

Matjaž Deželak¹, Aljoša Bavec², Miomir Knežević³

Uporaba poliHIPE-biokompatibilnih akrilnih polimerov v tkivnem inženirstvu kostnih nadomestkov

The Use of Biocompatible PolyHIPE Acrylates for Bone Tissue Engineering

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: poliHIPE-materiali, tkivno inženirstvo, kostni nadomestki, kostno tkivo, 3D-porozni materiali, predklinične študije, regenerativna medicina

Tkivno inženirstvo je relativno novo področje regenerativne medicine, ki je v zadnjih desetletjih bolj ali manj prešlo zgodnje razvojne faze in že daje klinične rezultate. Njegovo bistvo je z inženirskim pristopom, ob uporabi celic, neživih materialov ter biokemijskih in fizikalno-kemijskih dejavnikov izboljšati oziroma nadomestiti prizadeto biološko funkcijo. Ker ima kostno tkivo ključno oporno in integracijsko vlogo za celoten organizem, poleg tega pa se relativno počasi regenerira, je uporaba primernih neživih materialov še posebej pomembna. Kostno tkivo vsebuje relativno veliko zunajceličnega matriksa in je hkrati mehansko trdno in prožno, a ne glede na to biološko zelo dinamično. Njegova tvorba in razgradnja potekata v odvisnosti tako od okolja kot od celic samih. Poleg tega predstavlja tudi ustrezno bioinformacijsko okolje za rast in razvoj kostnih celic. 3D-porozni material mora zato imeti ustrezne mehanske, kemijske in biološke lastnosti, zaradi česar je iskanje primernih materialov in tehnologij zahtevno. Akrilni polimeri so se že izkazali kot zelo obetajoči, predvsem v izvedbi emulzij z visokim deležem notranje faze. Njihove prednosti so predvsem tehnološke, kar pomeni enostavno in prilagodljivo pripravo ter reproducibilnost, slabosti pa so predvsem biološke, med drugim neustrezno bioinformacijsko okolje, (neustrezna) biorazgradljivost in toksičnost monomerov.

ABSTRACT

KEY WORDS: polyHIPE materials, tissue engineering, bone substitute, bone tissue, 3D scaffolds, pre-clinical studies, regenerative medicine

Tissue engineering as a relatively new field of regenerative medicine has already gone through early developmental stages in a way that it already gives some clinical results. In essence, tissue engineering includes the use of a combination of cells, engineering, materials methods, and suitable biochemical and physio-chemical factors to improve or

¹ Dr. Matjaž Deželak, univ. dipl. biol., Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; matjaz.dezelak@um.si

² Izr. prof. dr. Aljoša Bavec, univ. dipl. biol., Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; aljosa.bavec@mf.uni-lj.si

³ Doc. dr. Miomir Knežević, univ. dipl. biol., Educell d. o. o., Letališka cesta 33, 1000 Ljubljana; miomir.knezevic@educell.si

replace biological functions. Because bone tissue provides the main mechanical and integrating support to the whole organism and because it also regenerates relatively slowly, it is of great importance to use appropriate inanimate materials during wound healing. The principal component of bone tissue is extracellular matrix which is mechanically both firm and flexible but still biologically dynamic structure that is synthesized and degraded as a result of extra- and intracellular signaling. Apart from that, it also represents a suitable bioinformational environment for bone cell growth and development. That is why it is necessary for a 3D scaffold to have proper mechanical, chemical, and biological characteristics. Acrylate polymers have already proved as a promising material for 3D scaffold engineering especially in the form of high internal phase emulsion. Their advantages are mainly technological, i.e. simple and adaptable production and reproducibility, but they lack some biological qualities such as suitable bioinformational environment, biodegradability, and monomere toxicity.

UVOD

Odpoved oziroma zmanjšano delovanje človeških tkiv in organov kot posledica fizioloških okvar ter mehanskih in drugih poškodb je eden izmed najbolj dragih in zapletenih izzivov zdravstvenega varstva (1). Razvite so bile različne kirurške strategije, med drugim uporaba povsem umetnih nadomestkov (protez), neživih procesiranih tkiv ter živih avto- oziroma alogenskih tkiv (2).

Kljub uspehom ima vsaka od uveljavljenih metod zdravljenja negativne plati (1):

- pomanjkanje primernih tkiv ali organov za presaditev,
- pogosto dosmrtna imunosupresija v primeru alogenske presaditve,
- nezadostna oziroma neustrezna funkcionalnost vsadkov in presadkov,
- njihova predhodna odpoved,
- okužbe s patogenimi mikrobi in
- druge.

Zaradi omenjenih problemov trenutnih načinov nadomeščanja izgubljenih funkcionalnosti tkiv ali organov se že nekaj časa v znanstvenem raziskovanju pozornost posveča predvsem matičnim celicam, tkivnemu inženirstvu (angl. *tissue engineering*, TE) in *de novo* organogenezi, in sicer ne samo kot novemu viru tkiv in organov za presaditev,

ampak tudi kot možnosti neposrednega zdravljenja poškodb ali bolezni (3).

