



## AVTOLOGNI TKIVNOINŽENIRSKI KOSTNI NADOMESTKI IZ ALVEOLNIH OSTEOBLASTOV

### Autologous tissue-engineered bone substitutes from alveolar osteoblasts

Rode M., Marolt D., Maličev E., Kregar Velikonja N.

#### Izvleček

Pri zdravljenju poškodovanega kostnega tkiva lahko z uporabo avtolognih tkivnoinženirskih kostnih nadomestkov vsaj deloma povrnemo normalno funkcijo tkiva, tako da omogočimo pospešeno regeneracijo kostnine. Namen naših raziskav je bil pripraviti in ovrednotiti celične kulture kostnih celic – osteoblastov, ki smo jih izolirali iz alveolne kosti, preostale pri rutinskih parodontalnih posegih, ki smo jo odvzeli 37 pacientom s parodontalno boleznijo. S testiranjem različnih okoliščin gojenja smo želeli razviti metode za rutinsko pripravo kostnih nadomestkov iz teh celic. Celični odgovor smo primerjali z merjenjem celične proliferacije, aktivnosti alkalne fosfataze, mineralizacije medceličnine in izražanja genov za specifične osteoblastne proteine. Alveolne kostne celice smo uspešno gojili do 8. pasaže. Uspeh celične izolacije je bil neodvisen od mesta odvzema (mandibula ali maksila) in od starosti pacienta. Celice so med gojenjem obdržale fenotip osteoblastov, saj so tudi v višjih pasažah izražale kostno specifične gene in ohranile sposobnost mineralizacije medceličnine. Namnožene celice smo za pripravo tkivnih nadomestkov uspešno nasadili na hidroksiapatitne nosilce in jih gojili v rotacijskih bioreaktorjih. Zaključimo lahko, da nam je uspelo razviti celoten postopek priprave avtolognih kostnih nadomestkov, ki temeljijo na uporabi osteoblastov iz alveolne kosti. Tkivni nadomestki iz alveolnih osteoblastov so primerni za uporabo v parodontologiji za regeneracijo alveolne kosti.

**Ključne besede:**  
alveolni  
osteoblasti,  
tkivno inženirstvo,  
raziskava in vitro

#### Abstract

In the treatment of damaged bone tissue, normal tissue function can be at least partly restored and bone regeneration promoted with the use of autologous tissue-engineered bone substitutes. The aim of our study was to prepare and evaluate cell cultures of osteoblasts isolated from remnants of alveolar tissue removed from 37 patients with periodontal disease undergoing routine periodontal procedures. By testing different culture conditions, we wished to develop procedures for the routine preparation of bone substitutes from these cells. Cell responses were compared by measuring cell proliferation, alkaline phosphatase activity, matrix mineralization, and gene expression of osteoblast-specific proteins. Alveolar osteoblasts were successfully cultured up to the 8th culture passage. The success of isolation was independent of the site of tissue acquisition (mandible or maxilla) and the patient's age. The cells maintained the characteristic osteoblast phenotype during in vitro proliferation, as shown by osteogenic gene expression and capacity for matrix mineralization manifested also by late passage cells. Cultured cells were successfully seeded on hydroxyapatite scaffolds and grown in rotating bioreactors for the preparation of tissue substitutes. In conclusion, we developed the complete procedure for the preparation of autologous tissue substitutes from alveolar osteoblasts. Such tissue substitutes could be used for alveolar bone regeneration in periodontology.

**Key words:**  
alveolar  
osteoblasts,  
tissue  
engineering,  
in vitro study





## Uvod

Parodontitis je kronična vnetna bolezen, ki jo v večini primerov povzroči polimikrobni biofilm v obzobnem žepu. Mikroorganizmi v biofilmu povzročijo kronično vnetje, ki – nezdravljeno – poruši integriteto dlesninega epitelnega pripoja in povzroči razgradnjo veziva, pa tudi resorpcijo alveolne kosti ter v zadnji fazi izpad zoba (Cunningham in sod., 2014).

Higienska ali začetna faza predstavlja osnovo celovitega zdravljenja vnetne parodontalne bolezni in je nepogrešljivi del vzdrževalne faze. Z njo lahko pri pacientih dosežemo izboljšanje bolezni. Napredovale oblike bolezni pa lahko zdravimo tudi kirurško.

Idealno zdravljenje naj bi ne le preprečilo izgubo pripoja in obzobne kosti, ampak omogočilo tudi obnovo izgubljenih obzobnih tkiv (koreninskega cementa, pozobnice in čeljustne kosti).

Eden od ciljev takega zdravljenja je vzpostavitev novega vezivnega prirastišča. To se vzpostavi le, če v stik s koreninsko površino pridejo celice pozobnice, ki so sposobne zgraditi novo cementno plast. Kirurško metodo, pri kateri uporabimo membrane, da preprečimo vrast epitelijskih celic na koreninsko površino, označujemo kot metodo vodene tkivne obnove (Mance Kristan in Petelin, 2008). Kadar želimo sočasno nadomestiti izginulo obzobno kost ali kostne defekte v čeljustnih kosteh, lahko to metodo kombiniramo z dodajanjem avtologne kosti ali nadomestnih oseoinertnih, oseoinduktivnih ali oseokonduktivnih materialov. V teh primerih govorimo o metodi vodene kostne regeneracije (Coelho in sod., 2012). Avtologna kost vsebuje vse elemente, potrebne za uspešno celjenje: celice z osteogenim potencialom, signalne molekule in osteokonduktivni kostni matriks (Turhani in sod., 2005).

