



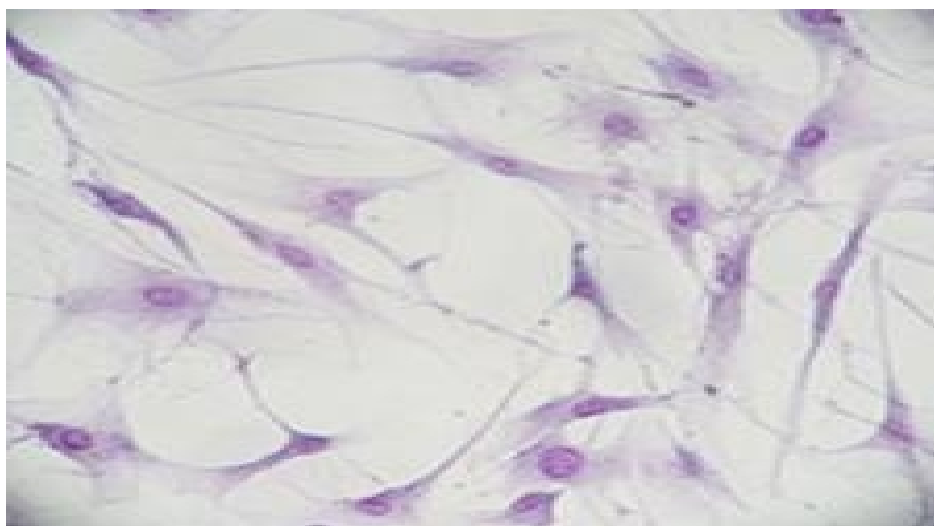
UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Ivica A. Vučković

**REGENERATIVNI POTENCIJAL MASN
TKIVA U NADOKNADI DEFEKATA KOSTIJU
NA EKSPERIMENTALNOM MODELU
KALVARIJE KUNIĆA**

-doktorska disertacija-



Niš, 2013.godine



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivica A. Vučković

**REGENERATIVNI POTENCIJAL MASN
TKIVA U NADOKNADI DEFEKATA KOSTIJU
NA EKSPERIMENTALNOM MODELU
KALVARIJE KUNIĆA**

-doktorska disertacija-

MENTOR

Prof. dr Dragan Petrović

Niš, 2013.godine

*„Sretan je i velik zaista samo onaj koji ne mora ni vladati
ni pokoravati se da bi mogao nešto biti“*

Johann Wolfgang Goethe(1749-1832)

Ovaj rad posvećujem:

*Svojoj porodici koja me nesebično podržavala ka ostvarenju ovog cilja, posebno svojim ćerkama **Hristini i Selestini** koje, polako ali sigurno, shvataju da se do uspeha stiže samo radom i zbog kojih imam snage za sve!*

Hvala

Mentoru Prof. dr Draganu Petroviću na ukazanom poverenju prilikom izbora teme, strpljenju, iskrenom prijateljstvu i neizmernoj podršci, hvala za trajno podsticanje, iskrene kritike, pohvale i savete u toku rada.

Prof. dr Stevi Najmanu koji me je uveo u tajne biologije, hvala za podršku u eksperimentalnom radu, stručnoj pomoći u analizi i obradi dobijenih rezultata, za neprekidno interesovanje i dragocene savete na putu uspešne realizacije ideje.

Prof. dr Nebojši Joviću za nesebičnu pomoć i podršku u toku izrade doktorske disertacije, korisnim sugestijama i spremnosti da me u svakom trenutku posavetuje i pomogne.

Prof. dr Slađani Petrović na stručnoj pomoći prilikom izbora i realizacije svih specifičnih radiočloških pregleda i stručnom tumačenju rezultata.

Prof. dr Milanu Višnjiću koji je od početka pratio, pomagao i podržavao celokupnu ideju uz veliki broj stručnih i dobronamernih saveta.

Asistentkinji Jeleni Živković za pomoć u realizaciji eksperimenta.

Mr. ph. Sanji Stojanović za veliku podršku i korisne sugestije prilikom uobličavanja teksta i sistematizacije rezultata.

Svim zaposlenim radnicima u Vivarijumu Medicinskog fakulteta u Nišu, a posebno Vesni, Vladi i Bogiju na pomoći u radu sa eksperimentalnim životinjama.

Posebno se zahvaljujem svim svojim dugogodišnjim prijateljima iz školskih i studentskih dana zbog kojih ovaj rad dobija još više na značaju.

Ova disertacija je realizovana u okviru projekta III41017 "Virtuelni koštano zglobni sistem čoveka i njegova primena u pretkliničkoj i kliničkoj praksi" Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije

Podaci o autoru:

Dr Ivica Vučković - rođen 1961. godine u Nišu. Od 1995.god. radi kao maksilofacijalni hirurg u Klinici za Stomatologiju Niš – maksilofacijalna hirurgija. Kao redovni profesor – saradnik Medicinske škole „Dr Milenko Hadžić“ u Nišu na predmetu Oralna hirurgija radi od 1996.godine. Akademske doktorske studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu upisao je školske 2007/2008 god.

Podaci o komisiji:

Prof. dr Stevo Najman, predsednik

- redovni profesor Medicinskog fakulteta u Nišu, uža naučna oblast Biologija.

Prof. dr Nebojša Jović, član

- redovni profesor maksilofacijalne hirurgije, VMA Beograd.

Prof. dr Milan Višnjić, član

- redovni profesor Medicinskog fakulteta u Nišu na predmetu Hirurgija sa ratnom hirurgijom plastična hirurgija.

Prof. dr Dragan Petrović, mentor i član

- redovni profesor Medicinskog fakulteta u Nišu, uža naučna oblast Maksilofacijalna hirurgija.

Prof. dr Slađana Petrović, član

- vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Nišu na predmetu Radiologija.

Naučni doprinos doktorske disertacije:

Doktorska disertacija Ivice Vučković pod naslovom "REGENERATIVNI POTENCIJAL MASNOG TKIVA U NADOKNADI DEFEKATA KOSTIJU NA EKSPERIMENTALNOM MODELU KALVARIJE KUNIĆA" predstavlja originalan i samostalan naučno-istraživački rad sa značajnim naučnim doprinosom u oblasti regenerativne medicine. Ova disertacija daje veliki doprinos razjašnjenju složenih mehanizama interakcije između ćelija masnog tkiva i njihovih produkata, kao i biomaterijala koji se koriste kao zamenici kosti u procesu diferencijacije mezenhimskih matičnih ćelija u pravcu osteogenih ćelija. Takođe, bavi se mehanizmima delovanja komponenti krvi i hemostatskog sistema na osteogeni proces u potpomognutoj regeneraciji i reparaciji kosti, kao i specifičnostima hemijske i fizičke strukture koštanih zamenika u ovom procesu. Ova disertacija koja je urađena na eksperimentalnom modelu ukazuje na mogućnost uspešne kliničke aplikacije integralnog masnog tkiva kao i mezenhimskih matičnih ćelija izdvojenih iz tog tkiva u rešavanju problema defekata kosti.

SKRAĆENICE:

ADSCs (eng. Adipose tissue-Derived Stem Cells) – mezenhimske matične ćelije masnog tkiva

AMP – adenzin monofosfat

ASP – proteini stimulacije acilacije

BC (eng. Blood Cells) – krvne ćelije, puna krv

BMP – koštani morfogenetski protein

BMSCs (eng. Bone-marrow stromal cells) – stromalne ćelije koštane srži

BMU (eng. Basic multicellular unit) – osnovna višćelijska jedinica

BO – *Bio-Oss*® – mineralni matriks goveđe kosti

CaP – kalcijum fosfat

CAT (eng. Cut Adipose Tissue) – seckano masno tkivo

CSD (eng. Critical sized defect) – defekt kritične veličine

DMEM (eng. Dulbecco's modified Eagle's medium) – medijum

ECM – ekstracelularni matriks

HA – hidroksiapatit

HA/TCP – hidroksiapatit /trikalcijum fosfat

HE – hematoksilin-eozin bojenje

IGF – insulinu slični faktori rasta

IL-6 – interleukin 6

MPR – multiplanarna rekonstrukcija skenerom

MSCs (eng. Mesenchymal Stem Cells) – mezenhimske matične ćelije

MSCT – multislajsna kompjuterizovana tomografija

NM – nanokompozitni materijal

PLGA (eng. Poly-Lactic-co-Glycolic Acid) – poli-laktid-ko-glikolna kiselina

SCID (eng. Severe Combined Immunodeficiency) – imunokompromitovane eksperimentalne životinje

SR – spontana regeneracija

SVF (eng. stromal vascular fraction) – vaskularna frakcija strome

TB (eng. Toluidin Blue) – bojenje toluidin plavim

TE (eng. Tissue Engineering) – tkivni inženjering

TGF- β – faktor transformacije rasta β

TNF- α – faktor tumorske nekroze α

α MEM (eng. α minimal essential medium) – medijum

SADRŽAJ

1.1.DEFEKTI KOSTIJU	1
1.1.1. STRUKTURA KOSTIJU	1
1.1.1.1.Klasifikacija koštanog tkiva	2
1.1.1.2. Histološka građa kortikalne kosti (kompakte).....	2
1.1.1.3. Histološka građa spongiozne kosti	3
1.1.1.4. Koštani matriks	3
1.1.1.5. Čelije koštanog tkiva	4
1.1.1.6. Osteogeneza	5
1.1.1.7. Modelacija i remodelacija kosti	8
1.1.2. FIZIOLOŠKI PROCES REGENERACIJE DEFEKATA KOSTI	8
1.1.3. REGENERACIJA DEFEKATA KOSTI U KLINIČKOJ PRAKSI	9
1.2. TRETMAN DEFEKATA KOSTI	10
1.2.1. VELIČINA DEFEKTA KOSTI.....	10
1.2.2. KONVENCIONALNI TRETMAN DEFEKATA KOSTI	11
1.2.2.1. Autogeni koštani graft.....	11
1.2.2.2. Alogeni koštani graft.....	12
1.2.2.3. Ksenogeni koštani graft	12
1.2.2.4. Sintetički graft.....	12
1.2.2.5. Tretman defekata kosti pomoći matičnih ćelija	13
1.3. MASNO TKIVO KAO IZVOR MATIČNIH ĆELIJA.....	17
1.3.1. MASNO TKIVO.....	17
1.3.1.1. Žuto (unilokularno) masno tkivo	17
1.3.1.2. Mrko (multilokularno) masno tkivo.....	17
1.3.2. MATIČNE ĆELIJE I MASNO TKIVO	18
1.4. MASNO TKIVO U REGENERATIVNOJ MEDICINI	19
1.4.1. REGENERACIJA MEKIH TKIVA	19
1.4.2. EKTOPIČNA KOST	20
1.4.3. TKIVNI INŽINJERING	20
1.5. EKSPERIMENTALNI MODELI	21
1.5.1. EKSPERIMENTALNI MODELI NA ŽIVOTINJAMA	21
1.5.2. MODEL DEFEKTA KOSTI	22
1.6. POSTAVKA PROBLEMA	23
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	25

3. MATERIJAL I METODE.....	26
3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE	26
3.2. IMPLANTATI I GRAFTOVI.....	26
3.3. EKSPERIMENTALNI DIZAJN.....	28
3.4. ANESTEZIOLOŠKA I OPERATIVNA PROCEDURA	31
3.4.1. UZIMANJE MASNOG TKIVA.....	32
3.4.2. FORMIRANJE I POPUNJAVANJE KALVARIJALNOG DEFEKTA	32
3.5. HISTOLOŠKA ANALIZA.....	34
3.6. HISTOHEMIJSKA BOJENJA	34
3.6.1. HEMATOKSILIN – EOZIN BOJENJE (HE).....	34
3.6.2. BOJENJE TOLUIDIN PLAVIM.....	35
3.7. SEM ANALIZA.....	35
3.8. STATISTIČKE METODE.....	35
4. REZULTATI	35
4.1. KLINIČKA OPSERVACIJA.....	37
4.1.1. OPIS STANJA ŽIVOTINJA PRED ŽRTVOVANJE	37
4.1.2. MAKROSKOPSKI IZGLED KALVARIJE ISPOD PERIOSTA	37
4.1.2.1. Izgled popunjenih defekata posle četiri nedelje – nosač <i>Bio-Oss</i>	37
4.1.2.2. Izgled popunjenih defekata posle četiri nedelje – nosač nanomaterijal	38
4.1.2.3. Izgled popunjenih defekata posle osam nedelja – nosač <i>Bio-Oss</i>	39
4.1.2.4. Izgled popunjenih defekata posle osam nedelja – nosač nanomaterijal.....	40
4.1.3. POPREČNI PRESEK POPUNJENIH DEFEKATA KALVARIJE KUNIĆA.....	41
4.1.3.1. Izgled poprečnih preseka defekata posle 4 nedelje – nosač <i>Bio-Oss</i>	41
4.1.3.2. Izgled poprečnih preseka defekata posle 4 nedelje –nosač nanomaterijal	44
4.1.3.3. Izgled poprečnih preseka defekata posle 8 nedelja –nosač <i>Bio-Oss</i>	44
4.1.3.4. Izgled poprečnih preseka defekata posle osam nedelja –nosač nanomaterijal.....	48
4.2. MSCT NALAZ KALVARIJE KUNIĆA.....	51
4.2.1. MSCT nalaz nedelju dana posle popunjavanja defekata.....	51
4.2.1.1. MSCT nalaz nedelju dana posle popunjavanja defekata-nosač <i>Bio-Oss</i>	51
4.2.1.2. MSCT nalaz nedelju dana posle popunjavanja defekata - nosač nanomaterijal	53
4.2.2. MSCT nalaz tri nedelje posle popunjavanja	57
4.2.2.1. MSCT nalaz tri nedelje posle popunjavanja defekata - nosač <i>Bio-Oss</i>	57
4.2.2.2. MSCT nalaz tri nedelje posle popunjavanja defekata - nosač nanomaterijal.....	60
4.2.3. MSCT nalaz šest nedelja posle popunjavanja defekata	61
4.2.3.1. MSCT nalaz šest nedelja posle popunjavanja defekata - nosač nanomaterijal	61
4.3. STATISTIČKA ANALIZA GUSTINE KOSTI U DEFEKTIMA	63

4.4. VREDNOSTI GUSTINE KOSTI POPUNJENIH DEFEKATA.....	71
4.4.1. Vrednost gustine kosti popunjenih defekata - nosač <i>Bio-Oss</i>	71
4.4.2. Vrednost gustine kosti popunjenih defekata - nosač Nanomaterijal	75
4.5. HISTOLOŠKI NALAZ POPUNJENIH DEFEKATA I KALVARIJE	80
4.5.1. HISTOLOŠKI NALAZ POSLE ČETIRI NEDELJE	80
4.5.1.1. Histološki nalaz posle 4 nedelje – nosač <i>Bio-Oss</i>	80
4.5.1.2. Histološki nalaz posle 4 nedelje – nosač nanomaterijal	84
4.5.2. HISTOLOŠKI NALAZ POSLE OSAM NEDELJA	88
4.5.2.1. Histološki nalaz posle 8 nedelja – nosač <i>Bio-Oss</i>	88
4.5.2.2. Histološki nalaz posle osam nedelja – nosač nanomaterijal	93
4.6. SEM ANALIZA POPUNJENIH DEFEKATA KALVARIJE KUNIĆA	99
4.6.1. SEM ANALIZA DEFEKATA KALVARIJE POPUNJENIH NANOMATERIJALOM STARIH ČETIRI NEDELJE	99
5. DISKUSIJA	106
6. ZAKLJUČAK	116
7. LITERATURA	117
SAŽETAK	128
SUMMARY	130
BIOGRAFIJA	132

1. UVOD

1.1.DEFEKTI KOSTIJU

Veliki broj ljudi u svetu suočava se sa problemom defekata u koštanom tkivu nastalih kao posledica traume, kongenitalnih anomalija ili hiruških ostektomija nakon sprovođenja onkoloških procedura. Nastali defekti posebno dobijaju na značaju kada je gubitak koštane mase veći od kritične veličine defekta pa organizam nije u stanju da izvrši spontanu regeneraciju. Postoji nekoliko mogućnosti za rekonstrukciju ovakvih defekata. One uključuju korišćenje koštanih graftova (autograft, alograft i ksenograft) kao i koštane konstrukcije nastale kao produkt tkivnog inženjeringa kosti.

1.1.1. STRUKTURA KOSTIJU

Koštano tkivo je specijalizovano vezivno tkivo i predstavlja jednu od najvažnijih potpora ljudskom telu. Sastoji se iz ćelija i van ćelijskog matriksa. Izrazitu čvrstinu i tvrdoću koštanom tkivu daje specifična struktura vanćelijskog matriksa koja sadrži visok procenat minerala.

Glavna uloga kosti je u izgradnji skeleta. Na taj način omogućava ljudskom telu održavanje telesnog oblika i kretanje, štiti vitalne organe u kranijumu, grudnoj duplji i koštanu srž smeštenu u kostima.¹

Koštano tkivo takođe, ima važnu ulogu u metabolizmu minerala, posebno kalcijuma koji je najvećim svojim delom (99% od ukupne količine u organizmu) deponovan u kostima.²

1.1.1.1. Klasifikacija koštanog tkiva

Koštano tkivo se deli na nezrelo (fibrozna ili primarna kost) i zrelo (lamelarna ili sekundarna kost). Kod nezrele ili fibrozne kosti, vanćelijski matriks je nepravilnog izgleda pošto su kolagena vlakna međusobno isprepletana. Ovaj tip koštanog tkiva sadrži četiri puta više nasumično raspoređenih osteocita, brže se stvara i ima viši stepen obnove. Kod lamelarne kosti, koja predstavlja normalan zreo oblik koštanog tkiva, mineralizovani matriks se sastoji iz koštanih listića (lamela) u kojima su kolagena vlakna pravilno raspoređena u vidu paralelnih snopova. Specifičan raspored lamela pruža najveći otpor dejstvu fizičkih sila.

Lamelarna kost se pojavljuje u dva osnovna oblika: kompakta ili kortikalna kost i spongioza ili trabekularna kost. Kompakta se nalazi na površini kostiju i predstavlja gusto, solidno koštano tkivo prožeto mikroskopski vidljivim kanalićima. Meko-tkivni elementi (krvni kapilari, ćelije) zauzimaju svega 10% ukupnog volumena kompakte. Spongioza se sastoji od koštanih gredica i pločica raspoređenih u vidu sunderaste mase sa brojnim šupljinama u kojima je smeštena koštana srž.³ Najveći deo koštanog tkiva (80%) čini kompakta, dok trabekularna kost učestvuje sa svega 20% u ukupnoj masi tvrde supstance čitavog skeleta.

1.1.1.2. Histološka građa kortikalne kosti (kompakte)

Osnovna odlika zrele (lamelarne) kosti je matriks, koji je u vidu pravilnih koštanih pločica - lamela. Najzastupljeniji sistem koštanih pločica u kompakti je Haversov sistem, koji se sastoji od koncentrično raspoređenih lamela oko Haversovog kanala. U ovim kanalima, koji su paralelni sa dužom osovinom kosti, nalaze se krvni kapilari, nervna vlakna i ćelije. Ceo sistem lamela je ograničen jednom cementnom linijom i čini osnovnu morfološku jedinicu kompakte - osteon. Prateći koncentričan raspored lamela, zapažaju se male šupljine, lakune, u kojima se nalaze zrele kosne ćelije, osteociti. Od lakuna se na sve strane pružaju tanki koštani kanalići, koji ih međusobno povezuju sa Haversovim kanalom. U ovim kanalićima nalaze se dugački citoplazmatski produžeci osteocita, i predstavljaju put izmene materija i gasova između osteocita i kapilara smeštenih u Haversovim kanalima. U koštanim lamelama, kolagena vlakna su pravilno raspoređena u vidu kosih i pretežno paralelnih snopova u okviru jedne lamele.

1.1.1.3. Histološka građa spongiozne kosti

Spongiozna kost se sastoji od koštanih gređica, trabekula koje su međusobno povezane, a između kojih se nalaze šupljine ispunjene kostnom srži. Kao i kod kompakte, matriks zrele spongioze sastoji se od koštanih pločica - lamela. Lamelle su raspoređene u vidu trabekularnih paketa međusobno odvojenih cementnim linijama. Površina trabekula prekrivena je endosteumom, a površni osteociti povezani su sa osteocitima u dubini putem koštanih kanalića, pomoću kojih se vrši razmena materija između krvnih kapilara oko trabekula i osteocita u dubini.

Kost je sa spoljašnje strane obavijena vezivno-tkivnom strukturom – pokosnicom (periost) i pripaja se za nju putem penetrirajućih snopova kolagenih vlakana, nazvanih Šarpejeva (*Sharpey*) vlakna. Periost se sastoji iz dva dela: spoljašnjeg sloja koga čini gusto nepravilno vlaknasto vezivno tkivo i unutrašnjeg (*cambium*), koji je rastresitije građe, više vaskularizovan i celularan. Unutrašnji sloj sadrži ćelije koje mogu da se diferencijuju u osteoblaste i ima važnu ulogu u srastanju koštanih preloma.

1.1.1.4. Koštani matriks

Matriks zrele kosti, deponovan u obliku koštanih lamela, se sastoji od organskog i neorganskog dela. Organski deo matriksa učestvuje sa 35%, a neorganski deo matriksa sa 65%.⁴

Organski deo matriksa (osteoid) čine najvećim delom kolagena vlakana, dok manji deo čine različiti glikoproteini, proteoglikani i lipidi koji obrazuju amorfnu komponentu matriksa ili osnovnu supstancu. U okviru osnovne supstance najzastupljeniji su osteokalcin, u nešto manjoj meri osteonektin (povezuje mineralne kristale za matriks), osteopontin (važan za adheziju ćelija za matriks), i koštani sijaloprotein (modulator mineralizacije). U malim količinama prisutni su i različiti faktori rasta i citokini, kao što su: faktor transformacije rasta β - (TGF- β), insulinu slični faktori rasta (IGF), interleukini (IL-1, IL-6) i koštani morfogenetski proteini (BMP 1-6). Oni doprinose diferencijaciji, aktivaciji i proliferaciji koštanih ćelija, kao i obnavljanju koštanog tkiva.

Neorganski deo matriksa sastoji se od kristala sličnih hidroksiapatitu. Kristali hidroksiapatita nalaze se vezani za kolagena vlakna, čije prisustvo je neophodno i za sam

proces mineralizacije. Neorganski deo matriksa obavlja dve osnovne funkcije: daje izrazitu čvrstinu kostima i kompresivnu snagu, ali služi i kao rezervoar jona kalcijuma, fosfata, magnezijuma i cinka.

1.1.1.5. Čelije koštanog tkiva

U koštanom tkivu se nalazi nekoliko vrsta ćelija čija je uloga izgradnja i održavanje koštanog matriksa kao i remodelacija koštanog tkiva. To su: osteoprogenitorske ćelije, osteoblasti, osteociti i osteoklasti⁵.

Osteoprogenitorske ćelije

Smeštene su u unutrašnjem celularnom sloju periosta, oblažu Haversove kanale i endosteum. Vretenastog su oblika i sadrže svetla okruglasta jedra. Potiču od mezenhimske matične ćelije i imaju sposobnost diferencijacije u osteoblaste. Međutim, u određenim uslovima, posebno u prisustvu niskog parcijalnog pritiska kiseonika, mogu da se diferencijuju i u hondroblaste, te da stvaraju hrskavični matriks.

Osteoblasti

Osteoblasti nastaju od osteoprogenitorskih ćelija i imaju ulogu u sintezi, izlučivanju i deponovanju praktično svih organskih komponenti koštanog matriksa, uključujući molekule kolagena, nekolaženih proteina i proteoglikana.

U toku procesa mineralizacije, soli kalcijuma deponuju se u osteoid, ali osteoblasti koji ostaju na površini uvek su odvojeni od mineralizovanog matriksa tankim slojem nemineralizovanog osteoida. Deponujući osteoid, osteoblasti se polako udaljuju jedan od drugoga (iako ostaju povezani dugačkim citoplazmatskim produžecima i nekusima) i bivaju okruženi matriksom sa svih strana. Tada se transformišu u zrele koštane ćelije, osteocite.

Stvaranje koštanog matriksa prolazi kroz dve faze. U prvoj fazi osteoblasti luče osteoid, a zatim se, u drugoj fazi, vrši mineralizacija osteoida. Po završetku mineralizacije, koštano tkivo može da se uvećava jedino dodavanjem novog koštanog matriksa na površini već postojećeg. Na taj način kost raste isključivo putem apozicije.

Osteociti

Osteociti su zrele ćelije koštanog tkiva i nastaju od osteoblasta. Imaju vretenast oblik i pravilno su raspoređene u mineralizovanom matriksu ispunjavajući lakune u kojima se nalaze. Osteociti pružaju brojne tanke citoplazmatske produžetke kojima se povezuju sa istim takvim produžecima drugih osteocita.⁶

Ovakva povezanost osteocita u okviru jednog osteona čini ih najozbiljnijim kandidatima za mehanosenzornu ulogu u detekciji potreba za povećanom produkcijom ili razgradnjom koštanog tkiva prilikom funkcionalne adaptacije skeleta ili potreba za reparacijom usled nastalih mikrooštećenja.⁷

Osteoklasti

Osteoklasti su ćelije koje nastaju fuzijom mononukleusnih progenitora monocitno-makrofagne ćelijske porodice. Njihova osnovna funkcija je resorpcija kosti, pa tako zajedno sa osteoblastima imaju centralnu ulogu u stvaranju skeleta i regulisanju ukupne mase kosti.⁸ Razgradnja kosti kreće pripajanjem osteoklasta za ogoljen koštani mineralizovani matriks. Pripajanjem osteoklasta za matriks i obrazovanjem pripojne prstenaste formacije, deo membrane okružen prstenom počinje da se uvećava i stvara brojne prstolike izvrate, naboranu membranu, koja predstavlja jednu od specifičnih fenotipskih karakteristika aktivnog osteoklasta.

Resorpcija matriksa započinje najpre demineralizacijom, a kasnije i razgradnjom organskog dela matriksa. Konačni rezultat ovih jonskih transportnih događaja je sekrecija hlorovodonične kiseline u resorptivnu mikrosredinu, što snižava pH. Kiselost sredine dovodi do rastvaranja koštanih minerala, a tek kasnije demineralizovan organski deo kosti biva razgrađen oslobađanjem lizozomskih proteaza. Po prestanku resorpcije, osteoklast se odvaja od kosti i kreće ka nekom drugom mestu gde započinje novi ciklus degradacije ili umire putem programirane ćelijske smrti - apoptoze.

1.1.1.6. Osteogeneza

Skeletni sistem se razvija iz mezoderma i ćelija nervnog grebena (nervne kreste). Od mezodermalnih ćelija nastaje embrionalno vezivno tkivo iz čijih mezenhimskih matičnih

ćelija nastaju osteoblasti. Iz tih razloga, u ćelijskoj kulturi, osteoblaste je teško razlikovati od fibroblasta.

Osteogeneza se odvija na dva načina:

- a) Direktno (intramembranska osifikacija)
- b) Indirektno (endohondralna osifikacija)

Intramembranska osifikacija

Odigrava se u predelu dobro vaskularizovanog mezenhima (mladog vezivnog tkiva). U toku osme nedelje embrionalnog razvića pojavljuju se grupe mezenhimskih ćelija koje menjaju fenotipske karakteristike, uvećavaju se i ispoljavaju znatno razvijeniji granulisan endoplazmatski retikulum, i konačno se diferentuju u osteoblaste. Osteoblasti počinju da luče osteoid u izolovanim ostrvcima okruženim mezenhimskim tkivom. Ova ostrvca se postepeno povećavaju, mineralizuju i povezuju, tako da nastaje fina mreža koštanih gredica (trabekula). Na površini ovih gredica, pored osteoblasta, zapažaju se i osteoklasti koji zajedno sa njima oblikuju nastalu primarnu spongiozu.

U kasnijoj fazi razvoja prostori između primarnih gredica postepeno se smanjuju tako da, na mestima gde će se stvoriti kompakta (kortikalno koštano tkivo), potpuno bivaju ispunjeni koštanim tkivom procesom koji se zove kompakcija. U ovom slučaju, osteoblasti stvaraju postepeno koncentrične lamele (sekundarno koštano tkivo) sve do centralnog dela proširenja, gde zaostaje krvni sud u novonastalom Haversovom kanalu. Na taj način stvaraju se prvi osteoni, koji su u početku okruženi primarnom ili fibroznom kosti. Kasnije, procesom remodelacije, primarna kost biva zamenjena definitivnom sekundarnom kosti. S druge strane na mestima gde će se razviti spongiozna kost, primarne gredice zadebljavaju, a mezenhimsko tkivo koje ispunjava prostore između gredica se diferentuje u kostnu srž. I ovde, u kasnijoj fazi, procesom remodelacije primarna kost se u gredicama razgrađuje i zamenjuje zreloom, lamelarnom kosti.

Endohondralna osifikacija

U toku ovog procesa, na mestima gde će se razviti kost, prvo dolazi do kondenzacije mezenhimskih ćelija, koje se zaokrugljuju i diferentuju u hondroblaste. Hondroblasti

formiraju hrskavični matriks i na taj način se stvara model od hijalinske hrskavice, približnog oblika buduće kosti. Na periferiji ovih hrskavičnih modela razvija se u početku perihondrijum (fibrozni omotač hrskavice). U kasnijoj fazi, neke od ćelija perihondrijuma, osteoprogenitorske ćelije, počinju da proliferišu i da u centralnom delu buduće dijafize dugih kostiju stvaraju koštani matriks koji mineralizuje. Stvaranje koštanog omotača oko centralnog dela dijafize buduće kosti smanjuje difuziju gasova i hranljivih materija do hondrocita u centralnom delu, tako da ovo, uz verovatno još nedovoljno proučene faktore, deluje na hondrocite da počnu da se transformišu.

U samom centru buduće dijafize, hondrociti menjaju svoje fenotipske karakteristike, postepeno se uvećavaju i započinju sintezu specifičnih matriksnih komponenti, koje dovode do kalcifikacije hrskavičnog matriksa. Kako hondrociti hipertrofišu, volumen intracelularnog matriksa se značajno smanjuje i tada započinje proces mineralizacije. Mineralizovan matriks potpuno sprečava difuziju gasova i hranljivih materija do hondrocita, što dovodi do njihove programirane ćelijske smrti - apoptoze. Tako se u centru buduće dijafize stvaraju šupljine okružene tankim mineralizovanim pregradama hrskavičavog matriksa. Istovremeno, u centralnom delu buduće dijafize, vezivno-vaskularni pupoljak (krvni sudovi i perivaskularni mezenhim) prodire kroz koštani omotač u centralni kalcifikovani deo. Ovaj pupoljak predvode osteoklasti koji resorbuju koštani omotač i kalcifikovani hrskavičavi matriks, dok vaskularni pupoljak raste proliferacijom endotelnih ćelija.

Prateće mezenhimsko tkivo sadrži oteoblastne prekursore, koji na kalcifikovanim pregradama stvaraju primarno koštano tkivo. Tako, u centralnom delu dijafize buduće kosti nastaje primarni osifikacioni centar.

Sekundarni osifikacioni centri javljaju se na krajevima hrskavičnog modela postnatalno, izuzev distalnog okrajka femura i proksimalnog okrajka tibije. Širenjem osifikacije u epifizama i dijafizi, hijalinska hrskavica zaostaje samo na granici između metafize i epifize u vidu epifizne ploče. Prisustvo epifiznih ploča i proliferacija hondrocita omogućava kontinuirani rast dugih kostiju sve do oko 20. godine života. Rast prestaje kada i poslednji ostaci hrskavice bivaju zamenjeni koštanim tkivom, odnosno posle fuzije metafiza i epifiza.

1.1.1.7. Modelacija i remodelacija kosti

Skelet je visoko specijalizovani i dinamičan organ u kome se odvija kontinuirana zamena delova tkiva - remodelacija. U toku razvoja skeleta i rasta, kosti čitavog skeleta oblikuju se do svoje konačne veličine i oblika. Ovo se postiže uklanjanjem koštanog tkiva na jednom mestu, a stvaranje na nekom drugom, procesom koji se naziva modelacija. Dijafize dugih kostiju povećavaju svoj dijametar dodavanjem koštanog tkiva sa spoljašnje strane, dok se istovremeno uvećava i medularni kanal resorpcijom koštanog tkiva sa unutrašnje strane. S druge strane, da bi kosti normalno funkcionisale u skeletu odraslih osoba odigrava se kontinuirana razgradnja i ponovna izgradnja koštanog tkiva. Na ovaj način obezbeđuje se stalna zamena starog koštanog tkiva novim i to na istom mestu. Ovaj proces naziva se remodelacija i on obezbeđuje kompletnu regeneraciju skeleta odraslih na svakih 10 godina.

Kod mladih odraslih osoba, postoji ravnoteža između razgradnje i ponovnog stvaranja, tako da se ukupna koštana masa održava u normalnim okvirima, a ovaj proces je pod uticajem dejstva mehaničkih sila i centralnih homeostatskih faktora.

Resorpciju kosti obavljaju osteoklasti i ona traje oko 3 nedelje po jednom mestu, dok ponovnu izgradnju obavljaju osteoblasti tokom sledećih 3-4 meseca. Ova dva procesa su prostorno i vremenski povezana, tako da svi osteoklasti i osteoblasti na određenoj lokaciji čine jedinstvenu strukturu prolaznog karaktera, poznatu kao osnovna višćelijska jedinica (BMU, engl.-*basic multicellular unit*). Iako je tokom procesa modelacije nemoguće uočiti anatomske jedinice analogne BMU, oblikovanje skeleta u toku rasta zahteva preciznu prostornu i vremensku sinhronizaciju aktivnosti osteoblasta i osteoklasta po nekom drugom principu od onog koji upravlja sa BMU u toku remodelacije skeleta.

1.1.2. FIZIOLOŠKI PROCES REGENERACIJE DEFEKATA KOSTI

Zarastanje kosti je komplikovan fiziološki proces koji se odvija u više faza. One se međusobno razlikuju zbog činjenice da kost, za razliku od ostalih tkiva u organizmu, zarasta originalnim a ne ožiljnim tkivom. Niz reakcija koje se tom prilikom javljaju, iz didaktičkih razloga, mogu se podeliti u 5 stadijuma⁹:

Stadijum hematoma - nastaje neposredno nakon povrede kao posledica oštećenja krvnih sudova u kosti i oko nje. Formirani hematoma u sebi može da sadrži i okolna devitalizovana tkiva (mišićno tkivo, masno tkivo, fascije, i dr.).

Stadijum subperiostalne i endostalne ćelijske proliferacije - nastaje kao reakcija na stvoreni hematoma pojavom raznih produkata zapaljenja sa naglašenom koncentracijom fagocita, koji razgrađuju devitalizovano tkivo. Krvni ugrušak sadrži različite faktore rasta (TGF-beta, PDGF) koji su zapravo stimulus za proliferaciju i diferencijaciju ćelija. Iz subperiosta i endosta dolazi do stvaranja osteoblasta i hondroblasta, mladih koštanih i hrskavičavih ćelija, koje popunjavaju mesto nakon resorpcije hematoma.

Stadijum stvaranja mekog kalusa - faza revaskularizacije i reparacije kosti. Ovu fazu karakteriše stvaranje vezivnog tkiva uključujući i stvaranje hrskavičavog tkiva i formiranje nove mreže kapilara. Tokom prvih 10 dana histološki nalazi pokazuju pojavu nezrele kosti, kalusa, na nekoliko milimetara od mesta preloma. Oko devetog dana u regiju kalusa dospevaju i makrofagi, fibroblasti i kapilari, a na kompletnu diferencijaciju ćelija u velikoj meri utiče lokalno snabdevanje kiseonikom, uticaj mehaničke sile spoljašnje sredine i signali iz lokalnih faktora rasta.

Stadijum maturacije kalusa - nastaje kao posledica taloženja kalcijuma u vezivni kalus. Kalcijum se oslobađa iz obližnjih koštanih fragmenata, te dolazi do njihove demineralizacije. Ovaj kalus je čvrst i kompaktan i naziva se koštani kalus.

Stadijum remodelacije - koštani kalus okružuje mesto preloma u obliku vretena. Vremenom, zbog jačanja kosti duž linija opterećenja, odnosno njene lize duž linija rasterećenja, dolazi do njegove remodelacije, pri čemu kost postupno poprima svoj oblik koji je imala pre povrede.

1.1.3. REGENERACIJA DEFEKATA KOSTI U KLINIČKOJ PRAKSI

Prekid kontinuiteta koštanog tkiva ili njegov nedostatak posledica su trauma, tumora ili poremećaja u razvoju koštanog sistema. Procesi zarastanja i nadoknade koštanih defekata

mogu biti praćeni nizom općtih i lokalnih komplikacija. Lokalne komplikacije najćeće se manifestuju kao usporeno zarastanje preloma i nezarastanje preloma.

Usporeno zarastanje preloma

Kod usporenog zarastanja preloma prisutne su sve faze zarastanja preloma samo što je vreme do klinićeke i radiografske potvrde zarastanja duće od oćekivanog za tu vrstu preloma i za taj uzrast povrećenog.

Nezarastanje preloma

U ovim slućajevima je proces zarastanja definitivno zaustavljen na nekoj od ranih faza zarastanja, sa evidentnim razmakom između koćtanih fragmenata, koji posle dućeg vremena biva ispunjen hrskavićavim i fibroznim tkivom, sa mogućnoćcu izvoćenja pokreta na mestu preloma.⁹ To je, klinićeki, slika laćznog zgloba (*pseudoarthrosis*), koji radiografski moće pokazivati proćirenje koćtanih fragmenata u nivou preloma, uz prisustvo skleroze u predelu medularnog kanala.⁹ Ovo je tzv. hipertrofićki tip nezaraslog preloma, dok kod drugog, atrofićkog tipa, nema znakova za celularnu aktivnost u nivou preloma - krajevi koćtanih fragmenata su uski, zaobljeni i porotićni.

1.2. TRETMAN DEFEKATA KOSTI

1.2.1. VELIĆINA DEFEKTA KOSTI

Da li će organizam u optimalnim uslovima uspeti da sanira koćtni defekt zavisi prvenstveno od velićeine samog defekta u koćti. Defekt kritićeke velićeine (CSD - eng. *critical-sized defect*) predstavlja najmanju velićinu defekta u odrećenju koćti i vrsti ćivotinje koji neće spontano da zaraste do kraja ćivota.¹⁰ Defekti koćti koji prelaze kritićnu velićinu ne mogu da budu sanirani od strane organizma mehanizmom koćtane reparacije. U takvim slućajevima pristupa se kovencionalnom tretmanu nadoknade izgubljene koćtane mase upotrebom koćtanih graftova ili se u novije vreme koristi tkivni inćinjeriing koćti (BTE - eng. *Bone Tissue Engineering*) upotrebom matićnih ćelija.

1.2.2. KONVENCIONALNI TRETMAN DEFEKATA KOSTI

Konvencionalni tretman defekata kosti podrazumeva transplantaciju kosti sa nekog drugog mesta u cilju stimulacije formiranja kosti. U odnosu na mesto sa koga se uzimaju, koštani graftovi mogu biti :

- autogeni (autologni) graftovi
- alogeni graftovi
- ksenogeni graftovi
- sintetički (aloplastični) zamenici koštanog tkiva

1.2.2.1. Autogeni koštani graft

U ovom trenutku autogeno presađivanje koštanih graftova predstavlja zlatni standard za nadoknadu koštanog tkiva. Autogeni koštani graftovi daju uspešne i predvidljive rezultate.¹¹ Slobodni koštani graftovi deluju više osteokonduktivno nego osteoinduktivno čak i kada je osteogena aktivnost prisutna u spongioznom delu grafta.¹²

Postoje dva oblika nevascularizovanih slobodnih koštanih graftova:

- kortikalni koštani graft
- spongiozni koštani graft

Kortikalni koštani graft zahteva više vremena za revaskularizaciju, ali je sposoban da izdrži mehanička opterećenja u ranoj fazi graftovanja. Zato je njegova upotreba prevashodno za kosne defekte koji zahtevaju rano mehaničko opterećenje.¹³

U kranio-maksilofacijalnoj hirurgiji ovi oblici graftova najčešće se koriste u nadoknadi smanjene vertikalne ili horizontalne dimenzije alveolarnih grebena, za poboljšanje kontura lica ili za nadoknadu pune debljine kosti. Donorna mesta najčešće su kosti pogravnine, rebra, spoljašnji ili unutrašnji korteks ilijačne kriste i simfiza mandibule.¹⁴

Spongiozni koštani graft je u praksi mnogo više zastupljeniji od kortikalnog uglavnom zbog lakše manipulacije i brže i bolje revaskularizacije.¹¹ Mesto sa koga se

najčešće uzima je prednja ili zadnja ilijačna kista. Nije otporan na mehaničke sile, ako se koristi za rekonstrukciju većih defekata, neophodna mu je dodatna stabilnost pomoću rigidne fiksacije titanijumskim mrežicama i pločicama. U kranio-maksilofacijalnoj hirurgiji najčešće se koristi kod rascepa alveolarnog nastavka i nepca, kao i za augmentaciju maksilarnog sinusa.

Kombinovanje oba ova grafta u vidu kortiko-spongioznog grafta obično daje najbolje rezultate. Njime se postiže mehanička stabilnost a u isto vreme i dobra revaskularizacija. Najčešće se koriste za nadoknadu pune debljine kosti donje vilice.¹⁵

Više decenija unazad koštani graftovi zdravih donora korišćeni su u terapiji nadoknade kosnih defekta, ali je njihova upotreba danas znatno smanjena zbog niza neželjenih efekata u vezi sa njihovom primenom. Ovi efekti najčešće se ogledaju u ograničenoj količini koštanog tkiva davajuće regije, mogućem poremećaju funkcije davajuće regije, pojavi bola, parestezije, hematoma, upale i dr.^{16-18.}

1.2.2.2. Alogeni koštani graft

Alogeni koštani graft može da bude jedna od mogućih alternativa za nadoknadu kosnih defekata. Ovaj tip grafta može se koristiti sa živih ili kadaveričnih ljudskih donora. Kao i autograftovi i ovaj tip grafta nosi sa sobom niz nedostataka uključujući, kao najvažniji, pokretanje imunog odgovora primaoca.¹⁹

1.2.2.3. Ksenogeni koštani graft

Ksenogeni koštani graft predstavlja graft koji ne pripada ljudskoj vrsti i izuzetno se retko koristi za nadoknadu defekata u kosti. Njegova upotreba je ograničena jer sa sobom nosi rizik od prenošenja virusa, pojave infekcije usled moguće toksičnosti i imunog odgovora što za posledicu ima odbacivanje grafta od strane primaoca.²⁰

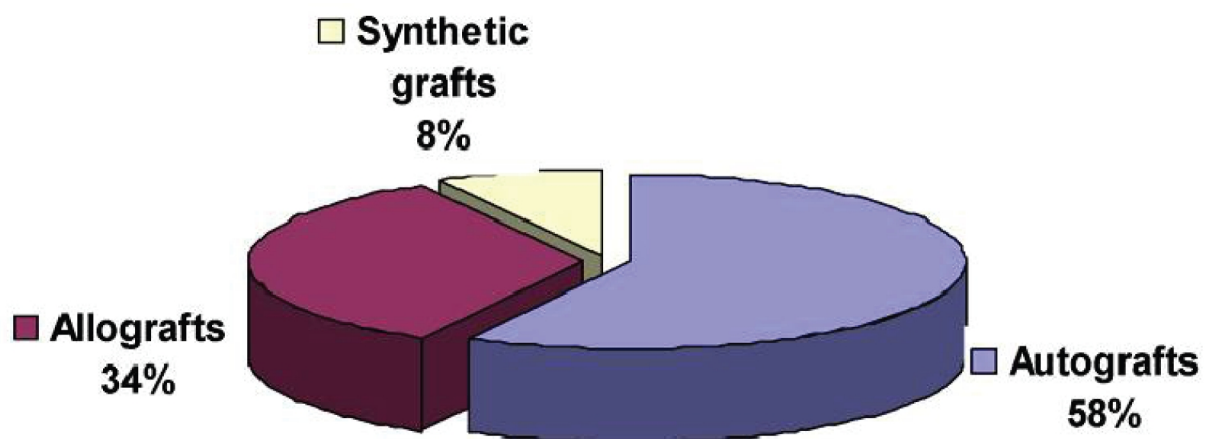
1.2.2.4. Sintetički graft

Sintetički graftovi su napravljeni od biomaterijala, koje po sastavu čine prirodni ili sintetički materijali, i koriste se da zamene deo živog sistema ili da funkcionišu u intimnom kontaktu sa živim tkivom. Ovu grupu materijala čine: metali, keramika, polimeri i kompoziti.