Principi in tehnologije TE so trenutno še v fazi razvoja, čeprav v nekaterih primerih že dajejo klinične rezultate (1). Eden izmed večjih preskokov v razvoju je bil zamenjava procesiranega biološkega materiala s tridimenzionalnimi poroznimi materiali (3D-nosilci), v katere pred presaditvijo naselimo celice in jim s tem omogočimo organizirano tvorbo ciljnega tkiva (3). Ta članek obravnava izključno regeneracijo kostnega tkiva, zato se v nadaljevanju osredotoča predvsem nanj.

Pri iskanju novih terapevtskih strategij za poškodbe kostnega tkiva s pomočjo TE je potreben interdisciplinaren in večkomponenten pristop (4). Potrebno je medsebojno dopolnjevanje poglobljenega znanja določenih znanstvenih disciplin s področja biologije, kemije, medicine, ved o materialih in medicinskega inženirstva (slika 1). Le na tak način lahko korak za korakom dosežemo optimizacijo postopkov in pripomočkov (4).

KOSTNO TKIVO

Zgradba kostnega tkiva

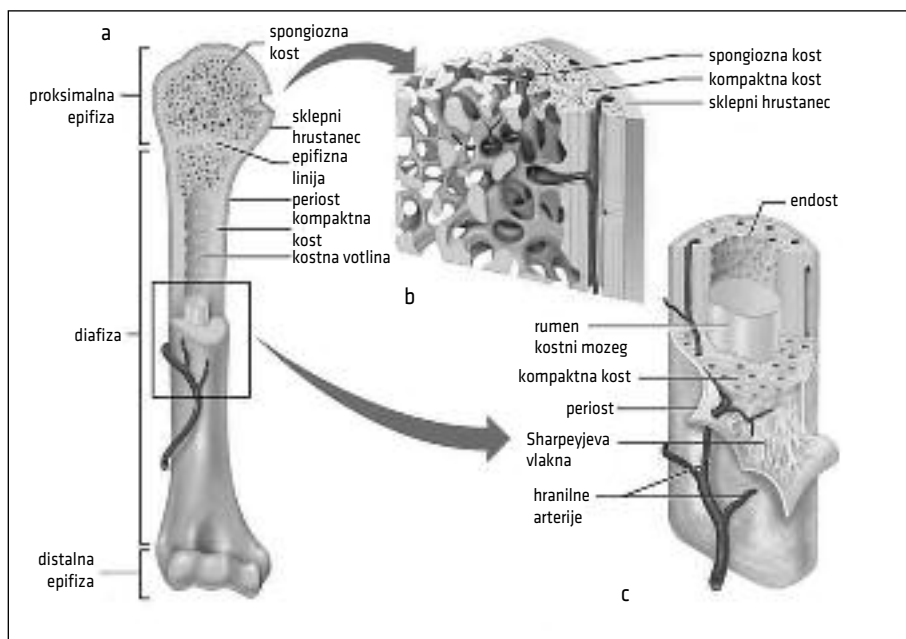
Podrobno razumevanje bioloških in biomehanskih značilnosti kosti je seveda ključnega pomena za uspešno TE. Kostno tkivo je

kompleksno, visoko organizirano in specializirano vezivno tkivo, ki je v primerjavi z mehкими tkivi fizično trdo, rigidno, se relativno dobro upira mehanskim poškodbam in je tudi delno prožno (5). Mikroskopska

slika razkrije manjši delež celic in obsežen medcelični matriks, ki ga sestavljajo pretežno kolagenska vlakna ter trdna, toga in mineralizirana anorganska snov, kalcijev hidroksiapatit $[(Ca)_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ (slika 2) (5).



Slika 1. Strategije regenerativne medicine temeljijo na dinamičnih in kompleksnih interakcijah različnih specialnosti in so potrebne, da ustvarimo uporabne umetne kostne nadomestke.



Slika 2. Shematska zgradba kostnega tkiva (6).

Osteoblasti se nahajajo na površini kostnega tkiva in so odgovorni za sintezo organskih sestavin zunajceličnega matriksa, njegovo organizacijo in končno mineralizacijo (7). Razvijejo se iz mezenhimskih prekursorjskih celic kostnega mozga, ki imajo sposobnost razvoja v celice maščobnega, hrustančnega in mišičnega tkiva (7). Glavni produkti zrelih osteoblastov so kolagen tipa I (90 % kostnih proteinov), osteokalcin, osteonektin, osteopontin, matriksni Gla-protein, fosforilirani glikoproteini (sialoproteini I in II), razni proteoglikani ter alkalna fosfataza (7).

Manjši delež osteoblastov ostane ujet v lakunah znotraj kostnega matriksa in te osteoblaste imenujemo osteociti (5). Verjetno opravljajo vlogo medcelične komunikacije, saj so njihova najopaznejša morfološka značilnost dolgi in tanki celični izrastki (filopodiji), ki se raztezajo po kanalih med lakunami (5). Med lakunami obstajajo še manjše povezave od kanalov filopodijev, kanalikuli, ki med krvnimi žilami in osteociti omogočajo izmenjavo hranil, plinov, odpadnih produktov in signalnih molekul (5). Pomembna naloga osteocitov je razgradnja kostnega matriksa. Pri tem se sprostijo kalcijevi ioni Ca^{2+} , ki so pomemben sekundarni obveščevalec pri uravnavanju notranjega celičnega ravnovesja (8). Lakune so razporejene radialno okrog Haversianovega kanala, v katerem se nahajajo žile (5).

