%

Posmatraju i prisustvo vezivnog tkiva u defektima ispunjenim ispitivanim materijalom, na eno je da je najve i procenat veziva, preko 75% bio u defektima ispunjenim sa BioOss-om. Najmanje veziva, ispod 25%, prona eno je u defektima u kojima je implantiran pHAP u kombinaciji sa PLGA(58,3%). Analiziraju i rezultate Kruskal-Wallis testom utvr eno je da izmedju 5 ispitivanih grupa nema statisti ki zna ajne razlike na konvencionalnom nivou zna ajnosti od 0.05, ali obzirom da je signifikantnost egzaktnog testa 0.063 , možemo ukoliko pomerimo nivo greške za 2% da kažemo da je ova razlika zna ajna. ($X^2=12.219$; $df=4$; $p=0.063$).

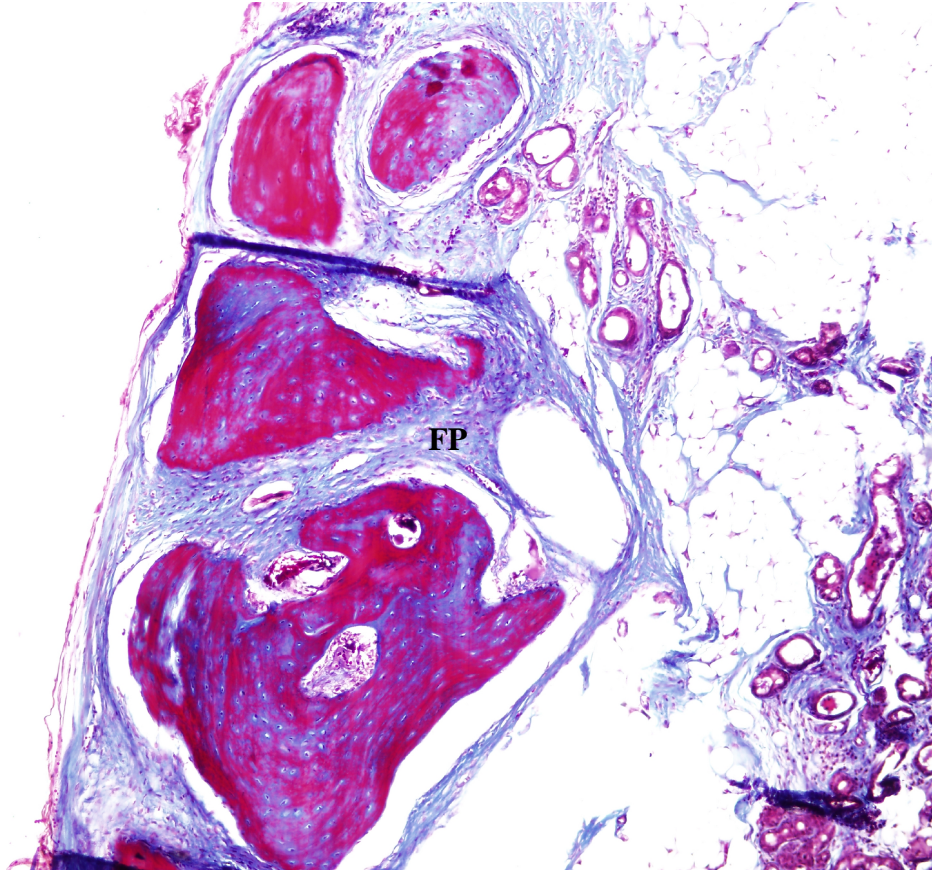


Grafikon 5.4.6. Prisustvo vezivnog tkiva u defektima ispunjenim ispitivanim materijalima.

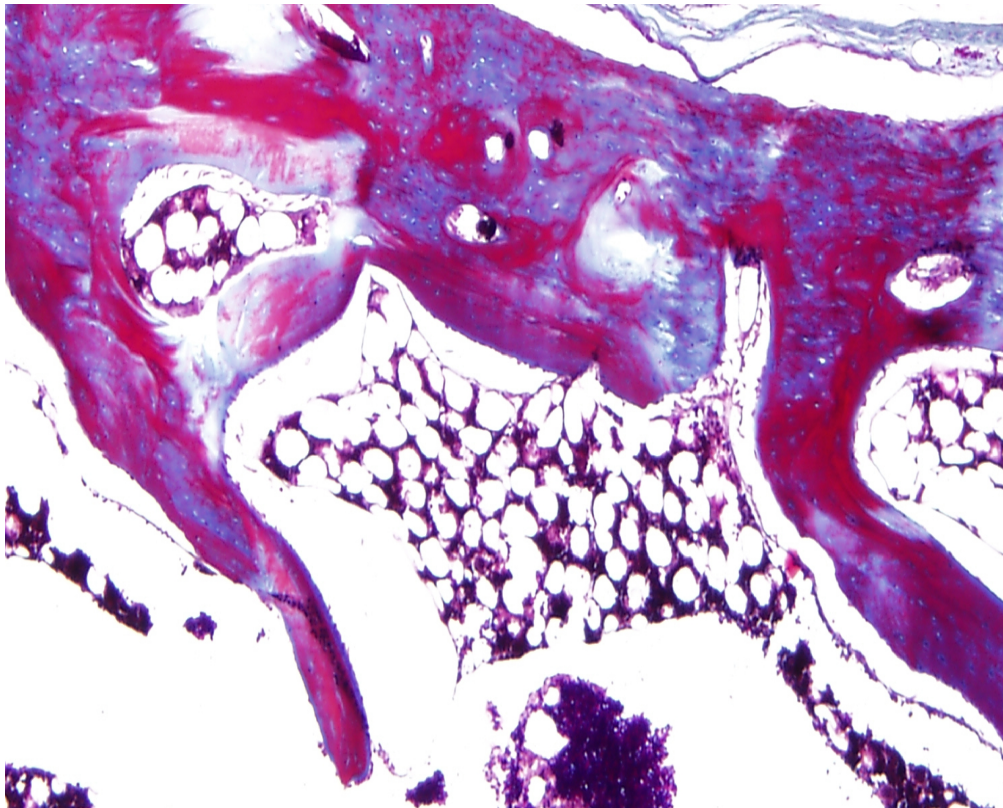
Tabela 5.4.13. Prisustvo vezivnog tkiva u defektima ispunjenim sa pHAP+PLGA i BioOss.

	Materijal	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Fibroplazija	pHAP+PLGA	12	7.88	94.50
	BioOss	7	13.64	95.50
	Total	19		

Uporednim testiranjem defekata ispunjenih sa pHAP+PLGA i BioOss i analiziranjem ovih podataka Mann-Whitney U testom, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u odnosu na postojanje fibroplazije kod ove dve grupe ($Z=-2.300$; $p=0.025$).



Slika 5.4.9.: Naglašeno prisustvo fibroplazije (FP). Proliferisani fibroblasti okružuju koštano tkivo na mestu defekta. Materijal Bio Oss (Trihromno bojenje Masson, 100x)



Slika 5.4.10.: Novostvoreno koštano tkivo pokazuje lamelarnu gradju. Nema elemenata fibroplazije. Naglašena mineralizacija osteoidnog matriksa. Materijal pHAP+PLGA. (Trihromno bojenje Masson, 100x)

Tabela 5.4.14. Prisustvo vezivnog tkiva u defektima ispunjenim sa pHAP+PLGA i pHAP.

	Materijal	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Fibroplazija	pHAP+PLGA	12	10.92	131.00
	pHAP	12	14.08	169.00
	Total	24		

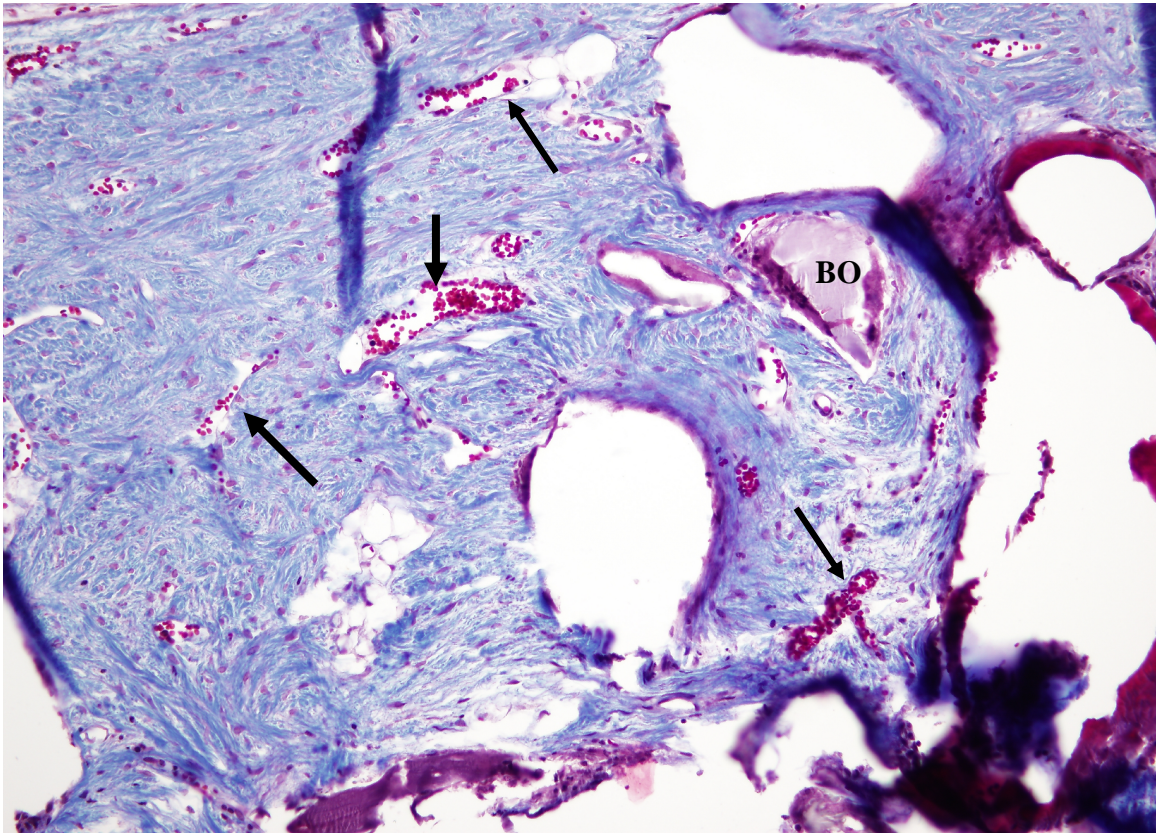
Porede i prisustvo fibroplazije kod defekata ispunjenih sa pHAP+PLGA i sa pHAP-om, i analiziranjem tih podataka Mann-Whitney U testom, utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na postojanje fibroplazije kod ove dve grupe ($Z=-1.203$; $p=0.312$).

5.4.7. Neoangiogeneza

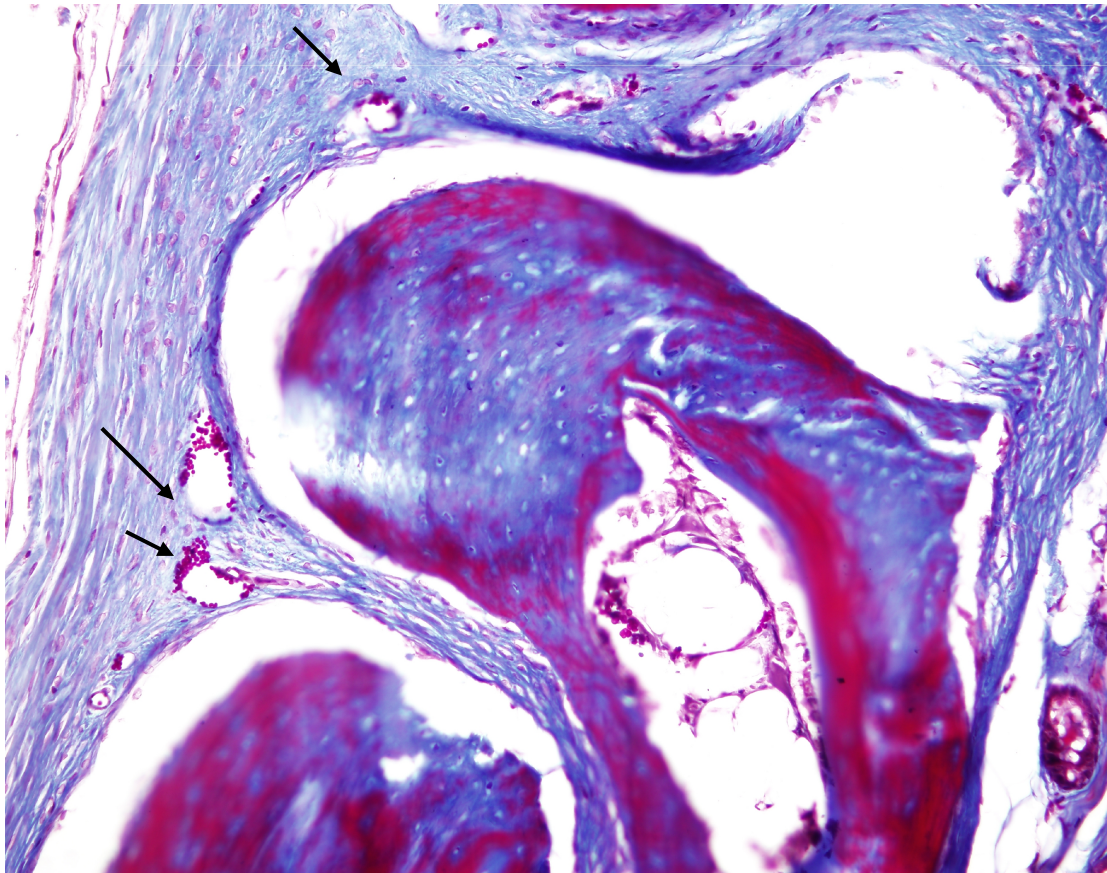
Tabela 5.4.15. Prisustvo novoformiranih krvnih sudova u defektima ispunjenim ispitivanim materijalima.

		Neoangiogeneza					
		bez angiogeneze	1,2 ks/HPM	3,4 ks/HPM	više od 4ks /HPM	Total	
Materijal	bez materijala	broj	0	1	1	2	4
		%	.0%	25.0%	25.0%	50.0%	100.0%
pHAP+PLGA		broj	1	4	5	2	12
		%	8.3%	33.3%	41.7%	16.7%	100.0%
BioOss		broj	1	2	3	1	7
		%	14.3%	28.6%	42.9%	14.3%	100.0%
pHAP+MTF		broj	4	1	5	1	11
		%	36.4%	9.1%	45.5%	9.1%	100.0%
pHAP		broj	1	7	3	1	12
		%	8.3%	58.3%	25.0%	8.3%	100.0%
Total		broj	7	15	17	7	46
		%	15.2%	32.6%	37.0%	15.2%	100.0%

U odnosu na prisustvo novostvorenih krvnih sudova u defektima dobijeni podaci analizirani su Kruskal Wallis testom, a statistički značajna razlika između svih ispitivanih grupa nije potvrđena. ($X^2=3.683$; $df=4$; $p=0.465$). Također statistički značajna razlika nije pronađena ni poređenjem i analiziranjem Mann Whitney U testom podataka vezanih za prisustvo neoangiogeneze u defektima ispunjenih sa pHAP+PLGA i Biooss, ($Z=-0,179$; $p=0.965$), kao pHAP+PLGA i pHAP ($Z=-1.055$; $p=0.345$).