Osobine koje jedan biomaterijala mora da poseduje da bi se koristio u tkivnom inženjeringu su:

- Biokompatibilnost
- Biorazgradljivost
- Otporan na sterilizaciju
- Vremenski stabilan
- Otporan na mehanička i fizička dejstva
- Lak za obradu

Sintetički graftovi se izrađuju u različitim oblicima i veličinama, ali sporo zarastanje i nemogućnost remodelacije u sklopu prirodnog procesa zarastanja predstavljaju njihove glavne nedostatke te je njihova zastupljenost u svakodnevnoj praksi svega 8% (Slika 1.1).^{21,22}



Slika 1.1. Pregled upotrebe koštanih graftova

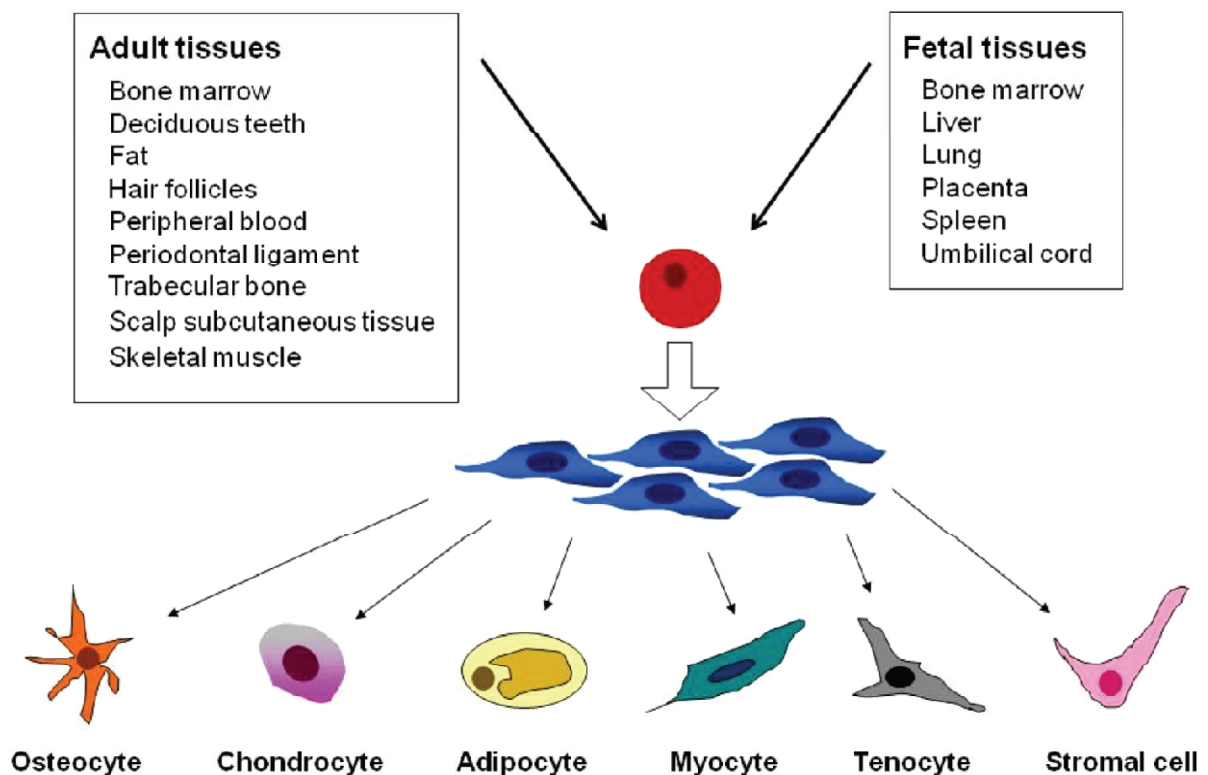
1.2.2.5. Tretman defekata kosti pomoći matičnih ćelija

Mezenhimske matične ćelije (MSCs) su prvi put opisane 1976.god. od strane Friedenstein i sar. kao ćelije koštane srži²³ i skrenule su posebnu pažnju biomedicinskim istraživačima jer su mogle lako da se umnožavaju i diferentuju u različite vrste ćelija i tkiva.²⁴

U poslednje vreme, Komitet Međunarodnog Društva za citoterapiju predložio je naziv "multipotentne mezenhimske stromalne ćelija".²⁵ Međutim, većina naučnika koristi jednostavan naziv "MSCs".

Precizna definicija ovih ćelija ostaje predmet polemike. Ipak, do danas MSCs su definisane kao ćelije koje, pod strogo kontrolisanim uslovima, mogu da se umnožavaju i diferencijuju u osteogene, hondrogene, adipogene, miogene, tenogene ili stromalne ćelijske linije.^{24,26-28.}

Postoji veliki broj različitih vrsta matičnih ćelija, koje se međusobno razlikuju u zavisnosti od stepena diferencijacije i sposobnosti samostalnog umnožavanja (Slika 1.2)²⁹.



Slika 1.2. Izvori MSCs i njihova sposobnost diferencijacije

Odrasle matične ćelije (*Adult stem cells*)

Odrasle matične ćelije podrazumevaju matične ćelije uzete iz zrelog tkiva. Zbog stadijuma razvoja u kome se nalaze, one imaju ograničeni potencijal u odnosu na matične ćelije dobijene iz embriona i fetusa.³⁰ Većina odraslih matičnih ćelija su multipotentne i u

odnosu na tkivo iz koga potiču mogu biti mezenhimske matične ćelije, matične ćelije masnog tkiva, matične ćelije zubne pulpe, itd.^{31,32.}

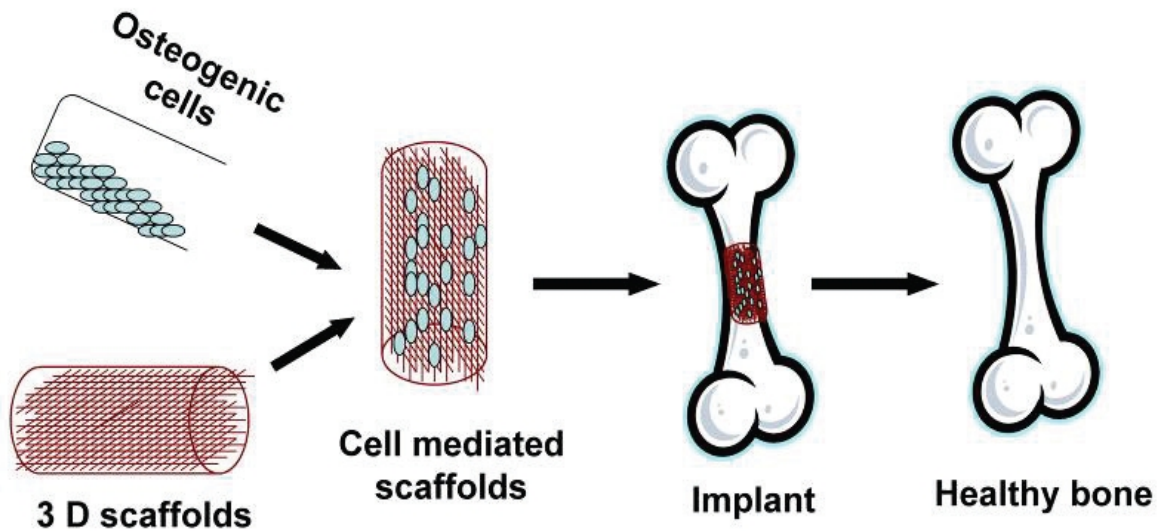
Iako je kost dinamičano i dobro vaskularizovano tkivo koje poseduje sposobnost reparacije i remodelacije, oko 10% koštanih preloma zahteva dodatno lečenje koštanim graftovima.^{33-36.} Da bi se zadovoljile kliničke potrebe reparacije i regeneracije koštanog tkiva novija istraživanja su usmerena na projektovanje koštanog grafta koji bi odgovarao po obliku i veličini kostnom defektu i u isto vreme imao sposobnost da stimuliše brzu reparaciju i regeneraciju koštanog tkiva.

Od kada su Langer i Vacanti 1993.god. prvi put uveli pojam tkivnog inženjeringa³⁷, regeneracija i reparacija koštanog tkiva odvijala se u dva pravca. Oba pravca su imala za cilj da omoguće rast kosti stvaranjem optimalne biološke mikrosredine pogodne za regeneraciju kosti aktiviranjem kritične mase osteogenih ćelija. Međutim, način na koji se osteogene ćelije aktiviraju je različit. Prvi pristup zasnovan je na unošenju egzogenih osteogenih ćelija koje bi pod dejstvom lokalnih faktora rasta vršile reparaciju i regeneraciju koštanog tkiva, dok se drugi pristup zasniva na unošenju faktora rasta koji bi stimulisali osteogene ćelije iz lokalne sredine i na taj način doveli do regeneracije i reparacije koštanog tkiva.³⁸

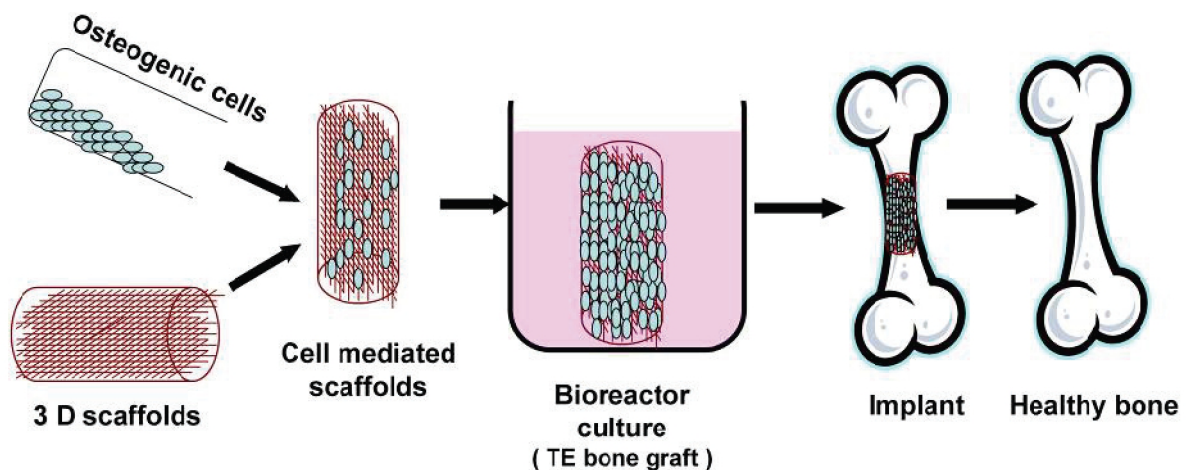
Pokazano je da korišćenje faktora rasta u tkivnom inženjeringu kosti može da bude efikasno na modelu malih eksperimentalnih životinja. Međutim, kod modela velikih eksperimentalnih životinja, javlja se problem kako odrediti optimalne doze faktora rasta zbog velikog variranja u njihovom terapijskom učinku koji se javlja kod malih i velikih životinja (do 100 puta). Drugi problem se odnosi na kratak poluživot većine od faktora rasta.^{39,40.} Pored toga, regeneracija i reparacija koštanog tkiva, zasnovana na korišćenju faktora rasta koji indirektno privlače i podstiču diferencijaciju i umnožavanje lokalnih osteogenih matičnih ćelija, biće ugrožena u odsustvu dovoljnog broja osteogenih matičnih ćelija.⁴¹

Nasuprot tome, unošenje egzogenih osteogenih ćelija funkcioniše nezavisno od prisustva lokalnih osteogenih ćelija, pa je veoma korisno u terapiji pacijenata sa smanjenim prisustvom osteoprogenitornih ćelija kao što su teška trauma, dijabetes, dugogodišnja upotreba duvana, zračenje, starenje, osteoporoza ili drugi metabolički poremećaji.³⁹ Ovako unešene osteogene ćelije luče širok spektar faktora rasta u fiziološkim dozama stvarajući, na taj način, idealne uslove neophodne za regeneraciju koštanog tkiva.⁴²

Postoje dva različita pristupa u korišćenju egzogenih MSCs za regeneraciju i reparaciju koštanog tkiva.⁴³ Prvi je njihovo zasejavanje na tkivnim nosačima i direktna implantacija u kostni defekt (Slika 1.3)²², dok drugi podrazumeva njihovo umnožavanje *in vitro* a nakon toga zasejavanje na tkivnim nosačima i implantaciju (Slika 1.4).^{22,44}



Slika 1.3. Direktna implantacija MSCs



Slika 1.4. Umnožavanje MSCs pre implantacije

1.3. MASNO TKIVO KAO IZVOR MATIČNIH ĆELIJA

1.3.1. MASNO TKIVO

Masno tkivo predstavlja specijalizovanu vrstu vezivnog tkiva za skladištenje lipida. Na osnovu distribucije, boje, strukture, inervacije i metaboličke aktivnosti razlikujemo:

- žuto (unilokularno) masno tkivo
- mrko (multilokularno) masno tkivo

1.3.1.1. Žuto (unilokularno) masno tkivo

Žuto masno tkivo predstavlja glavni depo energije u telu, a ujedno ima i mehaničku ulogu na određenim delovima tela (dlanovi, tabani, orbita oka, zglobovi). Služi kao termoizolator i kao termoregulator. Izgrađeno je od adipocita između kojih se nalaze mastociti. Adipociti su ćelije koje imaju sopstvenu *externu laminu* ispod koje se nalazi plazmalema sa receptorima za brojne signalne supstance (insulin, norepinefrin, hormon rasta i glikokortikoidi). Centar ćelije zauzima masna kap, koja nema sopstvenu membranu već je obavijena mrežom aktinskih filamenata. Organele su slabo razvijene (izuzev mitohondrija) i zajedno sa jedrom potisnute ka periferiji ćelije. U masnoj kapi su deponovani trigliceridi i karotenoidi od kojih i potiče boja ćelije. Distribucija zavisi od pola, ishrane i uzrasta. Kod dece se javlja u vidu kontinuiranog sloja (*panniculus adiposus*), dok se kod odraslih u pojedinim regionima nalazi u debljem sloju (oko bubrega, mišića lica, retroperitoneuma, u mezenterijumu, očnoj duplji), a u drugim iščezava.

1.3.1.2. Mrko (multilokularno) masno tkivo

Naziva se još i ksantoadipozno masno tkivo jer je izgrađeno od ksantoadipocita, koje su manje od adipocita. Takođe, sadrži sopstvenu *externu laminu*. Jedro je za razliku od adipocita, smešteno u centru ćelije i nikad uz plazmalemu, dok su ostale organele neupadljive (izuzev brojnih mitohondrija). Mrka boja tkiva potiče od citohroma sadržanog u ksantoadipocitima i od bogate vaskularne mreže koja prožima ovo tkivo. Ovaj tip masnog

tkiva je specijalizovan za stvaranje toplote jer ksantoadipociti oksidišu masne kiseline oko dvadeset puta brže i efikasnije od adipocita. Najbolje je izraženo kod životinja koje prespavaju zimski san (hibernatori), a kod čoveka se javlja u dvadeset osmoj nedelji embrionalnog razvoja, i nalazi se uglavnom u vratu, medijastinumu i interskapularnom regionu. Već u prvoj deceniji života ksantoadipociti poprimaju unilokusne karakteristike i poprimaju izgled adipocita.

Neposrednim oslobađanjem solubilnih bioaktivnih peptida - adipokina, adipociti regulišu brojne fiziološke i patofiziološke procese organizma. U adipokine se svrstavaju brojni hormoni, citokini i faktori rasta čija se ekspresija povećava sa akumulacijom masnog tkiva i koji ispoljavaju lokalne (autokrini i parakrini sekrecija) i sistemske efekte (endokrini sekrecija), kontrolisane signalima složene interaktivne neuroendokrine mreže.

Adipociti luče hemijske supstance kao što su leptin, rezistin, faktor tumorske nekroze alfa (TNF- α), proteine stimulacije acilacije (ASP), druge citokine - interleukin 6 (IL-6), proteine komplementa – adipsin, adiponektin, proteine akutne faze (haptoglobin, serumski amiloid A), supstrate (slobodne masne kiseline, glicerol), enzime – lipoproteinsku lipazu, holesterol estar transfer-proteine i apolipoprotein E, koji su uključeni u metabolizam masti i lipoproteina, aromatazu – za sintezu estrogena, retinol-vezujući protein (*retinol binding protein*–RBP) i angiotenzinogen.

1.3.2. MATIČNE ĆELIJE I MASNO TKIVO

Masno tkivo predstavlja bogat izvor MSCs i one se po svom potencijalu i sposobnosti diferencijacije ne razlikuju od matičnih ćelija koštane srži.⁴⁵ Multipotentne stromalne ćelije masnog tkiva nalaze se u vaskularnoj frakciji strome (SVF - *stromal vascular fraction*), i mogu se lako odvojiti od masnih ćelija, nakon digestije enzimom kolagenaze.^{46,47.}

U poređenju sa MSCs koštane srži, ADSCs imaju određene prednosti u tkivnom inženjeringu jer je masno tkivo u organizmu lako dostupno, ima ga u dovoljnoj količini, procedura uzimanja nije komplikovana a davajuća regija ne trpi znatna oštećenja. ADSCs se najčešće mogu dobiti nakon ekscizije ili aspiracije masnog tkiva. Još uvek nije ustanovljeno koji od ovih postupaka ima jasnu prednost u broju ili kvalitetu dobijenih ćelija,⁴⁸ ali se

prednost daje aspiraciji kao daleko manje invazivnoj proceduri. Takođe je uočeno da broj ADSC ćelija nakon aspiracije masnog tkiva ostaje stabilan čak i posle 24 časa, za razliku od broja ADSCs u ekscidiranom masnom tkivu gde se broj ADSCs znatno smanjuje.⁴⁹

Međutim, uočeno je da se pre izvođenja liposukcione aspiracije u sklopu same procedure ubrizgava slana tečnost putem injekcije sa ciljem da se smanji krvarenje u toku same hirurške intervencije i sam postupak učini lakšim. Ovako ubrizgan slani rastvor razblažuje koncentraciju ADSCs u aspiratu i njihov broj je znatno manji od broja ADSCs u masnom tkivu uzetom na klasičan način hirurškom resekcijom.

ADSCs se mogu diferentovati u različite tipove ćelija. Diferencijacija se najčešće može indukovati insulinom, deksametazonom, cikličnim AMP, β -glicerofosfatom, heparinom i različitim citokinima u zavisnosti od vrste ćelijske linije koju želimo da dobijemo. Na ovaj način diferencijacija ADSCs može da ide u pravcu ćelijskih linija mekih tkiva (adipociti, miociti glatke muskulature, miociti srčanog mišića), ali i u pravcu koštanog tkiva (osteociti i hondrociti).

1.4. MASNO TKIVO U REGENERATIVNOJ MEDICINI

1.4.1. REGENERACIJA MEKIH TKIVA

Jedna od najvažnijih upotreba ADSCs jeste nadoknada samog masnog tkiva. Veliki defekti mekih tkiva koji nastaju nakon traume, opekotina i kao posledica onkološke hirurgije predstavljaju čest problem. Nekoliko studija je pokazalo *in vitro* diferencijaciju ADSCs duž adipogenih rodova, uključujući akumulaciju intracelularnih lipidnih kapljica, i ekspresiju karakterističnih proteina i enzima.^{46,50,51.}

ADSCs su sađene na tkivnim nosačima i implantirane subkutano kod miševa i pacova.⁵² Skafoldi sa ovako zasađenim ćelijama pokazali su značajnu neovaskularizaciju implantata, kao i penetraciju preadipocita ili ADSCs u tkivni nosač i njihovu diferencijaciju u zrele adipocite.

Takođe je pronađeno da ADSCs mogu da se diferenciraju u ćelije glatke muskulature i mogu da budu dobar izvor za inženjering parenhimatoznih organa. ADSCs iz masnog tkiva potiljka i epididimusa mogu se koristiti kao idealne ćelije za tkivni inženjering donjeg urinarnog trakta.⁵³ Slična studija je izvedena od strane druge grupe naučnika koristeći ljudsko potkožno masno tkivo i masno tkivo omentuma. Utvrđeno je da ADSCs izolovane iz potkožnog masnog tkiva imaju veći kapacitet diferencijacije od ADSCs ćelija iz masnog tkiva omentuma i mogu biti dobar izvor za upotrebu u regenerativnoj medicini.⁵⁴

1.4.2. EKTOPIČNA KOST

Reparacija kosti kod eksperimentalnih životinja istraživana je na ektopičnoj osteogenezi i modelima defekta kosti. Obrazovanje ektopične kosti se dešava na vanskeletnim mestima i to najčešće u mišićima i potkožnom tkivu. Ovakvi modeli reflektuju apsolutni osteoinduktivni kapacitet proučavanog materijala.

U eksperimentima *in vivo*, ADSC ćelije su sađene u tkivne nosače u obliku poroznih kocki hidroksiapatit / trikalcijum fosfata i korišćene kao implantat kod imunodeficientnih miševa. Primećeno je da se novi osteoid, porekla humanih ADSC ćelija, javlja posle šest nedelja inkubacije.⁵⁵ Ovaj nalaz ukazuje na to da ADSC ćelije mogu imati značajan terapijski efekat u regeneraciji i reparaciji koštanog tkiva.

1.4.3. TKIVNI INŽINJERING

Pojam tkivnog inženjeringa (TE - *Tissue Engineering*) prvi su uveli Langer i Vacanti 1993.god. kao interdisciplinarnu oblast istraživanja koja primenjuje principe inženjeringa i prirodnih nauka u pravcu razvoja bioloških supstituenata sa ciljem obnove, održavanja ili poboljšanja funkcije tkiva.³⁷

Nagli razvoj nauke u pogledu biomaterijala, matičnih ćelija, faktora rasta i diferencijacije kao i odgovarajuće biološke sredine omogućio je sintezu tkiva u laboratorijskim uslovima na specijalno konstruisanim ekstracelularnim matricama (tkivni nosači) i njihovu upotrebu za regeneraciju i reparaciju tkiva. To podrazumeva sađenje MSCs

na tkivne nosače, njihovu kultivaciju *in vitro* a zatim aplikaciju *in vivo*. Idealni tkivni nosači bi trebalo da obezbede podršku za naseljene ćelije u vidu njihovog pripajanja, proliferacije i diferencijacije kao i formiranje ekstracelularnog matriksa.⁵⁶

Zato je veoma važno da površina tkivnog nosača ima odgovarajući topografski izgled i hemijski sastav, a da sama mikrostruktura tkivnog nosača bude porozna sa odgovarajućim oblikom i veličinom pora.⁵⁷

1.5. EKSPERIMENTALNI MODELI

1.5.1. EKSPERIMENTALNI MODELI NA ŽIVOTINJAMA

Eksperimentalne životinje se rutinski koriste kao *screening* za procenu izvodljivosti hirurških tehnika ili valijabilnosti implantata pre nego što se pređe na humana klinička ispitivanja. U mnogim oblastima istraživanja postoje životinjski modeli koji pokazuju određeni stepen sličnosti sa ljudskim fiziološkim uslovima i bolestima.

Životinje, kao i ljudi, fiziološki i u svojim reakcijama, zavise od svoje biološke konstitucije i sredine. Kao takve, one pokazuju veliki broj varijacija u ekspresiji gena u zavisnosti od životnog doba, pola, fizioloških i genetskih faktora. Ispitivanja na životinjskim modelima su praktičnija i klinički relevantnija od studija *in vitro*.

Eksperimentalne životinje se dele u dve grupe:

- male eksperimentalne životinje (miševi i pacovi)
- velike eksperimentalne životinje (kunići, majmuni, psi, ovce).

Male eksperimentalne životinje se češće koriste za ispitivanje modela kranijalnog defekta zbog niske cene koštanja, lakog održavanja i ne zahtevaju preciznu hiruršku tehniku.

Velike eksperimentalne životinje su mnogo skuplje, zahtevnije za održavanje i mora se upotrebiti precizna hirurška tehnika.

1.5.2. MODEL DEFEKTA KOSTI

Ukupna regenerativna i reparatorna sposobnost testiranog materijala se znatno bolje procenjuje ako se on implantira u samo koštano tkivo. Zato postoji potreba za kreiranjem modela defekata kosti kako bi se omogućila procena osteokonduktivnih i osteoinduktivnih potencijala materijala koji se koriste u tkivnom inženjeringu. Postoji nekoliko vrsta modela defekata kost:

- model sa prekidom kontinuiteta kosti
- model segmentnog defekta kosti
- model kalvarijalnog defekta kosti
- model otvorenog defekta kosti

Regeneracija *in vivo* na modelu kalvarijalnog defekata kosti kritične veličine predstavlja oblast aktivnog istraživanja. Lekari i naučnici kombinuju različite metode i postupke u cilju rešavanja ovih defekata na modelima eksperimentalnih životinja. Ovakvi modeli imaju dosta ograničenja, ali su trenutno naša najbolja opcija.⁵⁸ Odnos vrste životinja i defekta kritične veličine dat je u Tabeli 1.1.

Tabela 1.1. Vrsta eksperimentalnih životinja i kritična veličina kranijalnog defekta

Vrsta životinje	Miš	Pacov	Kunić	Majmun	Pas	Ovca
Defekt kritične veličine	5 mm	8 mm	15 mm	15 mm	20 mm	22 mm

Model kranijalnog defekta za ispitivanje tkivnog inženjeringa kosti obično se kreira na parietalnim kostima lobanje eksperimentalnih životinja. Veličina defekta zavisi od vrste eksperimentalne životinje i može biti kritične veličine (*critical-size*) ili manji od nje u zavisnosti od dizajna eksperimentalne studije koja se izvodi. Najčešće je okruglog oblika, a broj kreiranih defekata na poglavini jedne eksperimentalne životinje zavisi od njene veličine.

Prilikom kreiranja defekta, ukoliko se uklanja puna debljina kosti, mora se voditi računa da moždane ovojnice ostanu intaktne uz poštovanje svih principa asepsa i antiseptike.

1.6. POSTAVKA PROBLEMA

Adultne stem ćelije, poznate i kao mezenhimske stem ćelije (MSCs), su nediferentovane multipotentne ćelije u tkivu ili organu, koje služe za održavanje njihovog integriteta i reparaciju. Posebno bogat izvor mezenhimskih stem ćelija (MSC) je masno tkivo, koje je široko rasprostranjeno u organizmu u većini organa. Neželjeni efekti u kliničkim aplikacijama MSCs iz masnog tkiva nisu poznati, a njihova pluripotentnost je uporediva sa pluripotentnošću embrionalnih SC.

Mesenchymal stem cells (MSCs) se mogu diferencirati u osteoblaste i tako mogu biti izvor ćelija za koštanu regeneraciju i reparaciju. U poređenju sa stromalnim ćelijama koštane srži (*Bone-marrow stromal cells* - BMSCs), *Adipose tissue-derived stem cells* (ADSCs) imaju velike prednosti za kliničku primenu, uključujući lako i manje bolno izolovanje, manji rizik od komplikacija, relativnu obilnost izvora, kao i brzinu ekspanzije.

U biološkom redosledu događaja, tokom procesa osteogeneze, angiogeneza je njegov prethodni stadijum i uslov da do osteogeneze dođe. U sekretornom repertoaru masnog tkiva je i više proizvoda koji stimulišu angiogenezu i vaskulogenezu. Pokazano je da i ADSCs imaju potencijal da podstiču oba navedena procesa.

Koštana regeneracija uz pomoć MSCs biva ograničena njihovim malim brojem kada se koriste za transplantaciju *in vivo*. Jedan od načina da se prevaziđe ovaj problem malobrojnosti MSCs za transplantaciju je da se njihov broj uveća *ex vivo*. Sa druge strane, takav pristup rađa nove probleme među kojima je da *ex vivo* ekspanzija može da ograniči životni vek ovih ćelija i da dovede do gubitka njihovog osteogenog potencijala.

Mnogi autori su gajili komplekse ćelija *in vitro*, a potom ih implantirali natrag, u cilju tretiranja defekata kostiju.⁵⁷ Uloga zasejavanja ćelija, *in vitro*, u tkivnoj regeneraciji predstavlja nerešeno pitanje. Pitanje ostaje otvoreno i da li je samo podloga ili podloga modifikovana faktorima rasta dovoljna za koštanu regeneraciju. Pošto je pokazano da hidroksiapatitna sredina, kao i kost, mogu biti dobra mikrosredina za diferencijaciju prema

osteoblastima, pretpostavljeno je da se ADSC ćelijama u takvoj sredini i u organizmu, gde bi vladali fiziološki uslovi, može obezbediti njihova diferencijacija u ćelije kosti. Takođe, zapaženo je u sopstvenoj praksi da masno tkivo može da bude dobar graft u postcističnim defektima kosti sa razvojem u novo koštano tkivo, što je bio jedan od motiva da se primeni postupak formiranja graftova od originalnih ćelija adipoznog tkiva, bez prethodne *in vitro* kultivacije.

Reparacija koštanih defekata koji su nastali kao posledica traume, resekcije tumora ili kongenitalnih anomalija još uvek je veliki izazov za hirurge. U novije vreme, tkivni inženjering (TE) je pristup koji dosta obećava u regeneraciji kosti, što podrazumeva da se koriste matične ćelije, instruktivni molekuli i biomaterijali kao tkivni *scaffold* ili nosač za ćelije i molekule.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Na modelu defekta kalvarije kunića ispitati ulogu u regeneraciji defekta kosti:

1. Masnog tkiva primenjenog na dva načina:
 - a. izolovanjem mezenhimske frakcije ćelija bez prethodne kultivacije in vitro
 - b. usitnjenog celog masnog tkiva

2. Različitih nosača ćelija i tkiva:
 - a. komercijalni zamenik kosti (*Bio-oss*)
 - b. nanomaterijal PLGLA

Uloga masnog tkiva i nosača ćelija i tkiva će se procenjivati:

1. na osnovu dinamike regenerativnog procesa u prva dva meseca
2. primenom različitih metoda (merenjem denziteta kosti, MSCT, izradom histoloških preparata, SEM)

Cilj rada je kompletnije sagledavanje mehanizama interakcije između ćelija masnog tkiva i njihovih produkata sa jedne strane i biomaterijala koji se koriste kao zamenici kosti, sa druge strane. Koristeći biološke materijale koji su lako dostupni, a na način koji ne zahteva komplikovanu pripremu, cilj je da se uradi jednostavna procedura u stimulanju koštane regeneracije koja bi mogla lako da se izvede u svakoj hiruškoj sali i bez posebnih tehničkih zahteva.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

U eksperimentu su korišćeni zečevi soja *Chinchilla* muškog pola, starosti 3 meseca, težine od 3-3,5 kg. Eksperimentalne procedure su sprovedene uz dozvolu Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta br. 01-890-3. Životinje su čuvane u odvojenim kavezima u vivarijumu Instituta za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu u ambijentu temperature 22⁰ C i 12/12 h ciklusu svetla i mraka. Hranjene su *ad libidum* briketima za kuniće (smeša K sa 16% proteina – Veterinarski zavod „SUBOTICA“ a.d. Subotica). Životinje nisu hranjene dan pre hiruških intervencija.

3.2. IMPLANTATI I GRAFTOVI

Pod imlantatom su podrazumevani preparati čistog biomaterijala (*Bio-Oss*® ili nano-kompozitnog materijala), a pod grafovima mešavinu navedenih biomaterijala sa tkivima i komponentama tkiva.

Biomaterijal *Bio-Oss*® *Osteohealth, Shirley, USA* (Slika 3.1) je proizveden od mineralnog matriksa goveđe kosti. Veličina granula je 0.25-1.0 mm. Namenjen je za supstituciju kosti u oralnoj, periodontalnoj i maksilofacijalnoj hirurgiji.



Slika 3.1. Komercijalno pakovanje *Bio-Oss*®

Nano-kompozitni materijal (NPs CP/PLGA) u formi praha (dobijen ljubaznošću prof. N.Ignjatovića, ITN SANU) se sastoji od nano čestica kalcijum fosfata koje su obložene polimerom (poli-laktid-ko-glikolid-om) u masenom odnosu 8:2. Srednja vrednost čestica nano-kompozitnog materijala bila je 40 ± 5 nm u promeru⁵⁹.

Svi graftovi su u sastavu imali autolognu, sveže uzetu, punu krv dobijenu punkcijom ušne vene. Krv je mešana kao završna komponenta grafta, jer je nakon zgrušavanja imala funkciju vezivne komponente u formiranju grafta.

Za pripremu grafta sa izolovanim ćelijama (ADSCs) korišćeno je 100 mg masnog tkiva u koje se doda 37,5 μ l rastvora kolagenaze I (2000 jedinica/1 ml). Ependorfice se ostavljaju u vodenom kupatilu narednih 60 min. na temperaturi od 37⁰ C pri čemu se uzorci u njima povremeno mućkaju. Nakon isteka vremena, digestija se prekida dodavanjem 375 μ l hranjivog medijuma (DMEM) i uzorci vraćaju u vodeno kupatilo još 10 min. Iz vodenog kupatila uzorci se premeštaju u frižider u trajanju od 5 min kako bi se izbeglo adheriranje ćelija za zidove suda u kome se nalaze. Razloženo tkivo se zatim, uz pomoć pipetora, propušta kroz sito (veličina pora 180 μ m) za šta se upotrebi još 1 ml DMEM-a da bi se ćelije iz ependorfica i sa sita isprale.

Suspenzija ćelija se centrifugira 10 min (1000 obr/min) na temperaturi od 4⁰ C pri čemu adipociti ostaju na vrhu suspenzije a multipotentne ćelije na dnu. Iz ovakog medijuma uzima se 30 μ l suspenzije sa vrha, ukloni se središnji deo medijuma, uzme 30 μ l suspenzije sa dna (ukupno 60 μ l što odgovara jednoj kapi) i ćelije do implantacije drže na ledu.

Graft sa izolovanim ćelijama masnog tkiva se priprema od 60 μ l ćelijske suspenzije ovog tkiva, 30 mg sterilnog *Bio-Oss*® ili nano-kompozitnog materijala u zavisnosti od grupe

eksperimentalnih životinja i 60 µl krvi. Označen je kao ADSC (mezenhimske ćelije masnog tkiva).

Graft sa komadićima masnog tkiva se priprema od 60 mg iseckanog masnog tkiva, 30 mg sterilnog *Bio-Oss*®-a ili nano-kompozitnog materijala i 60 µl krvi. Označen je kao CAT (eng. *Cut Adipose Tissue* - seckano masno tkivo).

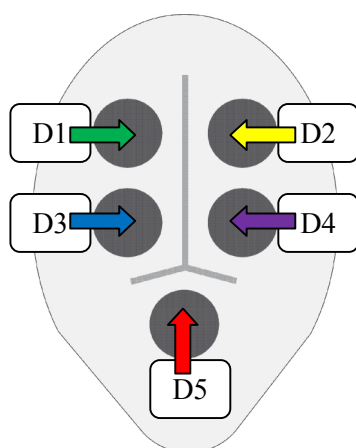
Graft koji je služio kao kontrola nosača za prethodna dva grafta je pripreman od 90 mg sterilnog *Bio-Oss*®-a ili nano-kompozitnog materijala i 60 µl krvi. Označen je kao BC (eng. *Blood Cells* – krvne ćelije -puna krv).

Za pripremu implanta korišćeno je, u zavisnosti od grupe eksperimentalnih životinja, 90 mg sterilnog *Bio-Oss*® ili nano-kompozitnog materijala na koje se u sterilnoj Petrijevoj posudici nakape 60 µl sterilnog fiziološkog rastvora tako da se dobije konzistencija paste. Označeni su kao BO (*Bio-Oss*®) i NM (nano-kompozitni materijal).

3.3. EKSPERIMENTALNI DIZAJN

U eksperimentu je korišćeno ukupno dvadeset eksperimentalnih životinja podeljenih u četiri grupe - po pet životinja u svakoj. U prvoj i trećoj grupi kao nosač izolovanih ćelija korišćen je *Bio-Oss*, a u drugoj i četvrtoj grupi za nosač je upotrebljen nano-kompozitni materijal.

Na kalvariji svakog kunića pravljena su pet defekata sa rasporedom prema priloženoj šemi (Šema 3.1), obeleženih kao D1 - D5. Po dva defekta smeštena su na parijetalnoj kosti obostrano od medijalne linije, a peti na frontalnoj kosti u nivou medijalne linije. Defekti su pravljeni čeličnim borerom obrnuto-koničnog profila dijametra 4 mm uz upotrebu fiziodispenzera (*SURGIC XT – NSK*) pri brzini od 800 obr/min. Svaki od koštanih defekata bio je okruglog oblika, 8 mm u prečniku i dubine 2 mm. Učinjeni defekti ispirani su sterilnim fiziološkim rastvorom pre njihovog popunjavanja. Nakon popunjavanja defekata vršena je repozicija periosta, režanj vraćao na svoje mesto i ušivao pojedinačnim šavovima.



Šema 3.1. Raspored kreiranja defekata na kalvariji kunića

Kod prve i treće grupe eksperimentalnih životinja popunjavanje defekata vršeno je na sledeći način:

D1 je ispunjen graftom od BO-ADSC (*Bio-Oss* + mezemhimske ćelije masnog tkiva).

D2 je ispunjen graftom BO-CAT (*Bio-Oss* + seckano masno tkivo).

D3 je ispunjen implantatom BO (*Bio-Oss*).

D4 je ispunjen graftom BO-BC (*Bio-Oss* + puna krv).

D5 je ostao nepopunjen, obeležen je sa SR (spontana regeneracija) i služio je kao negativna kontrola.

Kod druge i četvrte grupe eksperimentalnih životinja popunjavanje defekata vršeno je na sledeći način:

D1 je ispunjen graftom od NM-ADSC (nanomaterijal + mezemhimske ćelije masnog tkiva).

D2 je ispunjen graftom NM-CAT (nanomaterijal + seckano masno tkivo).

D3 je ispunjen implantatom NM (nanomaterijal).

D4 je ispunjen graftom NM-BC (nanomaterijal + puna krv).

D5 je ostao nepopunjen, obeležen je sa SR (spontana regeneracija) i služio je kao negativna kontrola.

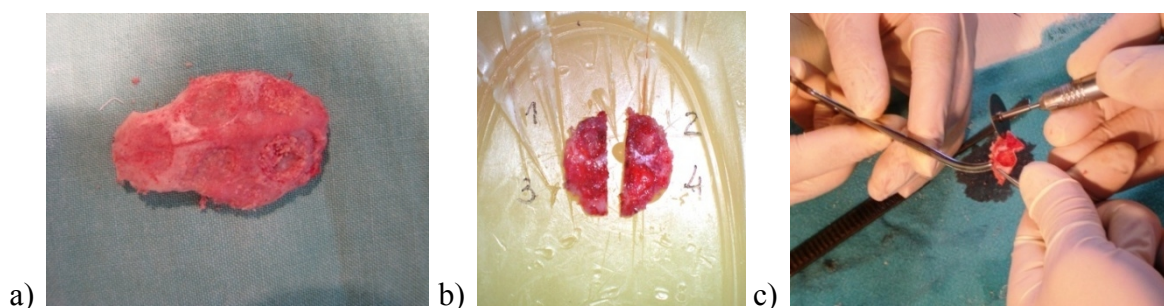
Polovina od ukupnog broja životinja (I i II grupa) žrtvovana je nakon četiri nedelje, a ostatak (III i IV grupa) nakon osam nedelja od popunjavanja defekata (Tabela 3.1). Kunići su

žrtvovani aplikacijom LD doze ZOLETIL R 50 (2 ml/kg telesne mase, tj. 100 mg/kg telesne mase).

Tabela 3.1. Prikaz eksperimentalnih grupa prema tipu nosača ćelija sa terminima žrtvovanja životinja.

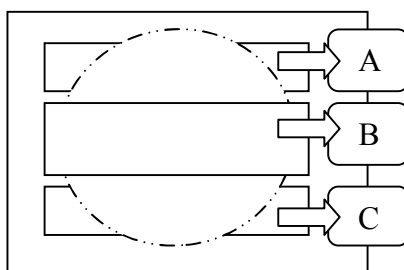
Grupe	Implantirani materijal	IV nedelja	VIII nedelja
I grupa 1 - 5	Mikropartikule hidroksiapatita(<i>BioOss</i>)	žrtvovanje	
II grupa 6 – 10	Nano-kompozitni materijal (NPs CP/PLGA)	žrtvovanje	
III grupa 11 - 15	Mikropartikule hidroksiapatita(<i>BioOss</i>)		žrtvovanje
IV grupa 16 - 20	Nano-kompozitni materijal (NPs CP/PLGA)		žrtvovanje

Nakon žrtvovanja, kod svake eksperimentalne životinje izdvojen je deo kalvarijalne kosti koji je u sebi sadržao svih pet defekata (Slika3.2-a). Defekti su zatim međusobno razdvajani dijamantskom šajbnom (Slika3.2-b,c).



Slika 3.2. a) kalvarijalna kost sa defektima; b) međusobno razdvojeni defekti dijamantskom šajbnom; c) uzimanje uzoraka iz defekta za histološku i SEM analizu.

Iz svakog defekta uzimana su po tri pravougaona uzorka grafta odnosno implantata od kojih je srednji (B) korišćen za histološku, a druga dva (A i C) za SEM (eng. *Scanning electron microscopic analysis*) analizu (Šema 3.2).



Šema 3.2. Kreiranje tri pravougaona uzorka implantiranog materijala za histološku (B) i SEM (A i C) analizu.