Žal se pri mnogo pacientih na mestu odvzema lahko pojavijo zapleti (infekcije, bolečine, poškodbe živcev). Dodatne težave pri presajevanju avtologne kosti predstavljajo podaljšan operacijski čas, večja izguba krvi, bolečina na mestu odvzema in večji stroški posega (Lucarelli in sod., 2004; Ji-Woong Jang in sod., 2012), zato se v parodontalni kirurgiji vse pogosteje uporabljajo kostni vsadki iz različnih biokompatibilnih materialov.

Takšni materiali so v večini primerov le biokonduktivni (podpirajo novo kostnino) ali bioinertni (samo zapolnjujejo prostor, ki ga sčasoma zapolni

lastna kost ob istočasni resorpciji teh materialov in ne povzročajo neželenih lokalnih ali sistemskih reakcij). Pri polnjenju kostnih okvar s kostnimi nadomestki zato pogosto ne pride do kostne regeneracije, ampak le do vezivne povezave tega materiala (Ji-Woong Jang in sod., 2012).

Tkivno inženirstvo je ena od sodobnih možnosti za obnovo izgubljenih tkiv. Za pridobitev celičnih elementov na tak način se največkrat uporabljajo izvirne mezenhimske celice iz kostnega mozga, ki so multipotentne (Zhi-quiring Jiang et al.; 2012). Gay in sodelavci so leta 2014 ugotovili, da so izvirne celice prisotne tudi v pozobnici.

Čeprav je večji del prizadevanj posvečen raziskavam matičnih celic, nekatere skupine razvijajo postopke gojenja in uporabe diferenciranih kostnih celic – osteoblastov za pripravo tkivnoinženirskih nadomestkov (Xiao in sod., 2003; Hofmann in sod., 2003; Turhani in sod., 2005b; Pradel in sod., 2006; Pradel in Lauer, 2012).

### *Namen naših raziskav*

V našem delu smo za pripravo tkivnoinženirskih kostnih nadomestkov kot vir osteoblastov preizkusili tkivo alveolne kosti in spongiozo dolgih kosti.

V seriji predkliničnih raziskav smo želeli ugotoviti:

- ali in kako lahko uporabimo preostale vzorce tkiva alveolne kosti za izolacijo in gojenje osteoblastov;
- ali *in vitro* gojeni osteoblasti ohranijo svoje značilnosti in sposobnost mineralizacije;
- ali je mogoče enake postopke gojenja uporabiti tudi za vzorce tkiva dolgih cevastih kosti ter kakšne so rastne lastnosti osteoblastov dolgih cevastih kosti;
- ali lahko tako pridobljene osteoblaste uporabimo za pripravo tkivnoinženirskih kostnih nadomestkov, ki bi se uporabljali za regeneracijo kostnih poškodb okoli zob.

## Material in metode

### *1. Odvzem tkiva*

Človeške osteoblaste za pripravo tkivnoinženirskih nadomestkov smo izolirali iz vzorcev kostnih tkiv, ki so ostali pri parodontalnih operacijskih posegih v Zdravstvenem domu Ljubljana in pri kirurških posegih na Ortopedski kliniki Kliničnega centra Ljubljana. V ta namen smo 20. maja 2003 pridobili soglasje Komisije za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje Republike Slovenije.





Pri svojem delu smo za izolacijo in gojenje celic z osteogenim potencialom preizkusili tkivo alveolne kosti in spongiozo dolgih kosti, pri čemer smo primerjali in ovrednotili različne postopke izolacije ter ugotavljali rast pridobljenih celic pri subkultivaciji. Postopke izolacije in gojenja celic iz alveolne kosti smo preizkušali in izboljševali na skupno 37 vzorcih alveolne kosti in 6 vzorcih dolgih kosti.

Najprej smo testirali metodo odvzema kostnega tkiva. Preizkusili smo dva načina odvzema alveolne kosti v maksili in mandibuli:

— vrtnanje s svedrom: drobce tkiva smo prenesli v transportni lonček z gojiščem;

— uporaba kostnih ščipalk: odvzete kose tkiva smo prenesli v transportni lonček z gojiščem.

Odvzeto tkivo smo hranili v transportnih lončkih pri temperaturi do 20 °C in z izolacijo celic začeli najkasneje 24 ur po odvzemu.

## 2. Izolacija in rast alveolnih osteoblastov v celičnih kulturah

Celične in tkivne kulture smo gojili v inkubatorjih pri 37 °C v vlažni atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>, za pripravo medijev in delo s kulturami pa smo uporabljali zaščitne mikrobiološke komore.

Naši postopki izolacije in gojenja celic iz alveolne kosti so že bili podrobneje opisani (Maličev in sod., 2008; Marolt in sod., 2014), zato v tem članku povzemamo le glavne faze našega dela. Kostno tkivo smo razrezali na drobce premera < 1 mm, jih sprali, razgradili v raztopini kolagenaze ali prenesli direktno v gojilne posode z gojiščem (za pripravo kultur eksplantatov) in inkubirali (Marolt in sod., 2014). Rast celic smo opazovali od prvega dne dalje in jo ocenjevali kvalitativno (odsotnost rasti [-], rast posamičnih celic [+], močna rast z razraščanjem kolonij [++]) ter tako ugotavljali splošne trende za izboljševanje postopkov izolacije in gojenja primarnih kultur celic iz alveolne kosti. Najuspešnejši postopek gojenja je podrobneje opisan v predhodni študiji (Marolt in sod., 2014).

Pri subkultivaciji celic iz alveolne kosti smo spremljali število pasaž (presaditev v novo gojilno posodo), do katerih smo celice lahko gojili, pri naključno izbranih vzorcih petih pacientov. Ugotavljali smo tudi specifično hitrost rasti celic v posameznih pasažah, ki smo jo izračunali iz števila nasajenih celic, števila celic v preraščeni kulturi in časa gojenja pasaže (Marolt in sod., 2014).