Slika 5.4.11.: Brojni krvni sudovi prisutni u fibroblasti noj stromi (strelice). Uo avaju se ostaci materijala sa gigantocelularnom reakcijom tipa oko stranog tela (BO). Materijal Bio Oss (Trihromno bojenje Masson, 100x)



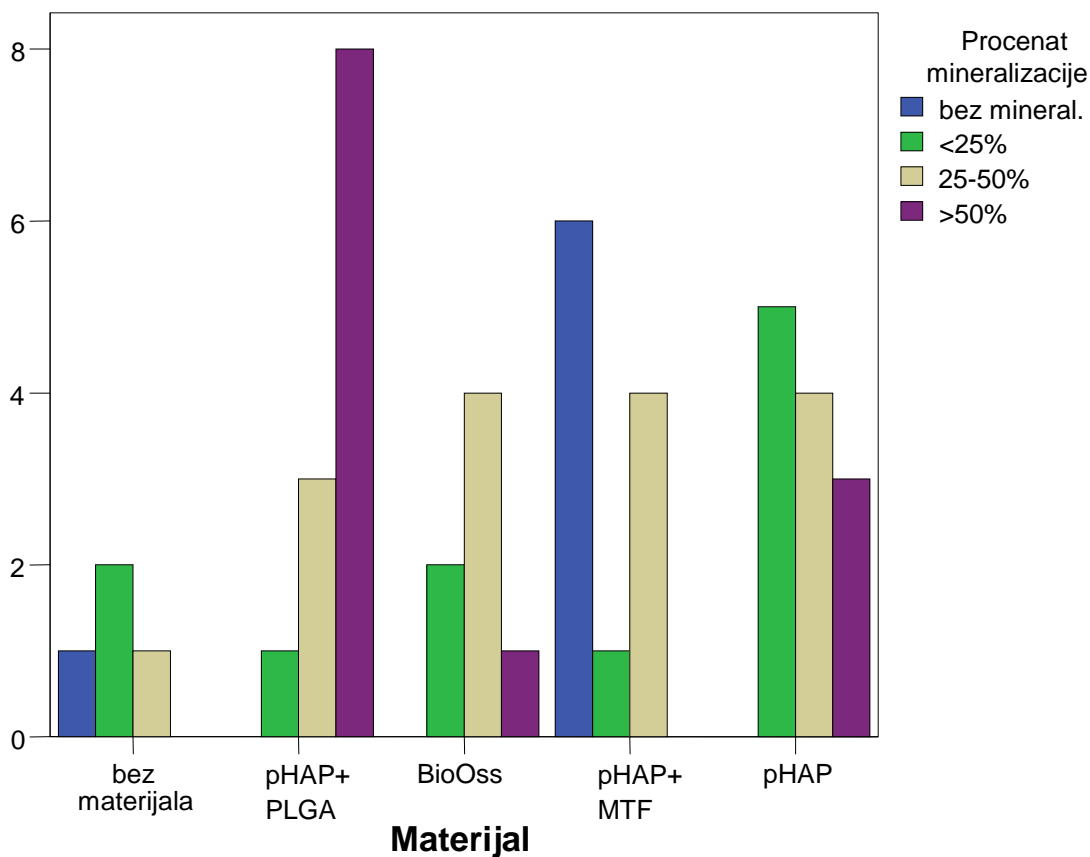
Slika 5.4.12.: Oko novostvorene kosti se uo avaju pojedina ni krvni sudovi dilatiranih lumena (strelice). Materijal pHAP+PLGA. (Trihromno bojenje Masson, 100x)

5.4.8. Procenat mineralizacije

Tabela 5.4.16. Procenat mineralizacije u defektima ispunjenim ispitivanim materijalima

		Procenat mineralizacije				Total
		bez mineralizacije	<25%	25-50%	>50%	
Materijal bez materijala	broj	1	2	1	0	4
	%	25.0%	50.0%	25.0%	.0%	100.0%
pHAP+PLGA	broj	0	1	3	8	12
	%	.0%	8.3%	25.0%	66.7%	100.0%
BioOss	broj	0	2	4	1	7
	%	.0%	28.6%	57.1%	14.3%	100.0%
pHAP+MTF	broj	6	1	4	0	11
	%	54.5%	9.1%	36.4%	.0%	100.0%
pHAP	broj	0	5	4	3	12
	%	.0%	41.7%	33.3%	25.0%	100.0%
Total	broj	7	11	16	12	46
	%	15.2%	23.9%	34.8%	26.1%	100.0%

Analizirajući dobijene rezultate vezane za stepen mineralizacije defekata ispunjenih ispitivanim materijalom, iz tabele se vidi da je najveći procenat mineralizacije bio prisutan u defektima ispunjenih sa PLGA, u 66,7% slučajeva bilo je prisutno više od 50% mineralizovane kosti. Dobijeni podaci analizirani su Kruskal Wallis testom, i pronađena je statistički značajna razlika između svih ispitivanih grupa ($X^2=18.574$; $df=4$; $p=0.001$).



Grafikon 5.4.7. Procenat mineralizacije u defektima ispunjenim ispitivanim materijalima

U defektima koji su bili ispunjeni sa pHAP u kombinaciji sa metforminom mineralizacije nije bila prisutna u najvećem broju slučajeva (54,5%), više nego u negativnim kontrolama gde mineralizacija nije bila registrovana u 25% slučajeva.

Tabela 5.4.17. Procenat mineralizacije u defektima ispunjenim sa pHAP+PLGA i BioOss.

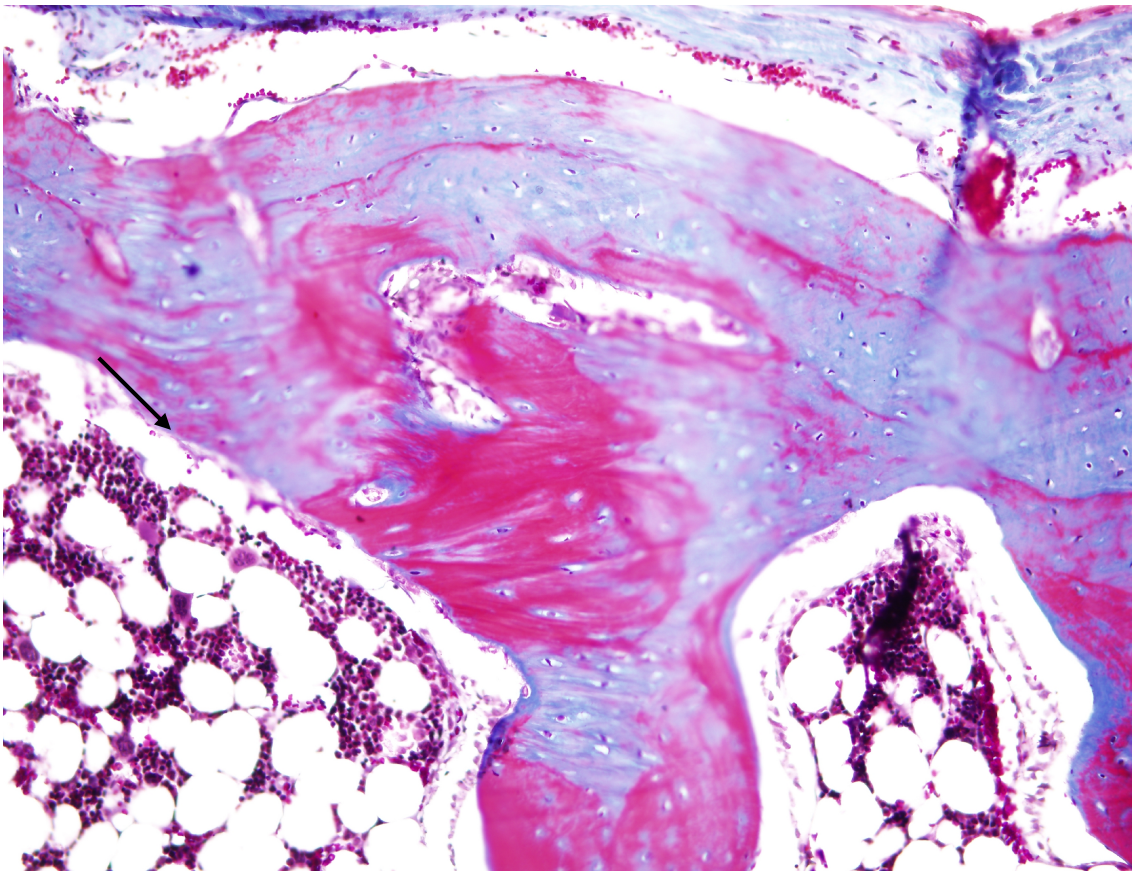
	Materijal	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Procenat mineralizacije	pHAP+PLGA	12	11.92	143.00
	BioOss	7	6.71	47.00

Porede i defekte ispunjene sa pHAP+PLGA i BioOss ponaosob i analiziraju i dobijene podatke Mann Whitney U testom dobijena je statistička značajna razlika između ove dve grupe ($Z=-2.118$; $p=0.039$).

Tabela 5.4.18. Procenat mineralizacije u defektima ispunjenim sa pHAP+PLGA i pHAP.

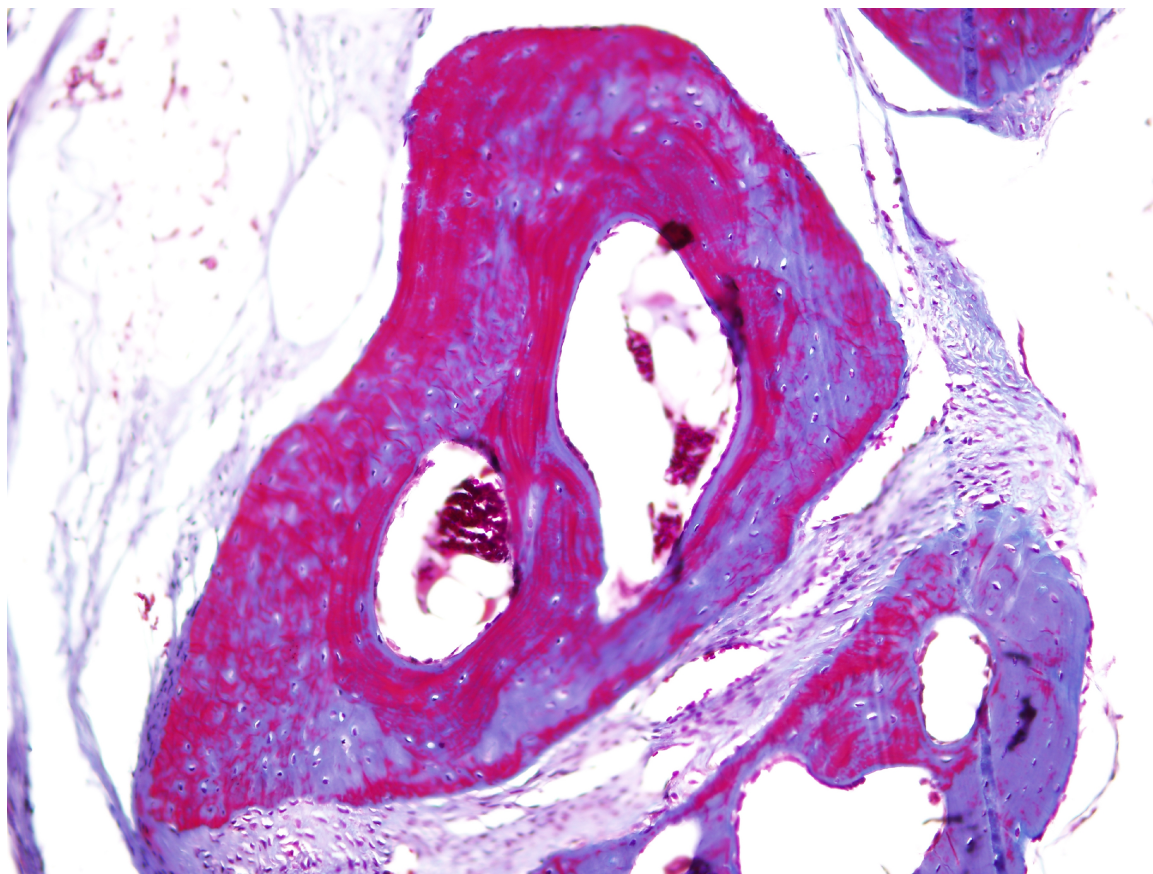
	Materijal	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Procenat mineralizacije	pHAP+PLGA	12	15.46	185.50
	pHAP	12	9.54	114.50
	Total	24		

Tako se analiziraju i podatke dobijene za pHAP+PLGA i pHAP Mann Whitney U testom došlo se do zaključka da je prisutna statistička značajna razlika između ova dva materijala kad je u pitanju procenat mineralizacije. ($Z=2.204$; $p=0.052$).