Efekat stvaranja koštanog tkiva u načinjenim defektima i njegova gustina praćeni su radiografski uz pomoć Multislajsne kompjuterizovane tomografije (MSCT – 64 skenera) (Slika 3.3) i to I, III i VI nedelje od popunjavanja defekata.



Sl.3.3. CT scanner 64-slice

3.4. ANESTEZIOLOŠKA I OPERATIVNA PROCEDURA

Svi kunići podvrgnuti su istim hirurškim procedurama. Na svakoj životinji urađene su dve hirurške intervencije. Prva je urađena sa ciljem da se uzme parče masnog tkiva za dalji tok eksperimenta, a u drugoj su kreirani defekti na kalvariji kunića i vršena implantacija materijala.

3.4.1. UZIMANJE MASNOG TKIVA

U toku prve intervencije, pripremi se interskapularna regija za uzimanje potkožnog mrkog adipoznog tkiva uklanjanjem dlaka brijačem i premazivanjem kože Povidon-jod alkoholnim rastvorom. Subkutano, u pomenutoj regiji, aplikuje se lokalni anestetik (2 ml *Lidocain 2% cum Noradrenalin*), a zatim napravi incizija kože u kranio-kaudalnom pravcu u dužini od 3cm (Slika 3.4). Tupom i oštrom preparacijom pristupi se uzimanju oko 0,5 cm³ masnog tkiva.



Slika 3.4. Uzimanje masnog tkiva iz interskapularne regije eksperimentalne životinje

Masno tkivo se stavi u sterilnu epruvetu u kojoj se nalazi 5 ml hranjivog medijuma. Načinjena rana se posle korektno hemostaze zatvori pojedinačnim šavovima. Iz uzetog masnog tkiva se tokom narednih dva sata pripreme graftovi za popunjavanje koštanih defekata.

3.4.2. FORMIRANJE I POPUNJAVANJE KALVARIJALNOG DEFEKTA

U pripremi za drugu hiruršku intervenciju kunići se uvode u opštu anesteziju intramuskularnom aplikacijom Tiletamin hidrohlorid + Zolazepam (*ZOLETIL^R 50*) u dozi od 0,5 ml/kg t.m. (25 mg/kg t.m.) čime se obezbedi dejstvo anestezije u trajanju od 60 min. minimalno. U slučaju potrebe dužeg rada, anestezija se održava aplikacijom 1/3 inicijalne doze.

Nakon uvođenja u anesteziju uklone se dlake sa parijetalne i frontalne regije glave i koža očisti dezinfekcionim rastvorima. Zatim se incizijom kože zajedno sa periostom polu-

lučnim rezom obostrano od medijalne linije formira režanj sa vrhom usmerenim napred i bazom pozadi (Slika3.5), isti odigne i oslobodi kalvarijalna kost .



Slika 3.5. Odizanje mukoperiostalnog režnja na kalvariji kunića i popunjavanje defekata pripremljenim graftovima i implantima.

Na eksplorisanoj spoljašnjoj površini kalvarije obeležavaju se mesta budućih defekata i isti kreiraju čeličnim borerom obrnuto-koničnog profila dijametra 4 mm uz upotrebu fiziodispenzera (*SURGIC XT – NSK*) pri brzini od 800 obr/min. Svaki od koštanih defekata bio je okruglog oblika, 8 mm u prečniku i dubine 2 mm. Učinjeni defekti ispirani su sterilnim fiziološkim rastvorom pre njihovog popunjavanja. Nakon korektne hemostaze vršeno je popunjavanje defekata, režanj vraćao na svoje mesto i ušivao pojedinačnim šavovima.

U postoperativnom toku nisu ordinirani antibiotici. Životinje su čuvane po ustaljenoj proceduri u ambijentu temperature 22⁰ C i 12/12 h ciklusu svetla i mraka. Sve rane zarasle su *per primam* bez komplikacija, tako da nijedna životinja nije izgubljena. Konci su uklanjani desetog postoperativnog dana.

3.5. HISTOLOŠKA ANALIZA

Za histološke i histoheмиjske analize isečeni su uzorci graftova i implantata sa delom okolne zdrave kosti i fiksirani u 10 % formalinu sa fosfatnim puferom. Fiksacija je ključna za prezervaciju tkivne strukture i sprečavanje ćelijske autolize od strane enzima, ćelijske razgradnje, degradacije tkiva i degeneracije proteina. Formaldehid obrazuje unakrsne veze između susednih proteinskih lanaca i ćelije čini pogodnim za bojenje. Graft odnosno implantat je dekalциfikovan u 10% EDTA kako bi se uklonile neorganske komponente iz tkiva i olakšalo njihovo sečenje za histološku i histoheмиjsku analizu.

Fiksirana i dekalциfikovana tkiva su dalje dehidrirana postepeno do apsolutnog etanola i isprana ksilenom, a onda ukalupljena u parafin i na mikrotomu (*LEICA RM2255, GERMANY*) sečena na debljinu oko 3-5 μm .

3.6. HISTOHEMIJSKA BOJENJA

3.6.1. HEMATOKSILIN – EOZIN BOJENJE (HE)

Hematoksilin – eozin (HE) je standardna histološka metoda bojenja. Hematoksilin je bazna boja koja boji jedra ćelija plavo. Eozin je kisela boja koja boji bazofilne strukture različitim nijansama roze, crvene ili narandžaste boje.

Postupak:

Deparafinizovani uzorci držani su u ksilolu 15 – 30 minuta a zatim isprani opadajućim koncentracijama etanola, prvo 100% a zatim 95%. Uzorci su zatim ispirani u destilovanoj vodi u trajanju od 5 minuta. Uzorci su osušeni i bojени prvo Hariss-ovim hematoksilinom u trajanju od 10 minuta a nakon ispiranja bojени su rastvorom eozina u trajanju od 10 minuta. Nakon ispiranja destilovanom vodom i rastućim koncentracijama etanola, 95% pa 100%, uzorci su osušeni a zatim ostavljeni da stoje u ksilolu 5 – 10 minuta. Za pravljenje trajnih preparata korišćen je kanada-balzam.

3.6.2. BOJENJE TOLUIDIN PLAVIM

Toluidin plavo (TB - eng. *Toluidin blue*) je plava katjonska boja koja se često koristi u histologiji za bojenje proteoglikana i glikozaminoglikana u tkivima.

Postupak:

Deparafinizovani uzorci držani su u ksilolu 15 - 30 minuta, isprani opadajućim koncentracijama etanola, prvo 100% a zatim 95%, a zatim ispirani u destilovanoj vodi u trajanju od 5 minuta. Uzorci se zagreju u termostatu a zatim boje rastvorom toluidin plavog i natrijum-tetraborata u trajanju od 1 - 2 minuta. Nakon ispiranja destilovanom vodom i rastućim koncentracijama etanola, 95% pa 100%, uzorci su osušeni a zatim ostavljeni da stoje u ksilolu 5 - 10 minuta. Za pravljenje trajnih preparata korišćen je kanada-balzam.

3.7. SEM ANALIZA

Za SEM (eng. *Scanning electron microscopic analysis*) analizu uzorci tkiva su pripremljeni fiksiranjem u 0.4% gluteraldehidu 24 sata, posle čega su ispirani 0.2M PBS-u (pH 7.2 - 7.4). Postfiksacija je vršena sa 1% osmium tetroksidom u veronalnom puferu (pH 7.2 - 7.4) tokom 2 sata. Fiksirani uzorci su dehidrirani u rastućim koncentracijama alkohola, a zatim u rastućim koncentracijama acetona. Dehidrirani uzorci su sušeni u tečnom CO₂. Osušeni uzorci su zlatom spaterovani u jonskom naparivaču JFC 1100E JEOL. Mikrostruktura površine uzoraka ispitivanih biomaterijala, pre i posle implantiranja, analizirana je skening elektronskom mikroskopijom na uređaju JSM 5300 JEOL.

3.8. STATISTIČKE METODE

Kvantitativna statistička analiza je sprovedena na računaru. Za upisivanje, rangiranje, grupisanje, tabelarno i grafičko prikazivanje podataka korišćen je *Excel* program iz *Microsoft Office 2007* programskog paketa. Proračuni su vršeni korišćenjem SPSS programa u verziji 18.0.

Za poređenja srednjih vrednosti procenta koštane gustine u odnosu na zdravu kost kod istih vrsta rupa i kod istog vremena zarastanja, a između dve različite vrste nosača korišćen je Studentov t - test za nezavisne uzorke. Za poređenja srednjih vrednosti procenta koštane gustine u odnosu na zdravu kost kod istih vrsta rupa i kod iste vrste nosača, a između tri različita vremena zarastanja korišćena je jednostrana analiza varijanse (*One-way ANOVA*) sa naknadnim Tukijevim testom (*Tukey post hoc test*).

U analizi je kao granica statističke značajnosti podrazumevana greška procene manja od 5% ($p < 0.05$).

4. REZULTATI

4.1. KLINIČKA OPSERVACIJA

4.1.1. OPIS STANJA ŽIVOTINJA PRED ŽRTVOVANJE

Obe grupe eksperimentalnih životinja, bez obzira na tip nosača u graftovima (*Bio-Oss* ili nanomaterijal), dobro su podnele postoperativni tok kao i vremenski period do termina određenih za žrtvovanje. U periodu od četiri, odnosno osam nedelja od ugradnje planiranih graftova i implantata, nijedna od životinja nije izgubila na težini niti je uočena promena u ponašanju u odnosu na preoperativni period. U postoperativnom toku nisu ordinirani antibiotici. Pojava dehiscencije operativnih rana, znakova infekcije ili odbacivanja graftova i implantata nije uočena. Kod svih životinja rane su zarasle *per primam intentionem*.

4.1.2. MAKROSKOPSKI IZGLED KALVARIJE ISPOD PERIOSTA

4.1.2.1. Izgled popunjenih defekata posle četiri nedelje – nosač *Bio-Oss*

Odizanjem režnja na pglavini, četiri nedelje posle popunjavanja defekata pripremljenim graftovima i implantatima, uočava se da je vezivno tkivo uraslo, kako u implantirani biomaterijal sva četiri defekta, tako i u peti koji je ostao nepopunjen. Režanj se na tim mestima veoma teško odvajao pa je često puta bila potrebna upotreba oštne disekcije nožem. Takođe je uočena razlika u međusobnom izgledu defekata. Površina defekata ispunjenog graftom BO-ADSC bila je neznatno iznad nivoa okolne zdrave kosti, površina defekata ispunjenog graftom BO-BC u nivou okolne zdrave kosti, površine defekata

ispunjenih graftom BO-CAT i implantatom BO pokazale su blago udubljenje u odnosu na zdravu kost, dok je kontrolni defekt (SR) imao značajno levkasto udubljenje.



Slika 4.1. a) odizanje mukoperiostalnog reznja; b) izdvajanje kalvarijalne kosti zajedno sa popunjenim defektima; c) uklonjena kalvarija – izgled nakon propuštanja svetlosnog zraka iz veštačkog izvora.

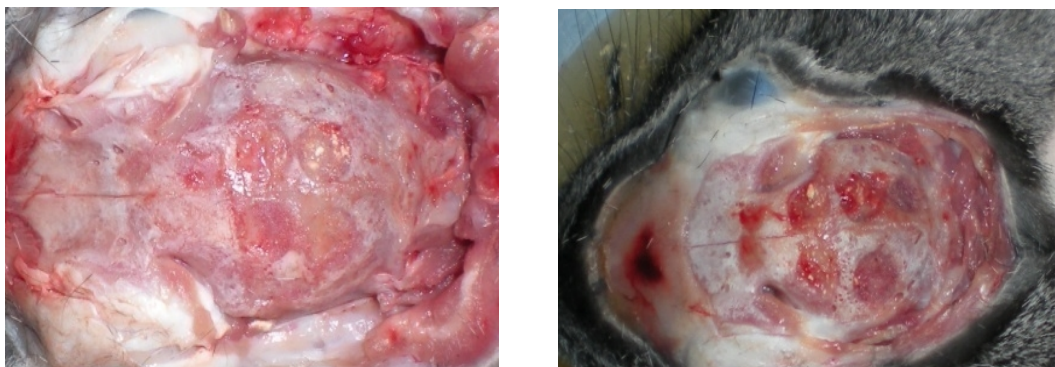
Defekt ispunjen BO-ADSC na površini pokazuje zrnastu strukturu ružičasto - crvene boje sa belim tačkama koje najverovatnije potiču od partikula *Bio-Oss*-a. Ovakva zrnasta struktura površine dobro je izražena i u defektu BO, značajno se smanjuje u defektima BO-CAT i BO-BC, dok u defektu SR pokazuje potpuno odsustvo. Defekt ispunjen BO-CAT jasno se razlikuje od ostalih defekata zbog prisutne žute prebojenosti na površini, što verovatno potiče od masnog tkiva u tom graftu. Svi popunjeni defekti pokazivali su kompaktnu konzistenciju i otpor na pritisak bez tendencije ugibanja površine.

Posle uklanjanja kompletne kalvarije i propuštanja veštačke svetlosti kroz preparat (Slika 4.1-c) najmanju prozirnost pokazuje defekt ispunjen BO-ADSC, koja je približna onoj kod zdrave kosti. Defekt ispunjen BO-CAT pokazuje povećanu propustljivost za svetlost samo u središnjem delu, kontrolni SR blago smanjenu propustljivost na celoj površini defekta, dok defekti ispunjeni BO i BO-BC pokazuju izrazitu propustljivost za svetlost u najvećem delu površine defekta.

4.1.2.2. Izgled popunjenih defekata posle četiri nedelje – nosač nanomaterijal

Posle četiri nedelje od popunjavanja defekata pripremljenim graftovima i implantatima, defekti u kojima je kao nosač korišćen nanomaterijal, pokazuju razlike u izgledu u odnosu na defekte sa *Bio-Oss*-om kao nosačem. Površina ovih defekata je bledo-ružičasta, dok se defekt ispunjen NM-CAT razlikovao od ostalih po tome što je zadržao žućkastu prebojenost (Slika 4.2). Kod svih defekata manje je izražena zrnasta struktura na

površini, ali se zato jasno uočava pojava nagomilavanja nanomaterijala u vidu “grudvica” i to naročito u defektu ispunjenom NM.

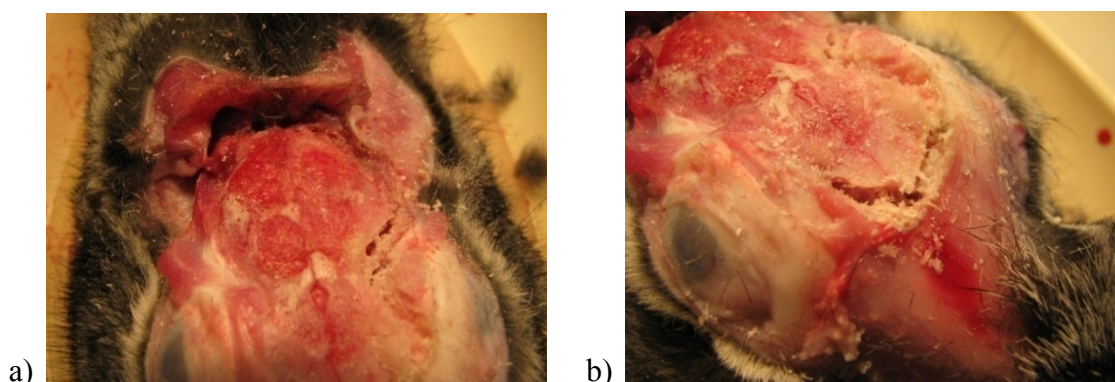


Slika 4.2. Izgled kalvarije i popunjenih defekata posle 4 nedelje - nosač nanomaterijal.

Površina defekta ispunjenog graftom NM-ADSC bila je uglavnom u nivou okolne zdrave kosti, površine defekata ispunjenih graftovima NM-CAT i NM-BC su bile blago udubljene u odnosu na okolnu zdravu kost kalvarije, dok su površine defekta ispunjenog implantatom NM i defekta u kome se odvijala spontana regeneracija (SR) vidljive u obliku značajnog levkastog udubljenja (Slika 4.2).

4.1.2.3. Izgled popunjenih defekata posle osam nedelja – nosač *Bio-Oss*

Posle osam nedelja od popunjavanja defekata pripremljenim graftovima i implantatima sa *Bio-Oss* nosačem primetna je razlika u boji i strukturi njihovih površina (Slika.4.3-a).



Slika 4.3. Izgled kalvarije i popunjenih defekata posle 8 nedelja sa *Bio-Oss* nosačem: a) nakon odizanja periosta; b) zrnasta struktura površine defekata ispunjenih BO-ADSC i BO-CAT

Defekti popunjeni graftovima BO-ADSC, BO-CAT, BO-BC i implantatom BO pokazuju ružičasto-crvenu prebojenost, dok je jedino površina defekta SR bledo ružičasta

(Slika 4.3-a). Jasna granica prema okolnoj zdravoj kosti vidi se samo kod defekta ispunjenog implantatom BO. Površine defekata ispunjenih graftovima BO-ADSC i BO-CAT zadržale su zrnastu strukturu (Slika 4.3-b), ali je ona znatno manje uočljiva u odnosu na period nakon četiri nedelje. Defekti BO, BO-BC kao i defekt SR pokazuju manji nivo ispunjenosti u odnosu na nivo okolne zdrave kosti sa blagim levkastim centralnim udubljenjem.

4.1.2.4. Izgled popunjenih defekata posle osam nedelja – nosač nanomaterijal

Osam nedelja posle popunjavanja defekata graftovima i implantatima sa nanomaterijalom kao nosačem, vidljiva je žuta prebojenost površine defekta ispunjenog graftom NM-CAT, zrnasta struktura površine svih defekata se gubi, a samo površine defekata NM, NM-BC i SR pokazuju neznatno smanjenu ispunjenost u odnosu na okolnu zdravu kost (Slika 4.4).

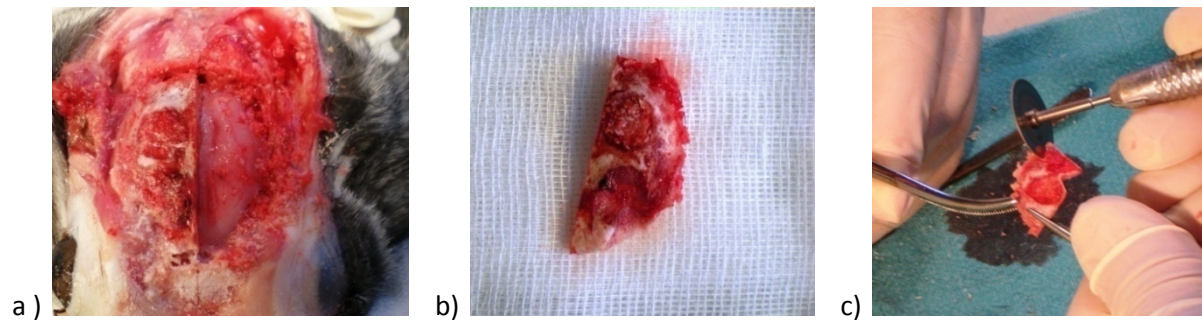


Slika 4.4. Izgled kalvarije sa popunjenim defektima posle 8 nedelja - nosač nanomaterijal.

Po izgledu i teksturi defekt ispunjen NM-ADSC je sličan okolnoj zdravoj kosti tako da je granica između njih veoma teško uočljiva.

4.1.3. POPREČNI PRESEK POPUNJENIH DEFEKATA KALVARIJE KUNIČA

Prilikom pravljenja preparata za dalje analize defekti sa kalvarije su uklanjani u celosti zajedno sa okolnom zdravom kosti (Slika.4.5).



Slika 4.5. a) uklanjanje kalvarijalne kosti uz očuvanje moždanih ovojnica; b) kalvarijalna kost sa grafitiranim defektima c) uzimanje uzoraka za histološku i SEM analizu dijamantskom šajbom.

4.1.3.1. Izgled poprečnih preseka defekata posle 4 nedelje – nosač *Bio-Oss*

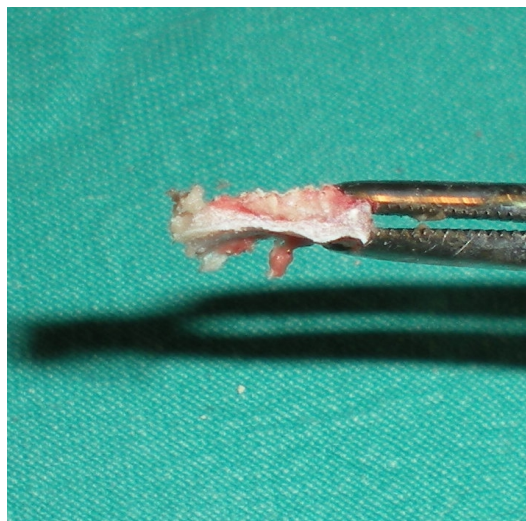
Posle četiri nedelje od popunjavanja defekta BO-ADSC graftom, prilikom pravljenja preparata, konstantovano je da graft, u toku sečenja dijamantskom šajbom, daje značajan otpor nalik otporu okolne zdrave kosti (Slika 4.6).



Slika 4.6. Poprečni presek defekata popunjenog BO-ADSC posle 4 nedelje.

Gornja površina grafta prati polulučni oblik kalvarije i neznatno prominira u odnosu na površinu okolne zdrave kosti. Boja je u većem delu ružičasto - crvena, dok se u centralnom delu grafta vidi beličasto polje. Na površini grafta vide se pojedinačne partikule *Bio-Oss*-a. Graft je vrlo čvrsto spojen za dno i bočne površine defekta okolne zdrave kosti tako da ga je nemoguće mehanički odvojiti od njih.

Posle četvrte nedelje od popunjavanja defekta BO-CAT graftom, u toku sečenja preparata dijamantskom šajbnom, konstantuje se znatno slabiji otpor u odnosu na defekt ispunjen BO-ADSC kao i na okolnu zdravu kost (Slika 4.7).



Slika 4.7. Poprečni presek defekta ispunjenog graftom BO-CAT posle 4 nedelje.

Granica između okolne zdrave kosti i grafta je jasno uočljiva. Graft je u gornjoj trećini blede ružičaste boje i prati krivinu kalvarije dok donje dve trećine pokazuju žutu prebojenost. U celini je kompaktan i intimno prianja za okolnu zdravu kost.

Posle četiri nedelje od popunjavanja defekta, implantat BO daje relativno dobar otpor na sečenje dijamantskom šajbnom. U gornjoj trećini graft je blede ružičaste boje a njegova površina je blago ispod nivoa okolne zdrave kosti (Slika.4.8).



Slika 4.8. Poprečni presek defekta popunjenog implantatom BO posle 4 nedelje.

Donje dve trećine grafta su na preseku bledo ružičaste do bele boje i primetna su nagomilavanja granula *Bio-Oss*-a u vidu grudvica. Granica između okolne zdrave kosti i implantata je jasno uočljiva ali sam implantat nije moguće odvojiti od defekta u kosti.

Posle četiri nedelje od popunjavanja defekta graftom BO-BC, graft daje dobar otpor na sečenje dijaminskom šajbnom. Ceo je homogen, čvrsto spojen za okolnu zdravu kost i od nje se razlikuje samo po boji (Slika 4.9).



Slika 4.9. Poprečni presek defekta popunjenog graftom BO-BC posle 4 nedelje.

Gornje dve trećine grafta su blede-crvene boje sa vidljivim okruglim poljima bele boje u promeru od 1 mm dok je njegova donja trećina izrazito bele boje. Površina grafta je ispod nivoa okolne zdrave kosti i pokazuje blago levkasto udubljenje u odnosu na zdravu kost.

Defekt SR, koji je ostao prazan i u kome se odvijala spontana regeneracija, služio je kao kontrola ostalim graftovima i implantatima. Posle četiri nedelje, po boji i teksturi, odgovara okolnoj kosti sa izrazitim levkastim udubljenjem u središnjem delu. Veoma je tanak i lak za sečenje.

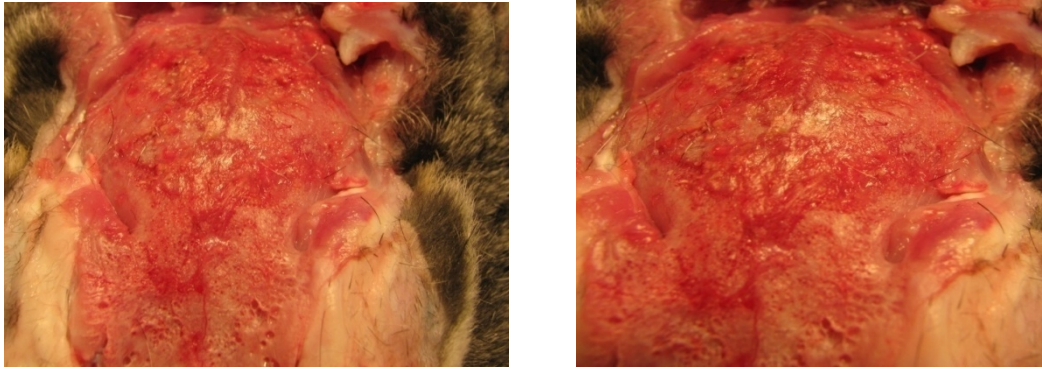
4.1.3. 2. Izgled poprečnih preseka defekata posle 4 nedelje –nosač nanomaterijal

Posle četiri nedelje od popunjavanja defekta NM-ADSC graftom, konstantovano je da sam graft, u toku sečenja dijamantskom šajbnom, daje slabiji otpor od okolne zdrave kosti. Graft je na poprečnom preseku ružičasto crvene boje, nalik na dobro prokrvljenu spongioznu kost, a površina ispod nivoa oklone zdrave kosti. Granica prema defektu nije lako uočljiva.

Defekti ispunjeni NM-CAT i NM-BC graftovima kao i NM implantatom i SR su izrazito tanki i laki za sečenje, blede ružičaste do bele boje, izuzev NM-CAT grafta koji pokazuje žućkastu prebojenost. Površine svih ispuna su ispod nivoa zdrave kosti

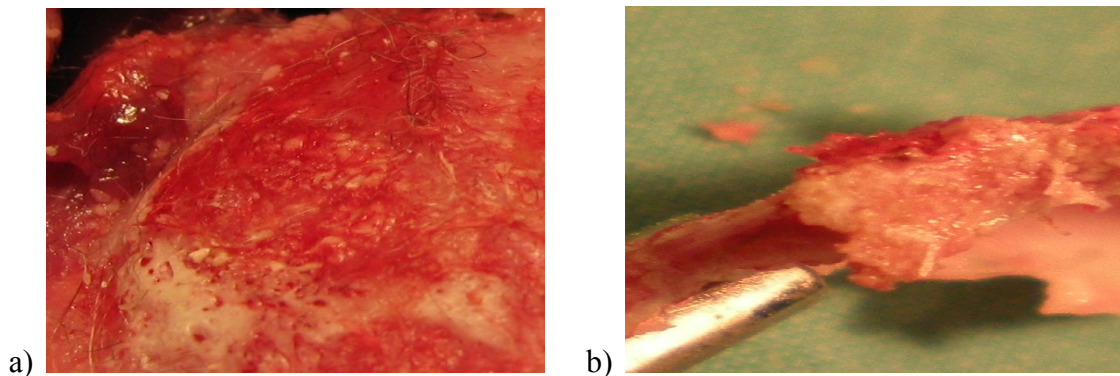
4.1.3.3. Izgled poprečnih preseka defekata posle 8 nedelja –nosač *Bio-Oss*

Defekti popunjeni graftovima BO-ADSC, BO-CAT i BO-BC u potpunosti su ispunjeni novostvorenom kosti i veoma teško se razlikuju od okolne zdrave kosti. Defekt ispunjen BO implantatom pokazuje neravnu površinu i udubljenje u centru implantata, dok defekt sa SR po svom izgledu odgovara okolnoj kosti sa prisutnim levkastim udubljenjem (Slika 4.10)



Slika 4.10. Izgled kalvarije kunića 8 nedelja nakon popunjavanja pet arteficialno načinjenih defekata u kojima je kao nosač korišćen *Bio-Oss*.

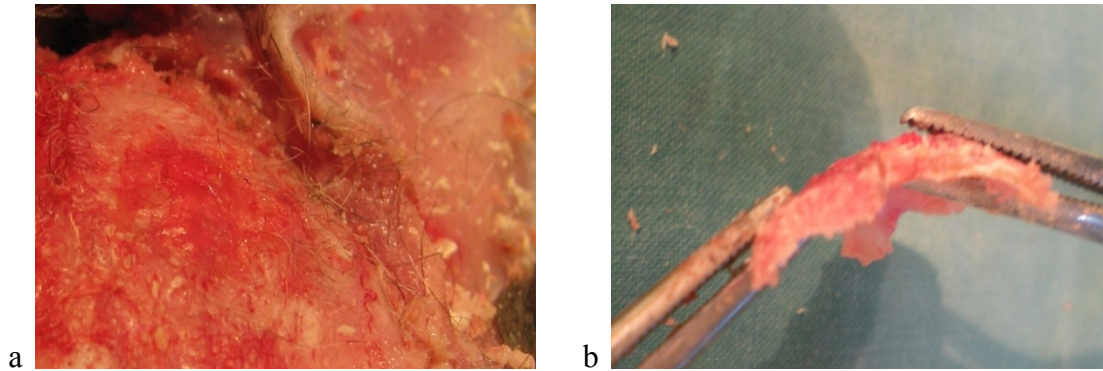
Posle osam nedelja od popunjavanja defekta graftom BO-ADSC konstantovano je da graft daje manji otpor prilikom sečenja od okolne zdrave kosti. Površina grafta pokazuje blage neravnine, ali uglavnom prati polulučni oblik kalvarije (Slika 4.11-a).



Slika 4.11. Defekt ispunjen graftom BO-ADSC posle 8 nedelja: a) površina defekta; b) poprečni presek defekta.

Sam graft je ružičasto – crvene boje i po izgledu i strukturi odgovara zdravoj kosti. Na poprečnom preseku grafta (Slika 4.11-b) vide se partikule *Bio-Oss*-a nagomilane na dnu defekta. Graft je vrlo čvrsto spojen za dno i bočne površine defekta okolne zdrave kosti tako da ga je nemoguće mehanički odvojiti od njih.

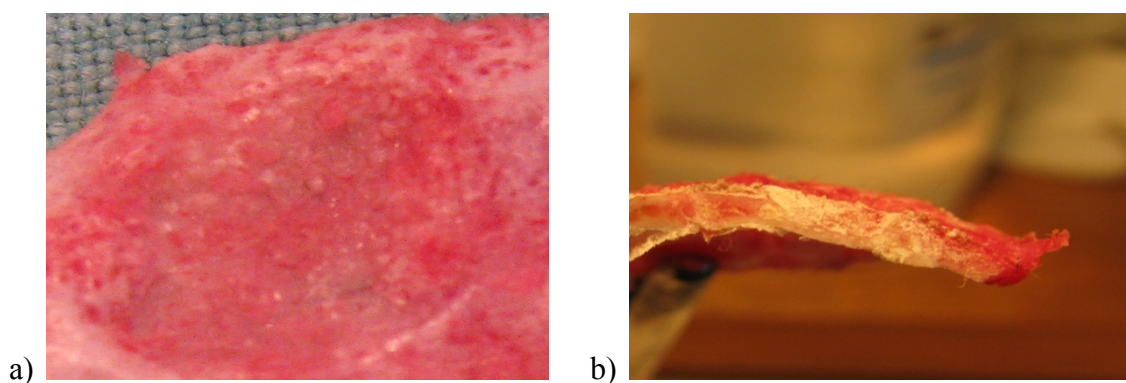
Defekt popunjen BO-CAT graftom posle osam nedelja pokazuje izraženiju crvenu prebojenost na površini od okolne zdrave kosti i prati krivinu kalvarije (Slika 4.12-a).



Slika 4.12. Defekt ispunjen graftom BO-CAT posle 8 nedelja: a) površina defekta; b) poprečni presek defekta.

U toku sečenja preparata dijamantskom šajbnom konstantuje se jači otpor u odnosu na defekt ispunjen graftom BO-ADSC i teško ga je razlikovati od onog koji daje zdrava kost. Graft je na preseku u gornjoj trećini bo boji i konzistenciji veoma sličan okolnoj zdravoj kosti dok središnji deo i donja trećina pokazuju žutu prebojenost (Slika 4.12-b). U celini je kompaktan i intimno prijanja za površinu defekta.

Defekt popunjen BO implantatom posle osam nedelja pokazuje bledo - ružičastu boju na površini sa prisutnim nepravilno razbacanim beličastim tačkicama - granulama najverovatnije od ostataka samog materijala (Slika 4.13-a)

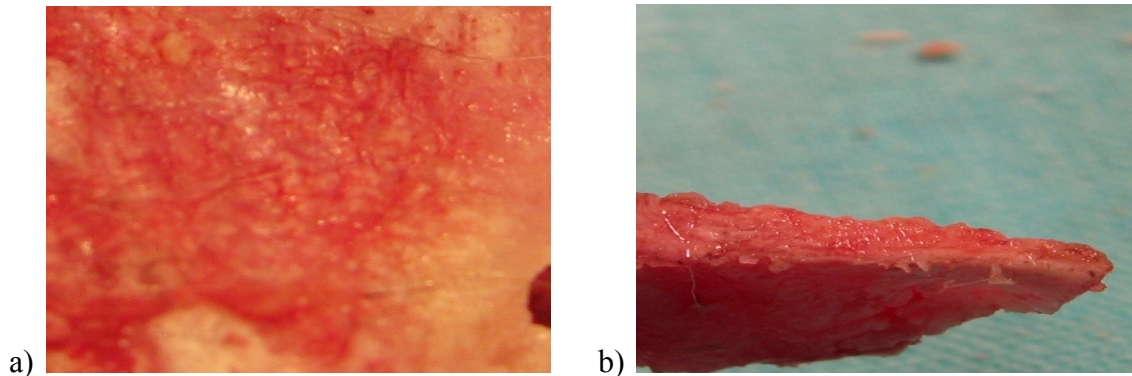


Slika 4.13. Defekt ispunjen implantatom BO posle 8 nedelja: a) površina defekta; b) poprečni presek defekta.

Površina implantata ne prati krivinu kalvarije već pokazuje lagano udubljenje i to najviše u centralnom delu implantata. Implantat daje relativno slab otpor prilikom sečenja

dijamantskom šajbnom, većim delom je bele boje na preseku sa jasnom granicom ka okolnoj kosti (Slika 4.13-b), kompaktan je i dobro spojen za zidove defekta.

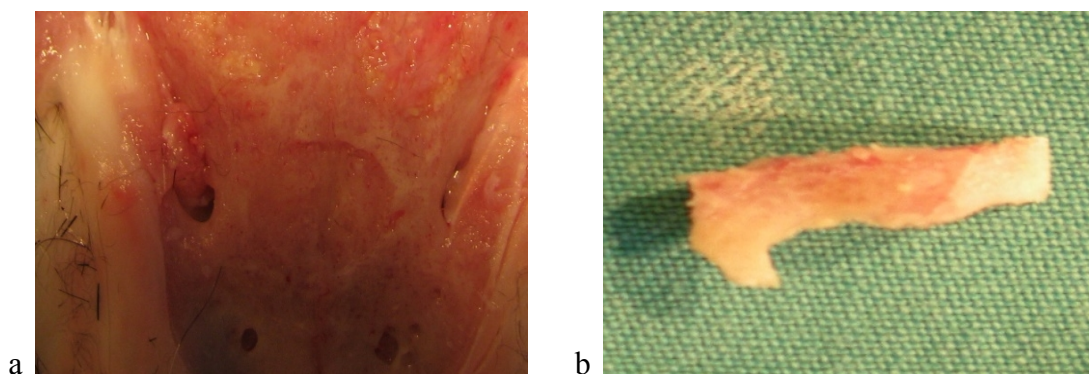
Posle osam nedelja od popunjavanja defekta graftom BO-BC uočljiva je izrazito ružičasta boja i na površini i na poprečnom preseku grafta. Površina grafta je neznatno ispod nivoa okolne zdrave kosti (Slika 4.14-a) i pokazuje blago levkasto udubljenje u centralnom delu u odnosu na zdravu kost.



Slika 4.14. Defekt ispunjen BO-BC posle 8 nedelja: a) površina defekta; b) poprečni presek defekta.

Graft je tanji u odnosu na ostale graftove (Slika 4.14-b), ali daje dobar otpor na sečenje dijamantskom šajbnom. Na poprečnom preseku ima homogen izgled, čvrsto je spojen za defekt u kosti i od njega se veoma teško razlikuje.

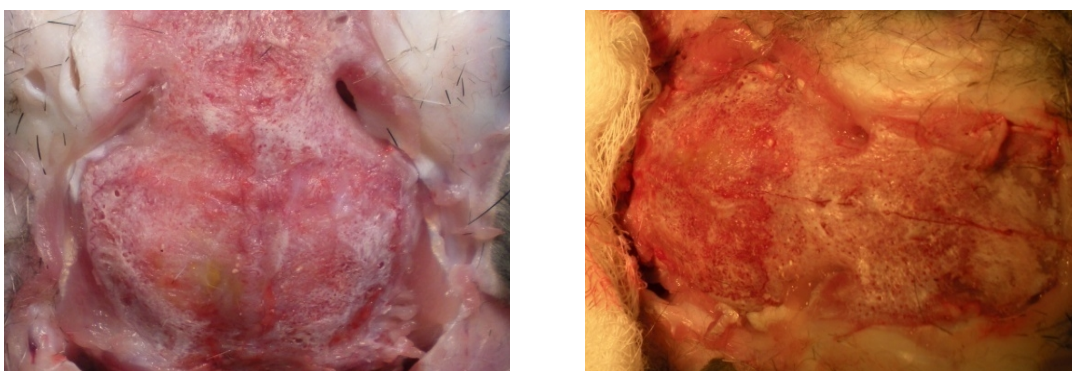
Defekt u kome se odvijala spontana regeneracija posle osam nedelja po svom izgledu na površini odgovara okolnoj kosti sa prisutnim levkastim udubljenjem (Slika 4.15-a). Na poprečnom preseku po boji i teksturi odgovara okolnoj kosti (Slika 4.15-b).



Slika 4.15. Defekt sa SR posle 8 nedelja: a) površina defekta; b) poprečni presek defekta.

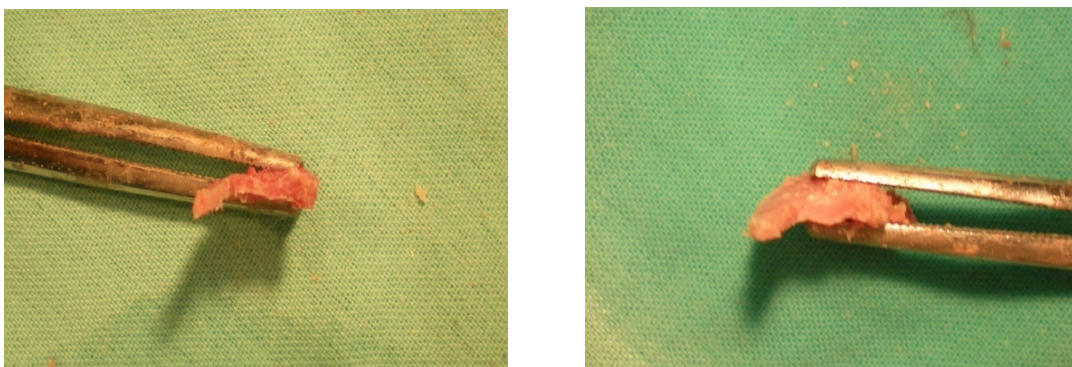
4.1.3.4. Izgled poprečnih preseka defekata posle osam nedelja –nosač nanomaterijal

Defekt popunjen NM-ADSC graftom i defekt SR skoro su u potpunosti ispunjeni novostvorenom kosti i po svom izgledu odgovaraju okolnoj zdravoj kosti sa prisutnim neznatnim levkastim udubljenjem u centralnom delu (Slika 4.16). Defekt ispunjen NM-CAT graftom je na površini žuto prebojen i relativno jasnih granica prema okolnom tkivu. Defekt ispunjen NM implantatom i NM-BC graftom pokazuju neravnu površinu i izrazito udubljenje u centru implantata odnosno grafta.



Slika 4.16. Površina kalvarije kunića 8 nedelja nakon popunjavanja pet arteficialno načinjenih defekata u kojima je kao nosač korišćen nanomaterijal.

Posle osam nedelja od popunjavanja defekta graftom NM-ADSC uočava se da gornja površina grafta uglavnom prati polulučni oblik kalvarije (Slika. 4.17). Sam graft je ružičasto – crvene boje i po izgledu i strukturi odgovara zdravoj kosti.



Slika 4.17. Poprečni presek defekta ispunjenog NM-ADSC posle 8 nedelja.

Graft je vrlo čvrsto spojen za dno i bočne površine defekta okolne zdrave kosti tako da ga je nemoguće mehanički odvojiti od njih. Ne postoji razlika u otporu prilikom sečenja grafta i okolne zdrave kosti.

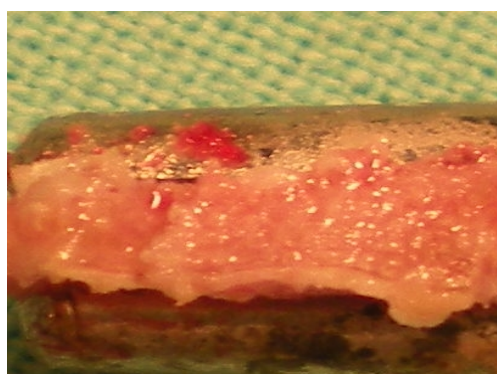
Defekt popunjen NM-CAT graftom posle osam nedelja pokazuje žućkastu prebojenost na površini u svom distalnom delu. Površina grafta ne prati u potpunosti krivinu kalvarije (Slika. 4.18).



Slika 4.18. Poprečni presek defekta ispunjenog graftom NM-CAT posle 8 nedelja.

U toku sečenja preparata dijamantskom šajbnom konstantuje se znatno slabiji otpor u odnosu na defekt ispunjen graftom NM-ADSC. Graft je na preseku u središnjem delu ružičaste boje i podseća na spongiozu zdrave kosti. U celini je kompaktan i intimno prianja za površine defekta.

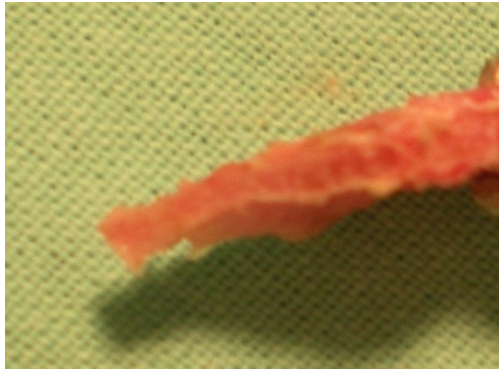
Defekt popunjen NM implantatom posle osam nedelja pokazuje bledo – ružičastu boju na površini sa prisutnim nepravilno razbacanim beličastim tačkicama – granulama na poprečnom preseku najverovatnije od ostataka samog materijala (Slika 4.19).



Slika 4.19. Poprečni presek defekta ispunjenog implantatom NM posle 8 nedelja.