Celice smo opazovali tudi s faznokontrastnim invertnim mikroskopom (model Eclipse TE300, Nikon Instruments, ZDA) in ugotavljali:

- preraščenost celičnih kultur (% s celicami prekrите površine gojilne posode),
- obliko in velikost celic,
- pojavljanje morfoloških posebnosti (oblika celic, nepritrjene mrtve celice),
- prisotnost granuliranega materiala v gojišču.

Poleg tkiva alveolne kosti smo za izolacijo osteoblastov preizkusili tudi spongiozo dolgih kosti in tako ovrednotili različne vire kostnega tkiva, ki so na voljo pri različnih operacijskih posegih, za izolacijo celic. Izbrali smo postopek priprave celičnih kultur eksplantatov (izraščanje osteoblastov iz koščka tkiva), ki je bil učinkovit v primeru alveolne kosti.

## 3. Ugotavljanje značilnosti alveolnih osteoblastov

V tkivnih nadomestkih smo ugotavljali prisotnost živih celic, izražanje genov značilnih osteoblastnih proteinov in aktivnost encima alkalna fosfataza (Maličev in sod., 2008).

Izražanje genov značilnih osteoblastnih proteinov: alkalne fosfataze, osteopontina in osteokalcina smo spremljali kvantitativno z metodo polimerazne verižne reakcije v realnem času (Maličev in sod., 2008; Marolt in sod., 2014). Aktivnost encima alkalna fosfataza in sposobnost mineralizacije medceličnine smo ugotavljali s histološkimi barvanji. V ta namen smo osteoblaste različnih pasaž gojili v osteoinduktivnem gojišču z dodatkom glicerofosfata beta in 2-fosfata askorbinske kisline ali v kontrolnem gojišču 1–3 tedne (Marolt in sod., 2014).

## 4. Priprava tkivnih nadomestkov

Tkivne nadomestke smo pripravili z nasajevanjem celic alveolne kosti na komercialno dostopen material Algipore® (The Clinician's Preference LLC, ZDA), ki se v parodontologiji rutinsko uporablja kot polnilni material za nadomestitev izgubljene alveolne kosti. Celice smo na porozne granule materiala (hidroksiapatit iz morskih alg, granule premera 0,3–1 mm, pore velikosti 10 mm) nasadili z uporabo fibrinskega lepila Beriplast (Aventis Behring, Nemčija) po postopku, ki so ga opisali Turhani in sod. (2005a), in pripravljene nadomestke v obliki diskov gojili v rotacijskih bioreaktorjih (podrobneje opisano v študiji Maličev in sod., 2008). V tkivnih nadomestkih smo ugotavljali prisotnost živih celic, izražanje genov



značilnih osteoblastnih proteinov in aktivnost encima alkalna fosfataza. Poleg tega smo vzorce tkivnih nadomestkov poslali na Inštitut za biologijo celice Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, kjer so za nas pripravili elektronskomikroskopske posnetke gojenih nadomestkov.

Tako pripravljene nadomestke bomo uporabili za klinično namestitve v okvarjeno obzobno kost.

### 5. Statistične analize

Postopke izolacije celic iz alveolne kosti smo statistično ovrednotili z linearno regresijsko analizo, ki smo jo naredili v programu Microsoft® Office Excell (Microsoft, ZDA).

Izplen celic (odvisna spremenljivka) smo ugotavljali v odvisnosti od starosti pacienta (neodvisna spremenljivka). Statistično značilne razlike med različnimi postopki izolacije celic ter med značilnostmi različnih skupin pri gojenju celic in tkivnih nadomestkov smo ugotavljali s Studentovim testom  $t$ , s Studentovim parnim testom  $t$  in z enoparametrično ANOVO s programoma Microsoft® Office Excell (Microsoft, ZDA) in In Stat (Graph Pad Software, ZDA). Za statistično značilne smo upoštevali razlike, pri katerih je bila vrednost  $P < 0,05$  ali  $P < 0,001$ .

## Rezultati

### 1. Uspešnost izolacije alveolnih osteoblastov

V primeru vrtnja s svedrom smo celice alveolne kosti uspešno izolirali iz 2 od skupno 7 vzorcev (29 %), v primeru odvzema s kostnimi ščipalkami pa iz 28 od skupno 30 vzorcev (93 %). Predvidevamo, da je pregrevanje tkiva pri vrtnju negativno vplivalo na preživetje celic. Oba postopka odvzema sta bila primerna za vzpostavitev primarnih kultur celic iz alveolne kosti, brez težav z mikrobiološko kontaminacijo. Podobno nam je uspelo izolirati celice iz tkiva dolgih kosti iz 4 od skupno 6 vzorcev (67 %).

### 2. Uspešnost rasti alveolnih osteoblastov v primarnih kulturah

V primarnih kulturah smo izražanje celic iz kostnega tkiva oz. posamične celice, pritrjene na dno gojilne posode, opazili 1–3 dni po nasaditvi kulture (Slika 1). Za prerast primarnih kultur oz. razrast gostih kolonij pa je bilo potrebnih 9–22 dni gojenja, tako pri izolaciji osteoblastov s pripravo kultur eksplantatov kot tudi pri izolaciji celic z razgradnjo tkiva s kolagenazo.

Izplen celic ni bil odvisen od mesta v čeljustni kosti, iz katerega je bilo odvzeto kostno tkivo. Regresijska analiza je pokazala, da med izplenom celic in starostjo pacienta ne obstaja statistično značilna povezava, saj je bila vrednost  $P > 0,05$  pri obeh metodah izolacije.