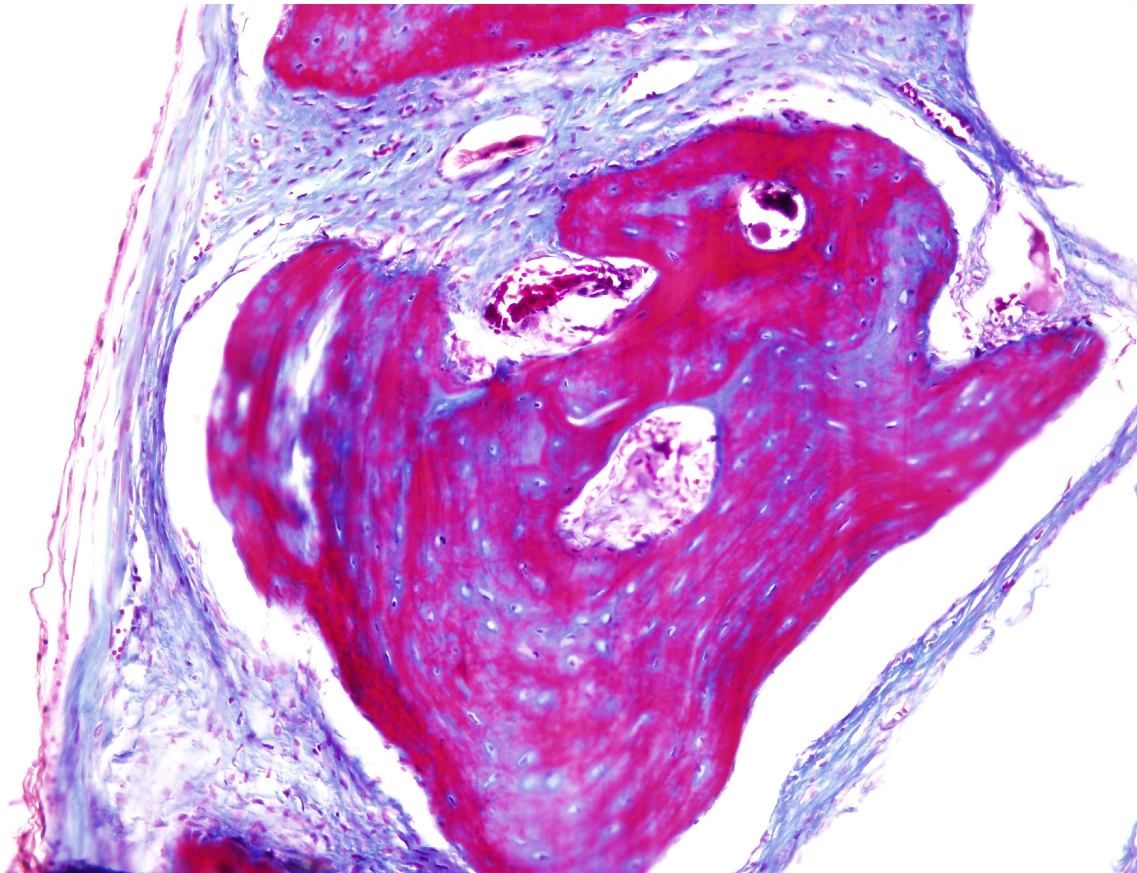


Slika 5.4.13.: Mineralizacija u gredicama je naglašeno iregularna. Koštane gredice pokazuju manje od 25% mineralizacije. Dominantno je prisustvo organskog

nemineralizovanog koštanog matriksa, koje ini više od 75% koštane mase. Materijal pHAP. (Trihromno bojenje Masson, 200x)



Slika 5.4.14.: Umereno regularna mineralizacija novostvorene kosti. Mineralizovani i nemineralizovani matriks su približno podjednako zastupljeni u koštanom tkivu, sa oko 50%. Materijal BioOss. (Trihromno bojenje Masson, 200x)



Slika 5.4.15.: Mineralizacija u gredicama je regularna, lamelarnog tipa. Koštane gredice pokazuju više od 75% mineralizacije. Dominantno je prisustvo mineralizovanog koštanog matriksa. Materijal pHAP+PLGA. (Trihromno bojenje Masson, 200x)

5.4.9. Prisustvo bazofila

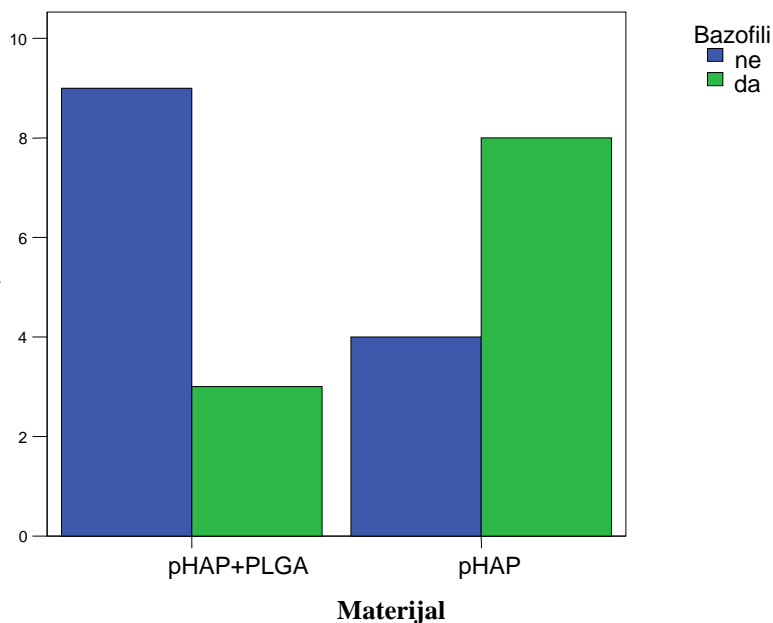
Tabela 5.4.19. Procena prisustva bazofila u defektima ispunjenim ispitivanim materijalima

		Bazofili				Total
		nisu nadjeni	1,2 /HPM	3 -5 /HPM	više od 5/HPM	
Materijal bez materijala	broj	2	1	1	0	4
	%	50.0%	25.0%	25.0%	.0%	100.0%
pHAP+PLGA	broj	9	2	1	0	12
	%	75.0%	16.7%	8.3%	.0%	100.0%
BioOss	broj	5	1	0	1	7
	%	71.4%	14.3%	.0%	14.3%	100.0%
pHAP+MTF	broj	5	4	1	1	11
	%	45.5%	36.4%	9.1%	9.1%	100.0%
pHAP	broj	4	2	4	2	12
	%	33.3%	16.7%	33.3%	16.7%	100.0%
Total	broj	25	10	7	4	46
	%	54.3%	21.7%	15.2%	8.7%	100.0%

Podaci dobijeni o prisustvu bazofila u defektima pokazali su da je u defektima ispunjenim sa PLGA u 75% slu ajeva bazofili nisu na eni, u BioOss-u kod 71% slu ajeva. Statisti kom obradom ovih podataka Kruskal Wallis testom statisti ka zna ajnost nije na ena

Tabela 5.4.20. Procena prisustva bazofila u defektima ispunjenim sa pHAP+PLGA i pHAP.

		Bazofili		Total	
		ne	da		
Materijal	pHAP +PLGA	broj	9	3	12
		%	75.0%	25.0%	100.0%
	pHAP	broj	4	8	12
		%	33.3%	66.7%	100.0%
Total		broj	13	11	24
		%	54.2%	45.8%	100.0%



Grafikon 5.4.8. Procena prisustva bazofila u defektima ispunjenim sa pHAP+PLGA i pHAP.

Ukoliko se podaci o prisustvu bazofila predstave kao da li su oni prisutni ili nisu, analizom Chi-Square nalazi se statistički značajna razlika u njihovom prisustvu između PLGA i pHAP ($\chi^2=4.196$; $df=1$; $p=0.041$).

Tabela 5.4.21. Spirmanova korelaciona analiza ispitivanih parametara međusobno

	Vel. defeka	Dzinovske celije	Fibroplazija	Neoangiogeneza	Procenat mineralizacije	Bazofili
Velicina defekta	1.000	.233	-.074	-.317(*)	-.410(**)	.046
Dzinovske celije	.233	1.000	.377(**)	.443(**)	-.590(**)	.505(**)
Fibroplazija	-.074	.377(**)	1.000	.306(*)	-.091	.246
Neoangiogeneza	-.317(*)	.443(**)	.306(*)	1.000	-.197	.378(**)
Procenat mineralizacije	-.410(**)	-.590(**)	-.091	-.197	1.000	.436(**)
Bazofili	.046	.505(**)	.246	.378(**)	-.436(**)	1.000

* Značajnost na nivou 0.05

** Značajnost na nivou 0.01

U tabeli 5.4.21. prikazana je međusobna korelacija ispitivanih parametara. Uočava se da je prisustvo defekta u preparatima obrnuto proporcionalno procentu mineralizacije i prisustvu krvnih sudova. Tako je što je više prisutna fibroplazija, što je veći i broj registrovanih novih krvnih sudova i što je više prisutnih bazofila, veći je i broj nalaženja i džinovskih elija. U slučaju visokog procenta mineralizacije, džinovske elije nisu nađene. Neoangiogeneza je srazmerna pojavi fibroplazije u preparatima a obrnuto srazmerna procentu mineralizacije.

6. DISKUSIJA

6.1. DISKUSIJA MATERIJALA

Tkivno inženjerstvo koštanog tkiva se zasniva na zasejavanju elija na vešta ki proizveden ekstracelularni matriks- elijski nosa , uz prisustvo biološki aktivnih molekula. Visoko porozni nosa i igraju važnu ulogu u zasejavanju elija, njihovoj migraciji, proliferaciji i diferencijaciji, tako da oni aktivno u estvuju vode formiranje novog tkiva u tri dimenzije. Idealan skafold bi trebalo da bude biokompatibilan, biorastvorljiv, da ima dobre mehane osobine i da pospešuje elijsko vezivanje, diferencijaciju i proliferaciju(59).

Razmatranja za sintetisanje novih nosa a su izuzetno kompleksna i ukljuuju sastav materijala, arhitekturu, strukturnu mehaniku, površinske osobine, brzinu degradacije, raspadne produkte kao i kompoziciju dodatih komponenti i naravno, promene svih ovih faktora tokom vremena. Od komponenti koje ulaze u sastav budu eg nosa a zavise njegove osobine, arhitektura odreuje velinu pora i njihovu me usobnu povezanost, što je jedna od najvažnijih osobina. Da bi došlo do dobre vaskularizacije i nesmetanog protoka nutritivnih materija, kao i eliminacije razgradnih produkata, optimalna velina pora bi trebalo da bude oko 300 nm, zatim, trebalo da imaju dobru interkonekciju i da procenat poroznosti materijala bude što ve i. Kriti ni momenat je uskladiti ove zahteve sa dobrim mehanim osobinama. Osnovne biološke interakcije, kao što su vezivanje proteina i peptida, adhezija elija, njihova migracija i proliferacija, predstavljaju primarne funkcije površinskih osobina nosa a, a brzina degradacije mora biti usklaena sa stvaranjem novog tkiva, pri emu se mora voditi ra una o biokompatibilnosti raspadnih produkata (24).

Do sada su mnogobrojni materijali korišeni kao elijski nosa i pri tkivnom inženjerstvu koštanog tkiva, pri emu se svi mogu podeliti u dve osnovne grupe: prirodni i vešta ki.

Razliiti biokerami ki materijali su imali široku upotrebu u tkivnom inženjerstvu kosti. Oni se smatraju biokompatibilnim, tvrdim, krtim, sa relativno lošim osobinama pri istezanju, ali odli nom kompresivnom snagom, visokom otpornošu na trošenje. Hidroksiapatit se više od dve decenije koristi kao zamenik kosti zbog svojih pogodnih osobina i sli nosti sa neorganskom komponentom prirodne kosti. On je

osteokonduktivan, biokompatibilan, ima sporu resorpciju i pri visokoj poroznosti ima loše mehaničke osobine (100).

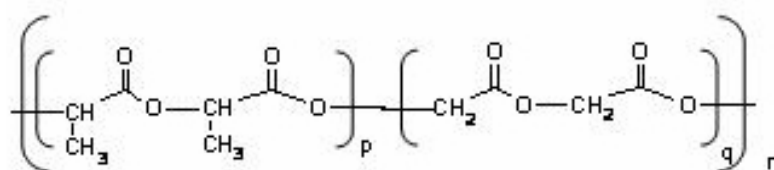
Mnogi tipovi polimera koristili su se za tkivno inženjerstvo kosti, a jednostavno se mogu podeliti na prirodne i sintetičke. Prirodni materijali imaju potencijalnu prednost biološkog prepoznavanja što može pozitivno podržati elijsku adheziju i funkciju. Ipak, oni mogu dovesti do imune reakcije domaćina i mogu sadržavati patogene ne isto. Tako je, kod njih se manje može uticati na mehaničke osobine i biorazgradljivost, a neki od njih nemaju veliku rasprostranjenost u prirodi, što ih čini dosta skupim. S druge strane sintetski polimeri imaju mogućnost široke proizvodnje, uz kontrolu mehaničkih osobina, stepena degradacije i mikrostrukture. Iako su mnogobrojni polimeri ispitivani u cilju njihove upotrebe u tkivnom inženjerstvu, ni jedan od njih ne ispunjava sve zahteve za elijskog nosača u inženjerstvu kosti, uglavnom zbog slabih mehaničkih osobina, koje potječu od visoke poroznosti, kao i brze resorpcione kinetike (101).

Kompozitni elijski nosači predstavljaju najnoviji tip elijskih nosača. Kombinacija polimera i bioaktivne keramike predstavlja jednu vrstu kompozitnih elijskih nosača. Zbog svega ovoga mi smo se odlučili za ispitivanje poroznog hidroksiapatita kao i kompozitnih materijala i to poroznog hidroksiapatita u kombinaciji sa prirodnim polimerom polilaktidglikolidom - PLGA i sa metforminom kao aktivnom supstancom. Njihova kombinacija dovodi do poboljšanja mehaničkih osobina skafolda, a osnovni izazov pri njihovoj sintezi je postizanje dobrog hemijskog i/ili mehaničkog vezivanja hidroksiapatita i polimera. Mešavina ovih materijala pokazuje i bolje osteokonduktivne osobine od pojedinačnih sastojaka(102).

Na ovaj način se u mnogome rešavaju i problemi povezani sa biokompatibilnošću u polimera, koji uglavnom potječu od njihove brze degradacije i produkata razgradnje. Neorganski punioci hidroksiapatita koji se ugrađuju u brzo razgradljivi matriks polimera dovode do željenog nivoa degradacije i resorpcije nosača. Osobine kompozitnih nosača bi trebalo da budu dizajnirane tako da keramičke estice budu ugrađene ne samo u unutrašnjosti već i na površini nosača, što poboljšava biološke osobine materijala. Tako je, produkti razgradnje hidroksiapatita dovode do neutralizacije kiselih produkata razgradnje polimera, što opet dovodi do poboljšanog okruženja za elije, na koje pad pH nekada ima fatalan učinak(102).

Veliki izazov u nauci o materijalima i tehnologiji na podru ju tkivnog inženjerstva je kontrola ta nosti i reproduktivnosti izrade skafolda zbog standardizacije procesa izrade. Razne tehnike izrade skafolda za procesiranje raznih polimernih i kompozitnih materijala i razvoj razli itih mikrostruktura je sada veoma aktuelna tema istraživanja. Ipak još uvek i pored brojnih tehnika koje se primenjuju svaka od njih poseduje odre ene nedostatke sa stanovišta kontrole poroznosti skafolda, veli ine pora i distribucije, kao i prisustva ostataka toksi nih rastvara a u skafoldu.

Razumevanje mehanizma nukleacije pHAP-a u SBF je bitno za dublja istraživanja na ovom polju. Dalja unapre enja se mogu posti i odabiranjem odgovaraju ih polimera za funkcionalizaciju skafolda. Kao što je dobro poznato, karboksilne/hidroksilne grupe u PLGA lancima se ponašaju kao aktivni inioi u pokretanju nukleacije. Ove negativno naelektrisane grupe, u po etnoj fazi nukleacije, privla e Ca^{2+} jone iz SBF koji se potom vezuju za površinu polimera.