Osteoklasti so polarizirane celice z valovitim, nagubanim delom celične površine, pod katerim znotraj celice ni organelov (angl. *clear zone*), na zunanji površini tega področja pa so izraženi receptorji iz skupine integrinov, ki omogočajo stik s površino kostnega tkiva (9). Na mestu tega stika poteka regulirana, od sekrecije lizosomskih encimov in lokalnega kislega okolja odvisna resorpcija kostnega matriksa, začevši z demineralizacijo, ki ji sledi razgradnja organskega matriksa (10). Sinteza encimov in njihovo sproščanje iz celice (izključno na nagubanem predelu celice) sodita v običajno aktivnost osteoklastov. Najbolj tipični osteoklastni encimi so na tartrat (sol vinske kisline) odporni izoenzimi kisle fosfataze (služi kot označevalec osteoklastnega fenotipa) in cisteinske proteinaze, ki razgrajujejo kolagen (11). Osteoklasti ontogenetsko izvirajo iz hematopoetskih celic, podobno kot makrofagi.

Zunajcelični matriks kostnega tkiva

Zunajcelični matriks (angl. *extracellular matrix*, ECM) igra pomembno vlogo pri funkciji rastnih dejavnikov (12). Ta kooperativen proces se kaže kot konvergenca znotrajceličnih signalnih poti, ki jih sprožijo tako proteini zunajceličnega matriksa kot rastni dejavniki iz ostalih predelov telesa. Takšno vzajemno delovanje je še posebej pomembno pri regeneraciji poš-

Tabela 1. Proteini, ki sestavljajo kostno tkivo.

| Tip proteina | Ime | Funkcija |
|-----------------------|-----------------------|---|
| Kolagen | kolagen tipa I | natezna trdnost |
| | kolagen tipa V | natezna trdnost |
| Nekolagenski proteini | osteokalcin | mineralizacija |
| | osteopontin | mineralizacija, adhezija celic |
| | kostni sialoprotein-2 | mineralizacija |
| | osteonektin | adhezija celic, mineralizacija |
| | fibronektin | adhezija, diferenciacija in migracija celic |

kodovanih tkiv (13). Poleg ogrodja za nala-ganje mineralov kalcijevega hidroksiapati-ta služi ECM tudi za adhezijo celic in vpliva na njihovo diferenciacijo, saj celice zazna-vajo njegovo obliko in strukturo (13).

Kostno tkivo sestavlja več različnih pro-teinov (tabela 1). Kolagen tipa I je pogla-vitna sestavina mineraliziranega kostnega matriksa. Predstavlja 90–95 % organskega materiala in je osnova za začetek anorgan-ske mineralizacije, v manjših količinah pa je prisoten tudi kolagen tipa V (14).

Prisotnih je tudi več nekolagenskih proteinov, ki imajo različne regulatorne in organizacijske vloge. Izražanje osteokalci-na je omejeno na osteoblaste in predstavlja približno 15% nekolagenskih proteinov. Osteokalcin je drugi najpogostejši protein v kostnem matriksu, njegova karakteristi-ka pa so trije glutamatni ostanki, ki so mesto od vitamina K odvisne karboksilacije, nastali γ -karboksilglutamati pa omogočajo visokoafinitetno vezavo minerala hidroksiapa-tita (15–17).

Osteopontin je glikozilirani fosfopro-tein in je običajna sestavina mineralizira-nih tkivnih struktur (18). Odgovoren je za adhezijo celic preko Arg-Gly-Asp (RGD) motiva aminokislinskih ostankov, ki ga prepoznajo in vežejo integrini v plazmale-mi kostnih celic (18). Lahko je močno gliko-zilirani, poleg tega pa je bogat z aspartatom. Prav ta kislina narava mu najverjetneje omo-goča uravnavanje rasti kalcijevih krista-lov (19). Sintetizirajo ga osteoblasti in lahko obstaja v več strukturnih oblikah, kar je odvisno od načina in stopnje posttransla-cijskih modifikacij (20).

Kostni sialoprotein-2 (angl. *bone sialo-protein 2*, BSP-2) včasih imenujemo tudi integrin vezavni protein, kar nakazuje na njegovo vlogo pri adheziji celic, poleg tega pa sodeluje pri mineralizaciji (21). Je močno glikozilirani, kislo naravo z izoelektrično točko pri pH 3,9 pa mu daje relativno velik delež sialične kisline (21). Eksperimen-ti so pokazali, da lahko pride do medseboj-

nega vplivanja med BSP in kolagenom, hidroksiapatitom, matriksno metalopro-teinazo-2 in faktorjem H (22–25). Kolagen veže ne samo iz kosti ekstrahirani, ampak tudi rekombinanti BSP, in sicer z evolu-cijsko ohranjeno N-terminalno regijo (ami-nokislinski ostanki 19–46) (21, 22). Slednja vsebuje pretežno hidrofobne aminokislina brez fosforilacij in glikozilacij, možne pa so tirozinske sulfatacije, vendar posttransla-cijske modifikacije niso udeležene pri veza-vi kolagena (21, 22). Zelo pomembno je C-terminalno integrin prepoznavno področ-je RGD, ki dokazano vpliva na celično sig-nalizacijo in posledično diferenciacijo osteoblastov (26).