### 3. Uspešnost gojenja alveolnih osteocitov

V primarnih kulturah so celice večinoma rasle v obliki ločenih kolonij, ki so se večale, vendar pogosto niso prekile celotne površine gojilne posode. Celice alveolne kosti so bile značilne vretenaste oblike, dolžine 100–150  $\mu\text{m}$  in premera 20–30  $\mu\text{m}$ . Pri nekaterih vzorcih smo v celičnih kulturah opazili prisotnost okroglih (mrtvih) celic, pri drugih pa prisotnost večjih količin granuliranega materiala. Podobne morfološke karakteristike smo opazili tudi pri celicah dolgih kosti.

Pri štirih od petih naključno izbranih vzorcev alveolne kosti smo celice uspešno gojili do osme pasaže. Celotno število celic, pridobljenih v posameznih pasajah, je bilo odvisno od števila celic v preraščenih primarnih kulturah: iz približno 50.000–300.000 celic v preraščenih primarnih kulturah smo z nadaljnjim gojenjem v 23 dneh pridobili 106–107 celic, v 55 dneh pa do 3 x 10<sup>11</sup> celic, kar zadošča za pripravo tkivnoinženirskih nadomestkov.

V nasprotju s celicami alveolne kosti pa je bila sposobnost razmnoževanja osteoblastov dolgih kosti v naših celičnih kulturah omejena. Celice nam je uspelo gojiti do največ četrte pasaže in tako v 44 dneh gojenja pridobiti največ 3 x 10<sup>6</sup> celic. V nadaljnjih poskusih smo zato uporabljali le osteoblaste, izolirane iz alveolne kosti.

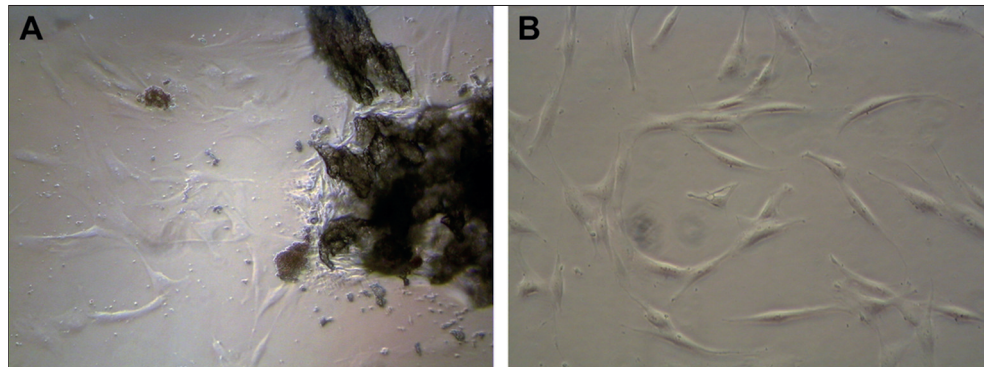
### 4. Izražanje osteoblastnega fenotipa med gojenjem v celičnih kulturah

Izražanje genov za alkalno fosfatazo, osteopontin in osteokalcin smo ugotavljali v drugi pasaži gojenja celic iz alveolne kosti, v kateri že pridobimo zadostno število celic za pripravo tkivnoinženirskih nadomestkov (106–107). V vseh vzorcih nam je uspelo zaznati izražanje vseh treh preučevanih kostnih genov, pri čemer smo opazili precejšnjo variabilnost relativnih vrednosti mRNA. Pri nadaljnjem gojenju celic alveolne kosti do pete pasaže smo opazili, da so bile ravni izražanja vseh treh preučevanih kostnih genov stabilne (Slika 2).

Po prvem tednu gojenja enoslojnih kultur alveolnih celic v osteoinduktivnem gojišču smo opazili aktivnost encima alkalna fosfataza, po dveh do treh tednih







**Slika 1:** Rast alveolnih osteoblastov v primarnih kulturah. Izražanje celic iz kostnega tkiva v kulturah eksplantatov (A) in rast posamičnih celic na dnu gojilne posode po razgradnji s kolagenazo (B) smo opazili 1–3 dni po nasaditvi kultur. Povečava: 100-krat.

gojenja pa močno kopičenje kalcijevih depozitov pri celicah 13 od 15 različnih vzorcev (črno obarvanje po von Kossu) in tako potrdili njihov osteogeni potencial. V vzorednih enoslojnih kulturah v kontrolnem gojišču nismo zaznali aktivnosti alkalne fosfataze in kopičenja mineralnih depozitov.

##### 5. Priprava tkivnih nadomestkov

Po nasaditvi celic alveolne kosti na hidroksiapatitne nosilce smo rast in pritrjevanje celic opazovali s histološkim barvanjem in z elektronsko mikroskopijo. Ugotovili smo, da so celice po treh tednih gojenja tkivnih nadomestkov v bioreaktorjih žive in pritrjene na granule nosilca. Celice so imele sploščeno morfolologijo in so v nekaterih predelih prekrivale površine nosilca v strnjeni plasti, v drugih predelih pa smo med pritrjenimi celicami lahko opazili prazne površine (Slika 3).

Po enem, dveh in treh tednih gojenja tkivnih nadomestkov v bioreaktorjih smo ugotavljali tudi izražanje alkalne fosfataze, osteopontina in osteokalcina ter ravni izražanja primerjali s tistimi v enoslojnih kulturah v osteoinduktivnem in kontrolnem gojišču. Pri izražanju alkalne fosfataze smo zaznali variabilne ravni izražanja v enoslojnih kulturah v obeh tipih gojišč (ti se med seboj niso statistično značilno razlikovale), v tkivnih nadomestkih pa je raven izražanja postopoma upadla in je bila po treh tednih značilno nižja kot v enoslojnih kulturah (vrednost  $P < 0,05$ ). Nasprotno pa je bila raven izražanja osteopontina v enoslojnih kulturah stabilna, v tkivnih nadomestkih pa značilno višja po enem tednu gojenja v primerjavi z dvema in tremi tedni gojenja v enoslojnih kulturah in v tkivnih nadomestkih (vrednost  $P < 0,05$ ).