Slika 6.1.1. Strukturna formula PLGA

U slede em koraku, PO_4^{3-} joni su privu eni pozitivno naelektrisanim Ca^{2+} jonima. Zbog toga proces nukleacije kalcijum fosfata zapo inje po etnim vezivanjem Ca^{2+} jona za aktivnu grupu odgovaraju ih polimera i naknadnim vezivanjem PO_4^{3-} jona za Ca^{2+} jone. Kao što je ve prikazano (103,104,105), koncentracija karboksilnih/hidroksilnih grupa na polimernoj površini skafolda (data preko gustine centara nukleacije) verovatno igra veoma bitnu ulogu u u estalosti i mehanizmu nukleacije kalcijum fosfata (106). Gustina mesta nukleacije može tako e uticati i na veli inu aglomerata i njihovu morfologiju. Rezultati prikazani u ovom radu jasno potvr uju ovu pretpostavku. U slu aju PLGA, kao što je prikazano, uo en je relativno mali udeo spojenih estica u procesu samoorganizovanja, što je verovatno uzrokovano zna ajno manjim udelom karboksilnih aktivnih grupa u PLGA. Ve i aglomerati (neki i preko 8 μm) su posmatrani kada je koriš en PLGA, koji verovatno ima manji broj

nukleacionih prostora koji dalje stvaraju odgovaraju i rast kalcijum-fosfatnih nukleusa i zrnaca.

Rezultati ovog rada prikazuju samostalno sastavljen pHAP na površini PLGA tankog filma. Loptaste estice pokazuju izuzetno razvijenu morfologiju sa strukturama nalik laticama na datoj površini. Veli ina estica se uglavno kre e od 2.5 do 3.5 μm . Sli ne vrednosti veli ine estica (prose nog pre nika od 2.44 μm) su pokazane u nekim radovima posve enim apatitnim biomimetskim strukturama koje su razvijene na PLGA skafoldu (69). Morfologija estica izgleda veoma sli na morfologiji dobijenoj u ovom radu, mada same slike su nedovoljno jasne i gustina naseljavanja je znatno manja nego u našim istraživanjima. ak i kad je koriš en 1.5xSBF ta gustina naseljavanja je bila neuporedivo manja nego u našim eksperimentima. Kod Que i saradnika (107) tako e je pokazano da pri koriš enju 1.5xSBF za apatitnu nukleaciju na PLGA, gustina naseljavanja je bila manja i proces nukleacije izgleda da je bio u svojoj po etnoj fazi (veli ina estica je bila manja od pola mikrona za vreme nukleacije od 24 h.). Sve ovo ukazuje da, mada se u principu procesi u svim slu ajevima odvijaju sli nim mehanizmima, brzina odvijanja procesa samoansamliranja biomimetskog karbonatnog hidroksiapatita u našim eksperimentima odvijala se neuporedivo ve om brzinom, što ukazuuje da su naši uzorci bili savršeno dizajnirani i da su naši kerami ki nosa i imali idealnu morfologiju povšine koja je uticala zna ajno i na sam na in deponovanja hidroksiapatita i na aktivnost površine tako deponovonih tankih filmova, koji su saglasno svojoj maloj debljini zadržali morfologiju kerami kog nosa a (skafolda). Dobijeni rezultat upu uje da je za o ekivati i vrlo brz proces naseljavanja progenitorskih elija na površinama takvog skafolda i njihovu veoma brzu diferencijaciju u osteoblastne elije i brzu osteointegraciju koja sledi potom. Takav zaklju ak posebno je proveravan istraživanjima koja su izvedena na animalnom modelu kalvarije kuni a.

Samoorganizovane nanostrukture dobijene u ovoj studiji mogu igrati zna ajnu ulogu u razumevanju rasta elija na površini skafolda. Nekoliko studija koje se bave ponašanjem elija na apatitu formiranom na površini polimera potvrđuju njegovu sposobnost da favorizuju osteoblastni rast elija (90, 108, 109, 110). Dalja istraživanja e se fokusirati na ponašanje elija na dobijenim strukturama koje su ovde opisane.

Ovim radom je prikazan novi metod proizvodnje skafolda. Postignut je poboljšan nanostrukturni dizajn prethodno stvorenih pHAP skafolda uz pomo

biomimeti kog tretmana u SBF. Da bi se unapredila nukleacija biomimeti ke apatitne faze PLGA tanki filmovi su naneti na površinu skafolda pre uranjanja u SBF. Faza biometri ki nukleisana u SBF, po FTIR merenjima, je kalcium hidroksiapatit. To je verovatno karbonatni apatit, iako FTIR spektar ne daje dovoljno dokaza kojima bi se podržala ova pretpostavka, zato što su COO⁻ grupe tako e prisutne u polimernim lancima. SEM mikrografije jasno pokazuju strukture sli ne biološkom apatitu u svim slu ajevima(Slike 5.1.9.; 5.1.10.; 5.1.11.). Posebno dobar primer ovih struktura se može videti u slu aju PLGA substrata.

Ova studija je pokazala kako dobiti strukture sli ne biološkom apatitu pomo u dodatnog nanodizajniranja poroznog pHAP skafolda biometri kim tretmanom. Dobijene strukture oponašaju strukturu prirodne kosti i pogodne su za srastanje i rast elija, omogu avaju i bržu regeneraciju kosti, kako je prikazano u nekim studijama(50). Ovaj mehanizam apatitne formacije *in vitro* je verovatno sli an mehanizmu nastajanja prirodnog koštang tkiva *in vivo*. Na taj na in nanodizajniran skafold obezbe uje uslove koji su sli ni fiziološkim za rast i proliferaciju elija.

6.2.DISKUSIJA TESTOVA INDIREKTNE I DIREKTNE CITOTOKSI NOSTI ISPITIVANIH MATERIJALA

In vitro ispitivanje citotoksi nosti biomaterijala je po etni korak u svakom istraživanju biokompatibilnosti. U ovoj studiji, kompozitni materijali su ispitivani kroz kvalitativne i kvantitativne analize, pri indirektnom (MTT test) i direktnom (LDH test) kontaktu sa elijskom kulturom. Treba imati u vidu da ovi testovi ne daju biološku ocenu materijala ve samo ocenu citotoksi ne aktivnosti(79). U suprotnom, medikamenti sa potvr enom pozitivnom klini kom upotrebom mogli bi biti pogrešno procenjeni.

eljske kulture kao biološki sistemi za testiranje našli su široku primenu u savremenim istraživanjima iz više razloga. Najzna ajnija je mogu nost dobre reproduktibilnosti ispitivanja(79). Kontinuirane elijske linije, standardizovane i dostupne svim laboratorijama koje se bave ovim poslom, omogu avaju da se eksperiment pod istovetnim uslovima više puta ponovi, a dobijeni rezultati se mogu uporediti sa istraživanjima drugih istraživa a ili laboratorija koje su primenile istu metodologiju. Kontinuirane elijske linije predstavljaju proste ponavljaju e sisteme bez

specifičnih metaboličkih aktivnosti koje imaju ciljane ćelije *in vivo*. Upravo zbog toga, one se mogu smatrati kao konstanta unutar određenog sistema ispitivanja, pa je time i smanjen broj varijabilnih parametara koji utiču na ispitivani materijal, time se fokusira isključivo na efekat materijala. Uslove kakvi postoje *in vivo* bolje simuliraju primarne ćelijske kulture, a specifične metaboličke aktivnosti odgovaraju onima koje poseduju ciljane ćelije. Za njihovo kultivisanje potrebna je duža i nestandardna procedura koju ne mogu ispoštovati sve laboratorije. Zbog toga u standardnim tehnikama ISO metodologija preporučuje se kontinuirane ćelijske linije. Osim toga, određena istraživanja pokazala su da u osnovnim karakteristikama nema bitnijih razlika kod ocene glavnih demonstriranih efekata poredeći i oba tipa ćelijskih kultura. Nepostojanje razlika evidentnije je ukoliko je citotoksičan efekat jače izražen (111).

Kontinuirane ćelijske linije - potiču iz kolekcije tipa-kulture (L-929, 3T3 mišji fibroblasti), humani diploidni fibroblasti WI-38, humane epitelne ćelije (He-La), ili primarne ćelije, uglavnom gingive, mukoze i pulpnih fibroblasta. Preporučuje se da se u toku istraživanja uvek sprovede kroz ispitivanja serije srodnih materijala za koje su rezultati ispitivanja već poznati, a da se evaluacija citotoksičnosti prezentira kroz podatke dobijene rangiranjem u odnosu na njih (112).

U ovom istraživanju korišćene su kontinuirane ćelijske kulture fibroblasta miša L929 (NCTC clone).

6.2.1. Diskusija indirektnog kontakta ispitivanih materijala sa ćelijskom kulturom

Pri ispitivanju **indirektnog** kontakta materijala sa ćelijskom kulturom vršena je kvantitativna evaluacija dobijenih rezultata uz pomoć MTT testa, uz korišćenje ekstrakta ispitivanih materijala. MTT test je standardni test koji se široko koristi prilikom ispitivanja citotoksičnosti hidroksiapatita i njegovih kombinacija sa različitim polimerima. On omogućava indirektnu ocenu ćelijskog rasta i proliferacije pošto mitohondrije živih ćelija oksidiraju MTT rastvor, dajući karakteristično plavo ljubičasto prebojene krajnje produkte. Ovim testom se određuje broj varijabilnih ćelija u odnosu na kontrolnu grupu, koja pokazuje 100% preživljavanja ćelija. Pozitivnu kontrolu predstavljao je 4% fenol, koji je doveo do preživljavanja nešto više od 30% ćelija u kulturi, što je visoko statistički značajna razlika ($p < 0.005$) u odnosu na negativnu kontrolu.

U ovom istraživanju broj vijabilnih elija L929 fibroblasta eksponencijalno se smanjuje pri njihovom izlaganju produktima degradacije ispitivanih materijala u vremenskom periodu od 24h, 48h i 72h, odnosno citotoksi nost se pove a sa pove anjem vremena u kome su elije izložene ekstraktima ispitivanih materijala. U slu aju ispitivanja indirektno citotoksi nosti pHAP-a i pHAP-a u kombinaciji sa PLGA, dobijeni rezultati pokazuju da nema velike razlike u preživljavanju elija u zavisnosti od dužine ekstrahovanja ispitivanih materijala u hranljivoj podlozi. Sa pove anjem vremenskog perioda izlaganja elija fibroblasta L929 ekstraktima razli itih koncentracija dolazi do eksponencijalnog smanjenja broja vijabilnih elija u kulturi. U slu aju pHAP-a u kombinaciji sa metforminom pokazuje izrazitu citotoksi nost u niskim koncentracijama (do 10mg/ml) bez obzira na vremenski period izloženosti hranljive podloge ovom materijalu. Nakon toga dolazi do oporavka i ak porasta broja elijske populacije fibroblasta L929 , da bi pri koncentracijama ve im od 60 mg/ml došlo do pojave ravnomernog pove anja citotoksi nosti sa porastom koncentracije produkata degradacije, kao kod ostalih ispitivanih materijala. Ni jedan od ispitivanih materijala(pHAP , pHAP + PLGA i pHAP sa metforminom) nije doveo do kompletnog citotoksi nog efekta na kulturu fibroblasta L929.

Indirektnim kontaktom i MTT testom prikazan je kratkotrajni efekat razgradnih produkata ispitivanih materijala na elijsku kulturu, posle izvršenog ekstrahovanja datih materijala u hranljivom medijumu. Razlike u citotoksi nosti testiranih materijala mogu biti objašnjene termalnim degradacijama polimernih lanaca koji su se pojavili tokom proizvodnje kompozitnih jedinjenja (113). Tokom proizvodnje kompozitnih materijala u odnosu na proizvodnju istog polimera u samom materijalu dolazi do stvaranja fragmenata niske molekularne mase. Ovi fragmenti lako prelaze u rastvor tokom preparacije ekstrakta za ispitivanja, i samim tim se u rastvoru pove a koncentracija produkata razgradnje kod kompozitnih materijala. Ovaj viši nivo degradacije može objasniti postignuti citotoksi ni efekat polikoglikolida u kompozitnom jedinjenju sa hidroksiapatitom (113). Nikoli i sar. (79), dobili su statisti ki zna ajan citotoksi an efekat pri ispitivanju indirektno citotoksi nosti pHAP u kombinaciji sa PLGA, što su objasnili prethodno navedenom injenicom. Me utim, Douglas i sar. (101) u svom istraživanju gde su ispitivali dejstvo PHAP i PLGA na elijsku kulturu humanih osteoblasta nisu dobili statisti ki zna ajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu MTT

testom, što se poklapa sa rezultatima ovog istraživanja. Autori su ekstrahovanje ispitivanog materijala vršili u različitim vremenskim periodima od 10 minuta do 24 sata i došli do zaključka da je najveći broj citotoksičnih supstanci oslobođeno u prvih 10 minuta ekstrahovanja. Ovo govori da se nimalo ili vrlo mala količina toksinih materijala oslobodila u vremenskom periodu između 10 minuta i 24 sata. Na ovaj način se mogu objasniti i rezultati koji su dobijeni ovim istraživanjem, s obzirom na činjenicu da je preživljavanje ćelija fibroblasta L929 bilo slično bez obzira na dužinu ekstrahovanja materijala u hranljivoj podlozi. Pri prvom kontaktu materijala sa hranljivom podlogom rastvaraju se degradacioni produkti koji su nastali u postupku izrade kompozitnih jedinjenja, što se dešava u prvih sat vremena ekstrahovanja. Dalje izlaganje hranljive podloge ispitivanim materijalima ne može dovesti do daljeg rastvaranja materijala, pa se ni dobijeni rezultati ne razlikuju vezano za različita vremena ekstrakcije. Sasvim su drugačiji rezultati testa indirektno citotoksičnosti kada je u pitanju pHAP u kombinaciji sa metforminom. Rezultati pokazuju izrazitu citotoksičnost u niskim koncentracijama (do 10mg/ml) bez obzira na vremenski period izloženosti hranljive podloge ovom materijalu. Nakon toga dolazi do oporavka i čak porasta broja ćelijske populacije fibroblasta L929, da bi pri koncentracijama većim od 60 mg/ml došlo do pojave ravnomernog povećanja citotoksičnosti sa porastom koncentracije produkata degradacije, kao kod ostalih ispitivanih materijala.

6.2.2. Diskusija direktnog kontakta ispitivanih materijala sa ćelijskom kulturom

Pri ispitivanju **direktnog** kontakta materijala sa ćelijskom kulturom koristi se LDH test citotoksičnosti u kome se preživljavanje, odnosno vijabilnost ćelija procenjuje na osnovu procenta LDH (laktat dehidrogenaze) koji se nalazi u ekstra ćelijskoj sredini. Laktat dehidrogenaza se kvantifikuje u cilju izračunavanja broja ćelija adheriranih na površinu materijala. Ovaj citolitički enzim se godinama koristio za merenje gubitka integriteta ćelijske membrane(114,115). Indirektno merenje aktivnosti LDH, koja je prisutna u citoplazmi intaktnih ćelija, može se izvršiti samo ako se izvrši liza ćelija. S obzirom da je dokazano da je LDH aktivnost direktno proporcionalna broju ćelija(116), razvijena je nova eksperimentalna procedura koja koristi merenje aktivnosti jednog enzima u cilju kvantifikacije adheriranja ćelija na ispitivani materijal(113).