Osteonektin ali SPARC (angl. *secreted protein, acidic and rich in cysteine*) je kalcij vezavni glikoprotein z visoko afiniteto do hidroksiapatita, tudi v prisotnosti denaturantov, kot sta urea in gvanidin (27). Poleg tega močno veže kolagen tipa I, kar posledično vodi do *in vitro* mineralizacije kola-gena tudi v odsotnosti kostnih celic (27). Ravno zaradi te lastnosti je osteonektin že bil preizkušen pri razvoju naprednih nano-kompozitov za regeneracijo skeletnih tkiv (28).

Tudi fibronektin ima značilno integrin prepoznavno področje RGD in pomembno vpliva na adhezijo, rast, diferenciacijo in migracijo celic (29). Sodeluje v začetnih fazah osteogeneze, domnevno zaradi spo-sobnosti nukleacije hidroksiapatitnih kri-stalov (30). Zanj so značilne različne konformacijske oblike, ki so odvisne od nje-govega okolja. Tako je pri vezavi fibronek-tina na hidroksiapatit molekularna oblika in s tem njegova aktivnost odvisna od elek-tričnega naboja in kemijskih lastnosti površine (31).

Pristop mimikrije zunajceličnega matriksa

Kostne celice bodo tvorile ECM, analogen nativnemu, le, če bodo v ustreznem okolju, zato je treba pripraviti 3D-nosilce s struk-

turo, sestavo in fizikalno-kemijskimi lastnostmi, čim bližjimi naravnemu zunajceličnemu matriksu kosti (32). Splošen pristop bi torej zajemal osnovno ogrodje iz biorazgradljive organske snovi z ustreznimi mehanskimi lastnostmi in veliko poroznostjo. Potreben bi bil tudi dodatek optimalnih količin kolagena (oziroma kolagenomimetika) in anorganskih kristalov hidroksiapatita. Upoštevatni je treba tudi ostale proteine, opisane v tem poglavju, ki so ključni za uspešno adhezijo, migracijo, proliferacijo in diferenciacijo kostnih celic.

TKIVNO INŽENIRSTVO KOSTNIH NADOMESTKOV NA OSNOVI TRIDIMENZIONALNIH NOSILCEV

Tako kot pri TE ostalih tkiv, moramo biti tudi pri pripravi kostnih nadomestkov pozorni na tri področja oziroma sestavine, in sicer (5):

- *in vitro* pripravo viabilnih in vitalnih celic ciljnega tkiva,
- pripravo ustreznih 3D-nosilcev in
- identifikacijo ter pripravo osteoinduktivnih rastnih dejavnikov oziroma njihovih sintetičnih kemijskih nadomestkov.

Da dosežemo čim večjo uspešnost in učinkovitost, mora biti celotno načrtovanje posameznih sestavin že od samega začetka skladno s končnimi lastnostmi vseh ostalih sestavin, ravno zato je podrobno poznavanje biokemijsko-fizikalnih lastnosti kostnega tkiva in lastnosti uporabljenih materialov tako pomembno.

Kostne celice

V dosedanjih raziskavah so za namene TE že raziskovali osteoregenerativno sposobnost mezenhimskih matičnih celic (angl. *mesenchymal stem cell*, MSC), stromalnih celic kostnega mozga, periostealnih celic in osteoblastov (33–36). Izbira celic je odvisna predvsem od tega, na kateri razvojni stopnji kostnega tkiva želimo začeti zdravljenje. Skladno s tem izberemo tiste

celice, ki jih je najlažje pridobiti in namnožiti *in vitro*, saj je za izvedbo posega potrebna relativno velika količina celic (4).

V praktične namene so se kot zelo uporabne izkazale odrasle MSC, saj jih z lahkoto izoliramo iz različnih tkiv, predvsem iz kostnega mozga, pa tudi iz maščobnega in mišičnega tkiva ter iz periferne krvi (37–41). Imajo sposobnost razvoja v hondrogeno, adipogeno ali osteogeno linijo, pri čemer za razvoj v osteogeno zadostuje dodatek deksametazona, askorbinske kisline in β -glicerolfosfata v gojišče celic (33). Delež MSC je v samem kostnem mozgu sicer zelo majhen (0,003–0,015%), a jih je možno razmnoževati daljše obdobje, ne da bi izgubile zmožnost diferenciacije (33, 38). Pri večkratnih ponovitvah podvojitve celic sicer lahko pride do s starostjo povezane zaustavitve celičnega cikla, ki je povezana predvsem s skrajševanjem dolžine telomer po vsaki celični delitvi (42). Ta problem je možno rešiti z genskim inženirstvom, in sicer z ektopičnim izražanjem človeške telomerne reverzne transkriptaze (angl. *human telomerase reverse transcriptase*, hTERT), s čimer preprečimo krajšanje telomer in občutno podaljšamo življenjsko dobo celic (43).