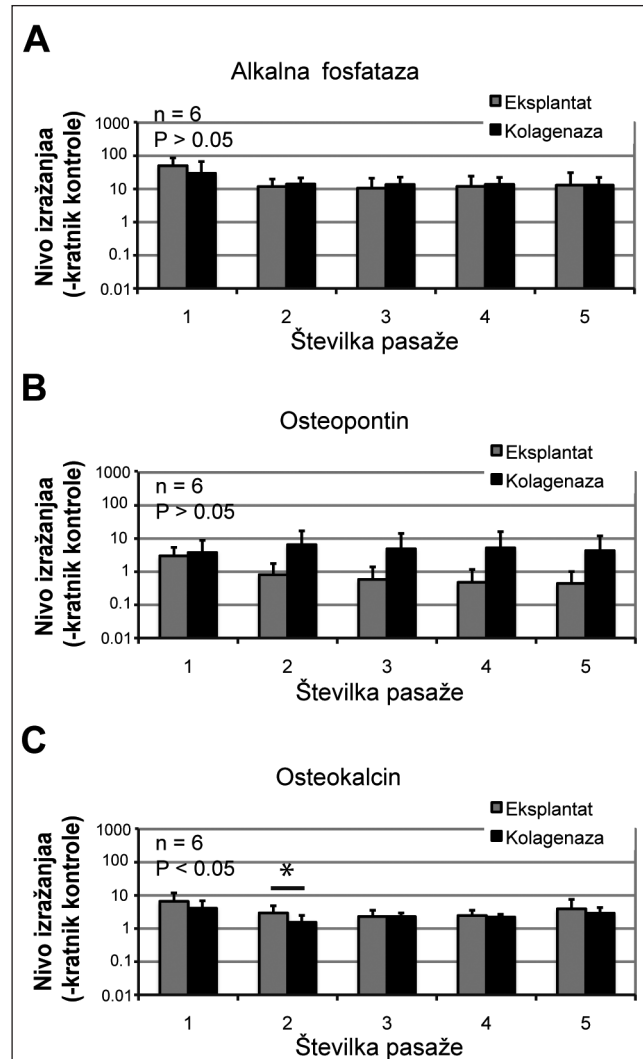
Ravni izražanja osteokalcina so bile v povpreču najvišje v tkivnih nadomestkih po enem in dveh tednih gojenja, vendar razlike v primerjavi z enoslojnimi kulturami niso bile statistično značilne (vrednost  $P > 0,05$ ).

Rezultati analize aktivnosti alkalne fosfataze so pokazali, da je bila ta višja v tkivnih nadomestkih kot v enoslojnih kulturah. Rezultati izražanja genov skupaj z rezultati aktivnosti alkalne fosfataze kažejo, da gojenje celic iz alveolne kosti v tkivnih nadomestkih spodbudi izražanje zrelega osteoblastnega fenotipa.

##### Razpravljanje

Iskanje mogočih rešitev za zdravljenje ali nadomestitev poškodovanega ali obolelega kostnega tkiva je eno najaktualnejših področij tkivnega inženirstva. Po analogiji s presaditvijo avtolognih, *in vitro* vzgojenih hondrocitov za zdravljenje poškodovanega sklepnega hrustanca, ki je v klinični praksi že dobro uveljavljen pristop in je v uporabi tudi v Sloveniji (Drobnič in sod., 2002), smo želeli razviti tehnologijo priprave avtolognih tkivnoinženirskih kostnih nadomestkov, katerih uporaba bi lako pripomogla k zdravljenju in boljši regeneraciji kostnega tkiva. Obnova alveolne kosti bi lahko predstavljala modelni sistem tako za vpeljavo postopkov priprave in gojenja tkivnih nadomestkov kot tudi za preučevanje in ovrednotenje procesa regeneracije kostnega tkiva po vsaditvi tkivnih nadomestkov. Pri obnovi alveolne kosti je treba nadomestiti manjše količine kostnega tkiva (velikostnega razreda  $1 \text{ cm}^3$ ), za kar je verjetno potrebna namnožitev in nasajevanje nekaj





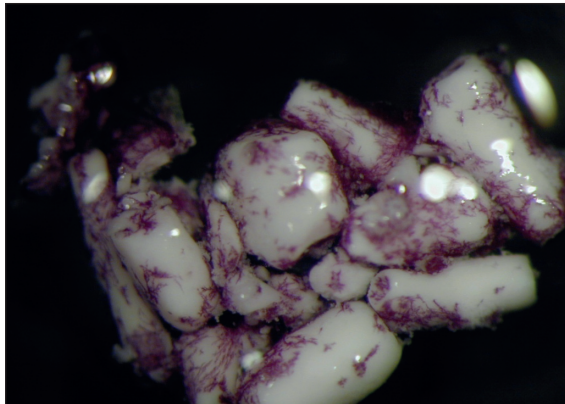
**Slika 2:** Izražanje genov osteoblastnih proteinov alkalna fosfataza (A), osteopontin (B) in osteokalcin (C) je bilo stabilno med gojenjem alveolnih osteoblastov od prve do pete pasaže. Raven izražanja genov, normalizirana na vrednosti izbranega kontrolnega vzorca alveolnih osteoblastov, je bila večinoma primerljiva med celicami, izoliranimi v kulturah eksplantatov in po razgradnji s kolagenazo (\* označuje edino opaženo statistično značilno razliko, vrednost  $P < 0,05$ ) (privzeto iz Marolt in sod., 2014).