Rezultati su pokazali značajnu elijsku proliferaciju i adheziju u prisustvu svih ispitivanih materijala. U ovom eksperimentu, pHAP, pHAP sa PLGA i pHAP sa metforminom nisu pokazali citotoksičnost u direktnom kontaktu sa elijskim kulturom fibroblasta L929. Prvog dana eksperimenta, broj elija u prisustvu svakog od ispitivanih materijala nije se značajno uvećao. Od drugog dana eksperimenta elije su se umnožavale i njihov broj je eksponencijalno rastao. Na kraju eksperimenta, sedmog dana, elije fibroblasta L929 su bile u bliskom kontaktu sa svakim od ispitivanih materijala u velikom broju i neizmjenjene morfologije.

Adhezija elija i proliferacija različitih tipova elija na različite površine zavisi od karakteristika površina samih polimera u kompozitnim elijskim nosačima kao što su stepen hidratacije(117,118), površinski napon (119), površinsko naelektrisanje i topografija(120). elijska adhezija je bolja ukoliko je površina hidrofilnija što omogućava adsorpciju površinskih proteina nestabilnim i reverzibilnim vezama(117). Umeren stepen hidratacije substrata omogućava elijama da deponuju svoje proteine za adheziju menjaju i ih za proteine koji se mnogo bolje vezuju. Veruje se da je ovaj mehanizam sporiji na ekstremno hidrofobnim ili hidrofilnim površinama, što je verovatno jedan od glavnih razloga zbog kojih elije ne proliferišu i ne adheriraju na njima(121). U ovom istraživanju svi ispitivani materijali nisu pokazali razlike u elijskoj adheziji, što govori da su svi faktori koji utiču na proces adhezije i proliferacije elija za ispitivane materijale slični. Tako i drugi faktori mogu uticati na elijsku adheziju. Hemijske karakteristike, kao što su prisustvo karboksilnih(122) i hidroksilnih(123) grupa, mogu biti važne u zavisnosti od vrste elija, za adheziju elija i za njihov rast. Curtis i sar. (30) našli su da je prisustvo velikog broja hidroksilnih grupa ima suprotan efekat. Ova istraživanja pokazuju da je potreba za optimalnom gustinom hidroksilnih grupa potrebna da bi se postigla dobra elijska adhezija. Topografija materijala tako i je veoma bitna kad se diskutuje o elijskoj adheziji. Studije koje se odnose na morfologiju površine biomaterijala pokazale su postojanje afiniteta različitih tipova elija za hrapave površine materijala(124). Rezultati eksperimenata ovog rada, kao i karakterizacija ispitivanih materijala pokazuje da su površine pHAP, pHAP sa PLGA kao i pHAP sa metforminom pogodne za adheriranje elija i za njihovu proliferaciju i da se odlikuju karakteristikama koje omogućavaju rast elija u direktnom kontaktu sa ovim materijalima. I pored dokazane citotoksičnosti u

testu indirektnog kontakta, već je napomenuto da više faktora utiče na adheziju i proliferaciju elija, tako da sa stanovišta nauke o materijalima to nije presudno za ponašanje elija u direktnom kontaktu sa ispitivanim materijalima, što je slučaj i u ovom radu.

6.3.DISKUSIJA TESTA IRITACIJE

Cilj testa primarne kutane iritacije je bio da odredi iritativne osobine pHAPa u kombinaciji sa različitim polimerima u toku njegove jednokratne primene na intaktnu kožu kunića.

Testovi iritacije su jedan od međunarodno standardizovanih načina da se utvrdi lokalni iritirajući i potencijal medicinske opreme, materijala ili ekstrakata, koristeći mesta kao što su koža i mukozne membrane, najčešće u animalnim modelima.

Po preporukama ISO 10993-10 u metodama rada kao eksperimentalne životinje korišćeni su kunići, soja Novozelandski beli, zbog izuzetno osetljive i svetle kože na kojoj se lako uočavaju sve nastale promene.

Svi kunići preživeli su celokupno trajanje istraživanja. Za vreme trajanja istraživanja kunići su izgledali zdravi i aktivni. Nije bilo znakova trovanja, neželjenih farmakoloških efekata ili neobičajnog ponašanja kunića. Indeks primarne kutane iritacije kod kunića sa svim testiranim materijalima i negativnom kontrolom je iznosio nula, Indeks primarne kutane iritacije kod kunića u grupi pozitivna kontrole, na kraju istraživanja (72 sata nakon aplikacije) imali su vrednost 2.11. U ovoj grupi životinja uсталost i težina iritacije smanjivala se sa vremenom. Nakon sedam dana od primene supstance (mlečne kiseline 98%) i u ovoj grupi ispitivanih životinja više nije bilo znakova iritacije kože.

U ovim istraživanjima biokompatibilnosti pozitivne i negativne kontrolne grupe su neophodne da bi potvrdile adekvatno izvođenje test procedure ili da bi se u odnosu na njih adekvatno procenjivali rezultati.

Svi uzorci materijala su ispitivani u obliku paste. Sve oblasti kože kunića pokazale su iste osobine, bez reakcije crvenila (eritem) i bez edema, što u ovom testu ukazuje da nema rastvorljivog štetnog sadržaja koji se otpušta iz materijala i napada elije kože. Indeks primarne kutane iritacije iznosio je 0.0. Na osnovu ovih rezultata zaključeno je da kompozitni elijski nosači nisu ispoljili iritirajući efekat. Nakon *in vivo*

ispitivanja u testu primarne kutane iritacije može se zaključiti da ispitivani materijali u obliku paste mogu biti u kontaktu sa kožom bez efekta iritiranja kože.

6.4.DISKUSIJA TESTA BIOFUNKCIONALNOSTI NA ANIMALNOM MODELU

Ispitivanje biofunktionalnosti nekog materijala i njegovog osteoinduktivnog i osteokonduktivnog efekta vrši se na predkliničkom animalnom modelu, koji je jednostavan, lak za izvođenje i koji dozvoljava poređenje različitih osteopromotivnih materijala(125). Istraživanjima je potvrđeno da je predklinički model u kome se koriste životinje, kao što su pacovi i kunići, esencijalan u razvoju i ocenjivanju novih zamenika kosti. Testovi na životinjama za materijale koji će se koristiti u tkivnom inženjerstvu moraju se sagledati sa sledećih aspekata: izbor defekta, izbor životinje, starost životinje, anatomsko mesto i veličina lezije(126). Koštani defekti kritične veličine predstavljaju aktivan model za studiju zarastanja kosti, s obzirom da, po definiciji, ne zarastaju bez intervencije(127,128). Dobro dokumentovani dokazi jasno potvrđuju da, ukoliko se defekti kosti kritične veličine ostave netretirani, oni neće spontano zarasti, odnosno kost se neće spontano regenerisati(129). Na osnovu ovoga zaključuje se da različiti biomaterijali mogu biti ocenjivani kao tretmani izbora sa ciljem da se ustanovi da li mogu da postignu regeneraciju.

Regeneracija defekata kritične veličine proučavana je kod kalvarija hrčaka, na femuru, tibiji, mandibuli i kalvariji pacova, na femoralnim kondilima, tibiji, radijusu i kalvariji kunića, kao i na metatarzusu ovaca i ilijalnoj kosti koza. Defekti na kalvariji kunića pune debljine, veličine 6 mm, koji su korišćeni u ovom eksperimentu, ispunjavali su kriterijume za koštane defekte kritične veličine (125,130,131,132,133,134,135). Model defekata kritične veličine u predelu kalvarije kunića uzet je iz sledećih razloga: prvo, zbog slabe vaskularizacije tog predela; drugo, zbog slabe razvijenosti mišića; treće, zbog slabo prisutne koštane srži kao potencijalnog izvora matičnih ćelija i četvrto zbog kvaliteta kosti koji je sličan karakteristikama kostiju kranio-maksilofacijalne regije(136). Sve to, ovaj model čini relevantnim i pouzdanim za testiranje koštanih zamenika(137). Sve životinje su dobro podnele hiruršku proceduru i bile su sposobne da se hrane dan posle hirurške intervencije.

Analiza nalaza sugerira da je ispitivanje modela sa defektom kritično veličine na kalvariji kuni a sa niskim morbiditetom.

U ovoj studiji korišten je disocijativni oblik anestezije zbog nemogućnosti intubiranja kuni a i samim tim nemogućnosti sprovođenja inhalacione anestezije, kako zbog anatomskih specifičnosti respiratornih puteva, tako i zbog velikog stresnog faktora koji eksperiment proizvodi kod ovih životinja(97).

Operativna procedura formiranja polumeseaste incizije i podizanje kutanog flapa na vrhu kalvarije kuni a radi eksponiranja kranijalne kosti i formiranja defekta u skladu je sa već objavljenim studijama(138,139). Transosealni defekti u kosti lobanje prečnika 6mm pravljani su posebnim trepan borerima, a vodilo se računa da ne dođe do povrede tvrde ovojnice mozga(dure mater)(130).

Ovaj eksperimentalni pretklinički model na životinjama omogućava takozvani dizajn u paru, pri čemu se na obe strane sagitalne linije kosti lobanje prave defekti(140). Ripamonti i sar. (98) koristili su sličan model formiranja defekta kosti pune debljine sa obe strane kalvarije, i to kod majmuna. Korišten je dizajn oblika kvadrata (Latin blok square design) radi postavljanja materijala u defekte, a sastojao se u rotacionoj dodeli materijala defektima, čime se balansirano distribuira svaki materijal i u anteriornu i u posteriornu regiju kalvarije (Statistical Analysis System, 1989)(98).

Kao negativna kontrola korišten je prazan defekt koji se spontano ispunjavaju krvlju(141), a kao pozitivna kontrola BioOss (Bio Oss^R, cancellous 0.25 - 1,0mm veličine, Geistlich AG, Wolhusen, Switzerland). Posle postavljanja materijala, defekti i materijal prekriveni su periostom i kožom. Periost je oduvan radi boljeg urastanja i vaskularizacije. U ovoj studiji korištena je modifikovana metodologija po Hammerleu i sar. (141), tako što nije korištena membrana za prekrivanje postavljenih materijala pre repozicije flapa.

Nakon perioda ocenjivanja i po žrtvovanju životinja, kosti lobanje su podvrgnute metodologiji histološke pripreme nedekalcifikovanih uzoraka.

Prilikom zarastanja kosti i nakon implantacije materijala sledi niz događaja. Inicijalno kao odgovor na povredu dolazi do osteoindukcije, tako što se iniciraju različiti tipovi preživelih ćelija(142). Na mesto povrede prodiru mezenhimalne stem ćelije poreklom iz kambijalnog sloja periosta i iz koštane srži (13), koje premošuju pukotinu, umnožavaju se i diferenciraju u preosteoblaste kao odgovor na prisustvo

faktora rasta i citokina iz trombocita, susednih elija i tkiva. Preosteoblasti se vremenom diferenciraju u osteocite. Diferencirane koštane elije sada su odgovorne za rast kosti na površini poznatoj kao osteokonduktivna površina i proces se naziva osteokonduktivni proces. To znači da osteokondukcija zavisi od osteoindukcije i definisana je kao proces urastanja kapilara, perivaskularnog tkiva i osteoprogenitor elija iz površine kosti u strukturu koštanog grafta(143). Ipak osteokondukcija se razlikuje između biomaterijala zato što nije samo kost odgovorna za rast kosti na površini defekta nego i implantirani materijal(144).

Rezultatima merenja veličine defekta utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između 5 ispitivanih grupa po veličini defekta. Pokazalo su da je najmanja prosečna vrednost defekta u grupi pHAP u kombinaciji sa PLGA (3,9mm) ali je i najveći i varijabilitet bio u pomenutoj grupi, odnosno raspon vrednosti je daleko veći od ostalih grupa. Upoređujući pHAP sa PLGA sa pozitivnom kontrolom gde je bio postavljen BioOss, koji se koristi kao zlatni standard, utvrđeno je da je veličina defekta bila manja u grupi koja sadrži pHAP sa PLGA, ali bez statistički značajne razlike između ove dve grupe, što se slaže sa nalazima drugih autora(145). Objašnjenje se može tražiti u malom broju uzoraka ili u kratkom periodu ocenjivanja nedovoljnom da se u potpunosti reparira defekt u kosti. U nekim grupama uočene su izuzetno visoke i niske vrednosti za ispunjenost koštanog defekta što je rezultiralo velikom standardnom devijacijom, što takođe govori o potrebi za većim uzorkom. Odabrani broj uzoraka i dužina perioda ocenjivanja u ovoj studiji zasnovani su na iskustvima prethodnih studija. Ne treba zaboraviti da se eksperimenti na životinjama moraju koristiti u skladu sa etičkim principima i dobrom istraživačkom praksom, koji takođe određuju broj životinja koje se mogu koristiti u istraživanju. Analizirana je i veličina defekta u grupi implantiranih materijala istog pHAP-a sa pHAP-om i PLGA. Na slici 5.4.1. gde je preparat sa implantiranim materijalom pHAP + PLGA, jasno se uočava novostvorena kost lamelarne građe koja je svojim većim delom mineralizovana. Sa druge strane istog pHAP, koji je prikazan na slici 5.4.2., pokazuje još uvek prisutan defekt uz prisustvo granulacionog tkiva sa elementima nespecifičnog zapaljenja. Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika kod ove dve grupe materijala, odnosno da je pHAP sa PLGA pokazao manju prosečnu veličinu defekta u odnosu na isti pHAP. Ovakav rezultat je potvrđen i u ispitivanjima kod drugih autora i ukazuje da kombinacija poroziog

hidroksiapatita sa polimerom PLGA poseduje bolje osteokonduktivne osobine(102).

Ova studija je pokazala da je prisustvo nespecifi nog zapaljenja u defektima naj eš e registrovano u negativnoj kontrolnoj grupi(prazne rupe) i u grupi gde je bio implantiran pHAP sa metforminom. Prisustvo nespecifi nog zapaljenja u preparatu ukazuje na produžen period stvaranja koštanog tkiva ili ak na nemogu nost stvaranja kosti. U prisustvu partikula BioOss-a koje se još nisu resorbovale, što se vidi na slici 5.4.3., formirano je granulaciono tkivo uz postojanje jako izražene limfocitne infiltracije. U defektima gde su bili implantirani ist pHAP i pHAP sa PLGA limfocitna infiltracija je bila manje izražena(slika 5.4.4.). Samostalno pHAP i pHAP u kombinaciji sa PLGA pokazali su najmanje prisustvo znakova zapaljenja, ali bez statisti ki zna ajne razlike u odnosu na BioOss.