Pri samem gojenju je treba popolnoma in v celoti izključiti kakršne koli potencialno toksične, imunogene ali kako drugače škodljive snovi. Na tem mestu naj izpostavimo rutinsko uporabo govejega fetalnega seruma (angl. *fetal bovine serum*, FBS) pri *in vitro* proliferaciji. Enake zahteve za odobritev kliničnih študij postavlja tudi ameriški vladni urad za prehrano in zdravila (FDA) (4, 44). Verjetnost prenosa patogenih mikrobov in prionov je zelo nizka, imunski odziv zaradi ksenogenih proteinov pa prav tako ni zelo verjeten, vendar tveganje za razvoj zapletov še vedno obstaja, zato bodo za klinično uporabo primerne samo celice, gojene brez prisotnosti živalskih proteinov, ali še bolje, v definiranih sintetičnih gojiščih (45, 46).

MSC so primerne za razvoj optimalnih tehnoloških postopkov pri pridobivanju potrebnih količin celic ustrezne kvalitete za TE kostnih nadomestkov. Neprecenljiva je tudi možnost individualnega pristopa pri zdravljenju, saj je priprava avtolognih celic enostavna, s tem pa se izognemo predvsem nevarnostim okužbe ali zavrnitvi kostnega nadomestka.

Tridimenzionalni porozni materiali

Ustrezni 3D-porozni materiali morajo biti v prvi vrsti biološko združljivi, neimunogeni, optimalno porozni in tehnološko ponovljivi (47). Pomembne lastnosti so tudi ustrezna trdnost in prožnost, čas biološke razgradljivosti (ustrezna sinhroniziranost med rastjo novega tkiva in sprotnim razpadom 3D-nosilca) ter bioesorpcija (4). Tudi elastičnost in rigidnost, ki sta povsem fizikalni lastnosti, imata vpliv na smer diferenciacije zarodnih celic (48).

Kot že omenjeno, morajo 3D-nosilci oponašati zunajcelični matriks, saj ta posreduje kemijske in fizikalne signale celicam, signaliziranje pa poteka v obeh smereh (47). Celice zaznavajo in organizirajo ECM preko integrinov, ki v odvisnosti od okolja sprožijo v celici signalne poti, ki vplivajo na migracijo, morfogenezo in homeostazo, v redkih primerih pa lahko pride tudi do tumorogeneze (47). Cukierman s sodelavci je glede na različne morfologije in molekularne označevalce predlagal štiri tipe povezav med celicami in ECM, pri čemer je vsaka prejšnja osnova za razvoj naslednje (49):

- fokalni kompleks (približno 1 μm velike točkaste adhezivne strukture na osnovi integrina),
- fokalna adhezija (močne povezave na osnovi aktina, najpogostejše in najočitnejše *in vitro* povezave kostnih celic z ECM),
- fibrilarna adhezija (centripetalna premestitev integrinov $\alpha_5\beta_1$, ki omogočajo fibrilogenezo fibronektina v odvisnosti od mehanske napetosti) in

- 3D-adhezija (prostorsko omrežje fibronektina s svojstvenima sestavo in fosforilacijskim vzorcem).

Sestavine ECM lahko vmešamo v samo zmes za pripravo 3D-nosilca, lahko jih naknadno kovalentno vežemo na 3D-nosilec ali pa nosilec impregniramo z njimi (nekovalentna vezava) (47). Za enakomerno porazdelitev celic sama porozna struktura 3D-nosilca ni dovolj, ključnega pomena je način inokulacije celic (47). Eden od načinov je umešanje celic med ostale sestavine med pripravo 3D-nosilca (47). Takšno zmes lahko vbrizgamo na mesto poškodbe, polimerizacija oziroma gelatinizacija 3D-nosilca pa poteče *in situ*, vendar se zaradi nevarnosti poškodb celic ne zdi obetajoča. Primernejši način je rotacijska naprava, ki s pomočjo vakuuma hitro in enakomerno porazdeli celice (50).

Ključnega pomena za to, da se iz posameznih celic razvije tkivo, je vsekakor zagotavljanje zadostnega in konstantnega dotoka hranil in kisika ter odtoka odpadnih snovi in ogljikovega dioksida (4). V *in vivo* pogojih zadostujejo difuzijski procesi, saj je razdalja med celicami in krvnimi kapilarami med 20 in 200 μm (51). Pri gojenju celičnih kultur v petrijevih posodah pa ti procesi ne zadostujejo in globlje ležeče celice hitro odmrejo zaradi omejene difuzije (52). Uporaba bioreaktorjev z dinamično perfuzijo problem v večji meri reši, vendar ga ne odpravi povsem, saj je ta pristop omejen s hitrostjo pretoka hranilne raztopine, ki še ne odplavi celic iz 3D-nosilca (52). Rešitev je v pripravi čim bolj mikroporozne strukture 3D-nosilca, pa tudi v pripravi 3D-nosilcev z notranjo površino, ki je visoko higroskopna, s čimer bi povečali kapilarni učinek in s tem dosegli enakomernjšo porazdelitev hranilnega medija.