Površina implantata ne prati krivinu kalvarije već pokazuje lagano udubljenje i to najviše u centralnom delu. Implantat daje slab otpor prilikom sečenja dijamantskom šajbnom. Kompaktan je i dobro spojen za površine defekta.

Defekt popunjen NM-BC graftom posle osam nedelja ima homogen izgled, čvrsto spojen za defekt u kosti i od njega se razlikuje samo po boji (Slika 4.20).



Slika 4.20. Poprečni presek defekta ispunjenog graftom NM-BC posle 8 nedelja

Gornja trećina grafta je bledo – crvene boje dok je središnji deo na poprečnom preseku ružičasto – crven i veoma sličan spongiozi zdrave kosti. Površina grafta je delom ispod, a delom u nivou okolne zdrave kosti. Graft daje slab otpor na sečenje dijamantskom šajbnom.

Arteficialno napravljeni defekt SR, koji je u ovom eksperimentu služio kao kontrola, posle osam nedelja po svom obliku, boji i strukturi u potpunosti odgovara izgledu okolne zdrave kosti (Slika 4.21).



Slika 4.21. Poprečni presek defekta SR posle 8 nedelja

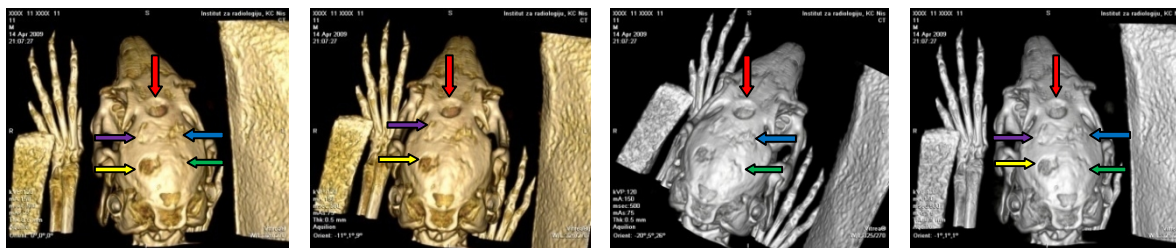
Otpor prilikom sečenja identičan je otporu zdrave kosti. Primetna je razlika na površini u vidu blagog levkastog udubljenja u centru defekta čime se gubi konveksna površina kalvarije.

4.2. MSCT NALAZ KALVARIJE KUNIĆA

4.2.1. MSCT nalaz nedelju dana posle popunjavanja defekata

4.2.1.1. MSCT nalaz nedelju dana posle popunjavanja defekata-nosač *Bio-Oss*

Na VR 3D (eng. *Volume Rendering 3 Dimension*) rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića, nedelju dana posle popunjavanja defekata, zapažaju se mesta četiri od pet arteficialno načinjena defekta (Slika 4.22). Defekt koji je bio popunjen graftom BO-ADSC je skoro potpuno regenerisan, pa se na snimku veoma teško može videti. On je u potpunosti ispunjen novostvorenom kosti. Na pojedinim mestima zapaža se prominencija novostvorene kosti iznad nivoa okolne zdrave kosti.

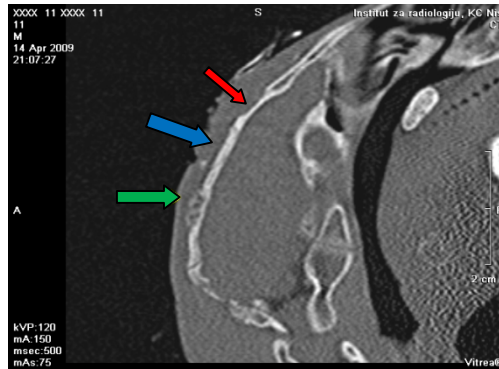


Slika 4.22. VR 3D rekonstrukcija koštanih struktura kalvarije kunića nedelju dana nakon popunjavanja defekata. BO-ADSC - zelena strelica; BO - CAT-žuta strelica; BO - plava strelica; BO-BC - ljubičasta strelica; SR - crvena strelica.

Sledeći defekt po količini novostvorene kosti je bio punjen BO implantatom, a zatim defekt popunjen graftom BO-BC. Najslabiju popunu defekta napravio je graft BO-CAT, dok je defekt SR ostao potpuno prazan.

Graft BO-ADSC, implantat BO i spontana regeneracija

Na MPR (multiplanarna) rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića u sagitalnom preseku vide se tri arteficialno načinjena defekta desno od mediosagitalne linije (Slika 4.23).

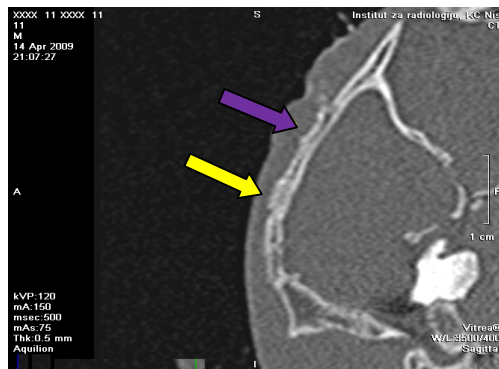


Slika 4.23. MPR rekonstrukcija koštanih struktura kalvarije kunića - sagitalni presek BO-ADSC – zelena strelica; BO – plava strelica; SR – crvena strelica.

Defekt punjen BO-ADSC graftom pokazuje prisustvo novostvorene koštane strukture, čija je ventralna kontura neznatno iznad površine okolne zdrave kosti (*tabulla externa*). Plava strelica označava defekt punjen BO implantatom sa površinom u ravni okolne kosti, dok crvena strelica označava defekt SR.

Graft BO-CAT i graft BO-BC

Na MPR rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića u sagitalnom preseku vide se dva arteficialno načinjena defekta levo od mediosagitalne linije (Slika 4.24).

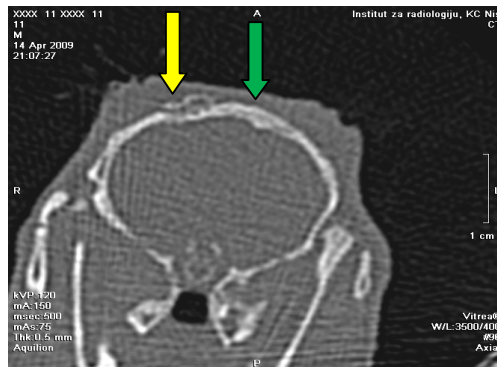


Slika 4.24. MPR rekonstrukcija koštanih struktura kalvarije kunića - sagitalni presek BO-CAT – žuta strelica; BO-BC – ljubičasta strelica.

Defekt punjen BO-CAT graftom pokazuje prisustvo novostvorene koštane strukture čija ventralna kontura je delom u ravni *tabullae externae* a delom prominira van nje. Ljubičastom strelicom označen je defekt punjen BO-BC graftom sa prisustvom novostvorene koštane strukture manjih denziteta u odnosu na prethodno opisan defekt i sa ventralnom konturom koja se nalazi ispod nivoa zdrave kosti.

Graft BO-CAT i graft BO-ADSC

Na MPR rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića u koronalnom preseku vide se dva arteficialno načinjena defekta (Slika 4.25) od kojih je žutom strelicom označen defekt punjen BO-CAT graftom sa prisustvom novostvorene koštane strukture čija ventralna kontura je delom u ravni *tabulae externae* a delom prominira van nje.

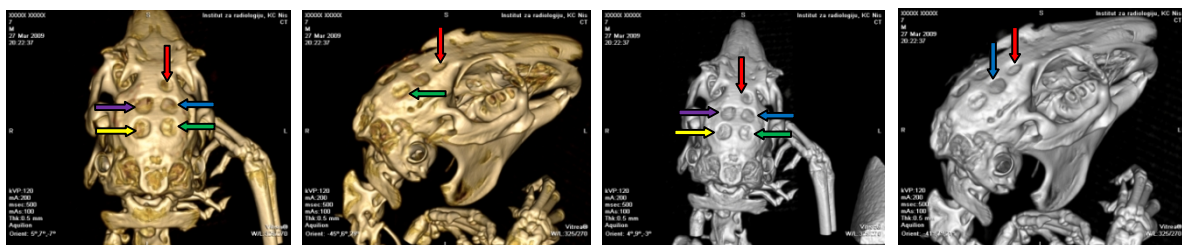


Slika 4.25. MPR rekonstrukcija koštanih struktura kalvarije kunića - koronalni presek
BO-CAT – žuta strelica; BO-ADSC – zelena strelica.

Ventralna površina i denzitet defekt punjenog BO-ADSC graftom odgovaraju okolnoj zdravoj kosti.

4.2.1.2. MSCT nalaz nedelju dana posle popunjavanja defekata - nosač nanomaterijal

Na VR 3D rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića (Slika 4.26) zapaža se pet arteficialno načinjenih defekata popunjavanih različitim graftovima i implantatima nakon nedelju dana.



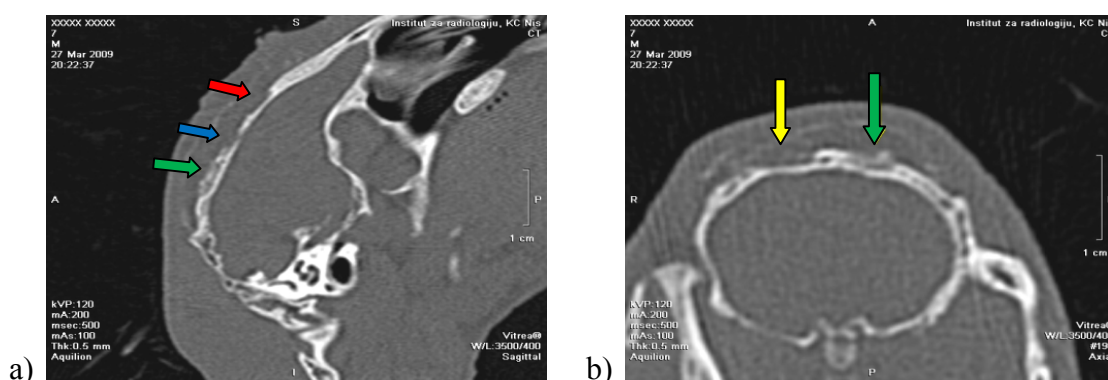
Slika 4.26. VR 3D rekonstrukcija koštanih struktura kalvarije kunića nakon jedne nedelje.

NM-ADSC - zelena strelica; NM-CAT - žuta strelica; NM - plava strelica; NM-BC - ljubičasta strelica; SR - crvena strelica.

Najviše novostvorene koštane strukture zapaža se u defektu punjenom NM-ADSC graftom. Drugi defekt po količini novostvorene kosti je defekt punjen NM-CAT graftom.

Graft NM-ADSC

Na MPR rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića u sagitalnom preseku (Slika 4.27-a), u nivou tri arteficialno načinjena defekta, desno od mediosagitalne linije, vidi se zelenom strelicom označen defekt punjen NM-ADSC graftom sa prisustvom novostvorene koštane strukture, čija je ventralna kontura u ravni površine okolne zdrave kosti.



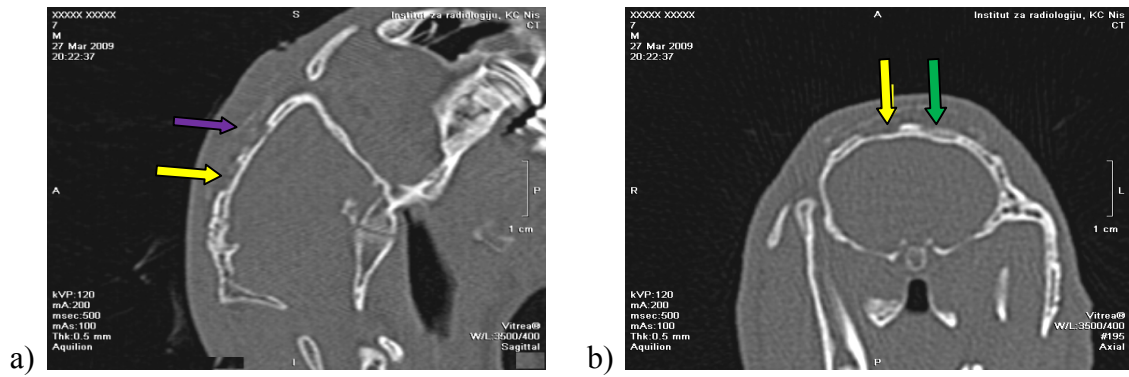
Slika 4.27. MPR rekonstrukcija: a) sagitalni presek; b) koronalni presek.

NM-ADSC - zelena strelica; NM-CAT - žuta strelica; NM - plava strelica; SR - crvena strelica.

Na MPR rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića u koronalnom preseku (Slika 4.27-b), u nivou dva arteficialno načinjena defekta, NM-ADSC graft pokazuje prisustvo novostvorene strukture čija ventralna kontura je delom u ravni *tabulae externae* a delom prominira van nje.

Graft NM-CAT

Na MPR rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića u sagitalnom preseku (Slika 4.28-a), u nivou dva arteficialno načinjena defekta levo od mediosagitalne linije, vidi se žutom strelicom označen defekt punjen NM-CAT graftom u kome se zapažaju diskretne strukture denziteta kalcijuma.



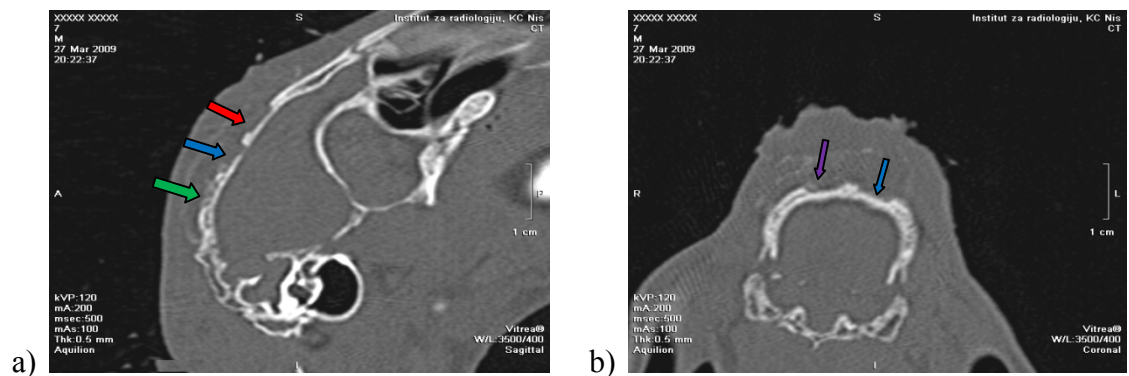
Slika 4.28. MPR rekonstrukcija: a) sagitalni presek; b) koronalni presek.

NM-CAT - žuta strelica; NM-BC - ljubičasta strelica; NM-ADSC - zelena strelica.

Na MPR rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića u koronalnom preseku (Slika 4.28-b), u nivou dva arteficialno načinjena defekta, vidi se defekt punjen NM-CAT graftom sa prisustvom diskretnih struktura denziteta kalcijuma.

Implantat NM

Na MPR rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića u sagitalnom preseku (Slika 4.29-a), u nivou tri arteficialno načinjena defekta desno od mediasagitalne linije, vidi se plavom strelicom označen defekt punjen NM implantatom sa jako diskretnom strukturom denziteta kalcijuma uz dorzalnu ivicu defekta.



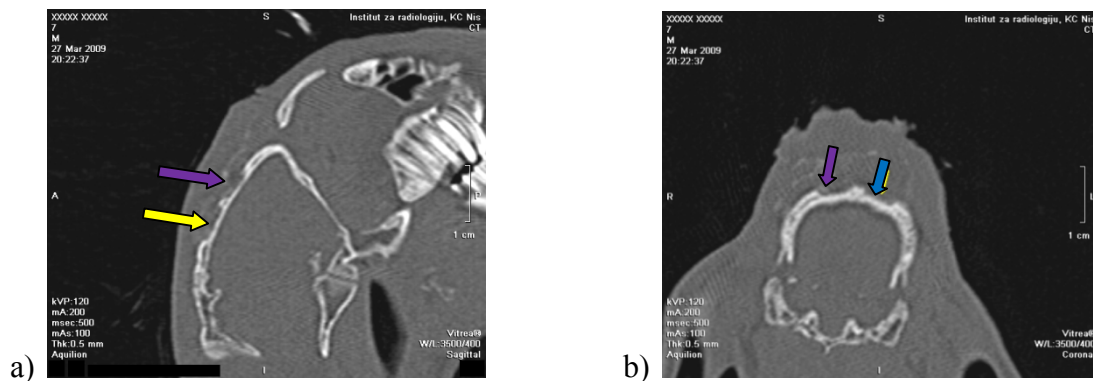
Slika 4.29. MPR rekonstrukcija: a) sagitalni presek; b) koronalni presek.

NM-ADSC-zelena strelica; NM-plava strelica; NM-BC-ljubičasta strelica; SR-crvena strelica.

Na MPR rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića u koronalnom preseku (Slika 4.29-b), u nivou dva arteficialno načinjena defekta, vidi se defekt punjen NM implantatom sa jako diskretnom strukturom denziteta kalcijuma.

Graft NM-BC

Na MPR rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića u sagitalnom preseku (Slika 4.30-a), u nivou dva arteficialno načinjena defekta levo od mediosagitalne linije, vidi se ljubičastom strelicom označen defekt punjen NM-BC graftom sa diskretnom strukturom denziteta kalcijuma po dnu defekta.



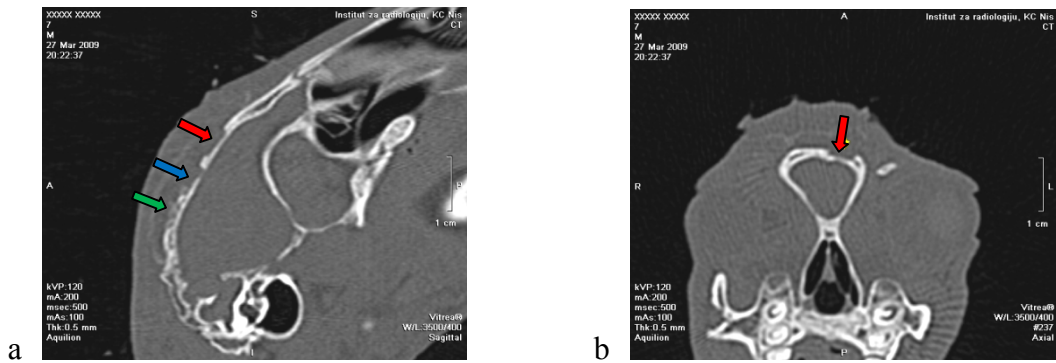
Slika 4.30. MPR rekonstrukcija: a) sagitalni presek; b) koronalni presek.

NM-BC - ljubičasta strelica; NM-CAT - žuta strelica; NM - plava strelica.

Na MPR rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića u koronalnom preseku (Slika 4.30-b), u nivou dva arteficialno načinjena defekta, ljubičastom strelicom je označen defekt punjen NM-BC graftom sa diskretnom strukturom denziteta kalcijuma.

Spontana regeneracija

Na MPR rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića u sagitalnom preseku (Slika 4.31-a), u nivou tri arteficialno načinjena defekta desno od mediosagitalne linije, vidi se crvenom strelicom označen defekt SR u kome se ne detektuje prisustvo struktura denziteta kalcijuma.



Slika 4.31. MPR rekonstrukcija: a) sagitalni presek; b) koronalni presek.

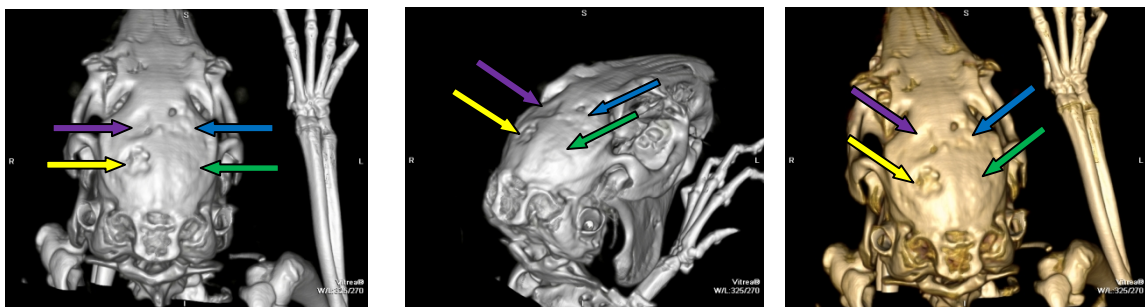
NM-ADSC - zelena strelica; NM - plava strelica; SR - crvena strelica.

Na MPR rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića u koronalnom preseku (Slika 4.31-b) uočava se defekt sa spontanom regeneracijom u kome se ne detektuje prisustvo struktura denziteta kalcijuma .

4.2.2. MSCT nalaz tri nedelje posle popunjavanja

4.2.2.1. MSCT nalaz tri nedelje posle popunjavanja defekata - nosač *Bio-Oss*

Na VR 3D rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića tri nedelje posle popunjavanja defekata zapažaju se mesta tri od četiri arteficialno načinjena defekta (Slika 4.32). Defekt koji je bio popunjen graftom BO-ADSC je potpuno regenerisan, pa se na snimku ne može videti. On je u potpunosti ispunjen novostvorenom kosti i čak se zapaža prominencija novostvorene kosti iznad nivoa okolne zdrave kosti.

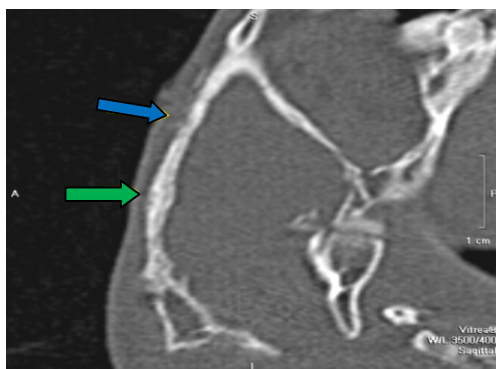


Slika 4.32. VR 3D rekonstrukcija koštanih struktura kalvarije kunića posle tri nedelje BO-ADSC - zelena strelica; BO-CAT - žuta strelica; BO - plava strelica; BO-BC - ljubičasta strelica.

Sledeći defekt po količini novostvorene kosti je bio punjen BO implantatom, a najslabiju popunu defekta napravio je graft BO-CAT.

Graft BO-ADSC i implantat BO

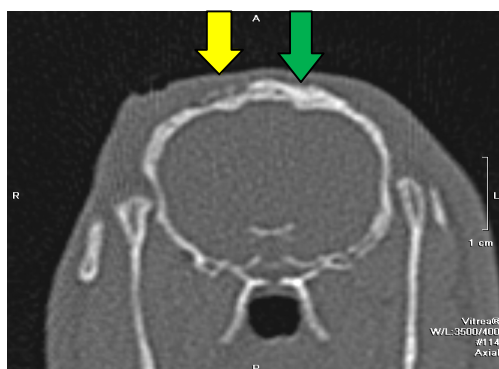
Na MPR rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića u sagitalnom preseku (Slika 4.33.), u nivou dva arteficialno načinjena defekta desno od mediasagitalne linije, vidi se defekt tri nedelje posle popunjavanja BO-ADSC graftom (na slici je označen zelenom strelicom). Prisustvo novostvorene koštane strukture u potpunosti ispunjava defekt tako da se ventralna kontura nalazi u ravni *tabulae eksternae* i blago prominira iznad nje. Plavom strelicom označen je defekt punjen BO implantatom sa prisustvom novostvorene koštane strukture manjih denziteta odnosu na prethodno opisan defekt i sa ventralnom konturom koja se nalazi ispod nivoa zdrave kosti.



Slika 4.33. MPR rekonstrukcija koštanih struktura kalvarije kunića nakon tri nedelje - sagitalni presek. BO-ADSC - zelena strelica; BO - plava strelica.

Graft BO-ADSC i graft BO-CAT

Na MPR rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića u koronalnom preseku (Slika 4.34), u nivou dva arteficialno načinjena defekta, žutom strelicom je označen defekt tri nedelje posle popunjavanja BO-CAT graftom sa prisustvom novostvorene koštane strukture izrazito manjih denziteta u odnosu na defekt punjen BO-ADSC graftom.

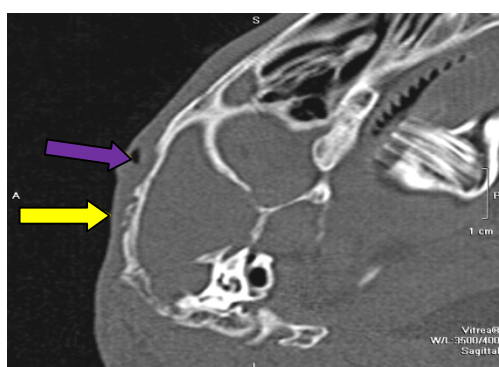


Slika 4.34. MPR rekonstrukcija koštanih struktura kalvarije kunića nakon tri nedelje - koronalni presek. BO-ADSC - zelena strelica; BO-CAT - žuta strelica.

Defekt popunjen BO-ADSC graftom pokazuje prisustvo novostvorene koštane strukture koja u potpunosti ispunjava defekt tako da se ventralna kontura nalazi iznad ravni *tabulae eksternae*.

Graft BO-CAT i graft BO-BC

Na MPR rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića u sagitalnom preseku (Slika. 4.35), u nivou dva arteficialno načinjena defekta levo od mediasagitalne linije, vidi se defekt tri nedelje posle popunjavanja BO-CAT graftom sa prisustvom novostvorene koštane strukture koja u potpunosti ne ispunjava defekt, ali se detektuje prisustvo dve strukture denziteta kalcijuma.

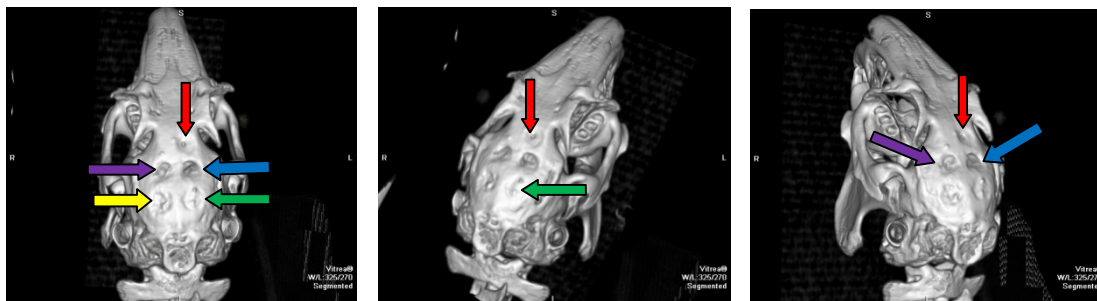


Slika 4.35. MPR rekonstrukcija koštanih struktura kalvarije kunića nakon tri nedelje - sagitalni presek: BO-CAT - žuta strelica; BO-BC - ljubičasta strelica.

Defekt punjen BO-BC graftom pokazuje prisustvo jako oskudne, jedva vidljive, novostvorene koštane strukture manjih denziteta u odnosu na prethodno opisan defekt.

4.2.2.2. MSCT nalaz tri nedelje posle popunjavanja defekata - nosač nanomaterijal

Na VR 3D rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića tri nedelje posle popunjavanja defekata zapažaju se mesta pet arteficialno načinjena defekta (Slika 4.36).

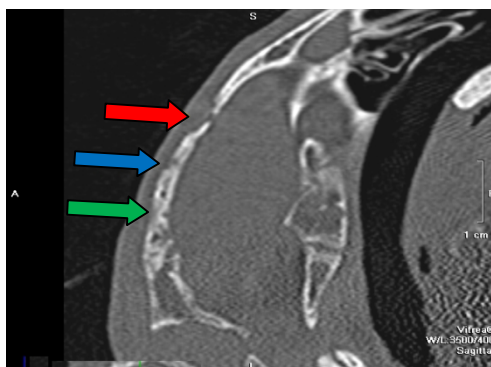


Slika 4.36 VR 3D rekonstrukcija koštanih struktura kalvarije kunića posle tri nedelje NM-ADSC - zelena strelica; NM-CAT - žuta strelica; NM - plava strelica; NM-BC - ljubičasta strelica; SR - crvena strelica.

Defekt, koji je bio popunjen graftom NM-ADSC, skoro je potpuno regenerisan pa se na snimku veoma teško može videti. U potpunosti je ispunjen novostvorenom kosti i na slici je označen zelenom strelicom. Sledeći, po količini novostvorene kosti, bio je defekt punjen NM-CAT graftom.

Graft NM-ADSC, implantat NM i SR

Na MPR rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića u sagitalnom preseku (Slika 4.37), u nivou tri arteficialno načinjena defekta desno od mediasagitalne linije, vidi se defekt tri nedelje posle popunjavanja NM-ADSC graftom sa prisustvom novostvorene koštane strukture koja u potpunosti ispunjava defekt tako da se ventralna kontura nalazi u ravni *tabulae eksternae*.

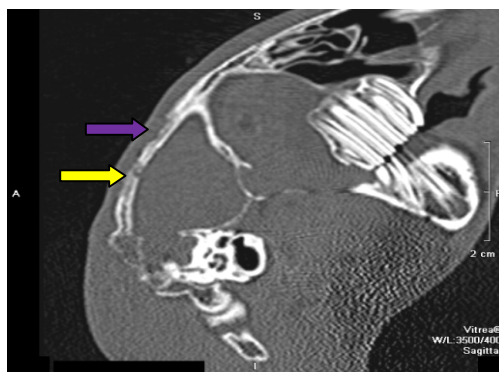


Slika 4.37. MPR rekonstrukcija koštanih struktura kalvarije kunića nakon tri nedelje - sagitalni presek: NM-ADSC - zelena strelica; NM - plava strelica; SR - crvena strelica.

Plavom strelicom označen je defekt punjen NM implantatom sa prisustvom novostvorene koštane strukture manjih denziteta u odnosu na prethodno opisan defekt. U defektu sa SR zapaža se izrazito oskudna i jedva vidljiva struktura denziteta kalcijuma.

Graft NM-CAT i graft NM-BC

Na MPR rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića u sagitalnom preseku (Slika 4.38), u nivou dva arteficialno načinjena defekta levo od mediasagitalne linije, vidi se defekt tri nedelje posle popunjavanja NM-CAT graftom sa prisustvom novostvorene koštane strukture koja gotovo u potpunosti ispunjava defekt.



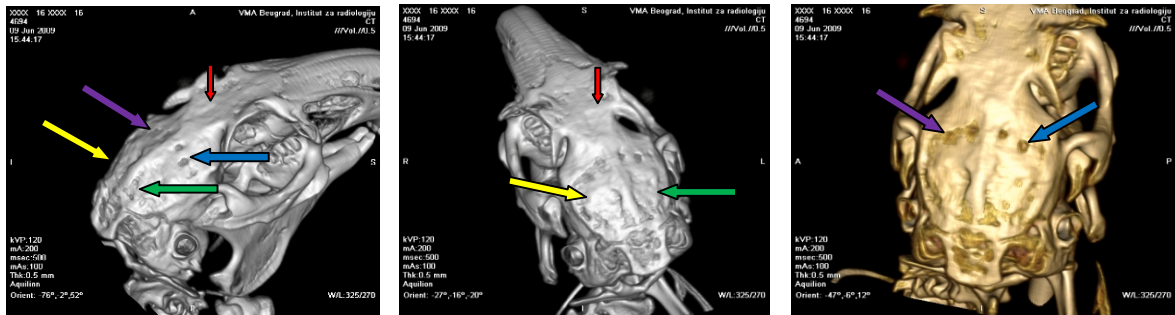
Slika 4.38. MPR rekonstrukcija - sagitalni presek : NM-CAT - žuta strelica; NM-BC - ljubičasta strelica.

Defekt punjen NM-BC graftom pokazuje prisustvo vidljive novostvorene koštane strukture manjih denziteta u odnosu na prethodno opisan defekt.

4.2.3. MSCT nalaz šest nedelja posle popunjavanja defekata

4.2.3.1. MSCT nalaz šest nedelja posle popunjavanja defekata - nosač nanomaterijal

Na VR 3D rekonstrukciji koštanih struktura kalvarije kunića, šest nedelja posle popunjavanja defekata, zapažaju se mesta tri od pet arteficialno načinjena defekta (Slika 4.39). Defekt koji je bio popunjen graftom NM-ADSC je potpuno regenerisan, pa se na snimku jedva može videti. On je u potpunosti ispunjen novostvorenim kosti i na slici je označen zelenom strelicom.



Slika 4.39 VR 3D rekonstrukcija koštanih struktura kalvarije kunića posle šest nedelja.

NM-ADSC - zelena strelica; NM-CAT - žuta strelica; NM - plava strelica; NM-BC - ljubičasta strelica; SR - crvena strelica.

Sledeći defekt po količini novostvorene kosti je SR, a najslabiju popunu defekta napravili su graft NM-BC i implantat NM.

4.3. STATISTIČKA ANALIZA GUSTINE KOSTI U DEFJEKTIMA

U grupi eksperimentalnih životinja, kod kojih je kao nosač korišćen *Bio-Oss* (Tabela 4.1), gustina kosti defekta ispunjenog BO-ADSC graftom posle nedelju dana iznosila je u proseku $1103,00 \pm 158,04$, posle tri nedelje je porasla na $1415,00 \pm 83,81$, da bi nakon šest nedelja opala na $515,50 \pm 121,82$.

Tabela 4. 1. Gustina kosti na mestima defekata u odnosu na starost defekta kada je nosač u graftovima bio *Bio-Oss*

Grupa	Vrsta rupe	Nedelja		
		I	III	VI
BioOss	BO-ADSC	1103,00±158,04	1415,00±83,81	515,50±121,82
	BO-CAT	732,20±270,25	400,25±129,00	731,50±164,54
	BO	993,20±195,23	565,25±229,69	158,50±54,85
	BO-BC	1007,60±167,00	615,59±110,26	655,50±129,9
	SR	103,80±33,56	72,75±19,00	612,50±10,97
	ZK	1342,60±214,64	1283,75±229,88	878,00±47,34

Gustina kosti defekta ispunjenog BO-CAT graftom posle nedelju dana iznosila je u proseku $732,20 \pm 270,25$, posle tri nedelje je opala na $400,25 \pm 129,00$, da bi nakon šest nedelja porasla na $731,50 \pm 164,54$.

Gustina kosti defekta ispunjenog BO implantatom posle nedelju dana iznosila je u proseku $993,20 \pm 195,23$, posle tri nedelje je opala na $565,25 \pm 229,69$, a nakon šest nedelja na $158,50 \pm 54,85$.

Gustina kosti defekta ispunjenog BO-BC graftom posle nedelju dana iznosila je u proseku $1007,60 \pm 167,00$, posle tri nedelje je opala na $615,59 \pm 110,26$, da bi nakon šest nedelja porasla na $655,50 \pm 129,9$.

Kod defekta obeleženog SR, koji je ostao nepopunjen i u kome se odvijala spontana regeneracija, gustina kosti je posle nedelju dana u proseku iznosila $103,80 \pm 33,56$, posle tri nedelje je opala na $72,75 \pm 19,00$, da bi nakon šest nedelja porasla na $612,50 \pm 10,97$.

Normalna gustina kosti je posle nedelju dana u proseku iznosila $1342,60 \pm 214,64$, posle tri nedelje je opala na $1283,75 \pm 229,88$, a nakon šest nedelja na $878,00 \pm 47,34$.

U grupi eksperimentalnih životinja, kod kojih je kao nosač korišćen nanomaterijal (Tabela 4.2), gustina kosti defekta ispunjenog NM-ADSC graftom posle nedelju dana iznosila je u proseku $420,60 \pm 160,25$, posle tri nedelje je porasla na $755,73 \pm 364,74$, da bi nakon šest nedelja opala na $582,35 \pm 285,27$.

Gustina kosti defekta ispunjenog NM-CAT graftom posle nedelju dana iznosila je u proseku $149,61 \pm 60,28$, posle tri nedelje je porasla na $276,10 \pm 325,14$, da bi nakon šest nedelja opala na $239,60 \pm 2,42$.

Gustina kosti defekta ispunjenog NM implantatom posle nedelju dana iznosila je u proseku $137,04 \pm 109,79$, posle tri nedelje je porasla na $155,65 \pm 66,42$, a nakon šest nedelja na $224,00 \pm 61,31$.

Tabela 4. 2. Gustina kosti na mestima defekata u odnosu na starost defekta kada je nosač u graftovima bio nanomaterijal

Grupa	Vrsta rupe	Nedelja		
		I	III	VI
NANOMATERIJAL	NM-ADSC	$420,60 \pm 160,25$	$755,73 \pm 364,74$	$582,35 \pm 285,27$
	NM-CAT	$149,61 \pm 60,28$	$276,10 \pm 325,14$	$239,60 \pm 2,42$
	NM	$137,04 \pm 109,79$	$155,65 \pm 66,42$	$224,00 \pm 61,31$
	NM-BC	$140,61 \pm 59,38$	$210,16 \pm 123,28$	$260,35 \pm 193,24$
	SR	$69,31 \pm 12,95$	$244,58 \pm 160,19$	$629,85 \pm 44,51$
	ZK	$1058,53 \pm 162,72$	$1050,33 \pm 160,22$	$788,15 \pm 61,14$

Gustina kosti defekta ispunjenog NM-BC graftom posle nedelju dana iznosila je u proseku $140,61 \pm 59,38$, posle tri nedelje je porasla na $210,16 \pm 123,28$, a nakon šest nedelja na $260,35 \pm 193,24$.

Kod defekta obeleženog SR, koji je ostao nepopunjen i u kome se odvijala spontana regeneracija, gustina kosti je posle nedelju dana u proseku iznosila $69,31 \pm 12,95$, posle tri nedelje je porasla na $244,58 \pm 160,19$, a nakon šest nedelja na $629,85 \pm 44,51$.

Normalna gustina kosti je posle nedelju dana u proseku iznosila $1058,53 \pm 162,72$, posle tri nedelje je opala na $1050,33 \pm 160,22$, a nakon šest nedelja na $788,15 \pm 61,14$.

U grupi eksperimentalnih životinja, kod kojih je kao nosač korišćen *Bio-Oss* (Tabela 4.3), gustina kosti defekta ispunjenog BO-ADSC graftom posle nedelju dana iznosila je u proseku $82,65 \pm 7,77\%$ od gustine normalne kosti, posle tri nedelje je značajno porasla na $113,10 \pm 22,40\%$ (ANOVA i Tukey post hoc test: $p < 0,05$), da bi posle šest nedelja značajno opala u odnosu na treću nedelju i to na $59,40 \pm 17,08\%$ ($p < 0,001$).

Tabela 4. 3. Relativna gustina kosti na mestima defekata po nedeljama, kada je nosač u graftovima bio *Bio-Oss*

Grupa	Vrsta rupe	Nedelja			Poređenje između nedelja
		I	III	VI	
Bio-Oss	BO-ADSC	$82,65 \pm 7,77$	$113,10 \pm 22,40$	$59,40 \pm 17,08$	I vs III: $p=0,045$ I vs VI: $p=0,131$ III vs VI: $p < 0,001$
	BO-CAT	$54,27 \pm 15,77$	$31,27 \pm 10,31$	$84,26 \pm 23,28$	I vs III: $p=0,163$ I vs VI: $p=0,999$ III vs VI: $p=0,004$
	BO	$75,88 \pm 12,80$	$43,86 \pm 16,51$	$18,35 \pm 7,24$	I vs III: $p=0,010$ I vs VI: $p < 0,001$ III vs VI: $p=0,043$
	BO-BC	$76,38 \pm 22,13$	$58,61 \pm 9,75$	$75,42 \pm 18,86$	I vs III: $p=0,498$ I vs VI: $p=0,997$ III vs VI: $p=0,521$
	SR	$8,10 \pm 3,57$	$5,81 \pm 1,85$	$69,86 \pm 2,52$	I vs III: $p=0,477$ I vs VI: $p < 0,001$ III vs VI: $p < 0,001$
	ZK	100	100	100	

Gustina kosti defekta ispunjenog BO-CAT graftom, posle nedelju dana, iznosila je u proseku $54,27 \pm 15,77\%$ od gustine normalne kosti, posle tri nedelje je opala na $31,27 \pm 10,31\%$, da bi nakon šest nedelja značajno porasla u odnosu na treću nedelju i to na $84,26 \pm 23,28\%$ ($p < 0,01$).

Gustina kosti defekta ispunjenog BO implantatom, posle nedelju dana, iznosila je u proseku $75,88 \pm 12,80\%$ od gustine normalne kosti, posle tri nedelje je značajno opala na $43,86 \pm 16,51\%$, da bi nakon šest nedelja opala na $18,35 \pm 7,24\%$, što je značajno niža vrednost i u odnosu na prvu ($p < 0,001$) i u odnosu na treću nedelju ($p < 0,05$).

Gustina kosti defekta ispunjenog BO-BC graftom, posle nedelju dana, iznosila je u proseku $76,38 \pm 22,13\%$ u odnosu na intaktnu kost, posle tri nedelje je opala na $58,61 \pm 9,75\%$, da bi nakon šest nedelja porasla na $75,42 \pm 18,86\%$.

Kod defekta obeleženog SR, koji je ostao nepopunjen i u kome se odvijala spontana regeneracija, gustina kosti je, posle nedelju dana, u proseku iznosila $8,10 \pm 3,57\%$ od gustine normalne kosti, posle tri nedelje je opala na $5,81 \pm 1,85\%$, da bi nakon šest nedelja porasla na $69,86 \pm 2,52\%$, što je značajno veća vrednost i u odnosu na prvu ($p < 0,001$) i u odnosu na treću nedelju ($p < 0,001$).

U grupi eksperimentalnih životinja, kod kojih je kao nosač korišćen nanomaterijal (Tabela 4.4), gustina kosti defekta ispunjenog NM-ADSC graftom, posle nedelju dana, iznosila je u proseku $39,96 \pm 13,53\%$ od gustine normalne kosti, posle tri nedelje je porasla na $68,47 \pm 28,55\%$, a nakon šest nedelja na $72,11 \pm 30,60\%$.

Gustina kosti defekta ispunjenog NM-CAT graftom, posle nedelju dana, iznosila je u proseku $14,30 \pm 5,60\%$ od gustine normalne kosti, posle tri nedelje je porasla na $26,47 \pm 31,77\%$, a nakon šest nedelja na $30,52 \pm 2,06\%$.

Gustina kosti defekta ispunjenog NM implantatom, posle nedelju dana, iznosila je u proseku $12,58 \pm 8,57\%$ od gustine normalne kosti, posle tri nedelje je porasla na $14,55 \pm 5,97\%$, da bi nakon šest nedelja porasla na $28,10 \pm 5,60\%$, što je značajno veća vrednost i u odnosu na prvu ($p < 0,05$) i u odnosu na treću nedelju ($p < 0,05$).