Istraživanjem je bilo obuhva eno i prisustvo džinovskih elija u defektima ispunjenim ispitivanim materijalom. Postojanje džinovskih elija u materijalu ukazuje na reakciju tkiva na partikule ispitivanog materijala kao na prisustvo stranog tela. Zadatak ove vrste elija je da ukloni ostatke materijala iz tkiva. Rezultati su pokazali da je ta vrsta elija naj eš e na ena u negativnoj kontrolnoj grupi, u 75% slu ajeva, i u grupi gde je implantiran pHAP sa metforminom, u 45% slu ajeva. U odnosu na ostale ispitivane materijale prisutna je statisti ki zna ajna razlika. Tako e, upore uju i prisustvo ovih elija kod BioOss-a i pHAP-a sa PLGA na ena je statisti ki zna ajna razlika, pošto je u defektima gde je bio postavljen kompozitni materijal pHAP sa PLGA bilo najmanje džinovskih elija. Na slici 5.4.5. gde je prikazan preparat sa implantiranim BioOss-om, jasno se uo ava novostvorena lamelarna kost, ali i ostatak partikula materijala okružen višejedarnim džinovskim elijama. Resorpcija pHAP sa PLGA bila je brža u odnosu na BioOss, što je jedan od osnovnih zadataka neophodnih za izradu elijskih nosa a, tako da su se džinovske elije u preparatima koji su sadržali pHAP sa PLGA retko nalazile.

Postojanje novostvorene kosti registrovano je u svim slu ajevima gde je implantiran pHAP, pHAP u kombinaciji sa PLGA i BioOss. Procenat mineralizacije je bio najve i kod kompozitnog materijala pHAP sa PLGA(66,7%). U odnosu na BioOss i na ist pHAP na ena je statisti ki zna ajna razlika. Novostvorena kost u preparatima sa pHAP i PLGA pokazivala je dobru lamelarnu gra u, sa jasno usmerenim osteocitima i dominantno izraženom mineralizacijom(slika 5.4.9.). Implantirani ist pHAP (slika

5.4.7.) tako e je pokazao postojanje novostvorene kosti, ali je kost bila nepravilne gra e, sa iregularnim zonama mineralizacije u gredicama, sa dominantnim prisustvom organskog nemineralizovanog matriksa i sa prisutnim partikulama materijala. Ovaj nalaz ukazuje na to da kompozitni elijski nosa pHAP koji u sebi sadrži polimer PLGA poseduje bolju osteokonduktivnost u odnosu na porozni hidroksiapatit samostalno. Na preparatima koji su sadržali BioOss (slika 5.4.8.), vidljive su novostvorene koštane grede koje u iregularnom aranžmanu popunjavaju defekt, dok je u gredicama prisutna približno jednaka koli ina nemineralizovanog i mineralizovanog osteoida uz prisustvo partikul amaterijala, koje su se retko uo avale u preparatima pHAP-a sa PLGA. Sve to ukazuje da je osteokonduktivnost ispitivanog pHAP-a sa PLGA bila bolja u odnosu na pozitivnu probu koju je predstavljao BioOss.

Najmanje novostvorene kosti i najmanji procenat mineralizacije registrovan je u negativnoj kontrolnoj grupi i kod pHAP-a sa metforminom.

Tako e je na eno da postoji statisti ki zna ajna razlika u postojanju vezivnog tkiva izme u pozitivne kontrole, BioOss-a sa jedne strane i pHAP-a sa PLGA i istog pHAP-a sa druge strane. U 75% slu ajeva vezivno tkivo je otkriveno u defektima ispunjenih BioOss-om dok je u 25% slu ajeva bilo u defektima sa pHAP+PLGA. U odnosu na prisustvo vezivnog tkiva, statisti ka razlika izme u pHAP-a i pHAP-a sa PLGA nije prona ena. Prisustvo vezivnog tkiva je obrnuto proporcionalno postojanju koštanog tkiva i može se re i da prethodi njegovom stvaranju. Iz ovog rezultata o igledno je da je stvaranje kosti kod kompozitnog elijskog nosa a pHAP sa PLGA pa ak i kod poroznog hidroksiapatita samostalno implantiranog, bilo brže nego kod standardnog materijala koji je koriš en u ovoj studiji BioOss-a.

Analizom postojanja novostvorenih krvnih sudova i bazofila izmedju ispitivanih grupa, statisti ka razlika nije na ena. Prisustvo neoangiogeneze ukazivalo je na sporije stvaranje koštanog tkiva. PHAP sa PLGA je, s obzirom na brže stvaranje koštanog tkiva u odnosu na druge ispitivane materijale pokazao postojanje manjeg broja krvnih sudova, ali bez statisti ki zna ajne razlike.

Može se zaklju iti da je porozni hidroksiapatit, kao zamenik kosti, imao pozitivan uticaj na novo formiranje kosti. Još jednom je potvr ena biokompatibilnost kalcijum hidroksiapatita kao i njegov osteokonduktivan potencijal. Tako e nanostrukturne estice hidroksiapatita pokazale su ve i stepen bioaktivnosti i

osteointegracije u odnosu na mikrostrukturni hidroksiapatit(146). Utvrđeno je da je adsorpcija proteina i adhezija elija veća u slučajevima kad se koriste nanostrukturne nego mikrostrukturne granule hidroksiapatita(147). Iz drugih istraživanja, poznato je da nanostrukturne estice hidroksiapatita imaju pozitivan uticaj na formiranje kosti tako što stimulišu osteogenu diferencijaciju iz mezenhimalnih stem elija. Tako je pokazano da ovaj pozitivan efekat zavisi od koncentracije nano estica hidroksiapatita, i da ove estice u velikim koncentracijama dovode čak do suprotnog efekta na osteogenu diferencijaciju matičnih elija(148). Prema tome, samo prisustvo nano estica hidroksiapatita kao zamenika kosti nije dovoljna garancija postojanja pozitivnog biloškog efekta. Međutim, nanokompozitni materijal koji se sastoji od nano estica hidroksiapatita i polimera PLGA ima karakteristike potrebnog skafolda.

Na najvažniji faktor jednog nanokompozitnog elijskog nosača, stepen degradacije, utiču (90): nanostruktura (oblik, dimenzija, funkcionalizacija, sastav), karakteristike polimera (molekularna težina, kristalinitet), površinske karakteristike (poroznost, hidrofilnost), obrada (morfologija, povezanost komponenti, veličina pora). Stepen degradacije, sa druge strane utiče na: biokompatibilnost, elijski odgovor, funkcionalnost materijala, obrazac otpuštanja aktivnih supstanci.

Porozni hidroksiapatit koji se kao skafold implantirao u kalvariju kunića kao nanokompozitni materijal u kombinaciji sa PLGA pokazao je statistički značajnu razliku u smanjenju defekata kritične veličine u odnosu na čist pHAP. Istraživanja Kimura i sar.(145), koja se poklapaju sa rezultatima ove studije, pokazuju da hidroksiapatit presvučen polimerom PLGA pravi površinsku strukturu granula obloženog apatita PLGA/pHAP koje omogućavaju stvaranje veće površine za kontakt sa osteogenim elijama. Površinske karakteristike nanokompozitnog skafolda ključni su faktor u uspešnom vođenju tkivnog inženjerstva, s obzirom da je prva interakcija između elija i supstrata adsorpcija proteina i elijska adhezija(149). Većina sintetičkih hidroksiapatita tokom raznih faza sinteze dobijaju specifičnu površinu od oko $2\text{m}^2/\text{g}$, čime se smanjuju mikropore(150) i osteokonduktivnost(151). BioOss^R poseduje površinu od $79,7\text{m}^2/\text{g}$ dok pHAP sa polimerom sadrži specifičnu površinu od oko $84\text{m}^2/\text{g}$ (152). Povećanjem specifične površine materijala, povećava se površina koja je u kontaktu sa elijama, a s obzirom da se specifična površina ova dva materijala neznatno razlikuje, to može biti jedan od razloga sličnih rezultata koje su u ovom radu pokazala ova dva materijala, što

je potvrđeno i kod drugih autora(52,137,152).

Osim toga pHAP se u *in vivo* uslovim sporo razgrađuje, a nepotpuno razgrađene estice pHAP mogu ugroziti ili onemogućiti potpuno koštano zarastanje(153). Iz tog razloga pHAP samostalno daje lošije rezultate u smanjenju veličine defekta nego kada je u kombinaciji sa PLGA. Naravno, u zavisnosti od udela komponenti u PLGA, brzina degradacija polimera može se modelovati, što takođe predstavlja prednost ovog kompozitnog materijala. Karakteristike degradacije skafolda su ključne u izboru bionanokompozita i njegovog dizajna za tkivno inženjerstvo kosti(100,154,155,156). Iz tog razloga polimerni nanokompozitni skafold mora imati odgovarajuće dizajn i ispunjavati određene kriterijume, koji uključuju biokompatibilnost, specifičnu biodegradibilnost, mehaničke karakteristike i u nekim slučajevima da ispunjavaju estetske zahteve(90). Biomaterijal ne sme samo stimulirati i podržavati rast tkiva u defektu, već u isto vreme mora da se odgovarajućim brzinom razgrađuje u netoksične sastojke, kako se stvara novo tkivo. U tom pogledu pHAP sa PLGA pokazao je dobre karakteristike u ovom istraživanju, što je potvrđeno i od strane drugih autora(145,146).

Upoređujući i sa deproteinizovanom bovinom kosti (BioOss^R), apatitno obložene granule pHAP-a sa PLGA imaju nekoliko prednosti. Prvo, granule pHAP u kombinaciji sa PLGA su sintetičkog porekla i ne postoji rizik od prenosa zaraznih bolesti i izazivanja reakcija imunog sistema. Drugo, apatitno obložene granule se jednostavno proizvode u velikim količinama. Treće, fizičke karakteristike i stepen degradacije pHAP-a sa PLGA se takođe jednostavno regulišu odnosom komponenti laktida i glikolida u polimeru, čime se može uticati na osobine materijala u zavisnosti od kliničkih zahteva.

Površina pHAP sa PLGA je bila obložena apatitom kao kod prirodne kosti inkubacijom u SBF. I pored toga što je sintetički kalcijum fosfat bioaktivan, njegova sličnost sa mineralima prirodne kosti je generalno slaba i njegove biološke karakteristike su daleko od one koju poseduje prirodna kost. Hidroksiapatit generisan tokom inkubacije u SBF je vrlo sličan nativnoj kosti, i zbog toga može da obezbedi bolju osteokonduktivnu sredinu za formiranje koštanog tkiva nego sintetički hidroksiapatit(69,155). Kompozitni materijal pHAP sa PLGA pokazao je zadovoljavajuću regeneraciju kosti *in vivo* u poređenju sa komercijalno dostupnim i široko prihvaćenim ksenogenim materijalom za graftovanje, BioOss-om^R. BioOss^R ima

minerale prirodne kosti na svojoj površini, s obzirom da se radi o deproteinizovanoj kosti, i visoko je porozan. Zahvaljujući tome, minerali kosti koji se nalaze na površini stimulišu formiranje kosti na implantiranom materijalu i omogućavaju visoku osteokondukciju(156). Na slici 1.1. prikazane su apatitno obložene granule pHAP sa PLGA na svojoj površini stimulišu stvaranje kosti i omogućavaju visoku osteokondukciju(145). Smatra se da je direktan kontakt sa osteogenim ćelijama koje migriraju iz okolnog tkiva odgovoran za ubrzanje stvaranja koštanog tkiva na površini granula pHAP sa PLGA.

Iz svega gore navedenog, može se reći da pHAP sa PLGA može da se razmatra kao moguća alternativa za BioOss. Ono što je bio i cilj ovog rada, pokazalo se da pHAP sa PLGA može da se koristi u daljim istraživanjima kao ćelijski nosač, koji bi u kombinaciji sa osteogenim ili stem ćelijama uz prisustvo osteoinduktivnih supstanci u estvovao u tkivnom inženjerstvu kosti. Dalja istraživanja u vešim serijama u *in vivo* uslovima trebalo bi da utvrde mogućnost primene ovog materijala u terapijske svrhe.

7.ZAKLJU AK

Na osnovu uporednog ispitivanja poroznog kalcijum hidroksiapatita, poroznog kalcijum hidroksiapatita u kombinaciji sa polilaktidkoglolidom i poroznog kalcijum hidroksiapatita u kombinaciji sa metforminom, iz dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

1. Struktura nanodizajniranog poroznog hidroksiapatita dobijenog modifikovanom hidrotermalnom metodom, bila je slična strukturi prirodne kosti. Kompozitni elijski nosa sintetisan na bazi ovakvog poroznog hidroksiapatita koji u sebi sadrži i PLGA, takođe poseduje nanostrukturu koja je po karakteristikama slična strukturi prirodne kosti.
2. Ispitivani materijali pokazali su citotoksičan efekat na elijsku kulturu fibroblasta L929, ali ni jedan od ispitivanih materijala (pHAP, pHAP + PLGA i pHAP sa metforminom) nije doveo do kompletnog citotoksičnog efekta na kulturu fibroblasta L929.
3. Rezultati eksperimenta ovog rada, kao i karakterizacija ispitivanih materijala pokazuje da su površine pHAP, pHAP sa PLGA kao i pHAP sa metforminom pogodne za adheriranje elija i za njihovu proliferaciju i da se odlikuju karakteristikama koje omogućavaju rast elija u direktnom kontaktu sa ovim materijalima.
4. U testu primarne kutane iritacije ni jedan od tri ispitivana test materijala (pHAP; pHAP + metformin; pHAP + PLGA) nije ispoljio iritirajuća svojstva, i mogu se smatrati neiritirajućim materijalima. Usled toga, pogodni su za primenu u *in vivo* uslovima.
5. U testu biofunktionalnosti, a na osnovu analiziranih histopatoloških parametara, uočeno je stvaranje nove kosti, prisustvo mineralizacije i reparatura defekata kritične veličine u slučajevima kad su implantacioni materijali bili pHAP i pHAP sa PLGA, što govori o njihovom osteokonduktivnom potencijalu. pHAP sa PLGA se pokazao, na osnovu ovog istraživanja jednak, a po nekim

parametrima i bolji od primenjenog zlatnog standarda BioOss-a. pHAP sa metforminom nije pokazao o ekivane rezultate.

6. Na osnovu prethodno navedenog, pHAP sa PLGA može u daljim istraživanjima da posluži kao osnova za dobijanje elijskog nosa a u tkivnom inženjerstvu kosti i da omogu i vezivanje osteoblasta ili nekog od prekursora osteoblasta, njihov rast i diferencijaciju.