Kot osnovno sestavino ECM so že raziskovali razne biološke molekule (kolagen, hialuronska kislina, laminin in druge), vendar se zaradi težavnega pridobivanja,

shranjevanja in ravnanja z njimi niso izkazali kot tehnološko in cenovno primerni za komercialno proizvodnjo (47). Sintetični organski polimeri pa so po drugi strani poceni, priprava je enostavna, prilagodljiva in ponovljiva.

Osteoinduktivni rastni dejavniki

Osteoinduktivni rastni dejavniki (angl. *osteoinductive growth factors*, OGF) v splošnem predstavljajo skupino proteinov, ki uravnavajo delovanje celic specifičnega tkiva (4). Nekatere od teh je prvi odkril Marshall Urist leta 1965 (53). Glavne skupine teh dejavnikov so transformirajoči rastni dejavnik β (angl. *transforming growth factor β* , TGF- β), inzulinu podobni rastni dejavnik (angl. *insulin-like growth factor*, IGF), iz trombocita izvirajoči rastni dejavnik (angl. *platelet-derived growth factor*, PDGF), bazični fibroblastni rastni dejavnik (angl. *basic fibroblast growth factor*, bFGF) in kostni morfogenetski proteini (angl. *bone morphogenetic proteins*, BMPs). V biološko aktivni obliki jih izločajo predvsem osteoklasti in delujejo stimulatorno tako na ostale kostne celice kot tudi na endotelne in žilne celice, s čimer se izboljšeno tkivo regenerira (4).

V praksi lahko uporabljamo dva enakovredna pristopa, vključitev bioaktivnih rekombinantnih OGF oziroma njihovih analogov v 3D-nosilec ali pa s pomočjo tehnologije rekombinantne DNA kostne celice spremenimo tako, da čezmerno izražajo OGF (4). Slednje lahko dosežemo že z običajnimi metodami genskega inženirstva (54, 55). Možnost njihove uporabe nedvomno obstaja, vendar je zaradi kompleksnega (so)učinkovanja različnih OGF in njihove še ne povsem razumljene fiziologije omejena (4). Bolj kot za terapijo bodo ti pristopi ključni pri raziskovalnem delu.

MATERIALI POLIHIPE **Splošne značilnosti**

Emulzije so mešanice vsaj dveh tekočin, ki se med sabo ne mešata, pri čemer je vsaj

ena tekočina (notranja ali diskontinuirna faza) dispergirana v eni izmed ostalih (zunanja ali kontinuirna faza) (56). Emulzije, ki imajo volumski delež notranje faze večji od 74,05 % (največji možni delež prostornine, ki ga lahko zavzamejo pravilno oblikovane enako velike kroglice, razporejene na najbolj učinkovit način), imenujemo poliHIPE (angl. *polymerised high internal phase emulsions*). Izraz poliHIPE je prvi definiral Lissant leta 1966 (57). Glede na to, da lahko pripravimo poliHIPE z deležem notranje faze do 99 %, je le-ta ali iz različno velikih kroglic ali pa iz geometrijskih struktur, imenovanih poliedri (58). Glede na naravo notranje in zunanje faze ločimo štiri tipe:

- voda v olju,
- olje v vodi,
- olje v olju, kjer uporabimo dve nepolarni topili, ki se v danih pogojih ne mešata, in
- ogljikov dioksid v vodi, kjer notranjo fazo predstavlja superkritični CO₂ (58).

Komercialno je najbolj zanimiv tip voda v olju, saj je pri tipu olje v vodi potrebnega veliko organskega porogena (snov, ki vpliva na velikost kroglic notranje faze), pri tipu ogljikov dioksid v vodi pa so uporabljeni fluorirani surfaktanti dragi in biološko nerazgradljivi, potrebna pa je tudi draga specialna oprema (59).

Priprava poliHIPE je relativno enostavna (58). Za pripravo tipa voda v olju zmešamo enega ali več monomerov, navadno tudi prečni povezovalc, začetnik polimerizacije in primeren surfaktant, medtem ko raztopino notranje faze dodajamo počasi med mešanjem. Nastalo emulzijo toplotno obdelamo, da zunanja faza polimerizira, notranjo speremo oziroma odstranimo s Soxhletovim ekstraktorjem ter posušimo (58). Tako dobimo trden porozen material, analogen peni. Morfološko ločimo tri vrste por, ki se med sabo ločijo po načinu nastanka:

- »vrzeli« nastanejo na mestu, kjer so v emulziji (pred toplotno obdelavo) bile kroglice oziroma poliedri notranje faze,

- »okna« so pore med sosednjima vrzelma in
- »pore«, ki so znatno manjše od vrzeli in oken, prisotne pa so znotraj kontinuirane faze (58).

Nastalo polimerno porozno strukturo lahko dalje kemijsko spreminjamo, če uporabimo monomere z reaktivnimi funkcionalnimi skupinami (58).