Gustina kosti defekta ispunjenog NM-BC graftom, posle nedelju dana, iznosila je u proseku $12,95 \pm 3,86\%$ od gustine normalne kosti, posle tri nedelje je porasla na $19,29 \pm 9,52\%$, a nakon šest nedelja porasla na $31,75 \pm 22,06\%$.

Tabela 4. 4. Relativna gustina kosti na mestima defekata po nedeljama kada je nosač u graftovima bio nanomaterijal

Grupa	Vrsta rupe	Nedelja			Poređenje između nedelja
		I	III	VI	
NANO-MATERIJAL	NM-ADSC	39,96±13,53	68,47±28,55	72,11±30,60	I vs III: p=0,299 I vs VI: p=0,227 III vs VI: p=0,673
	NM-CAT	14,30±5,60	26,47±31,77	30,52±2,06	I vs III: p=0,641 I vs VI: p=0,467 III vs VI: p=0,950
	NM	12,58±8,57	14,55±5,97	28,10±5,60	I vs III: p=0,914 I vs VI: p=0,026 III vs VI: p=0,049
	NM-BC	12,95±3,86	19,29±9,52	31,75±22,06	I vs III: p=0,804 I vs VI: p=0,196 III vs VI: p=0,453
	SR	6,69±1,65	24,67±17,24	80,61±11,90	I vs III: p=0,146 I vs VI: p<0,001 III vs VI: p<0,001
	ZK	100	100	100	

Kod defekta obeleženog SR, koji je ostao nepopunjen i u kome se odvijala spontana regeneracija, gustina kosti je, posle nedelju dana, u proseku iznosila $6,69 \pm 1,65\%$ od gustine normalne kosti, posle tri nedelje je porasla na $24,67 \pm 17,24\%$, da bi nakon šest nedelja porasla na $80,61 \pm 11,90\%$, što je značajno veća vrednost i u odnosu na prvu ($p<0,001$) i u odnosu na treću nedelju ($p<0,001$).

Posle prve nedelje, vrednost procenta gustine kosti graftova i implantata u defektima u kojima je kao nosač korišćen *Bio-Oss* u proseku je bila značajno veća u odnosu na gustinu kosti u defektima gde je za nosač korišćen nanomaterijal (Tabela 4.5) i to kod svih ispunjenih defekata na nivou $p<0,01$.

Tabela 4.5. Statistička značajnost razlika gustine kosti u popunjenim defektima u zavisnosti od vrste nosača

Poređenje između grupa	ADSC	p=0,001	p=0,049	p=0,496
	CAT	p=0,002	p=0,784	p=0,004
	BO-NM	p<0,001	p=0,016	p=0,077
	BC	p=0,001	p=0,038	p=0,024
	SR	p=0,493	p=0,072	p=0,128

Posle treće nedelje vrednost procenta gustine kosti graftova i implantata u defektima u kojima je kao nosač korišćen *Bio-Oss* u proseku je bila značajno veća u odnosu na gustinu kosti u defektima gde je za nosač korišćen nanomaterijal i to kod defekta ispunjenog BO-ADSC graftom (Studentov t test: $p<0,05$), BO implantatom ($p<0,05$) i BO-BC graftom ($p<0,05$).

Posle šeste nedelje vrednost procenta gustine kosti graftova i implantata u defektima u kojima je kao nosač korišćen *Bio-Oss* u proseku je bila značajno veća u odnosu na gustinu kosti u defektima gde je za nosač korišćen nanomaterijal i to kod defekta ispunjenog BO-CAT graftom ($p<0,01$) i BO-BC graftom ($p<0,05$).

Upoređujući vrednosti koštane gustine ispunjenih defekata izražene kao procenat od gustine normalne kosti u odnosu na vrstu materijala i vreme uočljivo je da u grupi, u kojoj je kao nosač korišćen *Bio-Oss* (Tabela 4.6), graft sastavljen od BO-ADSC ima značajnu prednost u prvoj ($p<0,001$) i trećoj ($p<0,05$) nedelji u odnosu na SR dok se ta prednost u šestoj nedelji gubi. Takođe je značajan nalaz da je u prvoj i trećoj nedelji razlika u gustini između BO-ADSC grafta i okolne zdrave kosti statistički zanemarljivo mala.

Defekt ispunjen BO-CAT graftom pokazuje statistički značajnu razliku u odnosu na SR samo u prvoj nedelji ($p<0,001$), dok je ta razlika kada je u pitanju zdrava kost prisutna i u prvoj i u trećoj nedelji u korist zdrave kosti.

Defekt ispunjen implantatom *Bio-Oss*-a ima statistički značajnu razliku u odnosu na SR u prvoj ($p<0,001$) i trećoj ($p<0,01$) nedelji, ali se ta razlika u šestoj nedelji menja u korist SR ($p<0,001$). U odnosu na zdravu kost, prisutna je statistički značajna razlika u trećoj i šestoj nedelji u korist zdrave kosti ($p<0,001$).

Tabela 4.6. Poređenje relativne gustine kosti na mestima defekata po nedeljama, kada je nosač u graftovima bio *Bio-Oss*

Grupa	Vrsta rupe	Nedelja		
		I	III	VI
BIOOSS	BO-ADSC	82,65±7,77	113,10±22,40	59,40±17,08
	BO-CAT	54,27±15,77	31,27±10,31	84,26±23,28
	BO	75,88±12,80	43,86±16,51	18,35±7,24
	BO-BC	76,38±22,13	58,61±9,75	75,42±18,86
	SR	8,10±3,57	5,81±1,85	69,86±2,52
	ZK	100,00	100,00	100,00
Poređenje između rupa	BO-ADSC vs BO-CAT	0,019	<0,001	0,196
	BO-ADSC vs BO	0,957	<0,001	0,009
	BO-ADSC vs BO-BC	0,969	<0,001	0,627
	BO-ADSC vs SR	<0,001	<0,001	0,903
	BO-ADSC vs ZK	0,296	0,698	0,010
	BO-CAT vs BO	0,117	0,730	<0,001
	BO-CAT vs BO-BC	0,103	<0,001	0,950
	BO-CAT vs SR	<0,001	0,100	0,720
	BO-CAT vs ZK	<0,001	<0,001	0,643
	BO vs BO-BC	0,999	0,167	<0,001
	BO vs SR	<0,001	0,006	0,001
	BO vs ZK	0,062	<0,001	<0,001
	BO-BC vs SR	<0,001	0,003	0,993
	BO-BC vs ZK	0,071	0,010	0,204
SR vs ZK	<0,001	<0,001	0,077	

Defekt ispunjen BO-BC graftom pokazuje značajno veću gustinu u odnosu na SR u prvoj ($p<0,001$) i trećoj ($p<0,005$) nedelji da bi se u šestoj nedelji ta razlika izgubila. U odnosu na zdravu kost, primetna je statistički značajna razlika u trećoj nedelji ($p<0,01$) u korist zdrave kosti.

U grupi u kojoj je kao nosač korišćen nanomaterijal (Tabela 4.7), graft sastavljen od NM-ADSC ima značajnu prednost u prvoj ($p<0,001$) i trećoj ($p<0,05$) nedelji u odnosu na SR dok se ta prednost u šestoj nedelji gubi. Kada je u pitanju zdrava kost značajna razlika postoji samo u prvoj nedelji i to u korist zdrave kosti.

Tabela 4.7. Poređenje relativne gustine kosti na mestima defekata po nedeljama, kada je nosač u grafovima bio nanomaterijal

Grupa	Vrsta rupe	Nedelja		
		I	III	VI
NANO	NM-ADSC	39,96±13,53	68,47±28,55	72,11±30,60
	NM-CAT	14,30±5,60	26,47±31,77	30,52±2,06
	NM	12,58±8,57	14,55±5,97	28,10±5,60
	NM-BC	12,95±3,86	19,29±9,52	31,75±22,06
	SR	6,69±1,65	24,67±17,24	80,61±11,90
	ZK	100,00	100,00	100,00
Poređenje između rupa	NM-ADSC vs NM-CAT	0,001	0,062	0,021
	NM-ADSC vs NM	<0,001	0,010	0,014
	NM-ADSC vs NM-BC	0,001	0,022	0,026
	NM-ADSC vs SR	<0,001	0,048	0,975
	NM-ADSC vs ZK	<0,001	0,243	0,203
	NM-CAT vs NM	0,999	0,949	0,999
	NM-CAT vs NM-BC	0,999	0,994	0,999
	NM-CAT vs SR	0,663	0,999	0,005
	NM-CAT vs ZK	<0,001	0,001	<0,001
	NM vs NM-BC	0,999	0,999	0,999
	NM vs SR	0,846	0,974	0,003
	NM vs ZK	<0,001	<0,001	<0,001
	NM-BC vs SR	0,812	0,999	0,006
	NM-BC vs ZK	<0,001	<0,001	<0,001
SR vs ZK	<0,001	<0,001	0,561	

Gustina defekta ispunjenog NM-CAT graftom pokazuje statistički značajnu razliku u odnosu na SR samo u trećoj nedelji ($p < 0,005$) ali u korist SR. Gustina okolne zdrave kosti u odnosu na ovaj graft je značajno veća kroz sva tri posmatrana perioda.

Isti obrazac odnosa gustine kosti u odnosu na spontanu regeneraciju i okolnu zdravu kost viđen je i kada su defekti ispunjeni NM implantatom i graftom NM-BC.

4.4. VREDNOSTI GUSTINE KOSTI POPUNJENIH DEFEKATA

Poredeći gustinu novostvorene kosti u procesu regeneracije i reparacije kalvarijalne kosti na mestu načinjenih defekata, koji su popunjavani različitim po sastavu implantatima i graftovima, uočljivo je da postoji različit obrazac tih procesa.

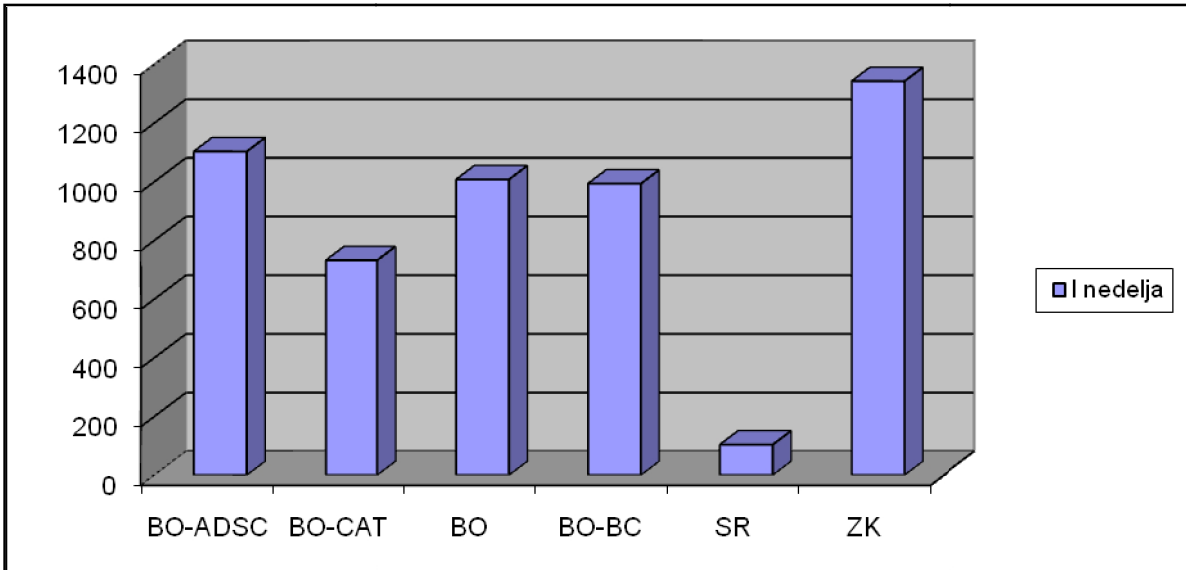
4.4.1. Vrednost gustine kosti popunjenih defekata - nosač *Bio-Oss*

U defektu popunjenom mešavinom matičnih ćelija iz masnog tkiva sa *Bio – Oss* nosačem (BO-ADSC) zapaža se da gustina kosti, nedelju dana posle unošenja grafta, iznosi preko 1100 numeričkih jedinica (Grafikon 4.1), odnosno 80% gustine intaktne kosti (Grafikon 4.2) i u poređenju sa BO-CAT graftom ima značajnu prednost. Naročito su ove vrednosti značajne u odnosu na vrednosti gustine kosti u defektu u kome se odvijala spontana regeneracija. Nakon tri nedelje ta gustina iznosi 10% više od intaktne kosti (Grafikon 4.4). Posle šest nedelja zabeležen je drastičan pad vrednosti na ispod 60% gustine intaktne kosti (Grafikon 4.6).

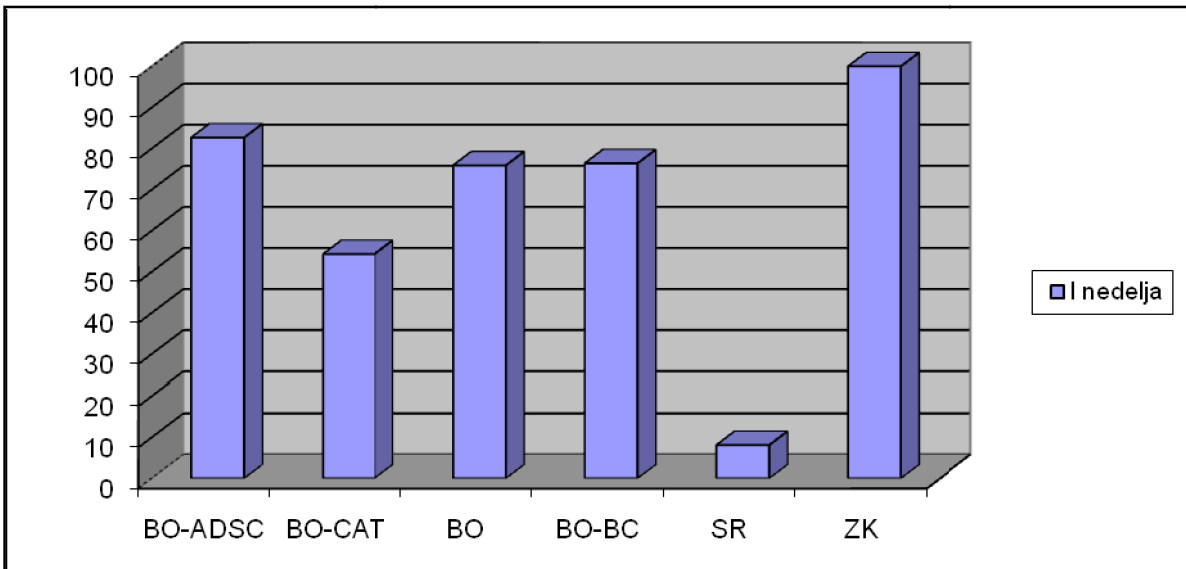
U defektu sa graftom sačinjenim od mešavine iseckanog masnog tkiva i *Bio – Oss* nosača (BO-CAT), posle nedelju dana od popune defekta, gustina kosti je bila na nivou 50% od intaktne kosti (Grafikon 4.2). Posle treće nedelje vrednost pada ispod 30% da bi u periodu između treće i šeste nedelje porasla na oko 80% gustine intaktne kosti.

Kontrola u defektu popunjenom samo *Bio–Oss*-om pokazuje obrazac u dinamičnu promenu koštane gustine u kojim se beleži drastičan i konstantan pad gustine kosti kroz posmatrani period. (Grafikon 4.1;Grafikon 4.3;Grafikon 4.5.)

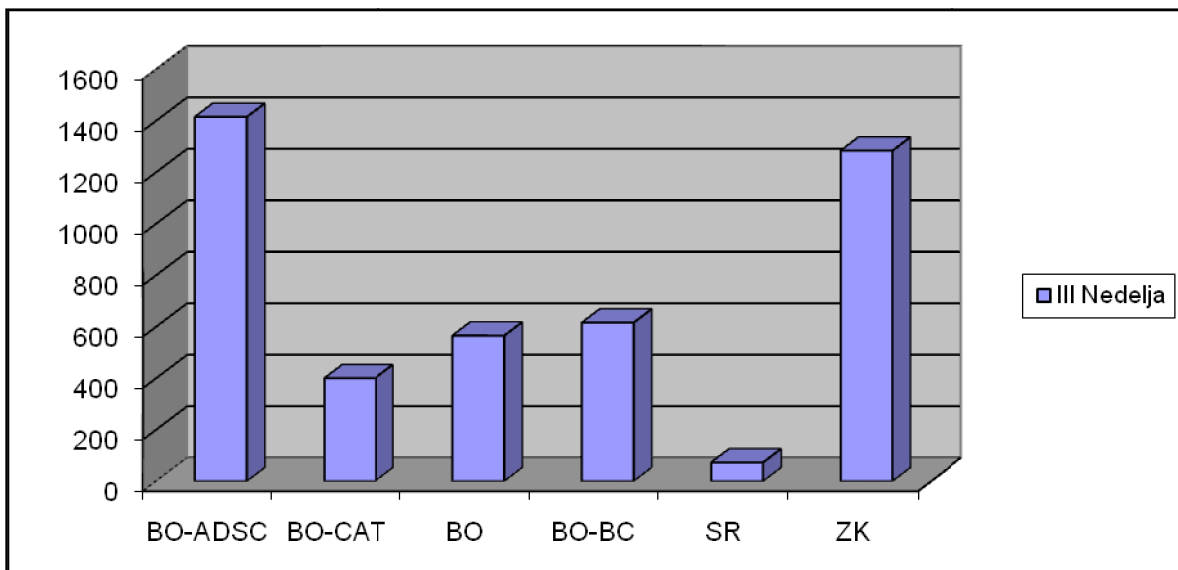
Kontrolna mešavina sačinjena od *Bio–Oss*-a i pune krvi (BO-BC) nije, u posmatranim periodima, drastično menjala gustinu koštanog tkiva, a ovaj parametar je iznosio oko 60-75% od intaktne kosti.



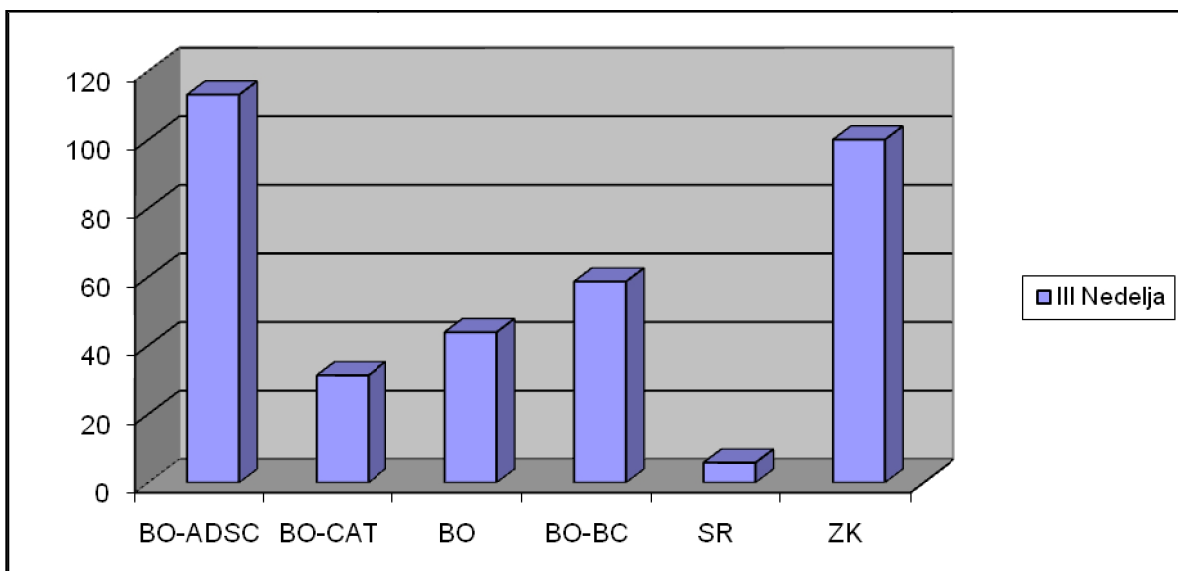
Grafikon 4.1. Vrednosti gustine kosti merene na mestu defekata nedelju dana posle njihovog popunjavanja ispitivanim grafovima i implantatima – nosač *Bio-Oss*



Grafikon 4.2. Vrednosti gustine kosti u procentima merene na mestu defekata posle nedelju dana u odnosu na intaktnu kost– nosač *Bio-Oss*



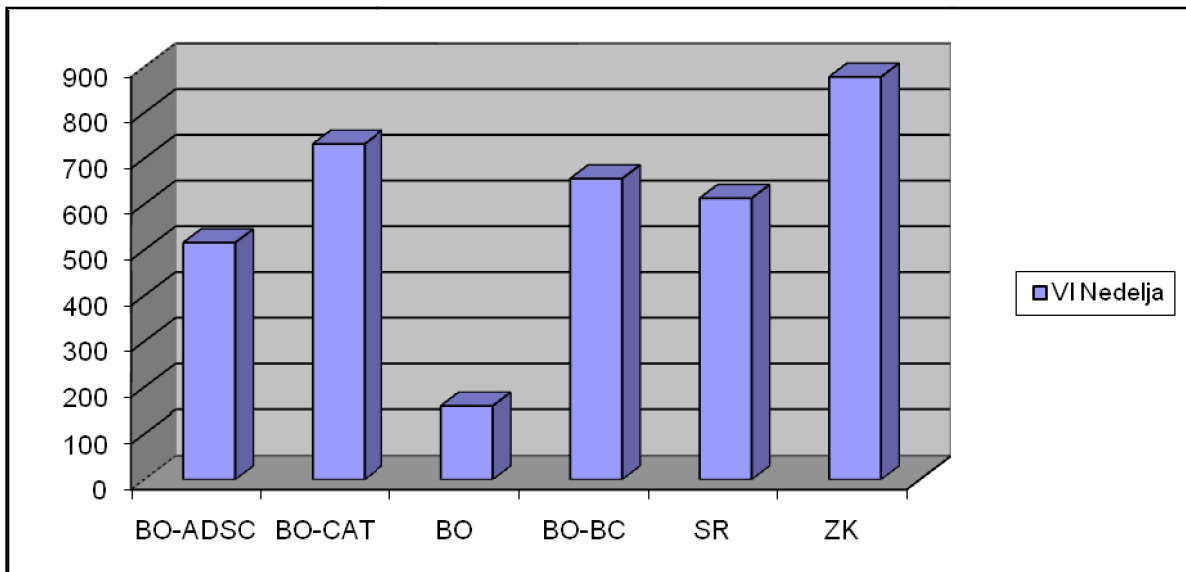
Grafikon 4.3. Vrednosti gustine kosti merene na mestu defekata tri nedelje posle njihovog popunjavanja ispitivanim graftovima i implantatima– nosač *Bio-Oss*



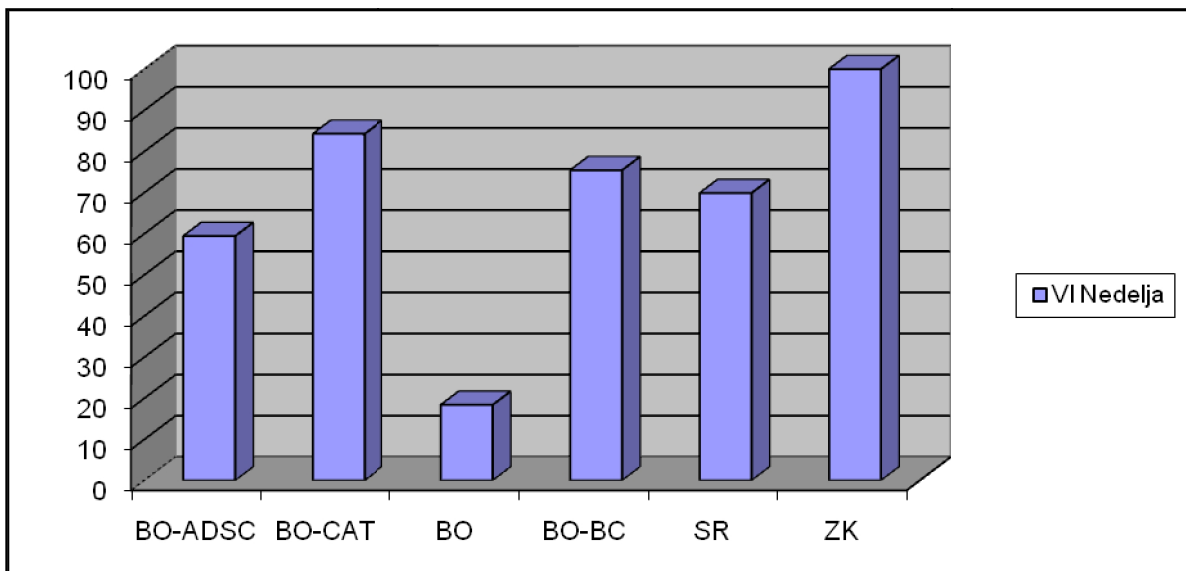
Grafikon 4.4. Vrednosti gustine kosti u procentima merene na mestu defekata posle tri nedelje u odnosu na intaktnu kost– nosač *Bio-Oss*

Konačno, kao opšta kontrola, služio je nepopunjen defekt u kome se odvijala spontana regeneracija (SR). U prva dva posmatrana perioda gustina kosti se nije značajno menjala i iznosila je oko 6-8% od gustine zdrave kosti. Šest nedelja nakon formiranja defekta gustina

kosti je dostigla oko 70% gustine intaktne kosti. Očigledno je dakle da, u periodu od treće do šeste nedelje, spontana regeneracija doživljava drastičnu akceleraciju.



Grafikon 4.5. Vrednosti gustine kosti merene na mestu defekata šest nedelja posle njihovog popunjavanja ispitivanim grafovima i implantatima – nosač *Bio-Oss*



Grafikon 4.6. Vrednosti gustine kosti u procentima merene na mestu defekata posle šest nedelja u odnosu na intaktnu kost – nosač *Bio-Oss*

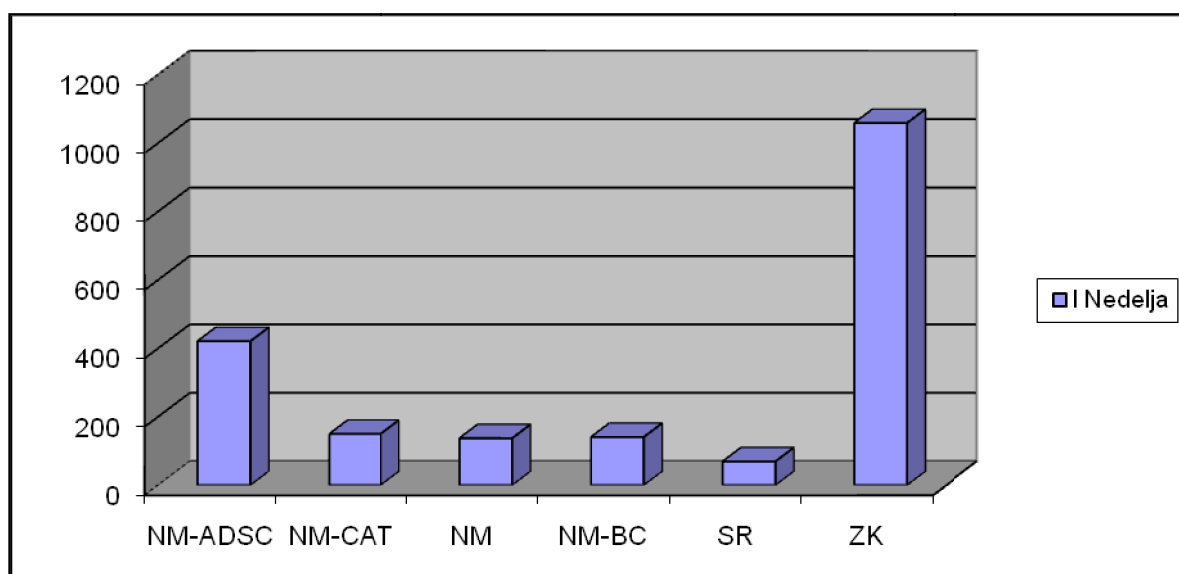
4.4.2. Vrednost gustine kosti popunjenih defekata - nosač Nanomaterijal

Kada je nano-kompozitni materijal korišćen kao nosač u graftu onda je posebno izraženo svojstvo ADSCs u povećanju koštane gustine i u prva dva perioda je ta kombinacija superiorna u odnosu na ostale kao i na SR. Posebno je uočljivo da od prve do treće nedelje gustina tkiva poraste sa oko 40% na skoro 70% od gustine zdrave kosti (Grafikon 4.8; Grafikon 4.10) U poslednjem periodu od treće do šeste nedelje vrednosti ovog parametra su se neznatno povećale (Grafikon 4.11; Grafikon 4.12) što je period kada regeneracija nepopunjenog defekta doživljava akceleraciju i ubedljivo prevazilazi ostale defekte popunjene nanomaterijalom kao nosačem.

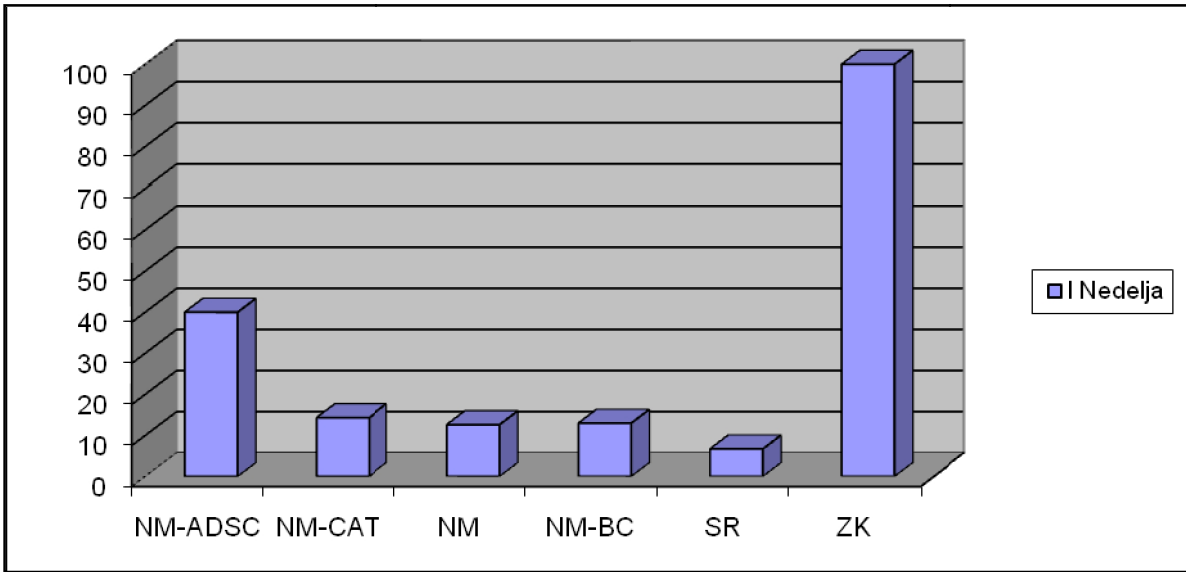
U defektu, popunjenom kombinacijom nano-kompozitnog materijala i seckanog masnog tkiva (NM-CAT), tokom celog ispitivanog perioda beleži se slabi ali kontinuirani rast gustine tkiva koji posle šest nedelja dostigne oko 30% gustine zdrave kosti.

Ovakav obrazac vidi se i u slučaju popune defekta kosti samim nano-kompozitnim materijalom, s tom razlikom što se tokom prve tri nedelje ne beleži uočljiv porast tkivne gustine.

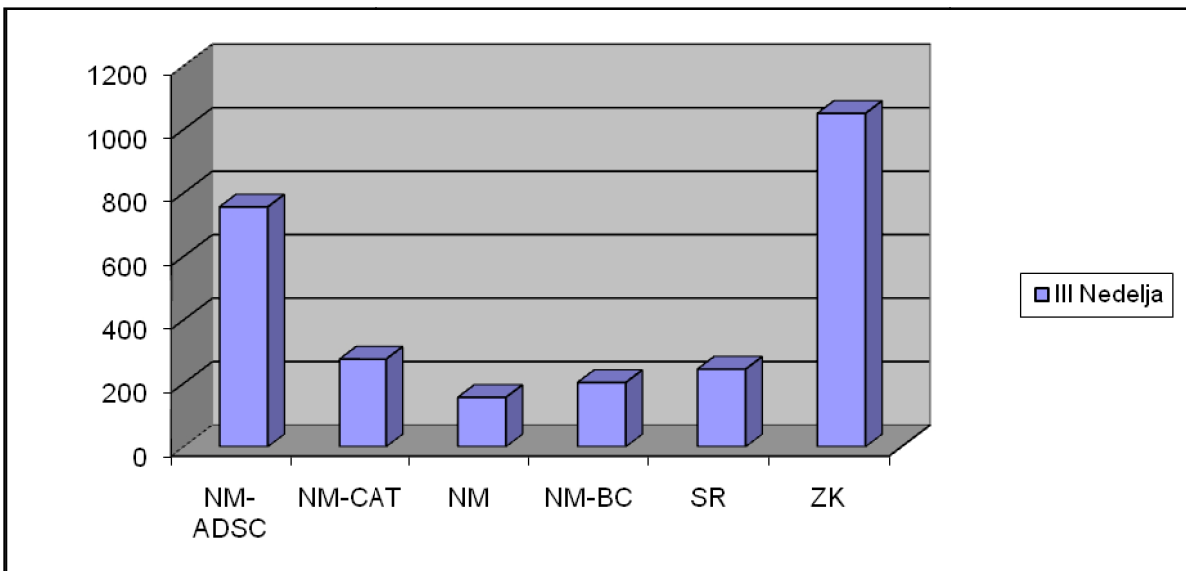
Takođe sličan obrazac regeneracije i reparacije uočljiv je i kada je defekt popunjen graftom načinjenim mešavinom nano-kompozitnog materijala i pune krvi (NM-BC).



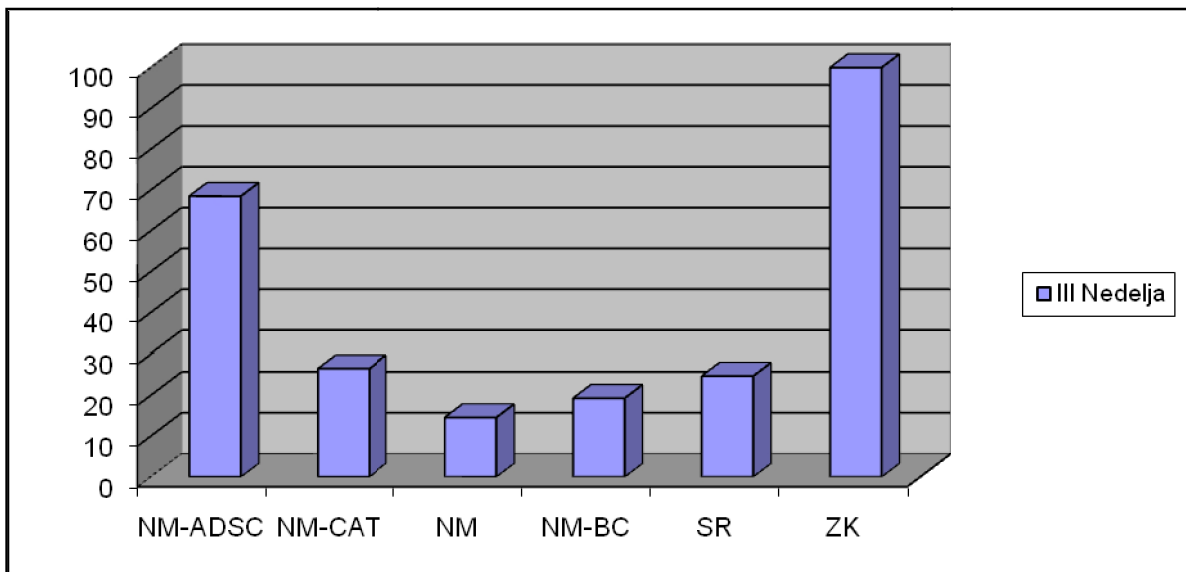
Grafikon 4.7. Vrednosti gustine kosti merene na mestu defekata nedelju dana posle njihovog popunjavanja ispitivanim graftovima i implantatima – nosač nanomaterijal



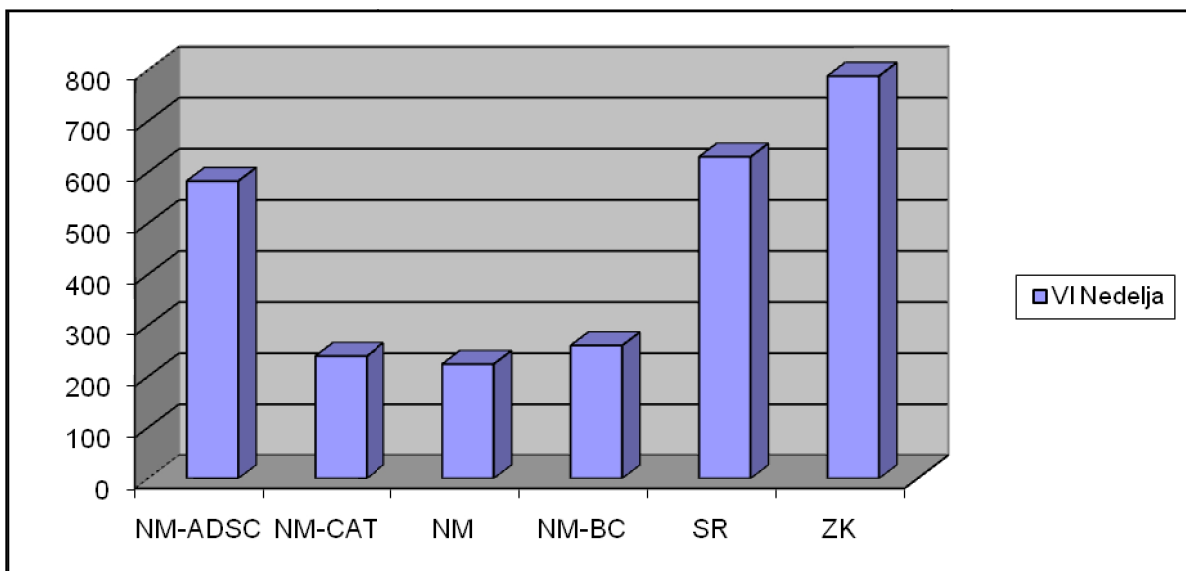
Grafikon 4.8. Vrednosti gustine kosti u procentima merene na mestu defekata posle nedelju dana u odnosu na intaktnu kost – nosač nanomaterijal



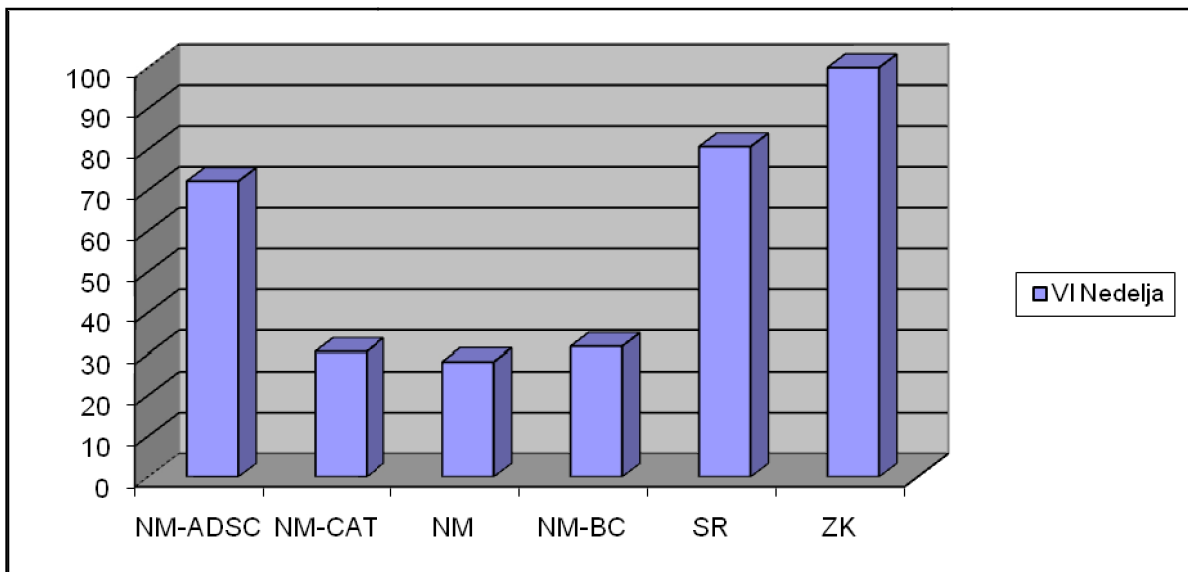
Grafikon 4.9. Vrednosti gustine kosti merene na mestu defekata tri nedelje posle njihovog popunjavanja ispitivanim grafovima i implantatima – nosač nanomaterijal



Grafikon 4.10. Vrednosti gustine kosti u procentima merene na mestu defekata posle tri nedelje u odnosu na intaktnu kost – nosač nanomaterijal

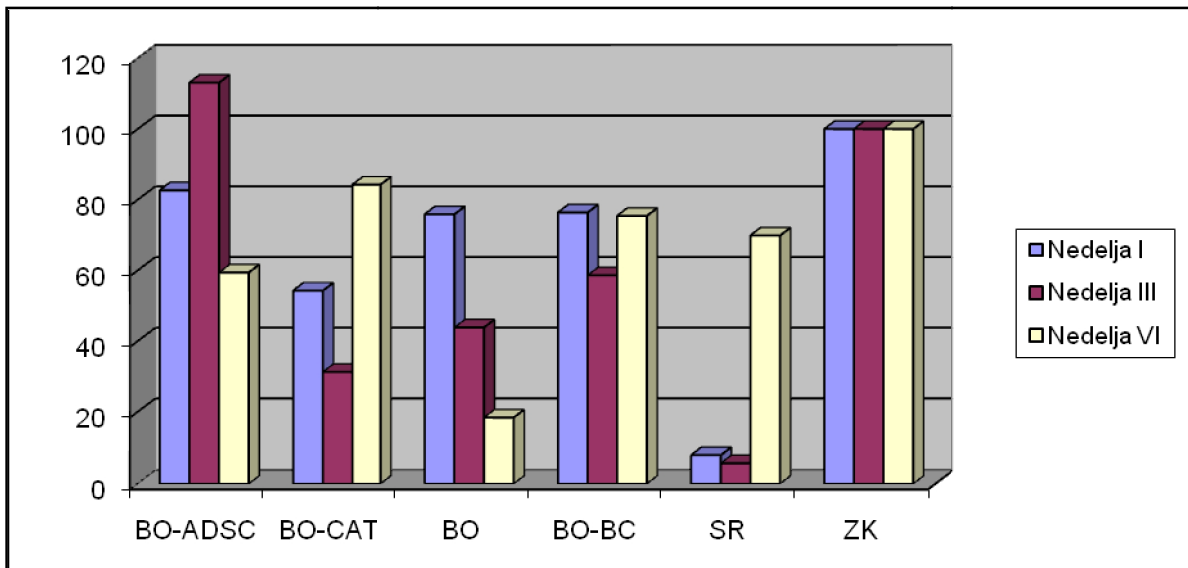


Grafikon 4.11. Vrednosti gustine kosti merene na mestu defekata šest nedelja posle njihovog popunjavanja ispitivanim graftovima i implantatima – nosač nanomaterijal



Grafikon 4.12. Vrednosti gustine kosti u procentima merene na mestu defekata posle šest nedelja u odnosu na intaktnu kost – nosač nanomaterijal

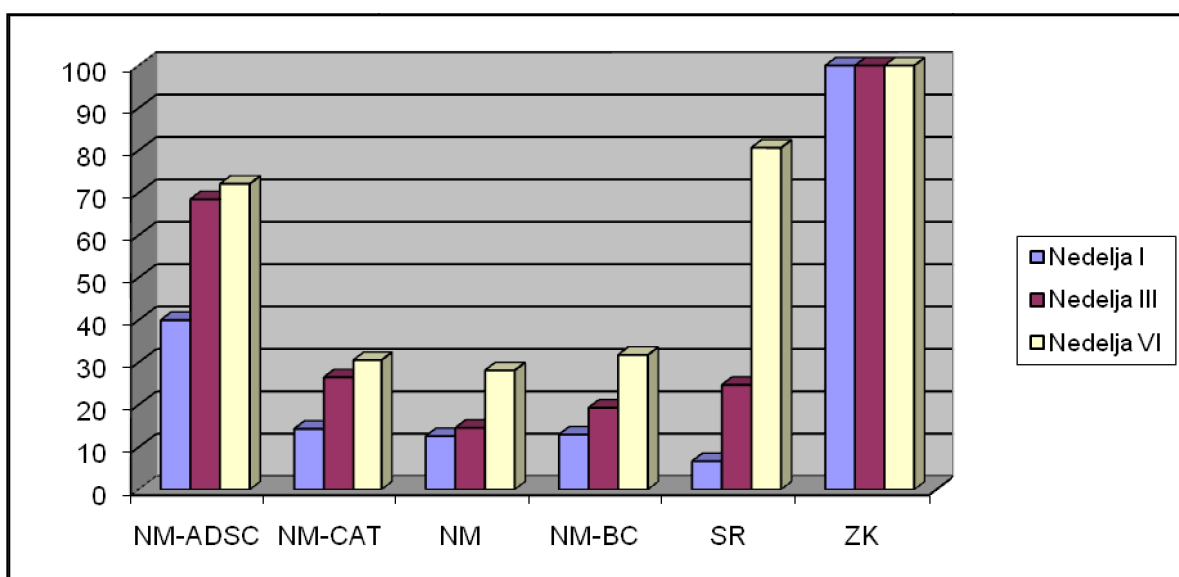
Kada se kompariraju dva ispitana materijala kao nosači vidi se dosta razlika u njihovim svojstvima koštanog supstituenta. Za nano-kompozitni materijal je očigledno da u toku celog ispitivanog perioda gustina tkiva-kosti raste sporijim ili bržim tempom, koji je takođe različit od perioda do perioda (Grafikon 4.14).