8.LITERATURA

1. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instr Course Lect.* 1996;45:387-99.
2. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect.* 1996;45:371-86
3. Bullough P. Atlas of orthopaedic pathology. New York:Gover Medical Publishing,1992.
4. Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port.* 2007 Apr-Jun;32(2):103-10.
5. Suda, T., Takahashi, N. and Martin, T. J. (1992). Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr. Rev.* 13, 66-80.
6. Ziv V, Weiner S. Bone crystal sizes: a comparison of transmission electron microscopic and X-ray diffraction line width broadening techniques. *Connect Tissue Res.* 1994;30(3):165-75.
7. La kovi V, Bumbaširevi V, Vuzevski V. *Histološki atlas.* Nauka Beograd, 2000.
8. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. *J Cell Mol Med.* 2006 Jan-Mar;10(1):7-19. Review.
9. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* 2011 May 31;9:66.
10. Bates P, Ramachandran M: Bone injury, healing and grafting. In *Basic Orthopaedic Sciences. The Stanmore Guide.* Edited by: Ramachandran M. London: Hodder Arnold; 2007:123-134.
11. Piš evi A. Zarastanje preloma. U: Piš evi A., Gavri M., Sjerobabin I. *Maksilofacijalna hirurgija.* Beograd: Izdava ka agencija Dragani , 1995:149-150

12. Ferguson C, Alpern E, Micalau T, Helms JA: Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 1999, 87:57-66.
13. Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg.* 2006 Apr;35(3):232-42.
14. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury.* 2005 Nov;36 Suppl 3:S20-7.
15. Misch CE, Dietsch F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent.* 1993 Fall;2(3):158-67.
16. Kokovic V. Vaskularizacija sintetičkog kalcijumhidroksiapatita i njegove smese sa humanom deproteinizovanom kosti implantiranih u donju vilicu pasa. Magistarska teza, VMA, Beograd, 2001.
17. Gazdag AR, Lane JM, Glaser PM, Forster RA. Alternatives to autogenous bone grafts, efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg.* 1995; 3: 1-8
18. Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med.* 2006 Jan-Mar;10(1):7-19.
19. Van Heest A, Swionowski M. Bone-graft substitutes. *Lancet* 1999;353(suppl 1):28-9
20. Hollinger JO, Brekke J. Role of bone substitutes. *Clin Orthop* 1996;324:55-65
21. Elsinger EC, Leal L. Coralline hydroxyapatite bone graft substitutes. *J Foot Ankle Surg* 1996;35:396-9
22. Thorwarth M, Wehrhan F, Schultze-Mosgau S, Wiltschko J, Schlegel KA. PRP modulates expression of bone matrix proteins in vivo without long-term effects on bone formation. *Bone.* 2006 Jan;38(1):30-40. Epub 2005 Oct 28.
23. Langer RS, Vacanti JP. Tissue engineering: the challenges ahead. *Sci Am.* 1999 Apr;280(4):86-9.
24. Huttmacher DW, Schantz JT, Lam CX, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007 Jul-Aug;1(4):245-60.
25. Stock UA, Vacanti JP. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med.* 2001;52:443-22

26. Howard D, Buttery LD, Shakesheff KM, Roberts SJ. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J Anat.* 2008 Jul;213(1):66-72. Epub 2008 Apr 15.
27. Bruder SP, Fox BS. Tissue engineering of bone. Cell based strategies. *Clin Orthop Relat Res.* 1999 Oct;(367 Suppl):S68-83.
28. Gröger A, Kläring S, Merten HA, Holste J, Kaps C, Sittinger M. Tissue engineering of bone for mandibular augmentation in immunocompetent minipigs: preliminary study. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2003;37(3):129-33.
29. Aubin JB. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol.* 1998;76:899-910
30. Vacanti CA, Bonassar LJ, Vacanti MP, Shufflebarger J. Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone. *N Engl J Med.* 2001 May 17;344(20):1511-4.
31. Trautvetter W, Kaps C, Schmelzeisen R, Sauerbier S, Sittinger M. Tissue-engineered polymer-based periosteal bone grafts for maxillary sinus augmentation: five-year clinical results. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011 Nov;69(11):2753-62. Epub 2011 Jun 16.
32. Sammartino G, Tia M, Marenzi G, di Lauro AE, D'Agostino E, Claudio PP. Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Jun;63(6):766-70.
33. Cheng X, Lei D, Mao T, Yang S, Chen F, Wu W. Repair of critical bone defects with injectable platelet rich plasma/bone marrow-derived stromal cells composite: experimental study in rabbits. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2008 Apr;14(2):87-95.
34. Reddi AH. BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 Jun;16(3):249-50.
35. Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J Tissue Eng Regen Med.* 2008 Jan;2(1):1-13. Review.

36. Garg A. Bone morphogenetic protein (BMP) for sinus lift. *Dent Implantol Update*. 2010 Apr;21(4):25-9.
37. Ward BB, Brown SE, Krebsbach PH. Bioengineering strategies for regeneration of craniofacial bone: a review of emerging technologies. *Oral Dis*. 2010 Nov;16(8):709-16. doi: 10.1111/j.1601-0825.2010.01682.x.
38. Huang S, Ingber DE. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat Cell Biol*. 1999 Sep;1(5):E131-8.
39. Garber A. Metformin and other biguanides: pharmacology and therapeutic usage, In: DeFronzo RA, Ferrannini E, Keen H, Zimmet P.: *International Textbook of Diabetes Mellitus*, third edition. John Wiley & Sons, Ltd., 2004 : 851–865.
40. Cortizo AM, Sedlinsky C, McCarthy AD, Blanco A, Schurman L. Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture. *Eur J Pharmacol*. Apr 24(2006);536(1-2):38-46.
41. Dominguez LJ, Davidoff AJ, Srinivas P, Standley P, Walsh MF, Sowers JR. Effects of metformin on tyrosine kinase activity, glucose transport and intracellular calcium in rat vascular smooth muscle. *Endocrinology* 137(1996), 113–121.
42. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest*. 108(2001), 1167–1174
43. Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, Zhou G, Williamson JM, Ljunqvist O, Efendic S, Moller DE, Thorell A, Goodyear LJ. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 51(2002), 2074–2081.
44. Zou M, Kirkpatrick SS, Davis BJ, Nelson JS, Wiles WG, Schlattner U, Neumann D, Brownlee M, Freeman M, Goldman MH. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. *J. Biol. Chem*. 279(2004), 43940–43951.
45. Chen ZP, Mitchelhill KI, Mitchell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE. AMP-activated protein

- kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett.* 443(1999), 285–289.
46. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, Yamauchi M, Sugimoto T. Metformin enhances the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells via AMP kinase activation as well as eNOS and BMP-2 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Oct 24;375(3):414-9.
 47. Van't Hof RJ, Ralston S. Nitric oxide and bone. *Immunology* 103(2001),255–261.
 48. Shah M, Kola B, Bataveljic A, Arnett TR, Viollet B, Saxon L, Korbonits M, Chenu C. AMP-activated protein kinase (AMPK) activation regulates in vitro bone formation and bone mass. *Bone.* 2010 Aug;47(2):309-19.
 49. Jeyabalan J, Shah M, Viollet B, Chenu C. AMP-activated protein kinase pathway and bone metabolism. *J Endocrinol.* 2012 Mar;212(3):277-90.
 50. Jokanovi V, *Nanomedicina, najve i izazov 21 veka, DATA STATUS, Beograd, 2012, ISBN 978-86-7478-152-4*
 51. Jokanovi V, Nik evi I, Daci B, Uskokovi D, Synthesis of nanostructured carbonated calcium hydroxyapatite by ultrasonic spray pyrolysis, *J. Ceramic Processing Research* 2 (2004) 157-162
 52. Jokanovi V, Izvonar D, Dramicanin MD, Jokanovic B, Zivojinovic V, Markovic D, Dacic B. Hydrothermal synthesis and nanostructure of carbonated calcium hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med.* 2006 Jun;17(6):539-46.
 53. Jokanovic V, Jokanovic B, Izvonar D, Dacic B. Thin films of SiO₂ and hydroxyapatite on titanium deposited by spray pyrolysis. *J Mater Sci Mater Med.* 2008 May;19(5):1871-9.
 54. Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med.* 2005 Jan-Mar;9(1):72-84.
 55. Kneser U, Kaufmann PM, Fiegel HC, Pollok JM, Kluth D, Herbst H, Rogiers X. Long-term differentiated function of heterotopically transplanted hepatocytes on three-dimensional polymer matrices. *J Biomed Mater Res.* 1999 Dec 15;47(4):494-503.
 56. Kneser U, Stangenberg L, Ohnolz J, Buettner O, Stern-Straeter J, Möbest D, Horch RE, Stark GB, Schaefer DJ. Evaluation of processed bovine cancellous

- bone matrix seeded with syngenic osteoblasts in a critical size calvarial defect rat model. *J Cell Mol Med.* 2006 Jul-Sep;10(3):695-707.
57. Ma PX, Zhang R. Microtubular architecture of biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res.* 2001 Sep 15;56(4):469-77.
 58. Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater.* 2005 Jul;4(7):518-24.
 59. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials.* 2000 Dec;21(24):2529-43.
 60. Hutmacher DW, Ng KW, Kaps C, Sittinger M, Kläring S. Elastic cartilage engineering using novel scaffold architectures in combination with a biomimetic cell carrier. *Biomaterials.* 2003 Nov;24(24):4445-58.
 61. Ginebra MP, Traykova T, Planell JA. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review, *J. Control. Release* 113 (2006) 102–110.
 62. Hench LL: Bioceramics: From concept to clinic. *J Am Ceram Soc.* 1991, 74(7):1487-510
 63. Kvirak N, Tas AC: Synthesis of Calcium Hydroxyapatite-Tricalcium Phosphate Composite Bioceramic Powders and Their Sintering Behavior. *J Am Ceram Soc.* 1998, 81, 2245
 64. Jokanovi V, Nik evi I, Daci B, Uskokovi D, Synthesis of nanostructured carbonated calcium hydroxyapatite by ultrasonic spray pyrolysis, *J. Ceramic Processing Research* 2 (2004) 157-162
 65. Jokanovi VR, Izvonar D, Drami anin MD, Jokanovi B, Živojinovi V, Markovi D, Daci B. (2006) Hydrothermal synthesis and nanostructure of carbonated calcium hydroxyapatite. *Journal of materials science-materials in medicine*, 17(6): 539-546
 66. Janackovic Dj, Jankovic I, Petrovic R, Kostic-Gvozdenovic Lj, Milonjic S, Uskokovic D: Influence of Synthesis Parameteres on the particle Sizes of Nanostructured Calcium-Hydroxyapatite. *Key Engin Mater:* 240-242, 2003
 67. Habraken WJ, Wolke JG, Jansen JA. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007 May 30;59(4-5):234-48.

68. Ginebra MP, Traykova T, Planell JA. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. *J Control Release*. 2006 Jun 28;113(2):102-10.
69. Zhang R, Ma PX, Biomimetic Polymer/Apatite Composite Scaffolds for Mineralized Tissue Engineering, *Macromol. Biosci*. 4 (2004) 100–111.
70. Wang M: *Biomaterials and Tissue Engineering*, 2004, Springer
71. Zhou Y., Chen F., Ho ST et al.: Combined marrow stromal cell-sheet techniques and high – strength biodegradable composite scaffolds for engineered functional bone grafts *Biomaterials* 2007;28(5):814-824.
72. Lickorish D, Guan L, Davies JE.: A three-phase, fully resorbable, polyester/calcium phosphate scaffold for bone tissue engineering: evolution of scaffold design. *Biomaterials* 2007;28(8): 1495–1502.
73. Khan YM, Katti DS, Laurencin CT.: Novel polymer-synthesized ceramic composite-based system for bone repair: an *in vitro* evaluation. *J Biomed Mater Res A* 2004;69(4): 728–737.
74. Gross KA, Rodriguez-Lorenzo LM.: Biodegradable composite scaffolds with an interconnected spherical network for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25(20): 4955–4962.
75. Wei G, Ma PX.: Structure and properties of nanohydroxyapatite/ polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25(19): 4749–4757.
76. Zhang RY, Ma PX.: Porous poly(L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process. *J Biomed Mater Res* 1999;45: 285–293.
77. Ma PX, Zhang R, Xiao G, Franceschi R.: Engineering new bone tissue *in vitro* on highly porous poly(-hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds. *Biomed Mater Res* 2001;54(2): 284–293.
78. Mathieu LM, Mueller TL, Bourban PE, et al.: Architecture and properties of anisotropic polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27(6): 905–916.
79. Nikoli N: Odnos biloške aktivnosti i strukturnog dizajna hidroksiapatitnih elijskih nosa a (magistarska teza). Beograd: Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu, 2009.

80. Kim SS, Park MS, Jeon O, Choi CY, Kim BS., Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 27 (2006) 1399–1409.
81. Jayasuriya AC, Assad M, Jayatissa AH, Ebraheim NA, Dissolution behavior of biomimetic minerals on 3D PLGA scaffold, *Surf. Coat. Technol.* 200 (2006) 6336–6339.
82. Ngiam M, Liao S, Patil AJ, Cheng Z, Chan CK, Ramakrishna S, The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering, *Bone* 45 (2009) 4–16.
83. Christenson EM, Anseth KS, van den Beucken Jeroen JJP, Chan CK, Ercan B, Jansen JA, et al. Nanobiomaterial applications in orthopedics. *J Orthopaedic Res* 2007;25(1):11e22.
84. Gleiter H. Nanostructured materials, basic concepts and microstructure. *Acta Mater* 2000;48:1e12.
85. Gorrasi G, Vittoria V, Murariu M, Ferreira ADS, Alexandre M, Dubois P. Effect of filler content and size on transport properties of water vapor in PLA/calcium sulfate composites. *Compos Sci Technol* 2008;9:627e32.
86. Peponi L, Tercjak A, Torre L, Mondragon I, Kenny JM. Nanostructured physical gel of SBS block copolymer and Ag/DT/SBS nanocomposites. *J Mater Sci* 2009;44:1287e93.
87. Qiao R, Brinson LC. Simulation of interphase percolation and gradients in polymer nanocomposites. *Compos Sci Technol* 2009;69:491e9.
88. Tjong SC. Structural and mechanical properties of polymer nanocomposites. *Mater Sci Eng R* 2006;53:73e197.
89. Murugan R, Ramakrishna S. Development of nanocomposites for bone grafting. *Compos Sci Technol* 2005;65:2385e406.
90. Armentano I, Dottori M, Fortunati E, Mattioli S, Kenny JM. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polymer Degradation and Stability* 2010;95 (11): 2126-2146
91. ISO/DIS 10993-5: In Biological evaluation of medical devices: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. 1992.