milijonov celic. Omenjeno število celic s sedanjimi postopki priprave in gojenja celičnih kultur zlahka dosežemo, poleg tega pa to ne zahteva velike izhodne količine tkiva za izolacijo celic – nekaj 100 mg (Brittberg in sod., 1994; Marolt in sod., 2014). Predvidevamo, da bi lahko v primeru rutinske uporabe tkivnoinženirskih nadomestkov za zdravljenje kostnega tkiva kostno tkivo zbirali že ob posegih ter izolirali, namnožili in ustrezno shranili pridobljene celice. Ob kasnejši klinični potrebi bi s shranjenimi celicami lahko pripravili avtologne

tkivne nadomestke hitreje in tako skrajšali operacijske čase in pospešili zdravljenje tkiva s takojšnjim vnosom večjega števila osteogenih celic (Lendeckel in sod., 2004).

Tkivo alveolne kosti človeka smo pridobili pri parodontalnokirurških posegih. Ker v literaturi nismo zasledili natančnejšega opisa metod odvzema tkiva, smo uporabili in primerjali dva postopka: odvzem tkiva z vrtnjem s svedom in odvzem tkiva s kostnimi ščipalkami. Primerjava uspešnosti izolacije celic je pokazala, da je primernejši postopek





**Slika 3:** Alveolni osteoblasti na površini hidroksiapatitnega nosilca. Žive celice so obarvane vijoličasto, granularna struktura nosilca je vidna v beli barvi (privzeto iz Maličev in sod., 2008).

odvzema tkiva s kostnimi ščipalkami, pri katerem smo celice izolirali pri 93 % odvzetih vzorcev. Pri vrtnanju s svedrom smo celice izolirali le pri 29 % vzorcev, kar je najverjetneje posledica pregrevanja tkiva ob odvzemu, ki povzroči odmiranje celic.

Izplen celic, izoliranih iz tkiva alveolne kosti, je med različnimi pacienti variiral in ni bil povezan s starostjo pacienta ali mestom odvzema tkiva. Rotter in sod. (2002) so naredili podobne analize pri gojenju hrustančnih celic iz nosnega hrustanca in ugotovili, da število celic, ki jih lahko gojijo v celičnih kulturah, ni povezano s starostjo pacienta.

Naši zaključki se ujemajo z rezultati predhodnih študij, ki so prav tako kazale možnost izolacije in gojenja alveolnih celic iz starejših pacientov (Clausen in sod., 2006; Pradel in sod., 2008). Nasprotno pa se zaključki študij gojenja mezenhimskih matičnih celic razlikujejo: nekateri avtorji poročajo, da hitrost rasti osteogenih celic v celičnih kulturah ni odvisna od starosti pacienta, drugi pa so ugotovili zmanjšanje hitrosti rasti pri celicah pacientov, starejših od 50 let (Mendes in sod., 2002).

Pri naših poskusih smo ugotovili, da imajo osteoblasti iz alveolne kosti veliko sposobnost rasti v celičnih kulturah, saj med njihovim gojenjem, vsaj vse do osme pasaže, ni prišlo do upočasnjevanja njihove rasti.

Po približno 3 tednih gojenja smo iz povprečno 50 mm<sup>3</sup> tkiva alveolne kosti vzgajali dovolj celic (106–107) za pripravo tkivnih nadomestkov.

Poleg tkiva alveolne kosti smo pri svojem delu za izolacijo celic preizkusili tudi spongiozo dolgih kosti, ki je je količinsko več in ostane pri nekaterih ortopedskih posegih.

Naši rezultati kažejo, da je spongioza dolgih kosti manj primerna za pridobitev osteoblastov, ki bi jih bilo mogoče gojiti *in vitro*, kar bi lahko pripisali različnim načinom osifikacije alveolne (direktna osifikacija) in dolgih kosti (indirektna osifikacija).

Molekularnobiološke analize celičnega fenotipa so pokazale, da izolirane celice v drugi pasaži izražajo gene za vse tri preučevane osteoblastne proteine. Izražanje gena za osteokalcin je bilo v celicah različnih vzorcev najbolj ohranjeno, izražanje gena za osteopontin pa najbolj variabilno. Med nadaljnjim gojenjem celic do pete pasaže smo zaznali razmeroma ustajene vrednosti izražanja genov.

Če povežemo rezultate izražanja genov in stabilen diferenciacijski potencial celic, ki se kaže v potrjeni aktivnosti alkalne fosfataze in sposobnosti mineralizacije pri celicah zgodnjih in poznih pasaž, lahko zaključimo, da med gojenjem alveolnih osteoblastov od prve do pete pasaže po opisanih postopkih ne pride do postopne dediferenciacije.

Za pripravo tkivnoinženirskih nadomestkov smo vzgojene alveolne celice nasadili na nosilce in jih gojili v rotacijskih bioreaktorjih. Pri izbiri nosilca za pripravo tkivnih nadomestkov, ki bi se lahko uporabljali pri zdravljenju alveolne kosti, je bilo ključno, da se material (hidroksiapatit, pridobljen iz morskih alg) že uporablja v kliniki za obnovo alveolnega kostnega tkiva. Predhodna primerjava hidroksiapatita iz morskih alg s sintetičnim polimernim materialom iz polilaktid-ko-glikolida za gojenje periostalnih celic pa je pokazala, da so celice na hidroksiapatitu fenotipsko ustrežnejše, pri čemer sta oba materiala podpirala rast celic (Turhani in sod., 2005b).