Grafikon 4.13 Vrednosti gustine kosti u procentima merene na mestima defekata po nedeljama u odnosu na intaktnu kost.

Sa druge strane, *Bio – Oss* kao koštani zamenik u funkciji nosača za graft ili imlantat, pokazuje vrlo različite obrasce u tempu i dinamici regeneracije kosti i reparacije defekata u zavisnosti od toga sa čime je kombinovan.

Ipak, ako se napravi poređenje popuna sa čistim BO i čistim NM onda je očigledno da u ispitivanom šestonedeljnom periodu smer promena tkivne gustine u slučaju ova dva koštana supstituenta je obrnut. Koštani defekt popunjen BO tokom ispitivanog perioda gubi na koštanoj gustini (Grafikon 4.13), a sa NM se ona povećava (Grafikon 4.14).



Grafikon 4.14 Vrednosti gustine kosti u procentima merene na mestima defekata po nedeljama u odnosu na intaktnu kost.

Upoređivanjem pojedinačnih vrednosti za ispitivane periode tokom prve i treće nedelje, koštana gustina u defektu popunjenom BO višestruko je veća od iste u defektu popunjenom NM. Nakon šest nedelja koštana gustina u defektu popunjenom sa NM je uočljivo veća od iste u defektu popunjenom BO.

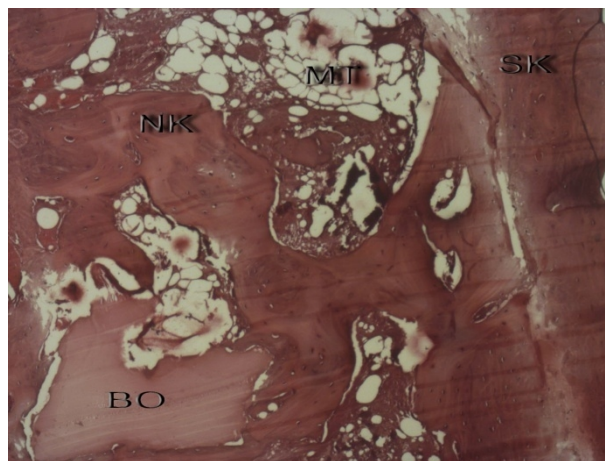
4.5. HISTOLOŠKI NALAZ POPUNJENIH DEFEKATA I KALVARIJE

4.5.1. HISTOLOŠKI NALAZ POSLE ČETIRI NEDELJE

4.5.1.1. Histološki nalaz posle 4 nedelje – nosač *Bio-Oss*

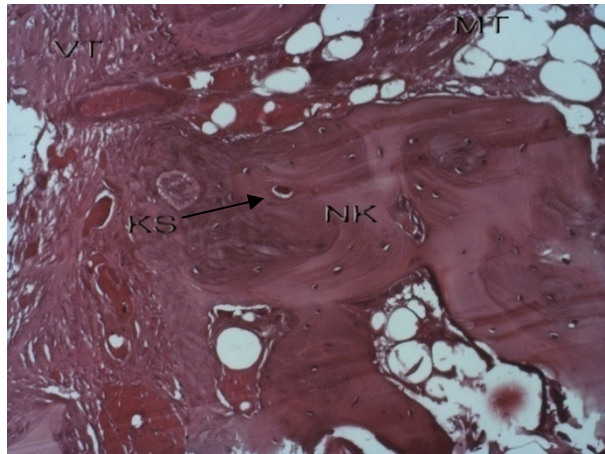
Graft BO-ADSC

Histološki nalaz defekta na kalvariji kunića popunjenog graftom BO-ADSC posle četiri nedelje pokazuje formiranje nove kosti okružene granulama *Bio-Oss*-a i masnim tkivom (Slika 4.40). Novoformirana kost vrlo intimno prijanja na staru kost, a u pojedinim njenim delovima vidi se formiranje novih krvnih sudova (Slika 4.41). Na površini preparata prisutno je obilje vezivnog tkiva.



Slika 4.40. Histološka slika grafta BO-ADSC starog 4 nedelje na granici prema staroj kosti.

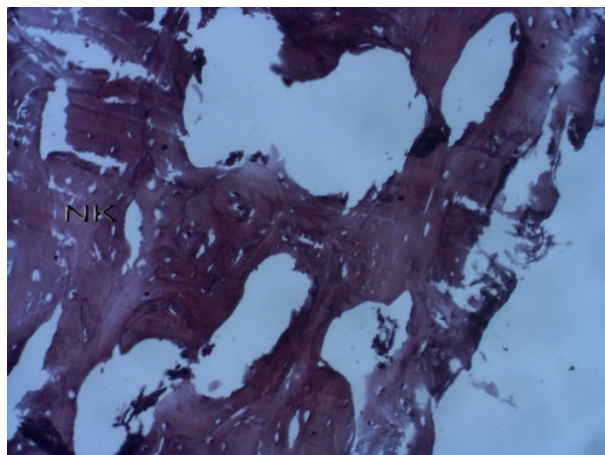
SK-stara kost, NK-novoformirana kost, BO- *Bio-Oss*, MT-masno tkivo. (HE, x10)



Slika 4.41. Krvni sudovi u novostvorenoj kosti u graftu BO-ADSC starom 4 nedelje (obeleženo strelicom). NK-novoformirana kost , VT-vezivno tkivo. (HE, x10)

Graft BO-CAT

U defektu na kalvariji kunića popunjenom graftom BO-CAT posle četiri nedelje histološki nalaz ukazuje na formiranje nove kosti i velikim brojem praznih prostora u njenoj strukturi najverovatnije nastalih nakon resorpcije granula *Bio-Oss*-a (Slika 4.42). Ove praznine vide se i na granici sa starom kosti (Slika 4.43).



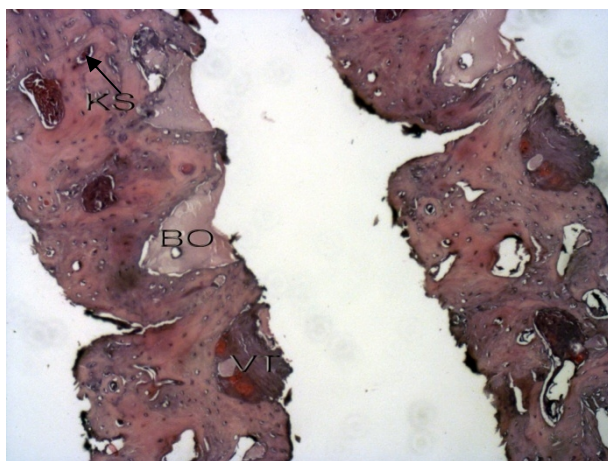
Slika 4.42. Histološka slika novostvorene kosti u graftu BO-CAT starom 4 nedelje. NK-novoformirana kost. (HE, x20)



Slika 4.43. Histološka slika novostvorene kosti u graftu BO-CAT starom 4 nedelje. SK-stara kost, NK-novoformirana kost. (HE, x10)

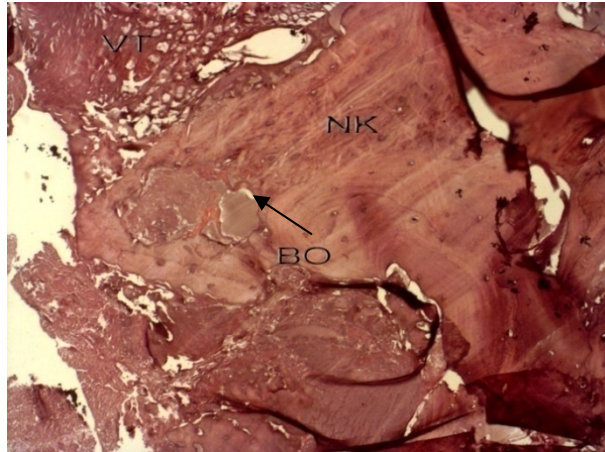
Implantat BO

Na histološkim presecima defekta ispunjenog BO implantatom, posle četiri nedelje od implantiranja (Slika 4.44) uočava se, levo na preparatu, stara kost. Desno od nje vide se granule *Bio-Oss*-a, a između njih prisutna polja novostorene kosti i u njima novi krvni sudovi.

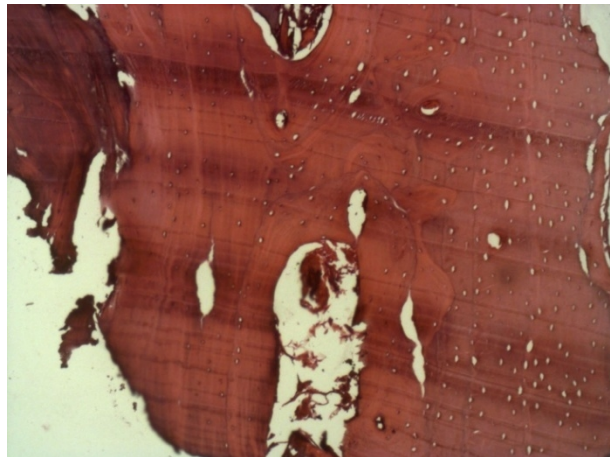


Slika 4.44. Novi krvni sudovi (obeleženo strelicom) i novi kolagen u implantatu BO starom 4 nedelje. BO-*Bio-Oss*, KS-krvni sud. (HE, x10)

Ceo preparat pokazuje intenzivnu crvenu prebojenost zbog prisustva kolagena (Slika 4.45; Slika 4.46) što upućuje na početak regeneracije.



Slika 4.45. Struktura nove kosti u implantatu BO starom 4 nedelje. NK- novoformirana kost, BO-*Bio-Oss*, MT-masno tkivo, VT-vezivno tkivo. (HE, x20)

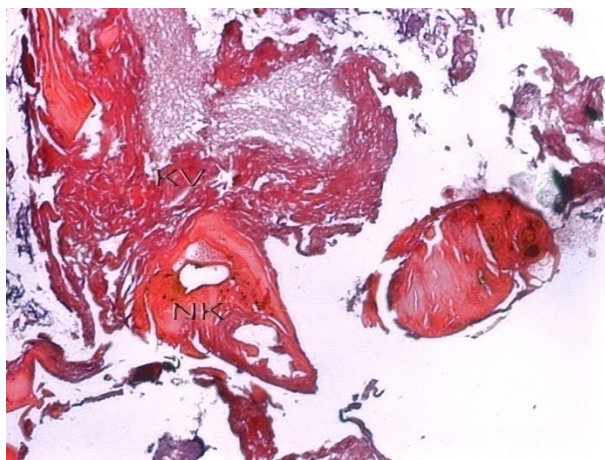


Slika 4.46. Novoformirana kost u implantatu BO starom 4 nedelje. (HE, x10)

4.5.1.2. Histološki nalaz posle 4 nedelje – nosač nanomaterijal

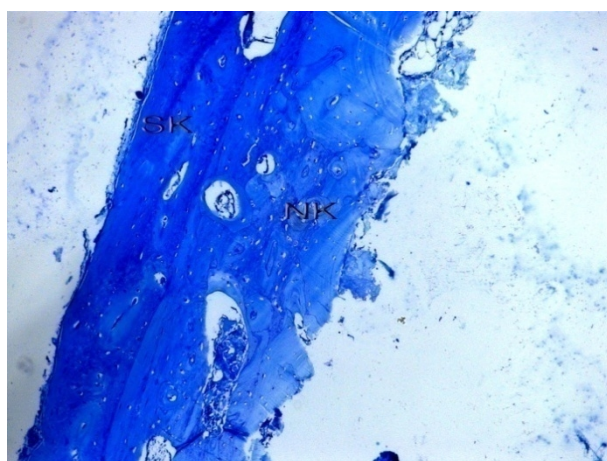
Graft NM-ADSC

Na histološkom preseku grafta NM-ADSC, posle četiri nedelje od popunjavanja defekta (Slika 4.47), vidi se novoformirana kost i krvni sudovi, čije je prisustvo tipično za regenerativni proces. Nova kost se uglavnom nalazi u graničnim delovima grafta sa recipijentnom kosti u blizini razvijenih krvnih sudova. Mogu se videti fragmenti spongiozne kosti u čijim šupljinama se uočava masno tkivo i hematopoeza. Ovaj tip grafta je dobro naseljen ćelijama. Uočljiva su mesta formiranja kostne srži i vidi se masno tkivo na većem delu površine preseka grafta, kao i vezivno tkivo koje prožima graft. Mestimično se vidi osteoblastni raspored ćelija na površini partikula graftiranog materijala. Graftirani materijal pokazuje mestimično veliku poroznost. Gusti kolagen je vidljiv oko ostrvaca materijala.



Slika 4.47. Nova kost i kolagen u graftu NM-ADSC starom 4 nedelje. NK-novoformirana kost, KV-kolagena vlakna.(HE, x10)

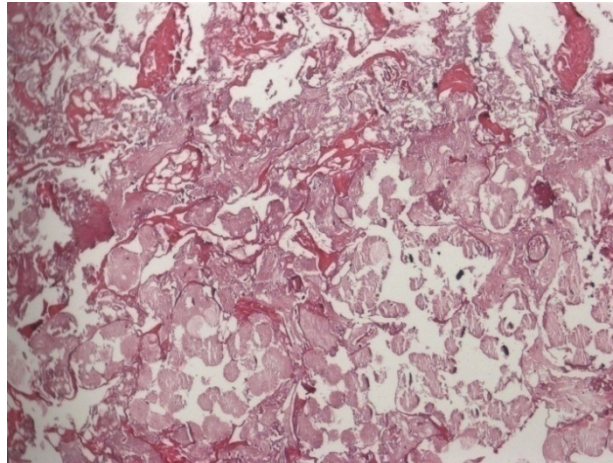
Preparat bojen Toluidin plavim (Slika 4.48) je acelularan, u „koštanim fragmentima“ postoje delovi koji odgovaraju lakunama osteocita, ali su prazni. Kroz ceo preparat uočavaju se masne kapi i vakuole. Vidi se fragment spongiozne kosti u čijim šupljinama se uočava masno tkivo i hematopoeza. Prisutan je kolagen. Delovi masnog tkiva liče i na kostnu srž (ćelije su između adipocita). Po periferiji i gore i dole i oko šupljina se vidi osteoid, dok je zrela kost u unutrašnjosti preparata. Nema osteoblasta po periferiji.



Slika 4.48. Nova kost u graftu NM-ADSC starom 4 nedelje. SK-stara kost, NK-novoformirana kost. (TB, x10)

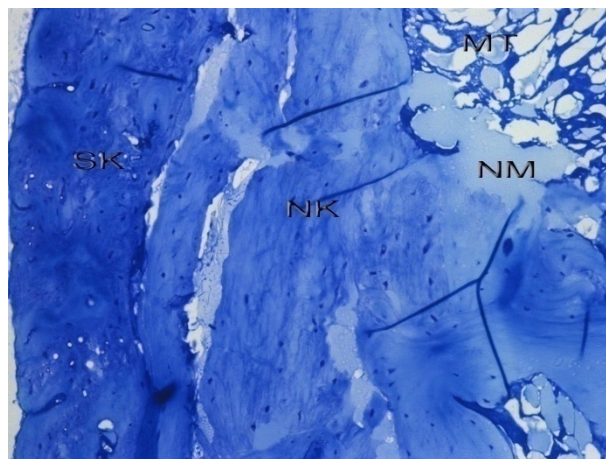
Graft NM-CAT

Histološki presek grafta NM-CAT (Slika 4.49) pokazuje prisutna kolagena vlakna unutar masnog tkiva, porozan materijal, masne kapi i vakuole. Vide se delovi mlade kosti, kao i zrela kost. Periferno su na preparatu prisutne masne ćelije sa ćelijama kostne srži u intersticijumu. Takođe se nalazi i acelularna bezstrukturna smesa različite gustine. Mogu se naći mesta kalcifikacije i osifikacije. Na preparatima dominira masno tkivo, sa puno drugih ćelija između ćelija masnog tkiva, fragmenti kosti sa osteocitima, a nailazi se i na lamele. Uočljivo je prisustvo palisadno poredanih ćelija koje bi mogle biti osteoblasti.



Slika 4.49. Novoformirana kost u graftu NM-CAT starom 4 nedelje. (HE, x10)

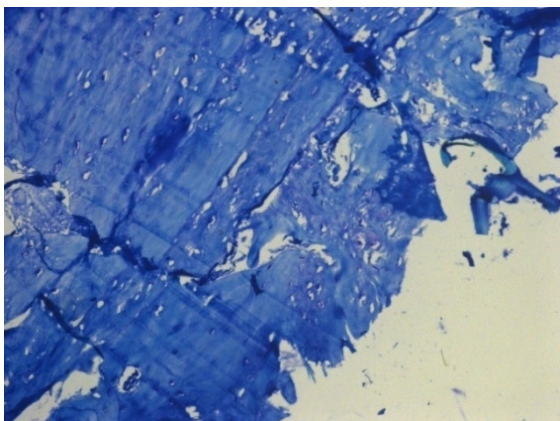
Na preparatu bojenom Toluidin plavim (Slika 4.50) uočava se formiranje nove kosti u graftu. U ostacima masnog tkiva je vidljiv nanomaterijal. Neka polja u graftu se vide kao mreža praznih prostora i kanala. Mestimično je vidljiv intenzivan razvoj novih krvnih sudova.



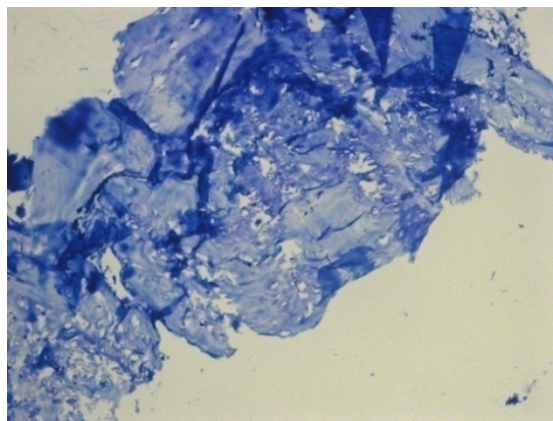
Slika 4.50. Novoformirana kost u graftu NM-CAT starom 4 nedelje. SK-stara kost, NK-novoformirana kost, MT-masno tkivo, NM-nanomaterijal. (TB, x10)

Implantat nanomaterijal

Histološki presek implantata NM posle četiri nedelje od ispuna pokazuje da se oko implantata (Slika 4.51) nalazi tipična struktura kosti – koštane gredice, osteociti zarobljeni u lakunama, šupljine ispunjene krvnim ćelijama, ali nema adipocita, sa osteoblastima na površini. Ova kost je celularnija od nalaza na prethodnom preparatu.



Slika 4.51. Struktura novostvorene kosti u implantatu NM. (TB, x20)

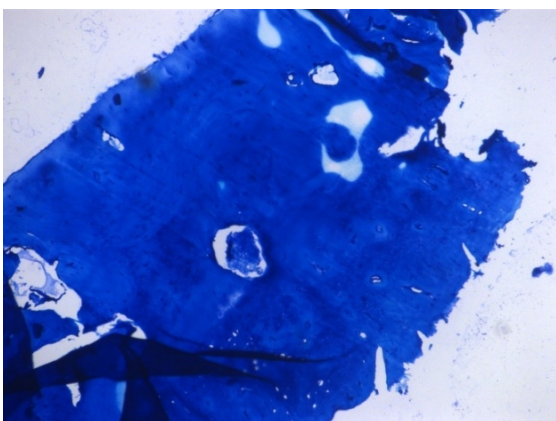


Slika 4.52. Visoka poroznost u novostvorenoj kosti u implantatu NM. (TB, x20)

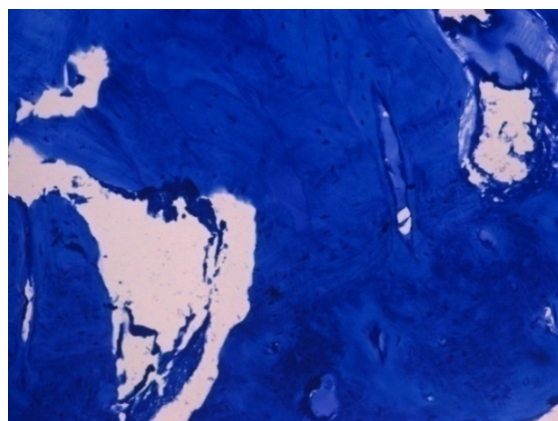
Na slici 4.52. vidi se materijal koji liči na koloid sa dosta malih vakuola što je znak resorpcije.

Graft NM-BC

Histološki presek grafta NM-BC (Slika 4.53) pokazuje bogato celularno koštano tkivo oko grafta, sa formiranom strukturom kosti. Granica između novoformirane i stare kosti (Slika 4.54) veoma teško se uočava.



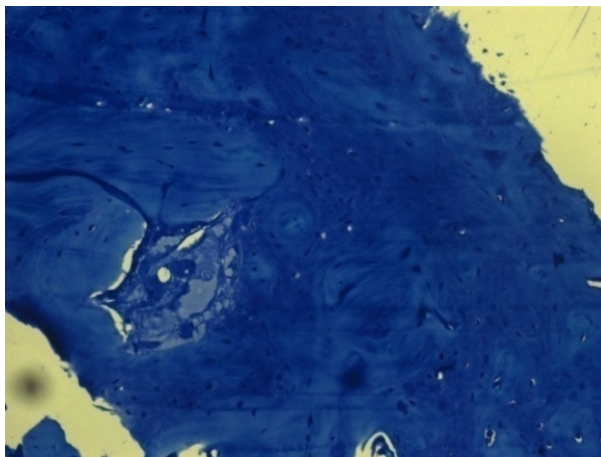
Slika 4.53. Histološka slika grafta NM-BC. (TB, x10)



Slika 4.54. Histološka slika graničnog dela grafta NM-BC i stare kosti. (TB, x20)

Spontana regeneracija

Histološki presek preparata u kome se odvijala spontana regeneracija (Slika 4.55) pokazuje samo koštano tkivo, ECM, osteocite u lakunama, koštane gredice spongiozne kosti i kolagena vlakna.



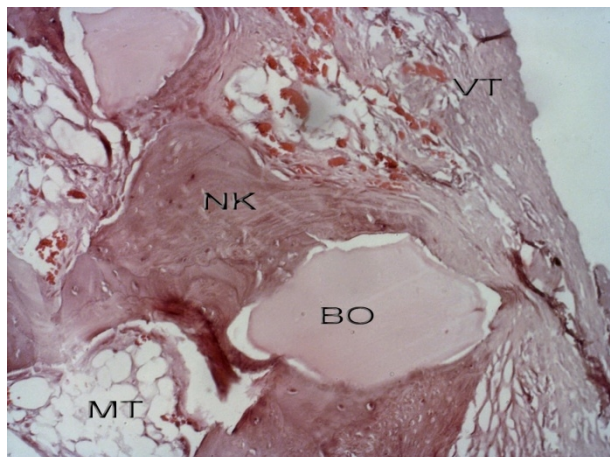
Slika 4.55. Histološka slika kosti u spontanoj regeneraciji. (TB, x10)

4.5.2. HISTOLOŠKI NALAZ POSLE OSAM NEDELJA

4.5.2.1. Histološki nalaz posle 8 nedelja – nosač *Bio-Oss*

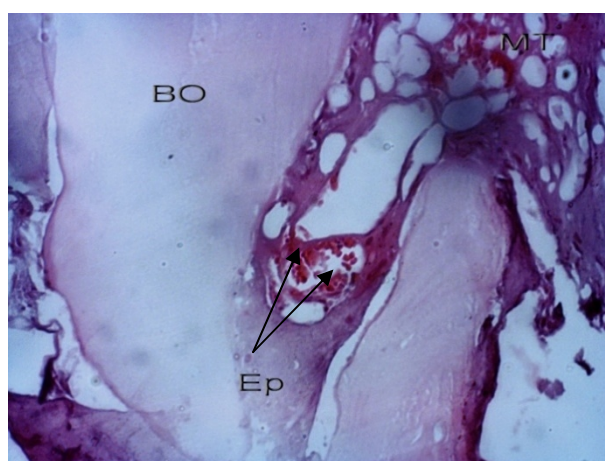
Graft BO-ADSC

Histološki nalaz defekta na kalvariji kunića popunjenog graftom BO-ADSC posle osam nedelja (Slika 4.56) pokazuje graft infiltrovan ćelijama sa osteogenom aktivnošću. Na površini grafta prisutna fibroza. Delovi grafta uhvaćeni u fibrozno tkivo. U prostoru između materijala vidi se formiranje osteona i početna mineralizacija.

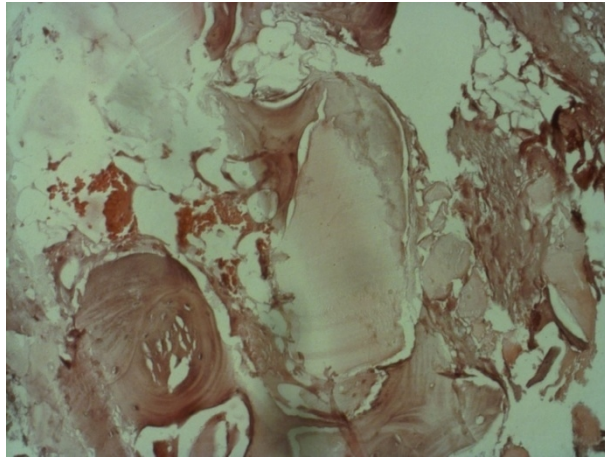


Slika 4.56. Novoformirana kost u prostoru između granula BO u graftu BO-ADSC starom 8 nedelje. NK-novoformirana kost, BO-*Bio-Oss*, MT-masno tkivo, VT-vezivno tkivo. (HE, x20)

Unutar grafta vide se ostrvca hematopoeze (Slika 4.57), a oko delova grafta mezenhimsko tkivo sa krvnim sudovima. Takođe, u graftu se se vidi primarna kost, kao znak osteogeneze (Slika 4.58.). Iz periosta sa površine primećuje se proliferacija veziva što može da sprečava naseljavanje matičnih ćelija. Na više preparata ovog grafta se vidi eritropoeza, kao i stvaranje nove kosti.

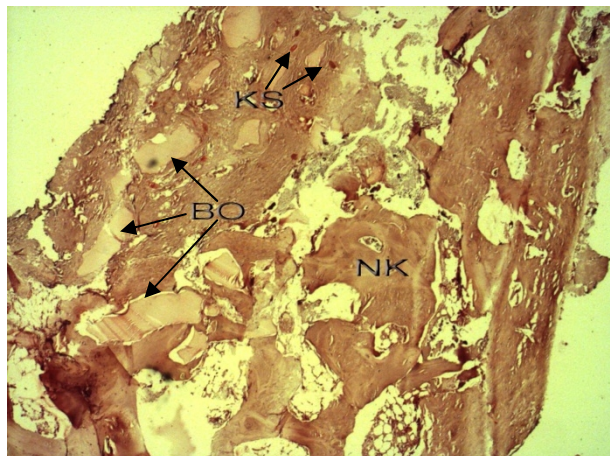


Slika 4.57. Eritropoeza u džepu BO unutar grafta BO-ADSC starog 8 nedelja. BO-*Bio-Oss* Ep-eritropoeza. (HE, x40)



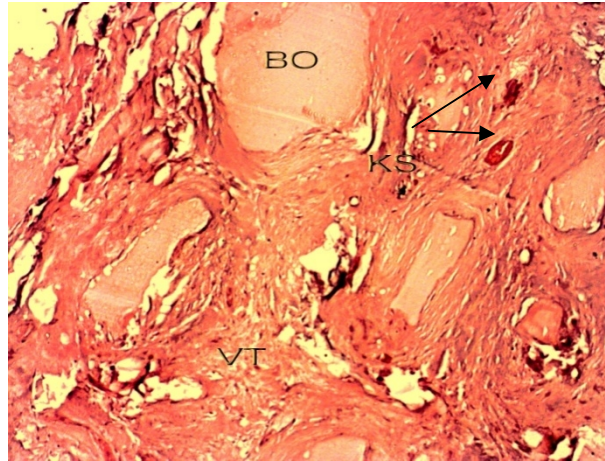
Slika 4.58. Detalj remodelacionog procesa na granici stare kosti i grafta BO-ADSC starog 8 nedelja. (HE, x20)

Graft BO-CAT



Slika 4.59. Novostvorena kost sa neresorbovanim BO u graftu BO-CAT starom 8 nedelja. NK-novoformirana kost, BO-*Bio-Oss*, KS-krvni sudovi. (HE, x5)

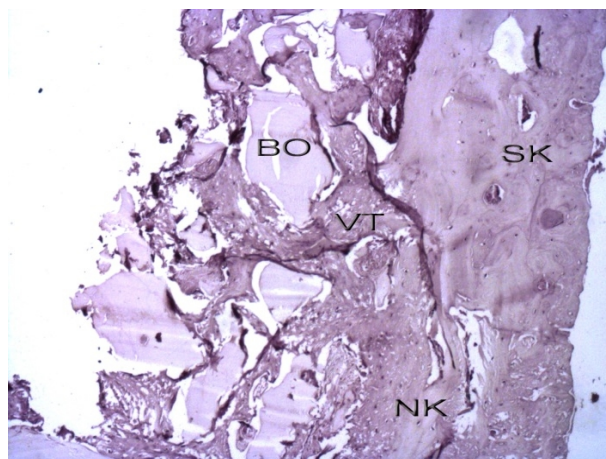
Na isečku kosti, uzete iz defekta popunjenog graftom BO-CAT starog osam nedelja, jasno se vidi novostvorena kost sa još neresorbovanim *Bio-Oss*-om (Slika 4.59). Takođe, uočljivo je stvaranje primarne kosti, kao i novih krvnih sudova, dok je *Bio-Oss* vidljivo integrisan u tkivo grafta (Slika 4.60).



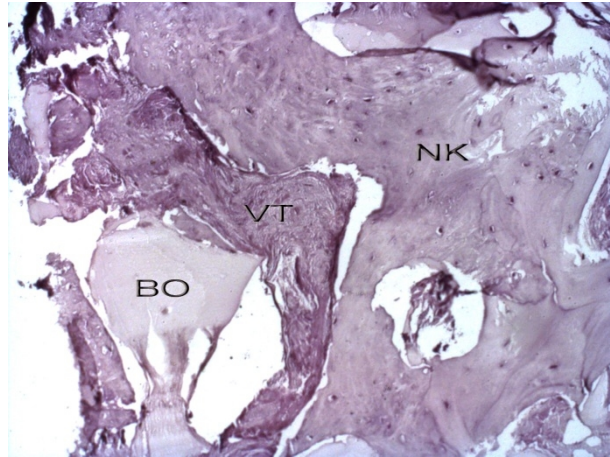
Slika 4.60. Vaskularizacija i razvijeno vezivno tkivo u graftu BO-CAT starom 8 nedelja.
BO-*Bio-Oss*, KS-krvni sudovi, VT-vezivno tkivo. (HE, x20)

Implantat BO

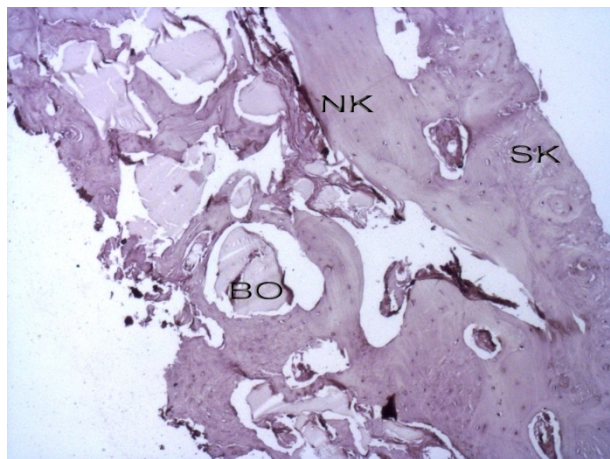
Na preparatima defekata kosti kalvarije popunjenih samo *Bio-Oss*-om posle osam nedelja od implantacije dobro se vidi prisustvo novostvorene kosti i vezivno tkivo (Slika 4.61; Slika 4.62). Granule *Bio-Oss*-a se uglavnom vide sa znacima procesa resorpcije koja je izvršena u prethodnom periodu (Slika 4.63).



Slika 4.61. Histološka slika implantata BO starog 8 nedelja. SK-stara kost, NK-novoformirana kost, BO- *Bio-Oss*, VT-vezivno tkivo. (HE, x10)



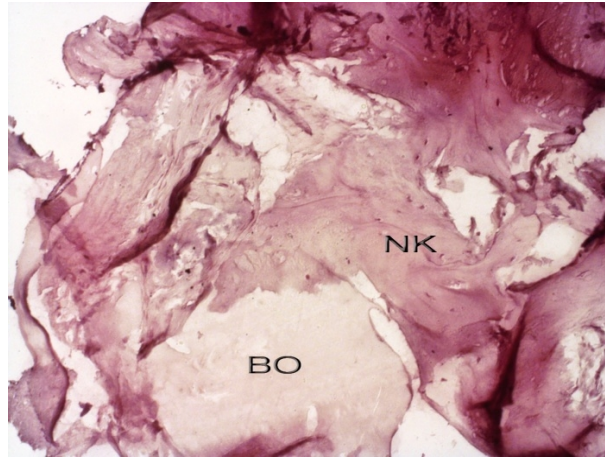
Slika 4.62. Novostvorena kost i vezivno tkivo u implantatu BO starom 8 nedelja. NK-novoformirana kost, BO- *Bio-Oss*, VT-vezivno tkivo. (HE, x20)



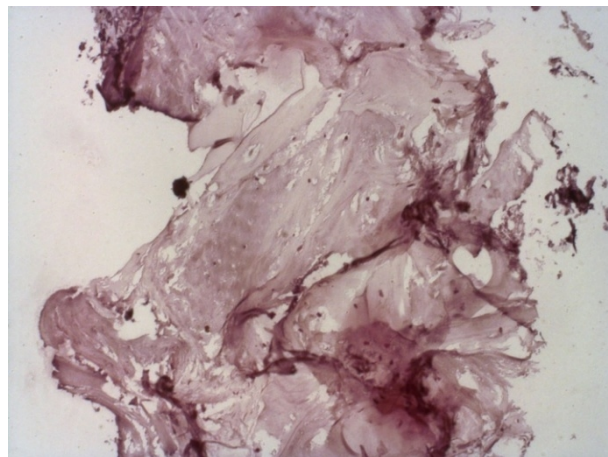
Slika 4.63. Novostvorena kost i granule BO u resorpciji u implantatu BO starom 8 nedelja. SK-stara kost, NK-novoformirana kost, BO- *Bio-Oss*. (HE, x10)

Graft BO-BC

Na histološkim slikama defekata kosti kalvarije popunjenih graftom BO-BC starim osam nedelja, vidi se novostvorena kost oko partikula BO, što ukazuje na osteogeni proces u ovom tipu grafta (Slika 4.64; Slika 4.65).



Slika 4.64. Novostvorena kost oko partikula BO u graftu BO-BC starom 8 nedelja.
NK-novoformirana kost, BO- *Bio-Oss*. (HE, x20)



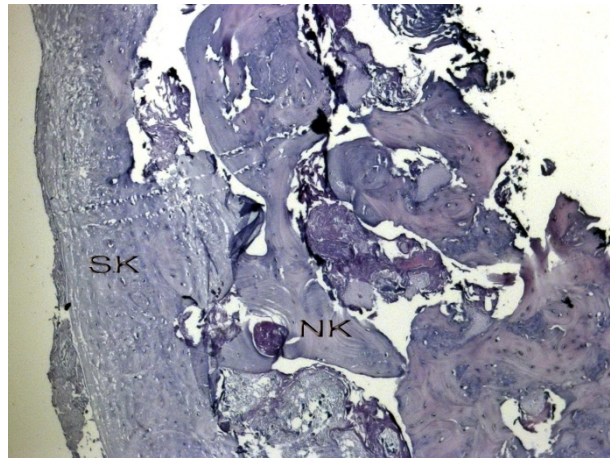
Slika 4.65. Novostvorena kost u graftu BO-BC starom 8 nedelja. (HE, x20)

4.5.2.2. Histološki nalaz posle osam nedelja – nosač nanomaterijal

Graft NM-ADSC

U defektu kalvarije sa graftom NM-ADSC starim osam nedelja vidi se mlada kost, osteoid (nemineralizovana kost), kao tanak sloj uz periferiju grafta i nepravilno unutar kosti (Slika 4.66; Slika 4.67). U spongioznoj kosti su vidljivi osteociti, osteoblasti i aktivna kost. U odnosu na četvrtu nedelju je manje osteoida, više zrele kosti, međutim, šupljine unutar kojih se u četvrtoj nedelji vidi kosna srž, ovde je destruisano tkivo. U okviru osteoida uočavaju se ljubičasta polja hrskavice. Mlada kost dominira na slikama (vidi se u crvenkastoj boji).

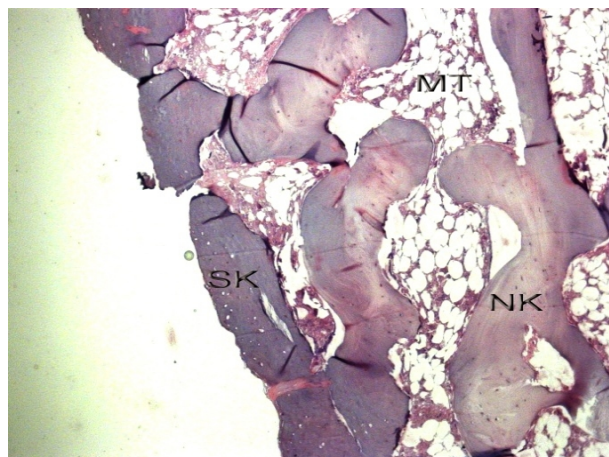
Osteociti u lakunama pokazuju minimalnu sintezu oko sebe. Unutar gredica sunderaste kosti uočava se struktura sa osteocitima slična Haversovom sistemu. Bogatija je kosna srž u odnosu na četvrtu nedelju. Kost oko masnog tkiva je mlada.



Slika 4.66. Histološka slika kosti kalvarije sa graftom NM-ADSC starim 8 nedelja.

SK-stara kost, NK-novoformirana kost (HE, x10)

Uopšte, graft NM-ADSC star osam nedelja je jako celularan, dobro integrisan u staroj kosti sa očiglednim osteogenetskim procesima, vidljivim i kao formiranje Haversovog sistema i cementnih linija. Formirane lakune u graftu su takođe znak nove kosti. Polja sa uočljivom koncentracijom nanopartikula pokazuju poroznost koja podseća na poroznost prirodne kosti.



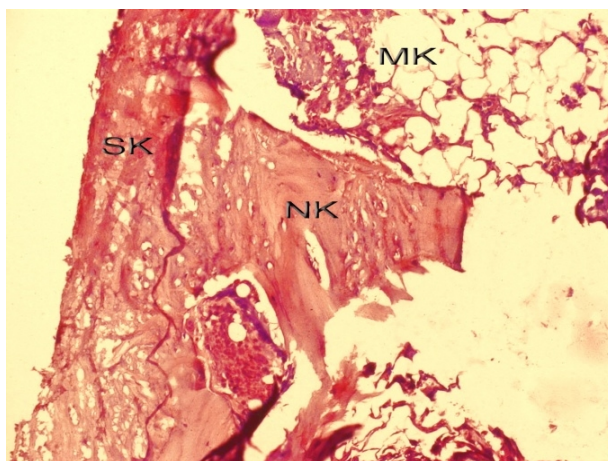
Slika 4.67. Histološka slika grafta NM-ADSC starog 8 nedelja. SK-stara kost, NK-novoformirana kost, MT-masno tkivo. (HE, x10)

Graft NM-CAT

Na mestu defekta u kalvariji posle osam nedelja od popunjavanja graftom NM-CAT, vide se fragmenti kosti i masnog tkiva (Slika 4.68; Slika 4.69; Slika 4.70). Na preparatima se vide polja bogata kolagenom, čija je crvenija boja na HE preparatima posebno istaknuta unutar nove kosti. Mestimično unutar kostnog tkiva je vidljiva kosna srž, kao i masno tkivo.