92. Ohno M, Abe T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *J Immunol Methods*. 1991 Dec 15;145(1-2):199-203.
93. ISO/DIS 10993-10: In Biological evaluation of medical devices: Tests for irritation and sensitization .1994.
94. ISO/DIS 10993-6: In Biological evaluation of medical devices: Tests for local effects after implantation.1994.
95. ISO/TR 7405: Biological evaluation of dental materials.,1984
96. Harkness JE, Wagner JE. *The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents* 4th ed. Baltimore, 1995. Williams and Wikins, 96-104
97. Ripamonti U, Van Den Heever B, Sampath TK, Tucker MM, Rueger DC, Reddi AH. Complete regeneration of bone in the baboon by recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1, bone morphogenetic protein-7). *Growth Factors*. 1996;13(3-4):273-89
98. Živojinovi RV. Biološki aspekti primene kalcijum hidroksiapatita I mineralni trioksid agregata u terapiji obolele pulpe (doktorska disertacija). Beograd: Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu, 2008.
99. Maquet V, Boccaccini AR, Pravata L, Notingher I, Jerome R.: Porous poly(-hydroxyacid)/bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. I: Preparation and *in vitro* characterization. *Biomaterials* 2004;25(18): 4185–4194.
100. Douglas T, Pamula E, Hauk D, Wiltfang J, Sivananthan S, Sherry E, Warnke PH. Porous polymer/hydroxyapatite scaffolds: characterization and biocompatibility investigations. *J Mater Sci Mater Med*. 2009 Sep;20(9):1909-15.
101. Hofmann I, Müller L, Greil P, Müller FA, Calcium phosphate nucleation on cellulose fabrics, *Surf. Coat. Technol*. 201 (2006) 2392–2398.
102. Jokanovi V., Markovi D. Biološki nosa i-skafoldi, osnov tkivnog inženjerstva u stomatologiji. U: Stamenkovi D (sa sar.). *Stomatološki materijali, knjiga 2*. Beograd: Stomatološki fakultet u Beogradu, 2012:429-454
103. olovi B, Jokanovi V, Todorovi -Markovi B, Markovi Z. AFM investigations of calcium hydroxyapatite thin films on the surface of thin silica films, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 11 (2009) 70-75.

104. Nge TT, Sugiyama J. Surface functional group dependent apatite formation on bacterial cellulose microfibrils network in a simulated body fluid. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Apr;81(1):124-34.
105. Hashizume M, Horii H, Kikuchi J, Kamitakahara M, Ohtsuki C, Tanihara M, Effects of surface carboxylic acid groups of cerasomes, morphologically stable vesicles having a silica surface, on biomimetic deposition of hydroxyapatite in body fluid conditions, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 21 (2010) 11–19.
106. Tampieri A, Sandri B, Landi E, Celotti G, Roveri N, Mattioli-Belmonte M, Virgili L, Gabbanelli F, Biagini G. HA/alginate hybrid composites prepared through bio-inspired nucleation, *Acta Biomaterialia* 1 (2005) 343–351.
107. Wang L, Shelton RM, Cooper PR, Lawson M, Triffitt JT, Barralet JE. Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering, *Biomaterials* 24 (2003) 3475–3481
108. Tommila M, Jokilampi A, Terho P, Wilson T, Penttinen R, Ekholm E, Hydroxyapatite coating of cellulose sponges attracts bone-marrow-derived stem cells in rat subcutaneous tissue, *J. R. Soc. Interface* 6 (2009) 873-880.
109. Qu X, Cui W, Yang F, Min C, Shen H, Bei J, Wang S, The effect of oxygen plasma pretreatment and incubation in modified simulated body fluids on the formation of bone-like apatite on poly(lactide-co-glycolide) (70/30), *Biomaterials* 28 (2007) 9–18.
110. Schmalz G.: Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials- advantages and Limitations, *J Dent Suppl* 1994;2(22):6-11
111. Markovi LJD. Ispitivanje biokompatibilnosti svetlosno polimerizuju ih glas jonomer cemenata (disrtacija). Beograd: Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu, 1998.
112. Marques AP, Reis RL, Hunt JA.: The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies. *Biomaterials* 2002;23:1471-1478.
113. Ito Y, Sisido M, Imanishi Y. Attachment and proliferation of fibroblast cells on polyetherurethaneurea derivatives. *Biomaterials* 1997;8:464-72

114. Allen M, Millett P, Dawes E, Rushton N. Lactate dehydrogenase activity as a rapid and sensitive test for the quantification of cell numbers in vitro. *Clin Mater.* 1994;16(4):189-94.
115. Wroblewski F, La Due JS. Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 1955;90:210-3
116. van Wachem PB, Beugeling T, Feijen J, Bantjes A, Detmers JP, van Aken WG. Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities. *Biomaterials.* 1985 Nov;6(6):403-8.
117. van Kooten TG, Schakenraad JM, van der Mei HC, Busscher HJ. Influence of substratum wettability on strength of adhesion of human fibroblasts. *Biomaterials* 1993;13:897-904
118. Hattori S, Andrade LD, Hibbs JB, Gregonis DE, King RN. Fibroblast cell proliferation on charged hydroxyethyl methacrylate copolymers. *J Colloid Interface Sci* 1985;103:72-8
119. van der Valk P, van Pelt AW, Busscher HJ, de Jong HP, Wildevuur CR, Arends J. Interaction of fibroblasts and polymer surfaces: relationship between surface free energy and fibroblast spreading. *J Biomed Mater Res.* 1983 Sep;17(5):807-17.
120. Koyano T, Minoura N, Nagura M, Kobayashi K. Attachment and growth of cultured fibroblast cells on PVA/chitosan-blended hydrogels. *J Biomed Mater Res.* 1998 Mar 5;39(3):486-90.
121. Ertel SI, Ratner BD, Horbett TA. Radiofrequency plasma deposition of oxygen-containing films on polystyrene and poly(ethylene terephthalate) substrates improves endothelial cell growth. *J Biomed Mater Res.* 1990 Dec;24(12):1637-59.
122. Curtis AS, Forrester JV, McInnes C, Lawrie F. Adhesion of cells to polystyrene surfaces. *J Cell Biol.* 1983 Nov;97(5 Pt 1):1500-6.
123. Rich A, Harris AK. Anomalous preferences of cultured macrophages for hydrophobic and roughened substrata. *J Cell Sci* 1981;5:1-7.
124. Le Guehennec L, Goyenvalle E, Aguado E, Houchmand-Cuny M, Enkel B, Pilet P, Daculsi G, Layrolle P. Small-animal models for testing macroporous

- ceramic bone substitutes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005 Jan 15;72(1):69-78.
125. Liebschner MA. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials.* 2004 Apr;25(9):1697-714.
126. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg.* 1998 Jul;9(4):310-6.
127. Rudert M. Histological evaluation of osteochondral defects: consideration of animal models with emphasis on the rabbit, experimental setup, follow-up and applied methods. *Cells Tissues Organs.* 2002;171(4):229-40.
128. Huh JY, Choi BH, Kim BY, Lee SH, Zhu SJ, Jung JH. Critical size defect in the canine mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Sep;100(3):296-301.
129. Hämmerle CH, Schmid J, Olah AJ, Lang NP. Osseous healing of experimentally created defects in the calvaria of rabbits using guided bone regeneration. A pilot study. *Clin Oral Implants Res.* 1992 Sep;3(3):144-7.
130. Anderson ML, Dhert WJ, de Bruijn JD, Dalmeijer RA, Leenders H, van Blitterswijk CA, Verbout AJ. Critical size defect in the goat's os ilium. A model to evaluate bone grafts and substitutes. *Clin Orthop Relat Res.* 1999 Jul;(364):231-9.
131. Viateau V, Guillemin G, Yang YC, Bensaid W, Reviron T, Oudina K, Meunier A, Sedel L, Petite H. A technique for creating critical-size defects in the metatarsus of sheep for use in investigation of healing of long-bone defects. *Am J Vet Res.* 2004 Dec;65(12):1653-7.
132. Springer IN, Açıllı Y, Kuchenbecker S, Bolte H, Warnke PH, Abboud M, Wiltfang J, Terheyden H. Bone graft versus BMP-7 in a critical size defect--cranioplasty in a growing infant model. *Bone.* 2005 Oct;37(4):563-9.
133. Jäger M, Sager M, Lensing-Höhn S, Krauspe R. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (I): Comparative anatomical study on rats' femur. *Biomed Tech (Berl).* 2005 Apr;50(4):107-10.
134. Rimondini L, Nicoli-Aldini N, Fini M, Guzzardella G, Tschon M, Giardino R. In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using

- an injectable biodegradable PLA/PGA copolymer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Feb;99(2):148-54.
135. Kruse A, Jung RE, Nicholls F, Zwahlen RA, Hämmerle CH, Weber FE. Bone regeneration in the presence of a synthetic hydroxyapatite/silica oxide-based and a xenogenic hydroxyapatite-based bone substitute material. *Clin Oral Implants Res.* 2011 May;22(5):506-11
136. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 1986 Apr;(205):299-308.
137. Hämmerle CH, Schmid J, Lang NP, Olah AJ. Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995 Feb;53(2):167-74.
138. Slote C. On surgical techniques to increase bone density and volume. Studies on rat and rabbit. Department of Biomaterials, Institute for Surgical Sciences, Sahlgrenska Academy, Goteborg University, Sweden, 2003.
139. Bidic SM, Calvert JW, Marra K, Kumta P, Campbell P, Mitchell R, Wigginton W, Hollinger JO, Weiss L, Mooney MP. Rabbit calvarial wound healing by means of seeded Caprotite scaffolds. *J Dent Res.* 2003 Feb;82(2):131-5.
140. Schmid J, Hämmerle CH, Flückiger L, Winkler JR, Olah AJ, Gogolewski S, Lang NP. Blood-filled spaces with and without filler materials in guided bone regeneration. A comparative experimental study in the rabbit using bioresorbable membranes. *Clin Oral Implants Res.* 1997 Apr;8(2):75-81.
141. Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II. *Clin Orthop Relat Res.* 1989 Nov;(248):294-309.
142. Urist MR, Grant TT, Lindholm TS, Mirra JM, Hirano H, Finerman GA. Induction of new-bone formation in the host bed by human bone-tumor transplants in athymic nude mice. *J Bone Joint Surg Am.* 1979 Dec;61(8):1207-16.
143. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001 Oct;10 Suppl 2:S96-101.

144. Kim SS, Kim BS. Comparison of osteogenic potential between apatite-coated poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite particulates and Bio-Oss. *Dent Mater J*. 2008 May;27(3):368-75.
145. Lewandrowski KU, Bondre SP, Wise DL, Trantolo DJ. Enhanced bioactivity of a poly(propylene fumarate) bone graft substitute by augmentation with nano-hydroxyapatite. *Biomed Mater Eng*. 2003;13(2):115-24.
146. Ginebra MP, Driessens FC, Planell JA. Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis. *Biomaterials* 2004;25:3453–62.
147. Liu Y, Wang G, Cai Y, Ji H, Zhou G, Zhao X, Tang R, Zhang M. In vitro effects of nanophase hydroxyapatite particles on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Sep 15;90(4):1083-91.
148. Vitte J, Benoliel AM, Pierres A, Bongrand P. Is there a predictable relationship between surface physical-chemical properties and cell behaviour at the interface? *Eur Cells Mater* 2004;7:52e63
149. Weibrich G, Trettin R, Gnoth SH, Götz H, Duschner H, Wagner W. Determining the size of the specific surface of bone substitutes with gas adsorption. *Mund Kiefer Gesichtschir*. 2000 May;4(3):148-52.
150. Henkel KO, Gerber T, Lenz S, Gundlach KK, Bienengraber V. Macroscopical, histological, and morphometric studies of porous bone-replacement materials in minipigs 8 months after implantation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Nov;102(5):606-13. Epub 2006 May 19.
151. Götz W, Gerber T, Michel B, Lossdörfer S, Henkel KO, Heinemann F. Immunohistochemical characterization of nanocrystalline hydroxyapatite silica gel (NanoBone(r)) osteogenesis: a study on biopsies from human jaws. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Oct;19(10):1016-26.
152. Van Landuyt P, Li F, Keustermans JP, Steydio JM, Delannay F, Munting E. The influence of high sintering temperatures on the mechanical properties of hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med* 1995;6:8-13

153. Yang YY, Shi M, Goh SH, Moochhala S, Heller J. POE/PLGA composite microspheres: formation and in vitro behavior of double walled microspheres. *J Control Release* 2003;88(2):201e13.
154. Loo SCJ, Ooi CP, Boey YCF. Radiation effects on poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly(l-lactide) (PLLA). *Polym Degrad Stab* 2004;83(2):259e65.
155. Hurrell S, Cameron RE. Polyglycolide: degradation and drug release. Part I: changes in morphology during degradation. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12(9):811e6.
156. Lickorish D, Ramshaw JA, Werkmeister JA, Glattauer V, Howlett CR. Collagen-hydroxyapatite composite prepared by biomimetic process. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Jan 1;68(1):19-27.

Dr Milan Petrović rođen je 9. X 1967.godine u Kumanovu. Osnovnu i srednju školu završio je u Beogradu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 1987. godine, a diplomirao je 1994. godine sa prosečnom ocenom 9,10. Obavezni lekarski staž završio je 1995. godine, kada je položio stručni ispit za doktora medicine. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 1995. godine, a diplomirao je 2001. godine sa prosečnom ocenom 9,14. Obavezni staž završio je 2002. godine na Stomatološkom fakultetu u Beogradu kada je položio stručni ispit za doktora stomatologije. Specijalistički ispit iz predmeta maksilofacijalna hirurgija položio je 2002. godine sa odličnom ocenom.

Doktorske studije iz naučne oblasti Maksilofacijalna hirurgija, dr Milan Petrović upisao je školske 2007/2008. godine i položio sve ispite predviđene nastavnim planom i programom doktorskih studija. Nastavno-naučno veće Stomatološkog fakulteta je 2011. godine donelo odluku o usvajanju predloga teme doktorske disertacije.

Dr Milan Petrović objavio je 7 naučnih radova, od kojih su 4 u međunarodnim časopisima. Učestvovao je na domaćim i međunarodnim kongresima gde je prezentovano 68 naučnih radova u kojima je bio autor ili koautor.

Dr Milan Petrović zaposlen je od 1995. godine na Klinici za Maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Милан Б. Петровић

број уписа 17/07

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

БИОЛОШКА АКТИВНОСТ КОМПОЗИТНИХ ХЕЛИЈСКИХ НОСАЧА НА
БАЗИ ВИСОКОПОРОЗНИХ ХИДРОКСИАПАТИТА И ХИДРОКСИЛАПАТИТА НА
ТК ИВНО ИНЖЕНЈЕРСТВО КОСТИ

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 12. 07. 2012.

Петровић Милан

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора МИЛАН Б. ПЕТРОВИЋ

Број уписа 17/07

Студијски програм ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ

Наслов рада БИОЛОШКА АКТИВНОСТ КОМПОЗИТНИХ БЕЛИЈСКИХ НОСАЧА НА БАЗИ
ВИСОКОПОРОЗНИХ ЖИВАКСИПАТАТА И ЊИХОВ УТИЦАЈ НА ТКИВО
И ИМЕЊЕРСТВО КОСТИ

Ментор ПРОФ. ДР МИРОСЛАВ ВУКАДИНОВИЋ, ПРОФ-ДР ДЕЈАН МАРКОВИЋ

Потписани _____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 12.07.2012.

Петровић Милан

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

БИОЛОШКА АКТИВНОСТ КОМПОЗИТНИХ ЧЕЛИЈСКИХ НОСАЧА НА
BAZI VISOKOPOROZNIH HIDROKSIPATITNA I NJIHOV UTICAJ NA
TKIVNO INŽENJERSTVO KOSTI

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 12.07.2012.

Петровић Јулија

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.