Predvidevamo, da bi lahko z vsaditvijo takšnega *in vitro* pripravljenega tkivnega nadomestka pospešili proces regeneracije tkiva, saj bi v mesto poškodbe vnesli žive, metabolno aktivne celice. To so v svoji študiji zaraščanja kritičnih defektov kostnine na golih miših pokazali Meinel in sod. (2005). Na pozitiven vpliv vnosa živih celic lahko sklepamo tudi iz obetavnih rezultatov zdravljenja s tkivnimi nadomestki v klinični študiji s periostalnimi celicami, ki sta jo naredila Schimming in Schmelzeisen (2004).





Mi smo tkivne nadomestke pripravili s celicami, ki smo jih izolirali iz vzorcev preostalega tkiva alveolne kosti pacentov z napredovalo obliko vnetne parodontalne bolezni. Pri celicah iz 4 vzorcev smo testirali in vzgojili tkivne nadomestke, ki so po treh tednih gojenja vsebovali žive celice tako v notranjosti kot na površinah tkivnega nadomestka. Elektronskomikroskopske analize so pokazale, da se celice lahko pritrjujejo in razraščajo na površini materiala, kot je bilo ugotovljeno tudi v predhodnih študijah Turhani in sodelavcev v letu 2005.

Med gojenjem tkivnih nadomestkov je prišlo do naraščanja aktivnosti alkalne fosfataze in izražanja specifičnih genov za osteoplastne proteine, kar kaže, da so celice prešle iz proliferacijske v diferenciacijsko fazo.

Vzorci izražanja genov, ki smo jih ugotovili v naših tkivnih nadomestkih, so se nekoliko razlikovali od ugotovitev predhodne študije gojenja periostalnih celic v enakem sistemu (isti tip materiala, sestava gojišča, bioreaktor) (Turhani in sod., 2005b) ter od študije rasti alveolnih celic na istem tipu materiala v statični kulturi (Turhani in sod., 2005c). Pri študiji periostalnih celic je izražanje gena za osteopontin padlo med 6. in 21. dnevom gojenja (približno za 3-krat), izražanje gena za osteokalcin pa je med 6. in 21. dnevom gojenja narastlo, pri čemer je bil vzorec izražanja genov v skladu z rezultati biokemijskih analiz prisotnosti osteoplastnih proteinov (Turhani in sod., 2005c). V študiji alveolnih celic je izražanje genov za osteopontin in osteokalcin narastlo med 6. in 21. dnevom gojenja (Turhani in sod., 2005d). Menimo, da bi bile razlike med rezultati omenjenih študij in našimi rezultati lahko posledica različne diferenciacijske stopnje celic (v primeru periostalnih celic) ali pa razlik v okoliščinah gojenja celic.

Na osnovi naših analiz celičnega fenotipa in predhodnih študij lahko zaključimo, da gojenje alveolnih osteoplastov v tkivnih nadomestkih v bioreaktorjih omogoči preživetje in spodbudi rast celic v tridimenzionalnem okolju tkivnih nadomestkov ter spodbudi močnejše izražanje diferenciranega fenotipa kot gojenje alveolnih osteoplastov v statičnih enoslojnih celičnih kulturah.

### Sklep

Uspelo nam je razviti zanesljiv postopek izolacije in gojenja osteoplastov iz alveolne kosti. Osteo-

blasti, ki smo jih izolirali iz vzorcev tkiva alveolne kosti, med daljšim gojenjem *in vitro* (do osme pasaže) niso kazali upočasnjevanja rasti, kar nam je omogočilo pridobitev zadostnega števila celic za pripravo tkivnih nadomestkov. Iz vzorcev kostnega tkiva dolgih kosti nam je uspelo izolirati osteoplaste le v nekaterih primerih, pri čemer je bil izplen celic nizek, dobljene celice pa so v izbranih okoliščinah gojenja kazale močno omejeno sposobnost razmnoževanja *in vitro*.

Analize izražanja genov so pokazale, da v osteoplastih, izoliranih iz alveolne kosti, med daljšim gojenjem v celičnih kulturah ne pride do izgube osteoplastnega fenotipa.

Celice so po razmnoževanju *in vitro* ohranile sposobnost diferenciacije, ki se je kazala v povišani aktivnosti alkalne fosfataze in mineralizaciji izvenceličnega matriksa ob prisotnosti specifičnih osteoinduktivnih diferenciacijskih faktorjev. Osteoplaste iz alveolne kosti je zato mogoče uporabiti za pripravo tkivnoinženirskih kostnih nadomestkov.

### Zahvale

Zahvaljujemo se sodelavcem z Ortopedske klinike Kliničnega centra v Ljubljani za pomoč pri pridobitvi tkiva dolgih kosti, preostalega pri kirurških posegih. Ministrstvu za izobraževanje, znanost in šport (projekti št. L4-6325-0311-04/4.06, 3311-01-831/476, P3-0371), Ministrstvu za obrambo in Javnemu skladu RS za razvoj kadrov in štipendije (projekt št. 11013-73/2012) se zahvaljujemo za finančno podporo našim študijam.

### Reference

- Brittberg M., Lindhal A., Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson O., Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New Eng J Med* 1994; 14: 889–95.
- Clausen C, Hermund NU, Donatsky O, Nielsen H. Characterization of human bone cells derived from the maxillary alveolar ridge. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17: 533–40.
- Coelho PG, Giro G, Kim W, Granato R, Marin C, Bonfante E, Bonfante S, Lilin T, Suzuki M. Evaluation of collagen-based membranes for guided bone regeneration, by three-dimensional computerized microtomography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012; 114: 437–43.
- Cunningham LL, Novak MJ, Madsen M, Abadi B, Ebersole JL. A bidirectional relationship of oral-systemic responses: observations of systemic host responses in patients after full-mouth extractions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2014; 117: 435–44.