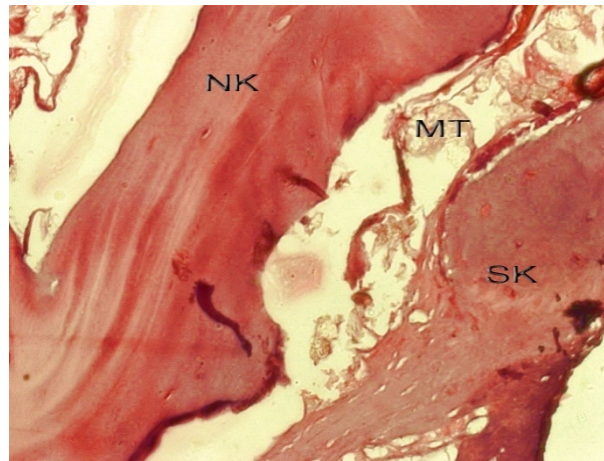


Slika 4.68. Histološka slika kosti kalvarije sa graftom NM-CAT starim 8 nedelja. SK-stara kost, NK-novoformirana kost. (TB, x10)



Slika 4.69. Novostvorena kost u graftu NM-CAT starom 8 nedelja. SK-stara kost, NK-novoformirana kost, MT-masno tkivo. (HE, x20)

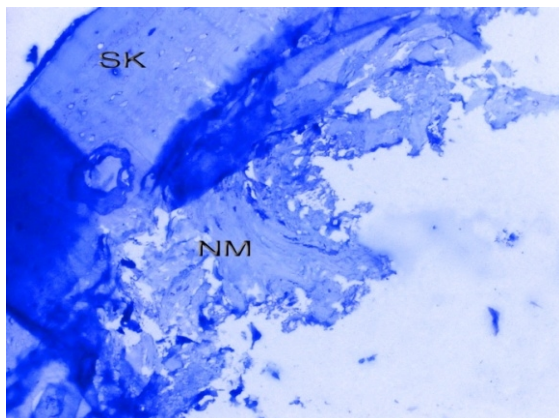
Slika 4.70 prikazuje granični deo kosti kalvarije i grafta NM-CAT starog osam nedelja, sa ostacima masnog tkiva u graftu. Nova kost u graftu, koja je stvorena naspram stare kosti, jasno se raspoznaje po uočljivim cementnim linijama.



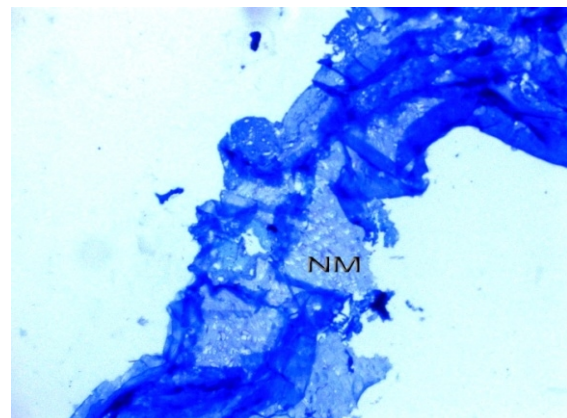
Slika 4.70. Granični deo kosti kalvarije i grafta NM-CAT starog 8 nedelja, sa ostacima masnog tkiva u graftu. SK-stara kost, NK-novoformirana kost, MT-masno tkivo. (HE, x40)

Implantat nanomaterijal

U defektima popunjenim NM implantatima vidi se da je nanomaterijal lepo srastao sa okolnom kosti (Slika 4.71; Slika 4.72). U nekim delovima preparata prisutno je tkivo koje se teško definiše; postoje acelularna polja koja su unutar implantiranog materijala, ali se u implantatu mestimično uočavaju polja sa kolagenom. Stara kost se raspoznaje po osteocitima smeštenim u lakunama.



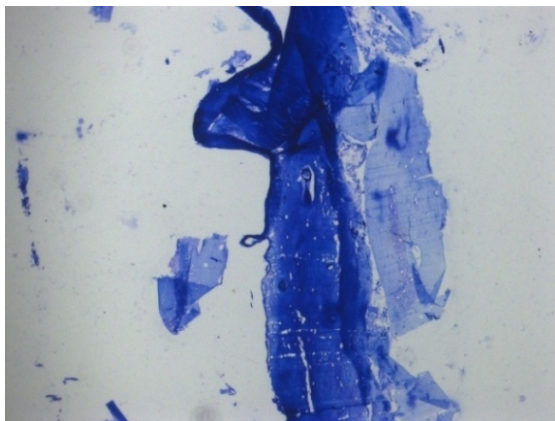
Slika 4.71. Histološka slika kalvarije sa implantatom NM starim 8 nedelja na mestu defekta. SK-stara kost, NM – nanomaterijal. (TB, x10)



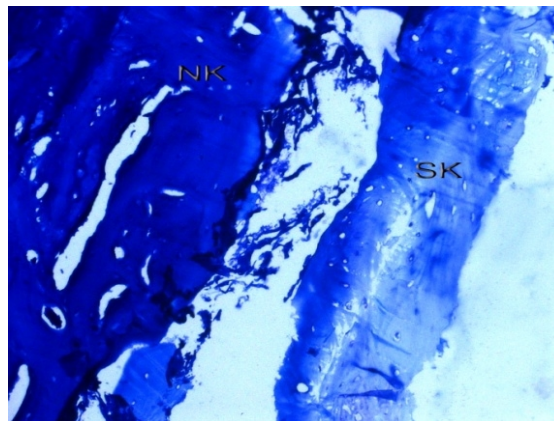
Slika 4.72. Acelularni deo implantata NM starog 8 nedelja. NM – nanomaterijal. (TB, x10)

Graft NM-BC

Histološka slika grafta NM-BC delimično podseća izgledom na NM tip implantata (Slika 4.73). Na preparatima se vide fragmenti stare kosti spongioznog tipa sa šupljinama ispunjenim kostnom srži (Slika 4.74).



Slika 4.73. Histološka slika kalvarije sa graftom NM-BC starim 8 nedelja na mestu defekta. (TB, x10)



Slika 4.74. Histološka slika kalvarije sa graftom NM-BC starim 8 nedelja na mestu defekta. SK-stara kost, NK-novoformirana kost (TB, x20)

Spontana regeneracija

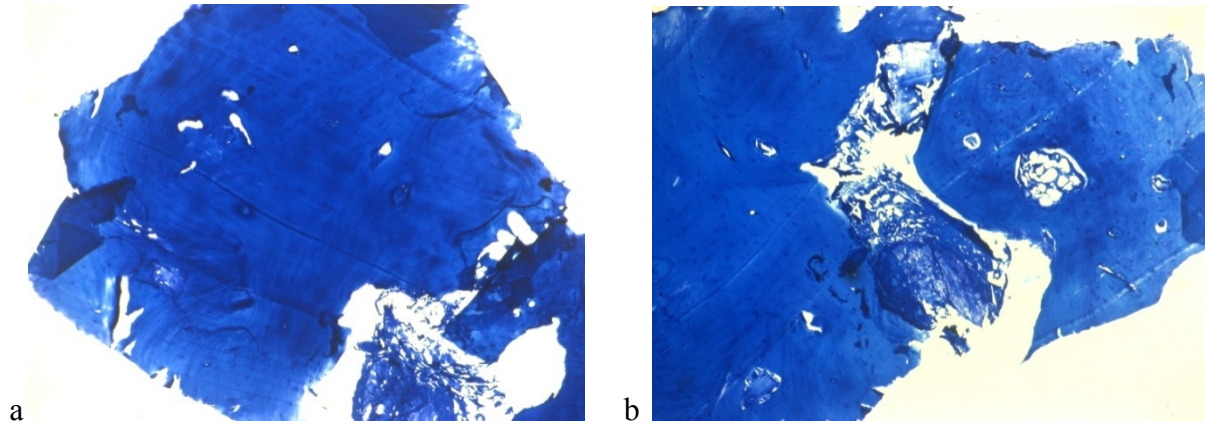
Kost u defektu u spontanoj regeneraciji nakon osam nedelja u odnosu na četvrtu nedelju je celularnija, a prostori oko lakuna su jače obojeni, što znači da ima više novostvorene kosti (Slika 4.75).



Slika 4.75. Spontana regeneracija defekta kalvarije posle 8 nedelja. (TB, x20)

Intaktna kost

Histološki izgled kosti koja se nalazi u okolini defekata ima tipičan spongiozni karakter sa masnim tkivom i kostnom srži u šupljinama (Slika 4.76.-a,b).



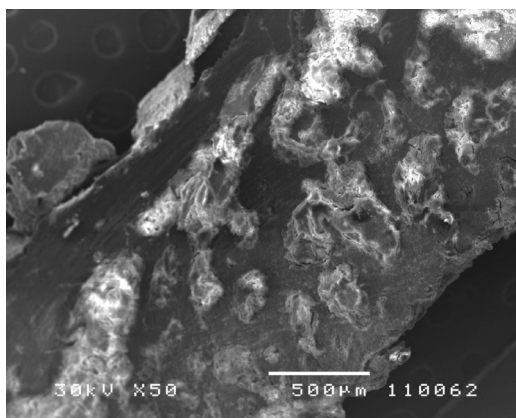
Slika 4.76. (a,b) Histološka slika intaktne kosti. (TB, x10)

4.6. SEM ANALIZA POPUNJENIH DEFEKATA KALVARIJE KUNIĆA

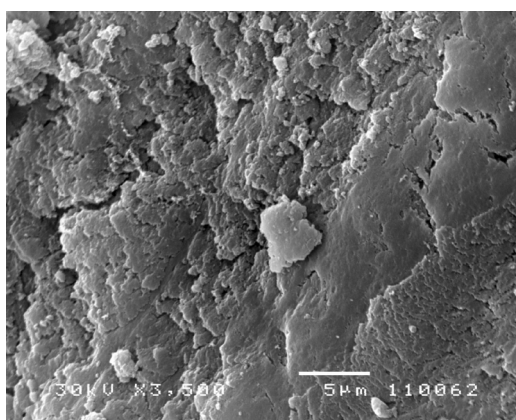
4.6.1. SEM ANALIZA DEFEKATA KALVARIJE POPUNJENIH NANOMATERIJALOM STARIH ČETIRI NEDELJE

Graft NM-ADSC

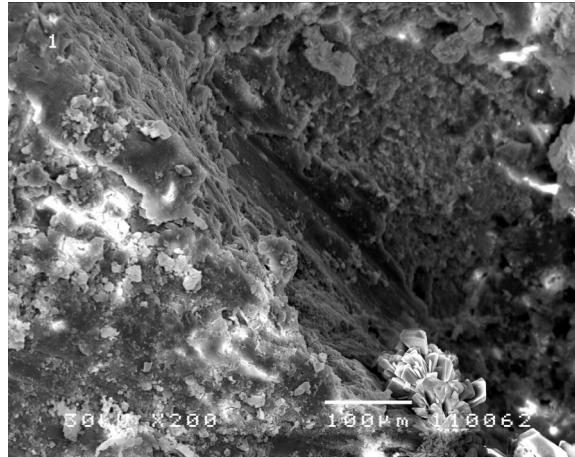
Na SEM mikrografijama kalvarije kunića sa defektom popunjenim graftom NM-ADSC starim četiri nedelje mogu da se vide strukture koje podsećaju na strukturu prirodne kosti i to sunderastog tipa (Slika 4.77; Slika 4.78). Pri SEM pregledu ovakvih uzoraka ne vidi se jasna granica izmedju kosti i grafta.



Slika 4.77. SEM mikrografija kalvarije kunića sa defektom popunjenim graftom NM-ADSC starim 4 nedelje.

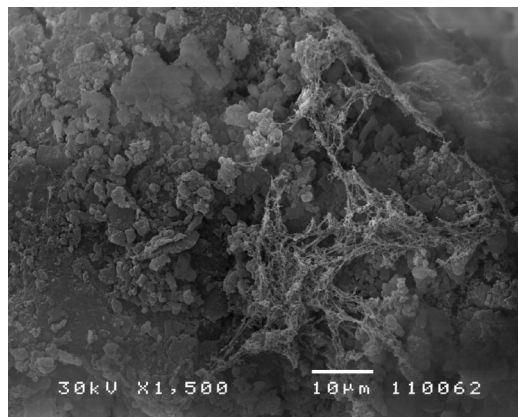


Slika 4.78. SEM mikrografija grafta NM-ADSC u kalvariji kunića starog 4 nedelje.



Slika 4.79. SEM mikrografija graničnog sloja kosti kalvarije kunića i grafta NM-ADSC starog 4 nedelje.

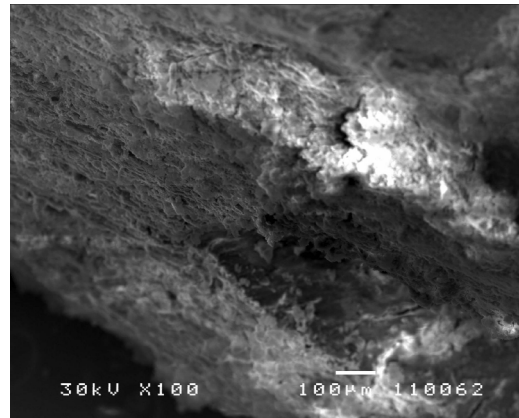
Na slici 4.79 se vidi formiranje nove kosti na graničnoj površini između stare kosti i grafta, kao i kristali HAp. Na SEM pregledu ovakvih uzoraka kristali HAp se mogu videti i na drugim graničnim područjima, kao npr. na granicama između fragmenata grafta.



Slika 4.80. SEM mikrografija grafta NM-ADSC starog 4 nedelje sa vlaknima ECM.

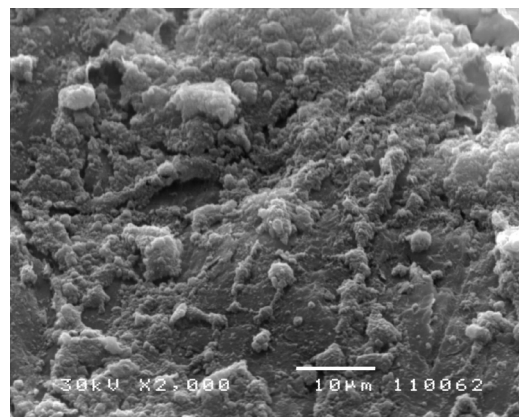
Slika 4.80 predstavlja SEM mikrografiju grafta NM-ADSC starog četiri nedelje na kojem su uočljiva vlakna ECM i zgrudvanog nanomaterijala u graftu. Cela struktura izgledom podseća na sunderastu kost.

Graft NM-CAT



Slika 4.81. SEM mikrografija sunderaste strukture grafta NM-CAT starog 4 nedelje.

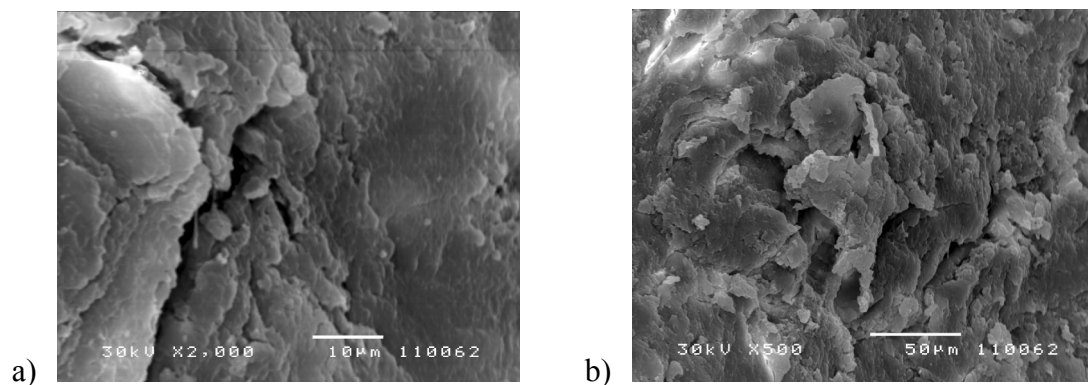
Slika 4.81 predstavlja SEM mikrografiju grafta NM-CAT starog četiri nedelje sa strukturom sunderaste kosti i lamelarnom organizacijom kosti.



Slika 4.82. SEM mikrografija osteocita u graftu NM-CAT starom 4 nedelje.

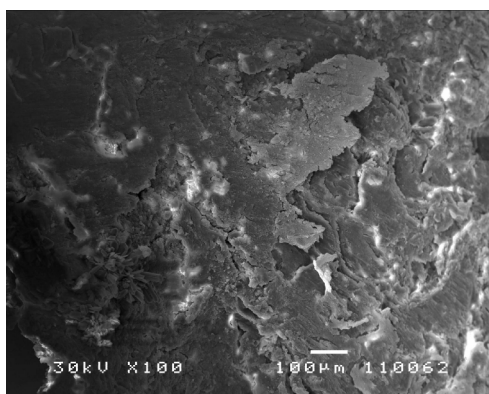
U graftu NM-CAT starom četiri nedelje slika 4.82 prikazuje SEM mikrografiju osteocita prekrivenih nanomaterijalom.

Implantat nanomaterijal

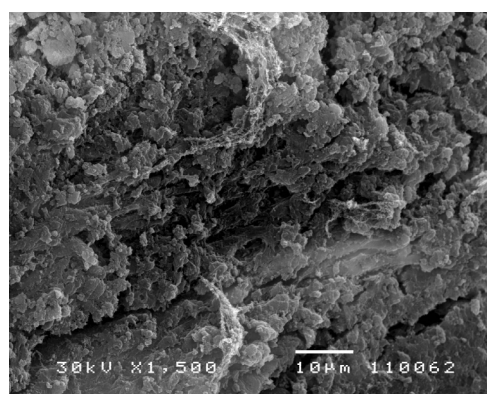


Slika 4.83. (a,b) SEM mikrografija implantata NM starog 4 nedelje.

Slika 4.83 (a,b) predstavlja SEM mikrografije implantata NM starog četiri nedelje na kojima su uočljivi poroznost i opšti izgled strukture koji jako podseća na struktru prirodne kosti.



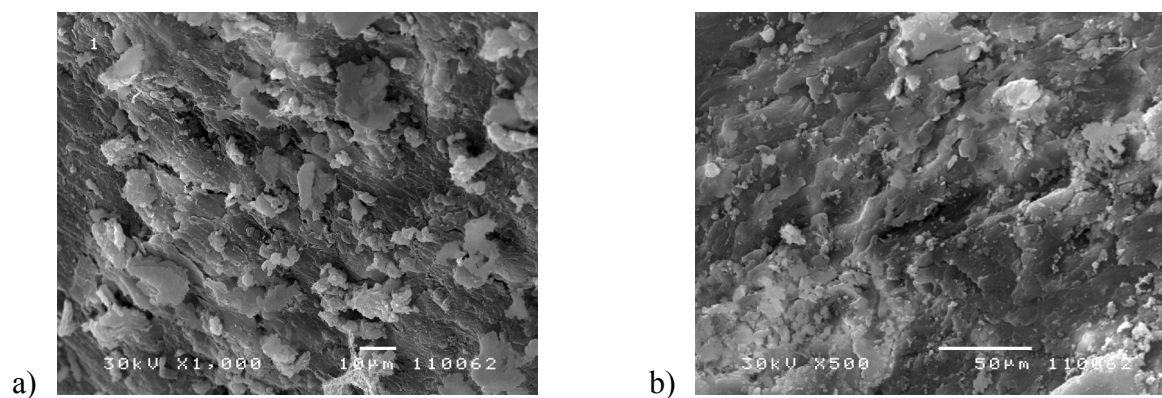
Slika 4.84. SEM mikrografija graničnog dela kosti i implantata NM starog 4 nedelje.



Slika 4.85. SEM mikrografija implantata NM starog 4 nedelje.

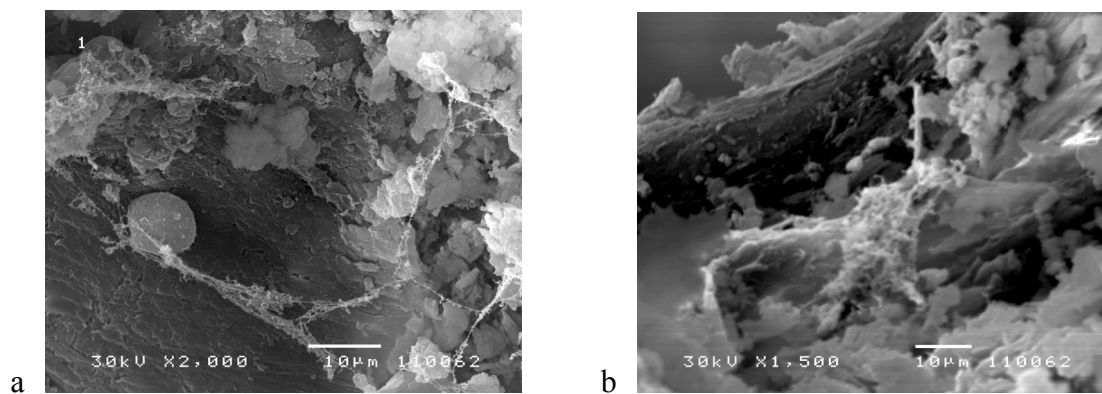
SEM mikrografija graničnog dela kosti i implantata NM starog četiri nedelje pokazuje da granica implantata i stare kosti nije jasna i da je implantat dobro integrisan sa starom kosti (Slika 4.84). Na slici 4.85 koja predstavlja SEM mikrografiju implantata NM starog četiri nedelje vide se vlakna ECM, koja su znak osteosintetskog procesa u implantatu.

Graft NM-BC



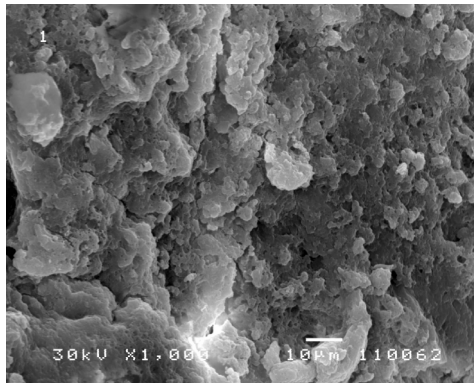
Slika 4.86. (a,b) SEM mikrografija grafta NM-BC starog 4 nedelje.

SEM analizom graftova NM-BC starih četiri nedelje utvrđeno je prisustvo struktura koje jako liče na prirodnu kost, ali sa većom poroznošću u odnosu na nju (Slika 4.86 a,b; Slika 4.87-a,b). Ove graftove odlikuje takođe prisustvo vlaknastog matriksa i značajnog broja ćelija (Slika 4.87-a,b).



Slika 4.87. (a,b) SEM mikrografija grafta NM-BC starog 4 nedelje sa vlaknastim matriksom i ćelijama u graftu.

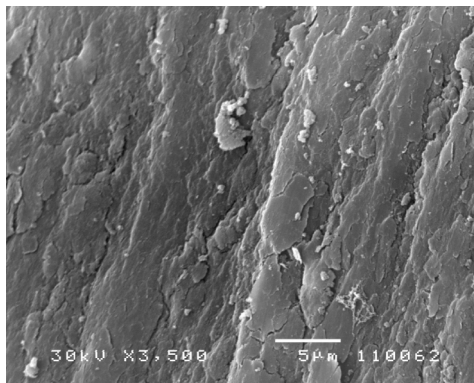
Spontana regeneracija



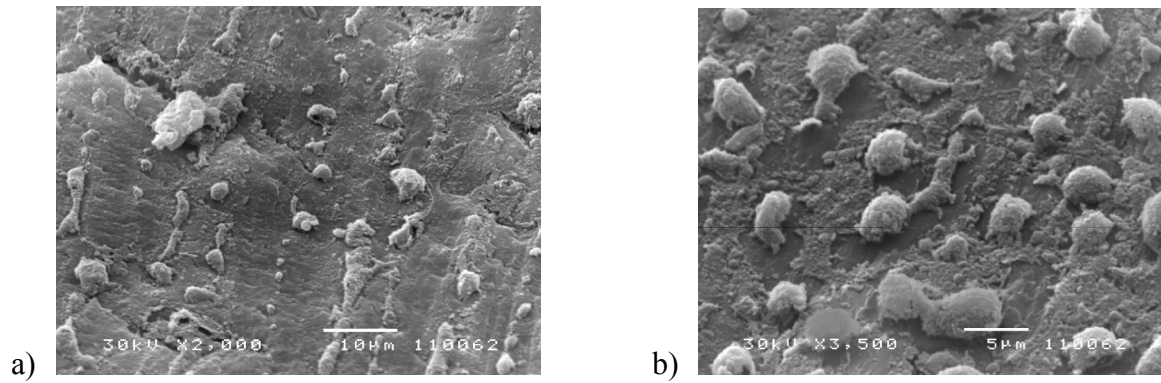
Slika 4.88. SEM mikrografija kosti kalvarije kunića u načinjenom defektu posle 4 nedelje regeneracije.

Na slici 4.88 je SEM mikrografija koja predstavlja uobičajen izgled kosti kalvarije kunića posle četiri nedelje regeneracije načinjenog defekta.

Intaktna kost



Slika 4.89. SEM mikrografija prirodne kosti kalvarije kunića.



Slika 4.90. (a,b) SEM mikrografija osteociti na površini lamele prirodne kosti.

Slika 4.89 predstavlja SEM mikrografiju prirodne kosti kalvarije kunića sa karakterističnom lamelarnom strukturom. Na slici 4.90 (a,b) SEM mikrografija prikazuje osteocite u dva različita uvećanja koji se vide na površini lamele prirodne kosti.

5. DISKUSIJA

Proučavanje bioloških mehanizama zarastanja kosti i njihovo razumevanje na modelu eksperimentalnih životinja od suštinske je važnosti, jer vodi ka asistiranoj reparaciji i regeneraciji kosti i daljoj kliničkoj primeni na ljudima.

Upotreba MSCs u TE kosti predstavlja novu i obećavajuću strategiju u nadoknadi defekata kosti nastalih delovanjem različitih etioloških faktora uključujući i osteogenesis imperfecta i osteoporozu.^{60,61} Još uvek se, kao najpristupačniji i najbogatiji izvor MSCs smatra koštana srž.^{24,62,63} Međutim, postupak uzimanja ćelija iz koštane srži aspiracijom je bolan i time neprikladan, a količina ćelija koje mogu da se dobiju na ovakav način je ograničena.^{24,46,64,65}

Stem ćelije koje se koriste za tkivnu reparaciju ili regeneraciju potiču iz raznih izvora, kao što su kostna srž, periferna krv, masno tkivo i dr.⁶⁶ Adultne stem ćelije, poznate i kao mezenhimske stem ćelije (MSCs), su multipotentne ćelije u tkivu ili organu, koje služe za održavanje njihovog integriteta i reparaciju.⁶⁷ Mezenhimske stem ćelije se lako izoluju, a zatim gaje, umnožavaju i diferenciraju u razna tkiva *in vitro*, što ih čini privlačnim izvorom za kliničke aplikacije.⁶⁸ Prednost korišćenja MSCs ćelija u tkivnom inženjeringu je u njihovoj plastičnosti koja se zasniva na sposobnosti da odgovore na fizičko-hemijski sastav mikrookoline tako da se omogući *de novo* formiranje tkiva. MSCs se mogu diferencirati u osteoblaste i tako mogu biti izvor ćelija za regeneraciju i reparaciju koštanog tkiva.

Dosadašnji pristup korišćenja ADSCs i stem ćelija uopšte u TE i u regenerativne svrhe je karakterisan *in vitro* ekspanzijom ovih ćelija, njihovim sađenjem na matrice sa kojima je onda vršena implantacija. Ovakav pristup zahteva dugotrajno uzgajanje ćelija, veliki broj ćelija koje je potrebno obezbediti sa odgovarajućim karakteristikama i uz sve rizike koje ovakav složeni postupak nosi.⁶⁹ U ovoj studiji ideja je bila da se formira graft sa biomaterijalom koji može da posluži kao tkivna matrica, sa induktivnim faktorima za osteogenezu koji su fiziološki derivisani i ćelijama iz tkiva koje sadrži nezrele ćelije sposobne da se usmere u diferencijaciju ka koštanom tkivu. Koristeći izvorne sveže ćelije iz autolognog masnog tkiva i bez prethodnog tretmana i kultivacije, jedan od ciljeva je bio da se proverí da li ovakav pristup može biti praktična prečica u nadoknadi defekta kosti prilikom rutinskog izvođenja operativnog zahvata.

Model kalvarijalnog defekta je vrlo koristan u ispitivanju regeneracije kosti, zato što je jednostavan za izvođenje, procenu ishoda procesa regeneracije i što je mali rizik za komplikacije. Primenjeni model je zadovoljavao kriterijume koje je preporučio Bosh⁷⁰ i koje su sledili mnogi drugi istraživači.⁷¹

U primenjenom modelu defekta kalvarije se pokazalo da ne postoji inflamatorni proces, pa u tom smislu mogu se isključiti svi efekti produkata takvog procesa na reparaciju napravljenih defekata.⁷²

Zlatna trijada faktora regeneracije i rasta kosti su: ćelije koje formiraju tkivo, materijal koji služi kao matriks tkiva i regulatorni faktori koji omogućavaju proliferaciju i diferencijaciju ćelija i konačno oblikovanje tkiva. U ovoj studiji, kao ćelije koje imaju potencijal da izgrade novu kost korišćene su mezenhimske ćelije iz masnog tkiva, za materijal koji ima ulogu tkivnog nosača uzeti su nano-kompozitni materijal i *Bio-Oss*® (mineralni matriks goveđe kosti), a regulatorni molekuli su mogli biti dobijeni iz implantiranih ćelija masnog tkiva, ali i iz krvi koja je u obliku koagulumata korišćena pri oblikovanju graftova.

Današnji većinski pristup u korišćenju mezenhimskih matičnih ćelija u tkivnom inženjeringu koštanog tkiva i potpomognutoj regeneraciji kosti se zasniva na prethodnoj indukciji osteblastne diferencijacije u *in vitro* uslovima. Često klinička praksa nameće potrebu za brzom nadoknadom koštanih gubitaka, pa duge pripreme sa *in vitro* fazom postaju neprikladne. U retkim slučajevima kada su se koristile sveže neindukovane MSCs za formiranje grafta pokazali su se varijabilni ishodi, sa manje ili više uspešnosti. U ovoj studiji

uz upotrebu neindukovanih mezenhimskih matičnih ćelija iz masnog tkiva namera je bila da se proveriti očekivana dobra osteogenetska svojstva NM i BO, a takođe i da se simulira zarastanje tkiva posle povrede, korišćenjem krvnog ugruška kao tkivnog lepka i stimulatora zarastanja. Studija je zato nametnula potrebu za više kontrola koje su postavljene na istoj kalvariji uz eksperimentalni graft koji je objedinio delovanje svih faktora trijade. Zato su kao kontrola za eksperimentalni graft, koji je sastavljen od izolovanih ćelija adipoznog tkiva pomešanih sa nano-kompozitnim materijalom ili *Bio-Oss*-om sjedinjenih pomoću krvnog ugruška, služili: graft sačinjen od iseckanog masnog tkiva sa NM ili BO u BC, implantat samo od NM ili BO, NM ili BO u BC i nepopunjeni defekt sa SR, kao opšta kontrola.

Dinamika osteogeneze u defektu je praćena MSCT skenerom na živim životinjama, što je bila velika prednost u odnosu na neke tehnike mikro-CT, u kojima je bilo neophodno za snimke žrtvovati životinje. Zato je primenjeni eksperiment mogao da se uradi lakše i na manjem broju životinja. Sa druge strane, prednost primenjenog metodološkog pristupa je da se može ista životinja snimati više puta i pratiti isti graft (implantat) kroz vreme, odnosno tokom trajanja eksperimenta. Ova tehnika pruža slične mogućnosti koje su opisane i pri korišćenju tehnika MCTA (eng. microfocus computerized tomography analysis).⁷³ Uspešna reparacija koštanih defekata ovom tehnikom demonstrirana je na imuno-kompromitovanim (eng. immuno-deficiency) životinjama, kao što su atimični miševi (eng. athymic mice)^{74,75}, kao i na imuno-kompetentnim životinjama kao što su psi i ovce.^{76,77}

Poredeći gustinu novostvorene kosti u procesu regeneracije i reparacije kalvarijalne kosti na mestu načinjenih defekata, koji su popunjavani različitim po sastavu implantatima i graftovima, uočljivo je da postoji različit obrazac tih procesa.

Kao opšta kontrola, služio je nepopunjen defekt u kome se odvijala spontana regeneracija (SR). U prva dva posmatrana perioda (prva i treća nedelja), gustina kosti u ovom defektu se nije značajno menjala i iznosila je oko 6-8% od gustine zdrave kosti (Grafikon 4.13). Šest nedelja nakon formiranja defekta gustina kosti je dostigla oko 70% gustine intaktne kosti. Očigledno je dakle da, u periodu od treće do šeste nedelje, spontana regeneracija doživljava drastičnu akceleraciju.

U odnosu na opštu kontrolu, graft sačinjen od BO-ADSC pokazuje da upravo u tom prvom periodu, do treće nedelje od popune defekta, gustina tkiva je u nivou bliskom intaktnoj

kosti što može biti veliki benefit u rešavanju ovakvog tipa defekta (Grafikon 4.13). Sa druge strane, ostaje otvoreno pitanje zašto u periodu od treće do šeste nedelje, kada spontana regeneracija buja, u slučaju graftiranja sa BO-ASDC dolazi do velikog kolapsa koštane gustine. Jedno od objašnjenja bi moglo da uzme u obzir ponašanje implantata sačinjenog samo od BO u kojem koštana gustina permanentno pada kroz praćeni period. Pad gustine tkiva u slučaju implantacije BO može da se objasni njegovom resorpcijom što pokazuju i histološke slike na četiri i osam nedelja (Slika 4.45; Slika 4.63).

Očekivana regeneracija kosti posebno u periodu od treće do šeste nedelje verovatno nije mogla da se ostvari i zbog formiranja fibroznog tkiva na graničnim površinama između implantata i površine defekta što se vidi na histološkim preparatima (Slika 4.70). Poznato je da, ako se između implantata i koštanog tkiva ostavi veći prostor (materijal nije dobro sabijen), dolazi do stvaranja hematoma koji se kasnije organizuje formirajući vezivno tkivnu strukturu i na taj način predstavlja mehaničku barijeru za integraciju implantata sa koštanim tkivom.⁷⁸

Na taj način, analizirajući dinamiku procesa u defektnoj kosti sa implantatima i graftovima, može se zaključiti da period od treće do šeste nedelje sa prisustvom ADSC odlikuje intenzivna resorpcija bez adekvatne kompenzacije u regeneraciji. Sa druge strane, u istom periodu, u defektu koji je popunjavao BO-CAT odvijaju se mnogo izraženiji procesi regeneracije u odnosu na procese resorpcije. Svakako je značajan nalaz da u slučaju popune defekta samo sa BO-BC (Grafikon 4.13), u celom toku posmatranog perioda, balans između procesa resorpcije i regeneracije se održava na konstantnom nivou.

Istraživajući ulogu pojedinih bioloških komponenti koje su stavljane u mešavinu sa nekim od nosača može se jasno uočiti da je ona različita upravo u zavisnosti od korišćenog nosača. ADSC u kombinaciji sa bilo kojim nosačem u početnom periodu reparacije defekta proizvode veliku tkivnu gustinu, a naročito u kombinaciji sa BO. Iz sprovedenih istraživanja može se zaključiti da primenjene mezenhimske stem ćelije iz masnog tkiva značajno unapređuju procese reparacije defekta. Sa druge strane, taj proces se zaustavlja u periodu od treće do šeste nedelje kada se ADSC kombinuju sa NM (Grafikon 4.14), ili tkivna gustina značajno pada u ovom periodu kada su ADSC kombinovane sa BO (Grafikon 4.5).

Primena CAT sa NM doprinosi u prvih nedelju dana značajno većoj koštanoj gustini nego ako je defekt ostavljen da spontano regeneriše. Do tri nedelje CAT primenjena sa BO doprinosi slabljenju tkivne gustine, a povećanju kada se primenjuje sa NM.

Materijali u funkciji supstituenata kosti korišćeni su i u kombinaciji sa punom krvlju što je bilo najpribližnije patofiziološkim uslovima reparacije povrede kosti sa krvarenjem. Krv je pripremana tako da se stvori koagulum i usled toga želatinozna konzistencija implantata odnosno grafta. U hirurgiji se inače koriste komponente plazme da se napravi takozvani fibrinski lepak, a u ovom istraživanju krv je poslužila u istu svrhu. Takođe, trombociti sa plazmom se u poslednje vreme koriste za indukovanje regenerativnih i reparativnih procesa u rekonstruktivnoj hirurgiji što je i u slučaju primenjene krvi u ovom istraživanju takođe evidentno. Zato implantati sa krvlju delom objedinjuju svojstva i biološke aktivnosti fibrinskog lepka i trombocita. Kako su graftovi sa ADSC i CAT sadržali punu krv, u razmatranju reparativnih i regenerativnih procesa posle graftiranja moraju da se uzmu u obzir i mogući efekti komponenti krvi. Krv u kombinaciji sa BO, u odnosu na sâm BO, pokazuje povoljan stimulatorni efekat na reparaciju defekta i posle šest nedelja on je još uvek veći u odnosu na SR (Grafikon 4.6).

Tkivo koje može da bude dobar izvor MSCs je masno tkivo. Ono poseduje dovoljan broj ovih ćelija za kliničku i laboratorijsku upotrebu, lako je dostupno, a potencijal diferencijacije, morfologija, fenotip i ekspresija gena ADSC veoma je slična MSCs iz koštane srži.^{46,63,79-82}

Primarna celularna komponenta masnog tkiva su adipociti, pričvršćeni na vlaknima kolagena, ali su prisutne i druge celularne komponente koje pripadaju stromalno-vaskularnoj frakciji u kojoj su glatkomišićne, endotelijalne ćelije, fibroblasti, krvne ćelije i preadipociti.^{83,84} U masnom tkivu takođe se nalaze ćelije sa fenotipskim karakteristikama sličnim onim koje imaju mezenhimske matične ćelije iz koštane srži. I jedne i druge pokazuju proliferacioni potencijal i sličan obrazac površinskih markera. Lee et al.⁶³ su pokazali da postoji sličnost između ćelija ADSCs i MSCs na osnovu analize gena i da je međusobna razlika u ekspresiji gena manja od 1%. Zato oba tipa MSCs imaju i vrlo sličan diferencijacioni potencijal.

Tako i ADSCs se diferencijuju kroz proces adipogeneze, hondrogeneze, osteogeneze i miogeneze.^{46,72} Covan et al.⁸⁵ utvrdili su da ADAS ćelije rastu sedam puta brže od ćelija koštane srži u laboratoriji. Takođe, formiranje nove kosti nije u korelaciji sa brojem ćelijskih pasaža dokle god humane matične ćelije zadržavaju svoj proliferativni potencijal,⁸⁶ kao i da zamrzavanje ćelija ne utiče na osteogeni potencijal, što umnogome olakšava njihovo skladištenje.⁸⁷

U poređenju sa MSCs dobijenim iz koštane srži, ADAS ćelije su lakše dostupne, procedura uzimanja pod lokalnom anestezijom je manje bolna, davajuća regija ne trpi značajna oštećenja, a broj ćelija koji se dobija tom prilikom je veliki i iznosi 4×10^7 ćelija u 100 cm^3 aspirata masnog tkiva u odnosu na 1×10^5 ćelija u 30 cm^3 aspirata koštane srži. Masno tkivo se zbog toga smatra jednim od povoljnijih izvora MSCs u odnosu na koštanu srž.^{79,80}

Da bi se podstakla osteogena indukcija MSCs *in vitro* koriste se suplementi kao što su vitamin C, 1.25-Dihidroksivitamin D3, β -glicerofosfat i deksametazon.⁸⁶⁻⁹² Deksametazon stimuliše proliferaciju MSCs i podržava diferencijaciju osteogene loze,^{87,88} dok β -glicerofosfat takođe ima važnu ulogu u mineralizaciji i modulaciji osteoblastne aktivnosti.⁹¹ Suplementi poput vitamina C i 1.25-Dihidroksivitamina D3, koji se obično koriste za osteogenu indukciju, dovode do povećane ekspresije alkalne fosfataze i promovišu proizvodnju osteokalcina.⁹² Osim toga, vitamina C je esencijalni vitamin uključen u konverziju ostataka prolina u hidrosiprolin. Tokom osteogeneze, slobodni fosfati mogu indukovati mRNA i proteinsku ekspresiju osteogenih markera kao što je osteopontin.⁹³ Fosfati takođe imaju uticaj na povećanu proizvodnju ključnog gena u regulaciji osteogeneze Cbfa-1.⁹⁴

Pored ovih suplemenata, neki rezultati pokazuju značajan uticaj retinoične kiseline (RA) i koštanih morfogenetskih proteina (BMPs) u regulaciji osteogeneze i adipogeneze.^{95,96} Pokazano je da RA promoviše diferencijaciju primarnih osteoblasta *in vitro* što dovodi do povećane ekspresije osteogenih gena i stvaranje koštanih depozita.⁹⁶ Slično RA, BMP-2 je takođe potentan induktor osteogeneze.⁹⁷ Utvrđeno je da sam BMP-2 može da menja oba markera za osteogenu i adipogenu diferencijaciju kod bipotentnih 3T3 preadipocita.^{95,98} U prisustvu insulina, BMP-2 blago inhibira adipogenezu 3T3-F442A ćelija što dovodi do smanjene akumulacije lipida.⁹⁵ Ovi rezultati ukazuju da i RA i BMP-2 pojedinačno poseduju sposobnost da promovišu osteogenezu inhibirajući adipogenezu u ćelijama. Studija po Skillington et al.⁹⁵ je zapravo pokazala zajedničko delovanje ovih faktora naglašavajući potencijalnu konvergenciju u regulaciji mezenhimskih ćelija u procesu osteogene diferencijacije na račun adipogeneze.

Formiranje osteoida uočeno je kada su osteoindukovane humane stem-ćelije (ADSCs) zasađene na hidroksiapatit/tricalcijum-fosfatne podloge (HA/TCP-eng. hydroxyapatite/tricalcium-phosphate) i implantirane subkutano imuno-deficijentnim (nude) miševima.⁵⁵ Osteoindukovane ADSCs na apatitom prekrivenom nosaču PLGA kiselinom mogle su da

repariraju defekt kritične veličine na kalvariji miša⁸⁵. Drugi autori sopštavaju da ADSCs u kombinaciji sa želatinskim gelom mogu da repariraju defekt nekritične veličine na modelu zeca za period od šest nedelja.⁹⁹

ADSCs zasađene na HA/TCP podlozi su se usmeravale na osteogenezu *in vivo* u SCID miševima⁵⁵ što je pokazalo da se ne razlikuje u odnosu na MSCs iz kostne srži.¹⁰⁰

Kada su korišćene autologne ADSCs u kombinaciji sa nosačem prekrivenim PLGA kiselinom u reparaciji defekta kritične veličine na lobanji kunića, uočeno je da osteoindukovane ADSCs pojačavaju stvaranje koštanog tkiva ako su zasejane na fibronektin tretiranom PLGA nosaču.¹⁰¹

Ovi rezultati pokazuju da masno tkivo i ADSCs mogu biti dobar izbor ćelija za inženjering kosti.