PoliHIPE-materiali so se izkazali kot uporabni pri pripravi hrane in kozmetike, kot kromatografski nosilci, za sintezo na trdni podlagi, imobilizacijo encimov in shranjevanje vodika ter kot 3D-nosilci za rast bioloških celic (58, 60).

Značilnosti, pomembne za tkivno inženirstvo kostnih nadomestkov, in dejavniki, ki vplivajo na njih

Velikost vrzeli se običajno giblje med 1 in več 100 μm , znani pa so tudi primeri z velikostmi pod 1 μm pa vse do 1 mm (58, 61). V splošnem vsakršno povečanje stabilnosti emulzije povzroči tvorbo manjših kroglic v emulziji in s tem tvorbo manjših vrzeli (62). Velikost oken je odvisna od deleža notranje faze (večji kot je njen volumen, bolj deformirane so kroglice) in od koncentracije surfaktanta, saj s povečanjem deleža surfaktanta stanjšamo plast monomernega filma med sosednjimi kroglicami (63). Odprtost strukture poliHIPE, ki je definirana kot razmerje premerov oken in vrzeli, povečamo z dodajanjem organskih spojin, ki so topne v obeh fazah, saj se s tem poveča difuzija vodnih molekul med kroglicami, z njo pa Ostwaldov efekt (64). Okna nastanejo zaradi krčenja zunanje faze med polimerizacijo, ko vmesna plast med sosednjima kroglicama izgine (58).

Dejavniki, ki povečajo stabilnost emulzije, so:

- povečanje polarnosti vodne faze,
- povečanje hidrofobnosti oljne faze,
- povečanje deleža surfaktanta,

- zvišanje hidrofilno-lipofilnega ravnotežja (angl. *hydrophile-lipophile balance*, HLB) surfaktanta in
- nižja temperatura notranje faze.

Relativno velik vpliv imata vrsta in količina surfaktanta, ki zmanjšuje površinsko napetost med obema fazama. Med sabo jih ločimo po HLB-vrednosti, ki je definirana kot dvajsetkratnik razmerja molske mase hidrofilnega dela molekule in molske mase celotne molekule in po tej definiciji lahko zavzame vrednosti od 0 do 20. Če uporabimo več različnih surfaktantov, je skupna vrednost HLB vsota zmnožkov vrednosti HLB posameznega surfaktanta in njegovega deleža v mešanici surfaktantov (60). Empirično je bilo ugotovljeno, da uporaba kombinacije surfaktantov, še posebej iz različnih skupin detergentov (neionski, kationski, anionski), učinkoviteje zmanjša površinsko napetost kot en sam (65). Namesto detergentov so v vlogi surfaktanta uporabni tudi delci nano- in mikrometrске velikosti, na primer ogljikove cevke, titan in silicij, s čimer dobimo tako imenovane Pickerjeve emulzije (59). Komercialno njihova uporaba ni zanimiva, saj so relativno dragi, vprašljiva pa je tudi njihova biokompatibilnost.

Povečevanje deleža prečnega povezovalca praviloma poveča specifično površino poliHIPE, merjeno v m^2/g (66). V primeru, da delež osnovnega monomera pade pod 10 %, pride pri zamreževanju do nehomogenosti in s tem do nastanka področij z manj mikroporami (67).

Odvisno od namena uporabe poliHIPE materiala želimo doseči ustrezno razmerje med trdnostjo in prožnostjo. Elastičnost povečamo z dodajanjem hidrofobnih monomerov, ki znižajo temperaturo steklastega prehoda (68).

Kemijske lastnosti notranje površine nimajo posebnih skupnih značilnosti. Odvisne so od kemijskih reagentov, ki jih uporabljamo, natančneje, od stranskih funkcionalnih skupin polimernega omrežja.

AKRILATNI MATERIALI poliHIPE KOT KOSTNI NADOMESTKI

Do sedaj je bilo opisanih relativno malo primerov uporabe poliHIPE-monolitov v TE, vendar imajo kar nekaj lastnosti, zaradi katerih bi jih lahko uporabili pri izdelavi kostnih nadomestkov (69). Obstaja kar nekaj monomerov, izpeljanih iz akrilne kisline, ki lahko tvorijo širok spekter polimerov, na primer metil akrilat, etil akrilat, n-butyl akrilat, s-butyl akrilat, i-butyl akrilat, t-butyl akrilat, 2-etilheksil akrilat in drugih, ki so dobra osnova za pripravo kostnih nadomestkov (slika 3).

Prednosti

Poliakrilati so biokompatibilni polimeri, ki se že uporabljajo v biomedicinski tehnologiji (70). Priprava akrilatnih poliHIPE je relativno enostavna, njihovo fizikalno in kemijsko strukturo pa je moč prilagajati širokemu spektru potreb s kontroliranjem vrste sestavin in njihovega deleža ter pogoji sinteze. Tako lahko dosežemo ustrezne mehanske lastnosti, poroznost in prepustnost, biokompatibilnost ter pritrditev in proliferacijo celic (71). Pomembna lastnost uporabnega 3D-nosilca je tudi ponovljivost in homogenost strukture, saj lahko že majhne razlike med 3D-nosilci vodijo v neenačkoren razvoj novega tkiva (59).