- Drobnič M, Kregar-Velikonja N, Radosavljevič D, Gorenšek M, Koritnik B, Maličev E, Wozniak G, Jeras M, Knežević M. The outcome of autologous chondrocyte transplantation treatment of cartilage lesions in the knee. *Cell Mol Biol Lett* 2002; 7: 361–3.
- Gay I, Cavender A, Peto D, et al. Differentiation of human dental stem cells reveals a role for microRNA-218. *J Periodontal Res* 2014; 49: 110–20.
- Hofmann A, Konrad L, Gotzen L, Printz H, Ramaswamy A, Hofmann C. Bioengineered human bone tissue using autogenous osteoblasts cultured on different biomatrices. *J Biomed Mater Res* 2003; 67: 191–9.
- Jang JW1, Yun JH, Lee KI, Jang JW, Jung UW, Kim CS, Choi SH, Cho KS. Osteoinductive activity of biphasic calcium phosphate with different rhBMP-2 doses in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012; 113: 480–7.
- Lendeckel S, Jodicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, Hedrick MH, Berthold L, Howaldt HP 2004. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2004; 32: 370–3.
- Lucarelli E., Donati D., Cenacchi A., Fornasari P.M. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. *Transfus and Apher Sci*, 2004; 2: 169–74.
- Lynch MP, Capparelli C, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Apoptosis during bone-like tissue development *in vitro*. *J Cell Biochem* 1998; 68: 31–49.
- Maličev E, Marolt D, Kregar Velikonja N, Kreft ME, Drobnic M, Rode M. Growth and differentiation of alveolar bone cells in tissue-engineered constructs and monolayer cultures. *Biotechnol Bioeng* 2008; 100: 773–81.
- Mance Kristan R, Petelin M. Zdravljenje kostnih žepov – prikaz dveh primerov. *Zobozdrav Vestn* 2008; 63: 114–21.
- Marolt D, Rode M, Kregar - Velikonja N, Jeras M, Knezevic M. Primary human alveolar bone cells isolated from tissue samples acquired at periodontal surgeries exhibit sustained proliferation and retain osteogenic phenotype during *in vitro* expansion. *PLoS One* 2014; 9: e92969.
- Meinel L, Fajardo R, Hofmann S, Langer R, Chen J, Snyder B, Vunjak-Novakovic G, Kaplan D. Silk implants for the healing of critical size bone defects. *Bone* 2005; 37: 688–98.
- Mendes SC, Tibbe JM, Veenhof M, Bakker K, Both S, Platenburg PP, Oner FC, de Bruijn JD, van Blitterswijk CA. Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: effect of culture conditions and donor age. *Tissue Eng* 2002; 6: 911–20.
- Pradel W, Eckelt U, Lauer G. Bone regeneration after enucleation of mandibular cysts: comparing autogenous grafts from tissue-engineered bone and iliac bone. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101: 285–90.
- Pradel W, Mai R, Gedrange T, Lauer G. Cell passage and composition of culture medium effects proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells from facial bone. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59 Suppl 5: 47–58.
- Pradel W, Lauer G. Tissue-engineered bone grafts for osteoplasty in patients with cleft alveolus. *Ann Anat* 2012; 194: 545–8.
- Rotter N, Bonassar LJ, Tobias G, Lebl M, Roy AK, Vacanti CA. Age dependence of biochemical and biomechanical properties of tissue-engineered human septal cartilage. *Biomaterials* 2002; 23: 3087–94.
- Schimming R, Schmelzeisen R 2004. Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62: 724–9.
- Turhani D, Weissenbock M, Watzinger E, Yerit K, Cviki B, Ewers R, Thurnher D.a. *In vitro* study of adherent mandibular osteoblast-like cells on carrier materials. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34: 543–50.
- Turhani D, Watzinger E, Weissenbock M, Cviki B, Thurnher D, Wittwer G, Yerit K, Ewers R.b. Analysis of cell-seeded 3-dimensional bone constructs manufactured *in vitro* with hydroxyapatite granules obtained from red algae. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 673–81.
- Turhani D, Cviki B, Watzinger E, Weissenbock M, Yerit K, Thurnher D, Lauer G, Ewers R. c. *In vitro* growth and differentiation of osteoblast-like cells on hydroxyapatite ceramic granule calcified from red algae. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 793–9.
- Zhi-qing J, Huan-ye L, Li-ping Z, Zhi-qiung W, De-zhi S. Repair of calvarial defects in rabbits with platelet-rich plasma as the scaffold for carrying bone marrow stromal cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012; 113: 327–33.
- Xiao Y, Qian H, Young WG, Bartold PM. Tissue engineering for bone regeneration using differentiated alveolar bone cells in collagen scaffolds. *Tissue Eng* 2003; 9: 1167–77.
- Prof. dr. Matjaž Rode, dr. dent. med., višji svetnik, Ulica Bratov Učakar 16, 1000 Ljubljana; Dr. Darja Marolt, Zavod RS za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana, in Educell, d. o. o., Prevale 9, 1236 Trzin; Doc. dr. Elvira Maličev, Zavod RS za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana, in Educell, d. o. o., Prevale 9, 1236 Trzin; Doc. dr. Nevenka Kregar Velikonja, Educell, d. o. o., Prevale 9, 1236 Trzin, in Fakulteta za zdravstvene vede Novo Mesto, Na loko 2, 8000 Novo Mesto