Za korišćenje adipoznog tkiva mora se imati u vidu da njegova metabolička aktivnost varira, kao i njegov kapacitet za proliferaciju i diferencijaciju, što zavisi od lokacije depoa tog tkiva, starosti i pola pacijenta.^{102,103} U ovoj studiji je korišćeno lako dostupno masno tkivo u intraskapularnoj regiji kunića.

Korišćenje zrelog autolognog masnog tkiva u plastičnoj i rekonstruktivnoj hirurgiji je bilo praćeno njegovom resorpcijom¹⁰⁴ i kalcifikacijom.¹⁰⁵ Iako ovo mogu biti nedostaci u navedenoj primeni, upravo u ovakvom razvoju događaja sa implantiranim masnim tkivom pokazana je dobra mogućnost da takve mane u drugim primerima budu prevedene u korisne osobine za potrebe reparacije koštanog tkiva. Resorpcija je jedna od ključnih karakteristika materijala koji se koriste kao koštani supstituenti da bi se stvorio prostor za rast mladog koštanog tkiva, a kalcifikacija je neophodna za stvaranje mineralnog dela matriksa kosti.

U dosadašnjim istraživanjima ADSC u svojstvu regenerativnih ćelija za inženjering masnog tkiva korišćeni su kao nosači materijali na bazi kolagena tipa I¹⁰⁶, nosači na bazi hijaluronske kiseline (eng. haluronic-acid based scaffold),¹⁰⁷ nosači koji nisu prožeti poliglikoličnom kiselinom (eng. non-woven polyglycolic acid)¹⁰⁸ i injektibilni nosači od poli- laktid-ko-glikolične kiseline.¹⁰⁹

Ključni faktori za uspešan tkivni inženjering pomoću ADSCs su hemijski sastav nosača, 3D arhitektura i njegova mehanička stabilnost.⁷¹ U ovoj studiji hemijski sastav je prirodan sastojak matriksa kosti –hidroksiapatit, arhitektura je sastavljena od nano partikula

koje su prirodno začetna forma deponovanja hidroksiapatita u ekstracelularnom matriksu (ECM) kosti, a mehaničko opterećenje, u modelu kritične veličine kranijalnog defekta nije uslov za regeneraciju obzirom na vrstu kosti.

Postoje različiti pristupi u korišćenju biomaterijala za tkivni inženjering MSCs. Biomaterijali mogu da se koriste kao sredstva za vođenje procesa proliferacije (ekspanzije) MSCs, njihove diferencijacije, kao nosači za ćelijsko snabdevanje i kao tkivni nosači.⁶⁹ Pristup u ovom istraživanju je bio da se na najjednostavniji način primene partikule nano-kompozitnog materijala i ADSCs u tkivnom inženjeringu kosti. Korišćeni graftovi i implantati su spremni u obliku paste, i u tom smislu najviše su odgovarali tipu injektibilnog grafta, s tim da ADSCs frakcija nije bila inkapsulirana nego direktno umešana u biomaterijal.⁶⁹ Inače, pristup rešavanju *critical size* defekta jeste upotreba injektibilnog grafta.

PLGA preko apsorbovanog kolagena tipa-I ima sposobnost da veže MSCs.¹¹⁰ U primenjenom graftu kolagen tipa I je mogao biti sintetisan od strane vezivnotkivnih ćelija što je vidljivo na histološkim preparatima (Slika 4.47; Slika 4.60).

Nanopartikule su u graftu organizovale uglavnom vrlo finu mrežastu strukturu sa veličinom okaca te mreže koja odgovara dimenzijama lakuna osteocita (Slika 4.66).

Topografija biomaterijala, koja podrazumeva specifične površinske obrasce je posebno bitna za usmeravanje ćelijskih prekusora ka osteoblastima. Hidroksiapatit poseduje takav jedinstven obrazac površine koji je prepoznatljiv za ćelije koštanog tkiva. Zato su verovatno i osteoblasti ćelije koje su vrlo senzitivne u interakciji sa svojom sredinom. To je bio važan razlog da se kao matriksni materijal koristi hidroksiapatit.¹¹¹

Ekspresija osteoblasnog fenotipa je posebno izražena na površinama sa kalcijum fosfatom,⁶⁹ a nano materijal je bio kompozit čiji je sastojak kalcijum fosfat. Takođe, PLGA, koji je bio deo nano kompozita, pojačava osteoblastnu uravnoteženost na površini.¹¹²

Preparati HA čestica mogu se činiti sličnim po hemijskoj formuli, ali ipak, njihov način sinteze i obrade može dati preparate vrlo različitih fizičko-hemijskih osobina i biokompatibilnosti.

Poznato je da HA adsorbuje fibronektin i vitronektin koji su ligandi za adhezivne receptore i od značaja su za adheziju MSCs i osteoblastnih prekusora.¹¹³ U eksperimentu

fibronektin i vitronektin kao sastojci krvi su mogli da se vežu za HA partikule u ovoj mešavini.

Kada su HA partikule u kompozitnom materijalu, one favorizuju kontakt sa osteoblastima.^{114,115} Takođe, adhezivna svojstva koja dovode do vezivanja za kost su pojačana kada su CP partikule bile kombinovane sa polimerom.¹¹⁶

Degradacijom HA nastaje alkalna sredina koja omogućuje mineralizaciju ekstracelularnog matriksa od strane osteoblasta. Sa druge strane, bazna mikrosredina takođe podstiče formiranje osteoblastnog fenotipa iz prisutnih prekusora, kao i regrutovanje okolnih ćelija za osteogeni proces tokom osifikacije.¹¹⁷

Bez stimulacije regeneracije, spontana regeneracija se izvodi na granicama defekta i odatle se nova kost širi popunjavajući defekt (Slika 4.55; Slika 4.75). U ovoj studiji je pokazano da rast kosti može da se pojavi i unutar defekta, bez kontakta sa originalnom kosti.

Pošto su mehanički stimuli uslov za osteogenu aktivnost, nanomaterijal, koji ima veću gustinu pakovanja od mikromaterijala, može mehanički da deluje snažnije na progenitorne ćelije, nego mikrohidroksiapatitne partikule.

Prisustvo HA u graftu može da objasni dobro vezivanje implantiranog materijala za kost¹¹⁶ (Slika 4.8; Slika 4.13–b; Slika 4.45).

Dobijeni rezultati da dolazi do stvaranja novih krvnih sudova u implantatu u prisustvu masnog tkiva se mogu tumačiti regrutovanjem ćelija za vaskulogenezu i rast krvnih sudova, kao što su endotelijalne ćelije¹¹⁸ (Slika 4.41; Slika 4.59). Inače, nađeno je da implantirane matične ćelije iz masnog tkiva ubrzavaju neovaskularizaciju i epitelizaciju u procesu regeneracije traheje.¹¹⁹ Verovatno, slični mehanizmi dovode do povoljnog efekta na osteogenezu i kada se ADSCs primene u graftovima za regeneraciju kalvarijalne kosti. Način kako ADSCs deluju stimulatorno na vaskularizaciju tkiva može biti preko njihove produkcije faktora rasta za krvne sudove. Naime, nađeno je da matične ćelije iz masnog tkiva pripojene za poliuretansku podlogu dramatično povećavaju produkciju VEGF u poređenju sa fibroblastima *in vitro*, i da ove ćelije takođe produkuju i povećavaju gustinu mikrovaskularizacije u okolnom tkivu kada su implantirane subkutano kod pacova.¹²⁰

Korišćenje krvnog koaguluma u aktuelnom eksperimentu je obezbedilo i delovanje fibrina, a takođe i delovanje aktiviranih trombocita kao izvora faktora rasta. Inače fibrinski gel može da deluje tako da pojačava aktivnost endotelijalnih ćelija¹²¹, kao i da

promoviše proliferaciju i migraciju glatkomišićnih ćelija¹²², što je uslov za neovaskularizaciju. Adhezivna aktivnost ADSCs se vrši dobrim delom preko vezivanja za fibronektin, koji je sastojak ekstracelularnog matriksa vezivnih tkiva uključujući i samu krv. Pri tome, jako je važna koncentracija fibrina, jer velika koncentracija pojačava adhezivnost ADSCs, a time sprečava njihovu mobilnost.¹²³

Odavno postoje zapažanja da adipozno tkivo promoviše zarastanje i da stimuliše neovaskularizaciju rožnjače oka.¹²⁴ Zapaženo je kada se implantat postavi subkutano, ako nema masnog sloja, oko implantata se napravi debela fibrozna kapsula sa redukovanom vaskularizacijom. Nasuprot tome, oko implantata u podkožnom masnom tkivu fibrozna kapsula je tanka i dobro vaskularizovana, što znači da masno tkivo jako redukuje reakciju organizma na strano telo.¹²⁰ Razvijeniija mikrovaskulatura u tkivu oko implantata obezbeđuje bolji transport supstanci a time i zdravije tkivo. Mehanizam koji može da bude uključen u ovu pojavu su citokini koji smanjuju reakciju organizma na strano telo i podstiču neovaskularizaciju, i da oni mogu da budu produkti ADSCs.^{32,125}

Važan citokin koji je produkt ADSCs je VEGF. Poznato je da VEGF deluje anti-inflamatorno, provaskularno i da podstiče zarastanje. VEGF *in vivo* deluje u jako niskim dozama (pikogram/mililitar) indukujući formiranje krvnih sudova i stabilišući ih.¹²² Takođe ADSC je značajan izvor IL-6, pored drugih ćelija (monociti, fibroblasti, endotelijalne ćelije), a za njega je poznato da deluje proinflamatorno, ali u sinergizmu sa drugim citokinima stimuliše proliferaciju multipotentnih hematopoetskih progenitora.¹²⁰ Kako je važna funkcija koštanog tkiva i njegova hematopoetska aktivnost ovaj potencijal ADSCs može biti dragocen za formiranje kosti kao organa u potpunosti.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu postavljenih ciljeva, primenjene metodologije i dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

- Potpomognuta regeneracija zavisi od vrste biomaterijala u funkciji koštanog zamenika kao i od bioloških komponenti koje se sa njim kombinuju;
- Upotreba samog *Bio-Oss*-a u svojstvu implantata vremenom dovodi do kolapsa koštane gustine;
- Ako se *Bio-Oss* koristi kao nosač u graftovima čije su komponente masno tkivo ili puna krv onda značajno doprinosi povećanju i održavanju koštane gustine;
- Nanopartikule PLGA su se pokazale kao dobar nosač za mezenhimske ćelije masnog tkiva u regeneraciji kalvarije;
- Upotreba nano-kompozitnog materijala povećava koštanu gustinu isključivo kada se koristi kao nosač za ADSCs;
- Kombinovanje svežih neindukovanih ADSCs sa nanopartilama u krvnom ugrušku poseduje osteogeni potencijal za brzu inicijaciju regeneracije kosti;
- Pristup u vođenoj regeneraciji kosti sa korišćenjem svežih neindukovanih ADSCs se pokazao kao obećavajući metod zbog povoljnog efekta na regeneraciju kosti i svoje jednostavne primene;
- Za primenu ADSCs i masnog tkiva su potrebna dalja istraživanja kako bi se ovi postupci unapredili i optimizovali.

7. LITERATURA

1. Junqueira LC, Carneiro J, Kelly RO. Textbook Functionele Histologie. 8th ed. In: Wisse E, Nieuwenhuis P, Ginsel L. Chapter Bone tissue. Elsevier: Maarsse; 2000 p.154-177.
2. Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone* 1992; 13: 3-6.
3. Martin RB, Burr DB, Sharkey NA. Skeletal tissue mechanics. Springer; 1998. p. 29-78.
4. Martin TJ. Cell biology in bone. In: Martin TJ, Ng KW, Nicholson, GC, editors. *Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism*, editors. NY: PLC Press; 1998. pp. 1-29.
5. Aubin JE, Heersch, JNM. Osteoprogenitor cell differentiation to mature bone-forming osteoblasts. *Drug Develop Res* 2000; 49: 206-15.
6. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. *Principles of Bone Biology*. Second edition. New York: Academic Press; 2002.
7. Long MW. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27: 677-90.
8. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000; 289: 1501-4.
9. Dragović M. Todorčić M. Aleksić P. Urgentna i ratna hirurgija. Beograd: Velarta; 1998. str. 696-697. (Serbian)
10. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop* 1986; 299–308.
11. Marx RE. Philosophy and particulars of autogenous bone grafting. *J Oral Maxillofac Clin North Am* 1993; 5: 599–612.
12. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1983; 174: 28–42.
13. Day S, Ostrum R, Clinton R, et al. Bone injury, regeneration, and repair. In: Buckwalter J, Einhorn T, Simon S, editors. *Biology and Biomechanics of Musculoskeletal System*. Chicago, Rosemont IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2000. p. 388-75.

14. Kainulainen V, Oikarinen K. Comparison of four bonecollectors designed for oral and maxillofacial surgery an in vitro study. *Clin Oral Impl Res* 1998; 9: 327-32.
15. Clokie CML, Sandor GKB. Bone: Present and Future. In: Babuš C, editor. *Dental implants: The art and science*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2001. pp. 59-84.
16. Heary R.F, Schlenk R.P, Sacchieri T.A, Barone D, BroteaC. Persistent iliac crest donor site pain: independent outcome assessment. *Neurosurgery* 2002; 50: 510–516.
17. Kretlow J.D., MikosA.G. Mineralization of synthetic polymer scaffolds for bone tissue engineering. *Tissue Engineering* 2007; 13: 927–938.
18. Nakajima T, Iizuka H, Tsutsumi S, Kayakabe M, TakagishiK. Evaluation of posterolateral spinal fusion using mesenchymal stem cells: differences with or without osteogenic differentiation. *Spine* 2007; 32: 2432–2436.
19. Nishida J, ShimamuraT. Methods of reconstruction for bone defect after tumor excision: a review of alternatives. *Med SciMonit* 2008; 14: 107–113.
20. Yang YG, Sykes M. Xenotransplantation: current status and a perspective on the future. *Nature Review Immunology* 2007; 7: 519–531.
21. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *MacromolBiosci*2004; 4(8): 743-65.
22. Zhiyong Zhang, Swee-Hin Teoh, Mahesh Choolani and Jerry Chan. Development of Human Fetal Mesenchymal Stem Cell Mediated Tissue Engineering Bone Grafts. In: Eberli D, editor. *Tissue Engineering*. Publisher: InTech; 2010. p. 1-29.
23. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology* 1976; 4: 267-274.
24. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5441): 143-147.
25. Dominici M, le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*2006; 8(4): 315-317.
26. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Experimental Hematology* 2004; 32(5): 414-425.

27. Alonso M, Claros S, Becerra J, Andrades JA. The effect of type I collagen on osteochondrogenic differentiation in adipose-derived stromal cells in vivo. *Cytotherapy* 2008; 10(6): 597-610.
28. Prockop DJ. Repair of tissue by adult stem/progenitor cells (MSCs), controversies, myths, and changing paradigms. *Molecular Therapy* 2009; 17(6): 939-946.
29. José A. Andrades, Silvia Claros, Pedro Jiménez-Palomo, José Ma López Puertas, Plácido Zamora Navas, Enrique Guerado, Manuel Monleón, María C. Araque and José Becerra. Skeletal Regeneration by Mesenchymal Stem Cells: What Else?. In: Eberli D, editor. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*. Publisher: InTech; 2011. p. 107-144.
30. Robinson BA. Human Stem Cell Research. Ontario Consultants on Religious Tolerance 2001. Dostupnona URL:
http://www.religioustolerance.org/res_stem1.htm
31. Barrilleaux B, Phinney DG, Prockop DJ, O'Connor KC. Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Eng* 2006; 12(11): 3007-19.
32. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007; 100(9): 1249-60.
33. Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am* 1995; 77(6): 940-56.
34. Hayda RA, Brighton CT, Esterhai JL. Pathophysiology of delayed healing. *ClinOrthopRelat Res* 1998; (355 Suppl): 31-40.
35. Marsh, D. Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion. *ClinOrthopRelat Res* 1998; (355 Suppl): S22-30.
36. Bongso A. *Stem cells: from bench to bedside*. New Jersey: World Scientific; 2005.
37. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110): 920-6.
38. Bongso A, Pelled G, Helm GA, Huard J, Schwarz EM, Gazit D. Review: gene- and stem cell-based therapeutics for bone regeneration and repair. *Tissue Eng* 2007; 13(6): 1135-50.
39. Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, Lee D. Role of bone substitutes. *ClinOrthopRelat Res* 1996; (324): 55-65.

40. Bruder SP, Fox BS. Tissue engineering of bone. Cell based strategies. *ClinOrthopRelat Res* 1999; (367 Suppl): S68-83.
41. Service RF. Tissue engineers build new bone. *Science* 2000; 289(5484): 1498-500.
42. Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2008;26: 434.
43. Hollinger JO, Einhorn TA, Doll BA, Sfeir C. *Bone Tissue Engineering*. Boca Raton: CRC Press; 2005.
44. Mendes SC, Sleijster M, den Van M, De BJ, Van BC. A cultured living bone equivalent enhances bone formation when compared to a cell seeding approach. *J Mater Sci Mater Med* 2002; 13(6): 575-81.
45. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24(5): 1294-1301.
46. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell* 2002; 13(12): 4279-4295.
47. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003; 5(5): 362-369.
48. Torio-Padron N, Huotari AM, Eisenhardt SU, Borges J, Stark GB. Comparison of pre-adipocyte yield, growth and differentiation characteristics from excised versus aspirated adipose tissue. *Cells Tissues Organs* 2010; 191(5): 365-371.
49. Bieback K, Hecker A, Kocaömer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, Klüter H. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells* 2009; 27(9): 2331-2341.
50. Ogawa R, Mizuno H, Watanabe A, Migita M, Hyakusoku H, Shimada T. Adipogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice-including relationship of sex differences. *BiochemBiophys Res Commun* 2004; 319(2): 511-7.
51. Tchkonina T, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Tchoukalova Y, Karagiannides I, Forse RA, DePonte M, Stevenson M, Guo W, Han J, Waloga G, Lash TL, Jensen MD, Kirkland JL. Fat depot origin affects adipogenesis in primary cultured and cloned

- human preadipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282(5): R1286-96.
52. Von Heimburg D, Zachariah S, Heschel I, Kuhling H, Schoof H, Hafemann B, Pallua N. Human preadipocytes seeded on freeze-dried collagen scaffolds investigated in vitro and in vivo. *Biomaterials* 2001; 22(5): 429-38.
 53. Yuan Q, Zeng X, Chen L, Peng E, Ye Z. Comparison of myogenic differentiation ability of adipose-derived stem cells from different sites in rabbit. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2010; 24(10): 1228-32.
 54. Toyoda M, Matsubara Y, Lin K, Sugimachi K, Furue M. Characterization and comparison of adipose tissue-derived cells from human subcutaneous and omental adipose tissues. *Cell Biochem Funct* 2009; 27(7): 440-7.
 55. Hicok KC, Du Laney TV, Zhou YS, Halvorsen YD, Hitt DC, Cooper LF, Gimble JM. Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng* 2004; 10(3-4): 371-80.
 56. Agrawal CM, Ray RB. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001; 55: 141-150.
 57. O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson LJ. The effect of pore size on cell-adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* 2005; 26: 433-441.
 58. Szpalski C, Barr J, Wetterau M, Saadeh BP, Warren MS. Cranial bone defects: current and future strategies. *Neurosurg Focus* 2010; 29(6): E8.
 59. Ignjatovic N, Liu C-Z, Czernuszka J, Uskokovic D. Micro and nano/injectable composite biomaterials of calcium phosphate coated with poly(dl-lactide-co-glycolide). *Acta Biomater*. 2007;3: 927-935.
 60. Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, McCarville ME, Orchard PJ, Pyeritz RE, Brenner MK. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* 2001; 97(5): 1227-31.
 61. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999; 5(3): 309-13.
 62. Kotobuki N, Hirose M, Takakura Y, Ohgushi H. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artif Organs* 2004; 28(1): 33-9.

63. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 2004; 14(4-6): 311-24.
64. Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med* 2005; 9(1): 72-84.
65. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7(2): 211-28.
66. Ballas CB, Zielske SP, Gerson SL. Adult bone marrow stem cells for cell and gene therapies: implications for greater use. *J Cell Biochem Suppl* 2002; 38: 20-8.
67. Vats A, Tolley NS, Polak JM, Buttery LD. Stem cells: sources and applications. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2002; 27(4): 227-32.
68. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001; 226(6): 507-20.
69. Chai C, Leong KW. Biomaterials approach to expand and direct differentiation of stem cells. *Mol Ther* 2007; 15(3): 467-80.
70. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone regeneration. *J Craniofac Surg* 1998; 9: 310-6.
71. Kochi G, Sato S, Fukuyama T, Morita C, Honda K, Arai Y, Ito K. Analysis on the guided bone augmentation in the rat calvarium using a microfocus computerized tomography analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 107(6): e42-8.
72. Guilak F, Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, Fermor B, et al. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol* 2006; 206: 229-237.
73. Min S, Sato S, Saito S, Ebihara H, Arai Y, Ito K. Microcomputerized tomography analysis: dynamics of bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvarium. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 106: 892-5.
74. Muraglia A, Martin I, Cancedda R, Qutro R. A nude mouse model for human bone formation in unloaded conditions. *Bone* 1998; 22: S131-4.
75. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1998; 16(2): 155-62.

76. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, et al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* 2000; 49: 328-37.
77. Arinzeh TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85A: 1927-35.
78. Petrović D. Primena fosfatne keramike sintetizovane u našim laboratorijama u cilju nadoknade postcističnih koštanih gubitaka. *Stomatološki glasnik Srbije* 1989; 3: 231-238.
79. Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, van Harmelen V, Gotherstrom C, Blomqvist L, Arner P, Ryden M. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res* 2005; 308: 283–290.
80. Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G and Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 2005; 87(1): 125-8.
81. Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F, Astier J, Vernochet C, Saint-Marc P, Guesnet J, Guezennec A, Amri EZ, Dani C and Ailhaud G. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315(2): 255-63.
82. Hattori H, Sato M, Masuoka K, Ishihara M, Kikuchi T, Matsui T, Takase B, Ishizuka T, Kikuchi M, Fujikawa K and Ishihara M. Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs* 2004; 178(1): 2-12.
83. Albright AL, Stern JS. Adipose tissue. In: Fahey TD, editor. *Encyclopedia of Sports Medicine and Science*. Internet Society for Sport Science: <http://sportsoci.org>; 1998.
84. Lanza RP, Langer RS, Vacanti J. *Principles of tissue engineering*. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press; 2002.
85. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 560-7.

86. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 1992; 13(1): 81-8.
87. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 1997; 64(2): 295-312.
88. Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE. Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. *Dev Biol* 1990; 140(1): 132-8.
89. Herbertson A, Aubin JE. Dexamethasone alters the subpopulation make-up of rat bone marrow stromal cell cultures. *J Bone Min Res* 1995; 10: 285-294.
90. Porter RM, Huckle WR, Goldstein AS. Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 2003; 90: 13-22.
91. Chung CH, Golub EE, Forbes E, Tokuoka T, Shapiro IM. Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcified Tissue Int* 1992; 51(4): 305-11.
92. Liu P, Oyajobi BO, Russell RG, Scutt A. Regulation of osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells: interaction between transforming growth factor-beta and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ In vitro. *Calcified Tissue Int* 1999; 65(2): 173-80.
93. Beck GR Jr, Zerler B, Moran E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(15): 8352-7.
94. Fujita T, Izumo N, Fukuyama R, Meguro T, Nakamuta H, Kohno T, Koida M. Phosphate provides an extracellular signal that drives nuclear export of Runx2/Cbfa1 in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280(1): 348-52.
95. Skillington J, Choy L, Derynck R. Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of pre-adipocytes. *J Cell Biol* 2002; 159: 135-146.

96. Song HM, Nacamuli RP, Xia W, Bari AS, Shi YY, Fang TD, Longaker MT. High-dose retinoic acid modulates rat calvarial osteoblast biology. *J Cell Physiol* 2005; 202: 255-262.
97. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004; 22: 233–241.
98. Ji X, Chen D, Xu C, Harris SE, Mundy GR, Yoneda T. Patterns of gene expression associated with BMP-2-induced osteoblast and adipocyte differentiation of mesenchymal progenitor cell 3T3-F442A. *J Bone Miner Metab* 2000; 18: 132–139.
99. Dudas JR, Marra KG, Cooper GM, Penascino VM, Mooney MP, Jiang S, et al. The osteogenic potential of adipose-derived stem cells for the repair of rabbit calvarial defects. *Ann Plast Surg* 2006; 56: 543-8.
100. Hattori H, Masuoka K, Sato M, Ishihara M, Asazuma T, Takase B, et al. Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006; 76: 230–239.
101. Di Bella C, Farlie P, Penington AJ. Bone regeneration in a rabbit critical-sized skull defect using autologous adipose-derived cells. *Tissue Eng Part A* 2008; 14(4): 483-90.
102. Tholpady SS, Llull R, Ogle RC, Rubin JP, Futrell JW, Katz AJ. Adipose tissue: stem cells and beyond. *Clin Plast Surg* 2006; 33(1): 55-62.
103. Giorgino F, Laviola L, Eriksson JW. Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies. *Acta Physiol Scand* 2005; 183(1): 13-30.
104. Niechajev I, Sevcuk O. Long-term results of fat transplantation: clinical and histologic studies. *Plast Reconstr Surg* 1994; 94: 496–506.
105. Ersek RA, Chang P, Salisbury MA. Lipo layering of autologous fat: an improved technique with promising results. *Plast Reconstr Surg* 1998; 101: 820–826.
106. Rubin JP, Bennett JM, Doctor JS, et al. Collagenous microbeads as a scaffold for tissue engineering with adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2007; 120: 414.
107. Stillaert FB, Di Bartolo C, Hunt JA, et al. Human clinical experience with adipose precursor cells seeded on hyaluronic acid-based spongy scaffolds. *Biomaterials* 2008; 29(29): 3953-9.

108. Itoi Y, Takatori M, Hyakusoku H, Mizuno H. Comparison of readily available scaffolds for adipose tissue engineering using adipose-derived stem cells. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010; 63(5): 858-64.
109. Choi YS, Cha SM, Lee YY, et al. Adipogenic differentiation of adipose tissue derived adult stem cells in nude mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345: 631-7.
110. Chastain SR, Kundu AK, Dhar S, Calvert JW, Putnam AJ. Adhesion of mesenchymal stem cells to polymer scaffolds occurs via distinct ECM ligands and controls their osteogenic differentiation. *J Biomed Mater Res A* 2006; 78: 73–85.
111. Dalby MJ, Di Silvio L, Davies GW, Bonfield W. Surface topography and HA filler volume effect on primary human osteoblasts in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 2000; 11: 805–810.
112. Kenar H, Kose GT, Hasirci V. Tissue engineering of bone on micropatterned biodegradable polyester films. *Biomaterials* 2006; 27: 885–895.
113. Kilpadi KL, Chang PL, Bellis SL. Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel. *J Biomed Mater Res* 2001; 57: 258–267.
114. Di Silvio L, Dalby MJ, Bonfield W. Osteoblast behaviour on HA/PE composite surfaces with different HA volumes. *Biomaterials* 2002; 23: 101–107.
115. Murphy WL, Hsiong S, Richardson TP, Simmons CA, Mooney DJ. Effects of a bone-like mineral film on phenotype of adult human mesenchymal stem cells in vitro. *Biomaterials* 2005; 26: 303–310.
116. Schneider OD, Stepuk A, Mohn D, Luechinger NA, Feldman K, Stark WJ. Light curable polymer/calcium phosphate nanocomposite glue for bone defect treatment. *Acta Biomater* 2010; 6(7): 2704-10.
117. Kotobuki N, Ioku K, Kawagoe D, Fujimori H, Goto S, Ohgushi H. Observation of osteogenic differentiation cascade of living mesenchymal stem cells on transparent hydroxyapatite ceramics. *Biomaterials* 2005; 26: 779–785.
118. Kurane A, Vyavahare N. In vivo vascular tissue engineering: influence of cytokine and implant location on tissue specific cellular recruitment. *J Tissue Eng Regen Med* 2009; 3(4): 280-9.
119. Suzuki T, Kobayashi K, Tada Y, Suzuki Y, Wada I, Nakamura T, Omori K. Regeneration of the trachea using a bioengineered scaffold with adipose-derived stem cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008; 117(6): 453-63.

120. Prichard HL, Reichert W, Klitzman B. IFATS collection: Adipose-derived stromal cells improve the foreign body response. *Stem Cells* 2008; 26(10): 2691-5.
121. Olander JV, Bremer ME, Marasa JC, Feder J. Fibrin-enhanced endothelial cell organization. *J Cell Physiol* 1985; 125: 1–9.
122. Naito M, Nomura H, Iguchi A. Migration of cultured vascular smooth muscle cells into non-crosslinked fibrin gels. *Thromb Res* 1996; 84: 129–36.
123. Lee SG, Yang JW, Park SG, Yang YI. Effect of stem cells and fibrin concentration on the vascularization of the Medpor orbital implant. *Clin Experiment Ophthalmol* 2010; 38(9): 885-91.
124. Silverman KJ, Lund DP, Zetter BR, et al. Angiogenic activity of adipose tissue. *Biochem Biophys Res Comm* 1988; 153: 347–352.
125. Kim WS, Park BS, Sung JH, et al. Wound healing effect of adipose derived stem cells: A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci* 2007; 48: 15–24.

SAŽETAK

Reparacija koštanih defekata koji su nastali kao posledica traume, resekcije tumora ili kongenitalnih anomalija još uvek je veliki izazov za hirurge. U novije vreme, tkivni inženjering (TE) baziran na primeni mezenhimskih matičnih ćelija (eng. MSCs) je pristup koji dosta obećava u regeneraciji kostiju. Posebno bogat izvor MSCs je masno tkivo. Dosadašnji pristup korišćenja mezenhimskih matičnih ćelija iz masnog tkiva (eng. ADSCs) i matičnih ćelija uopšte u TE i u regenerativne svrhe se karakteriše ekspanzijom ovih ćelija *in vitro*, a zatim sađenjem ćelija na nosače i njihovom implantacijom.

Pošto je pokazano da sredina bogata hidroksiapatitom, kao što je i prirodna kost, može biti dobra mikrosredina za diferencijaciju ADSCs u osteoblaste, pretpostavljeno je da se ovim ćelijama u takvoj sredini i u organizmu mogu obezbediti uslovi za diferencijaciju u osteogene ćelije.

Cilj ovog rada je bio ispitati ulogu masnog tkiva u regeneraciji defekta kosti na modelu defekta kalvarije kunića na dva načina, izolovanjem mezenhimske frakcije ćelija bez prethodne kultivacije *in vitro* i primenom usitnjenog celog masnog tkiva. Takođe, cilj je bio ispitati ulogu komercijalnog zamenika kosti (*Bio-Oss*) i nanomaterijala CP-PLGA (kalcijum-fosfat-poli-DL-laktid-ko-glikolid) u funkciji različitih nosača ćelija i tkiva.

Istraživanje je obuhvatilo dvadeset eksperimentalnih životinja podeljenih u četiri grupe po pet životinja u svakoj. U prvoj i trećoj grupi kao nosač izolovanih ćelija korišćen je *Bio-Oss* (mineralni matriks goveđe kosti), a u drugoj i četvrtoj grupi kao nosač je upotrebljen nanomaterijal CP-PLGA. Na kalvariji svakog kunića napravljena su 5 defekta od kojih su četiri punjena pripremljenim graftovima i implantatima a peti defekt je ostajao nepopunjen i predstavljao je spontanu regeneraciju. Proces stvaranja koštanog tkiva u napravljenim defektima i njegova gustina praćeni su radiografski pomoću MSCT-64 skenera i to posle I, III i VI nedelje od popunjavanja defekata. Polovina od ukupnog broja životinja (I i II grupa) žrtvovana je nakon četiri nedelje, a ostatak (III i IV grupa) nakon osam nedelja od popunjavanja defekata.

Nađeno je da stepen osteogenetskog procesa u ispitivanim graftovima zavisi od vrste biomaterijala korišćenih u svojstvu nosača ćelija i tkiva, kao i od bioloških komponenti koje

se sa njim kombinuju. Upotreba *Bio-Oss*-a u svojstvu implantata vremenom dovodi do kolapsa koštane gustine. Ako se *Bio-Oss* koristi kao nosač u graftovima čije su komponente masno tkivo ili puna krv onda značajno doprinosi povećavanju i održavanju koštane gustine. Nanomaterijal CP/PLGA se pokazao kao dobar nosač za mezenhimske matične ćelije masnog tkiva u regeneraciji kalvarije. Upotreba nanomaterijala povećava koštanu gustinu isključivo kada se koristi kao nosač za ADSC. Kombinovanje svežih neindukovanih ADSC sa nanomaterijalom u krvnom ugrušku dovodi do brze inicijacije regeneracije kosti.

Pristup u potpomognutoj osteoregeneraciji koji se bazira na korišćenju svežih neindukovanih ADSC se pokazao kao obećavajući zbog povoljnog efekta na regeneraciju kosti i svoje jednostavnosti. Za konačnu primenu ADSC i masnog tkiva u regenerativne svrhe potrebna su dalja istraživanja kako bi se ovi postupci unapredili i optimizovali.

SUMMARY

Repair of bone defects that arise as a result of trauma, tumor resection, or congenital anomalies is still a big challenge for surgeons. More recently, tissue engineering (TE) based on the use of mesenchymal stem cells (MSCs) is an approach that seems promising in the regeneration of bone. Particularly rich source of MSCs is adipose tissue. Current approach of using mesenchymal stem cells from adipose tissue (ADSCs) and stem cells in general, in the tissue engineering and regenerative purposes is characterized by the expansion of these cells *in vitro*, and then planting of cells on carriers and their implantation.

Since it has been shown that an environment rich in hydroxyapatite, as well as a natural bone, can be a good microenvironment for differentiation of ADSC into osteoblasts it was assumed that those cells in such an environment in the body can provide conditions for the differentiation into osteogenic cells.

The aim of this study was to investigate the role of adipose tissue in regeneration of bone defects in the rabbit calvaria defect model in two ways, by isolating mesenchymal stem cell fraction and application without precultivation *in vitro*, and the application of whole adipose tissue cut into small pieces. Also the aim was to examine the role of commercial bone deputy (Bio-Oss) and nanomaterial CP-PLGA (calcium phosphate-poly-DL-lactide-co-glycolide) in the function of different cell carriers and tissues.

The research included twenty experimental animals separated into four groups of five animals in each. In the first and the third group Bio-Oss (bovine bone mineral matrix) was used as a carrier of isolated cells and in the second and the fourth group nanomaterial CP-PLGA was used as a carrier. On calvaria of each rabbit five defects were made from which four were filled with prepared grafts and implants and the fifth defect remained unfilled and represented a spontaneous regeneration. The process of creating bone tissue and bone density in defects were observed radiographically using MSCT-64 scanner after I, III and VI week of filling defects. Half of the animals (group I and II) were sacrificed after four weeks, and the rest (group III and IV) after eight weeks of filling defects.

It was found that the degree of osteogenic process in the tested grafts depends on the type of biomaterial used as a carrier of cells and tissues, as well as biological components that are combined with it. The use of Bio-Oss in the role of the implant eventually leads to the

collapse of bone density. If Bio-Oss is used as a carrier in the grafts whose components are fat or whole blood then contributes significantly to the increasing and maintaining bone density. Nanomaterial CP / PLGA proved to be a good carrier for adipose-derived mesenchymal stem cells in regeneration of calvaria. The use of nanomaterials increases bone density only when used as a carrier for the ADSC. Combining fresh non-induced ADSC with nanomaterials in blood clots leading to rapid initiation of bone regeneration.

Approach to assisted osteoregeneration which is based on the use of fresh non-induced ADSC has proven to be promising due to the favorable effect on bone regeneration and their simplicity. For the final application of ADSC and adipose tissue in regenerative purposes requires further research in order to improve these processes and optimize them.

BIOGRAFIJA

Dr **IVICA VUČKOVIĆ** (rođen 1961. godine) **matični br: 0410961730019**

maksilofacijalni hirurg; prof.oralne hirurgije – Medicinska škola Niš

UNIVERZITET U NIŠU- MEDICINSKI FAKULTET

KLINIKA ZA STOMATOLOGIJU NIŠ – MAKSILOFACIJALNA HIRURGIJA

Ivica Vučković je rođen 04.10.1961.godine u Nišu. Na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu odsek Stomatologija diplomirao je 1987.godine. Specijalističke studije iz maksilofacijalne hirurgije na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu završio je 1994.godine (sa ocenom ODLIČAN) i stekao stručni naziv specijaliste - maksilofacijalni hirurg. Akademske doktorske studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu upisao je školske 2007/2008 god. Zapošljen je na Klinici za Stomatologiju Niš – Klinika za maksilofacijalnu hirurgiju od 1995.godine. Kao redovni profesor – saradnik Medicinske škole „ Dr Milenko Hadžić“ u Nišu na predmetu Oralna hirurgija radi od 1996.godine.

U okviru stručnog usavršavanja u Austriji (Beč) 2006.godine stekao je sertifikat za uspešno završen kurs iz implantologije **ANKYLOS multi_ indicative**. Dr Ivica Vučković je član *European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery (EACMFS)* od 2000.godine. U udruženju maksilofacijalnih hirurga Srbije nalazi se od 1995. godine. Član je Predsedništva Srpskog Lekarskog Društva (SLD) podružnice Niš.

Autor je i koautor više radova objavljenih u stranim časopisima i časopisima od nacionalnog značaja indeksiranim na SCI listi kao i većeg broja radova prezentovanih na stručnim kongresima maksilofacijalnih hirurga u zemlji i inostranstvu.

Radovi u časopisima međunarodnog značaja:

M22

1. Zoran Pesic, Nikola Buric, Ivica Vuckovic, Dragan Petrovic, Dragan Krasic, Andrija Cosic and Ivana Djokic. Use of 2-Octyl-Cyanoacrylate in surgical closing of Postparotidectomy salivary fistulas. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 2011; 268(11):1691-4. (IF: 1.287)

M23

1. Vučković Ivica, Petrović Dragan, Petrović Sladjana, Ivana Djokić. Surgery and conservative treatment of giant cell granuloma of the maxilla - case report. HealthMED. (*In press*)
2. Petrović Dragan, Mihailović Dragan, Petrović Sladjana, Živković Nikola, Mijović Žaklina, Bjelaković Bojko, Kostić Miloš, Kesić Ljiljana, Stanković Ana, Petrović Milica, Vučković Ivica. Asymptomatic flow of rosai-dorfman disease. Vojnosanitetski preglad. (*In press*)
3. Petrovic Dragan, Ajdukovic Zorica R, Petrovic Sladjana, Ignjatovic Nenad L, Najman Stevo J, Vuckovic Ivica. Semiquantitative radiological and clinical assessment of the restoration of alveolar bone defects treated with biphasic calcium phosphate/poly-dl-lactide-co glycolide composite. HealthMED 2011; 5(6):2105-2114. (IF: 0.435)
4. Petrovic Dragan, Visnjic Milan, Vuckovic Ivica, Petrovic Sladjana. Reconstruction of the skin and perimandibular soft tissue after osteoradionecrosis using the supraclavicular islet fasciocutaneous flap. HealthMED 2011; 5(1):223-229. (IF: 0.435)
5. Bojanović M, Živković-Marinkov E, Veselinović D, Bojanović A, Vučković I. Maligni tumori aurikule i periaurikularnog regiona Vojnosanit Pregl 2009; 66(8):611-616. (IF: 0.179)

Radovi u časopisima nacionalnog značaja:

M52

1. Pešić Z, Mihailović D, Đorđević B, Petrović S, Krasić D, Mijović Ž, Vučković I. Size and number of silver-stained nucleolar organizer regions and survival rate in patients with intraoral carcinomas. Acta Medica Medianae 2009; 26(4):181-185.
2. Pešić Z, Šurdilović S, Vučković I. Perforating wounds of neck produced by low velocity projectiles – report of two cases. Acta Medica Medianae 2004; 43 (1):61-64.

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu:

M34

1. Petrović D, Stanković M, Vučković I, Pešić Z, Milisavljević D, Petrović S, Đokić I, Stanković P. The influence of different treatment modalities on the functional outcome and survival rate for oral and oropharyngeal carcinoma. International Congress on Head and Neck Tumors. October 2011. Zagreb.

2. Z. Pesic, I. Vučković, D. Petrovic, D. Krasic. Modified transmasseteric anteroparotid approach in treating of fractured condylar process. 25th Congress of the International College for Maxillo-Facial-Surgery- October 27 to 30, 2010 – Belgrade, Serbia
3. Vučković I, Pešić Z, Petrović D, Bogdanović T. Transmasseteric anteroparotid approach in treatment of condilar fractures. First Macedonian Congress of Maxillofacial and Neck Surgery with International Participation – May 25 to 27, 2006 – Ohrid, FYR Macedonia
4. Vučković I, Krasić D, Burić N, Pešić Z. Temporal miofascial and pericranial flaps in reconstruction of head defects. 10th Congress of Maxillofacial Surgery of Yugoslavia with International Participation – November 23 to 25, 2000 – Belgrade, Serbia
5. Milojević J, Krasić D, Vučković I, Burić N. Parotid gland tumours surgery. 10th Congress of Maxillofacial Surgery of Yugoslavia with International Participation – November 23 to 25, 2000 – Belgrade, Serbia
6. Burić N, Krasić D, Vučković I: Island skin-muscular mental flap: new flap for functional reconstruction of lower lip. 10th Congress of Maxillofacial Surgery of Yugoslavia with International Participation – November 23 to 25, 2000 – Belgrade, Serbia

Saopštenja sa nacionalnih skupova štampana u izvodu:

M64

1. Vučković I, Krasić D, Pešić Z, Petrović D, Bogdanovic T. Five years of experience in the treatment of cheekbone fractures. 15th Congress of Otto-Rhino-Laryngologists of Yugoslavia – November 18 to 21, 1998 – Niš, Serbia
2. Pešić Z, Šurdilović S, Vučković I, Škuletić Č, Petrović D. Radical neck dissection complications of patients with intra-oral malignant tumours. 15th Congress of Otto-Rhino-Laryngologists of Yugoslavia – November 18 to 21, 1998 – Niš, Serbia
3. Šurdilović S, Pešić Z, Vučković I, Petrović D, Škuletić Č. Success analysis of upper jaw fractures treatment during the five years period. 15th Congress of Otto-Rhino-Laryngologists of Yugoslavia – November 18 to 21, 1998 – Niš, Serbia
4. Krasić D, Burić N, Šurdilović S, Pešić Z, Vučković I, Škuletić Č. Reconstruction of front-etmoidal region defects. 15th Congress of Otto-Rhino-Laryngologists of Yugoslavia – November 18 to 21, 1998 – Niš, Serbia