Slabosti

Poliakrilati sami so za človeški metabolizem zelo slabo razgradljivi, včasih celo popolnoma nerazgradljivi, zato je pri njihovi sintezi treba uporabiti kombinacijo različnih akri-

latnih monomerov, da povečamo razgradljivost *in vivo* (59). Celice imajo določeno sposobnost adhezije in proliferacije, vendar so potrebni dodatni vključki, da se njuna učinkovitost še poveča. Poleg tega poliakrilatni monomeri ne predstavljajo ustreznega okolja za diferenciacijo in aktivnost kostnih celic, zato so potrebni razni dodatki, na primer osteoinduktivni dejavniki.

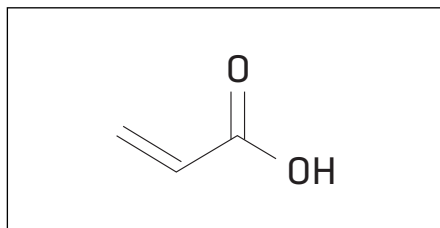
Predlagane izboljšave

Prožnost in rigidnost

Ustrezno razmerje med prožnostjo in rigidnostjo dosežemo z dodajanjem hidrofobnih monomerov, ki znižajo temperaturo steklastega prehoda, na primer z 2-etilheksil akrilat (EHA) in n-butyl akrilat (nBA), vendar z dodatki ne smemo pretiravati, saj hidrofobni monomeri hkrati povečajo stabilnost emulzije, kar vodi v vrzeli manjšega premera, kar pa zmanjšuje proliferacijo celic (62, 68). Prevelika prožnost 3D-nosilca ima lahko tudi negativne posledice na diferenciacijo, saj mehkejši matriks favorizira diferenciacijo MSC v hondrogeno in adipogeno linijo (48). Pri izbiri polarnih oziroma hidrofobnih monomerov moramo biti še posebej pozorni v primeru, ko akrilatne monomere kombiniramo z neakrilatnimi.

Poroznost in odprtost

Zadostna poroznost in odprtost sta nujni za uspešno in učinkovito migracijo in proliferacijo celic. Teoretično morajo biti okna vsaj malo večja od celic, tj. velikosti 40–50 μm , kakršna je tudi povprečna širina Haversovega kanala, vendar se je v praksi izkazalo, da morajo biti odprtine velike več 100 μm oz. blizu 1 mm (5, 71). Odprtost 3D-nosilca povečamo z dodatkom spojin, ki so topne v obeh fazah, kot so polietilenglikol, tetrahydrofuran ali metanol (64). Na povečanje poroznosti vpliva poleg že naštetih dejavnikov tudi način dodajanja notranje faze, tako v primeru kontroliranega dodajanja z brizgalno črpalko dosežemo širši spekter premera vrzeli kot s kapljičnim dodajanjem (72).



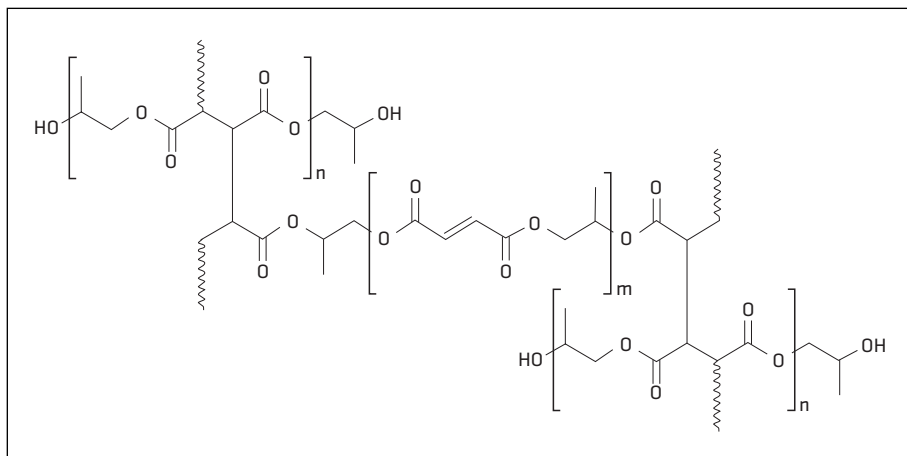
Slika 3. Akrilna ali propenojska kislina (monomer).

Biorazgradljivost

Priprava biorazgradljivih poliHIPE ni enostavna, saj prisotnost tako vodne kot organske faze omejuje nabor polimerizacijskih reakcij, hkrati pa je ravno popolna biorazgradljivost ključnega pomena pri načrtovanju *in situ* regeneracije kostnega tkiva s pomočjo 3D-nosilcev (71). Kot relativno uspešne so se že izkazale metode z uporabo razgradljivih oligomerov (73, 74). Nasprotno pa so se polimeri na osnovi izključno bioloških monomerov (poliglikolna kislina, polimlečna kislina in poli- ϵ -kaprolakton (PKL)) izkazali za zelo nestabilne, bodisi zaradi nizke temperature tališča bodisi zaradi hidrolitično nestabilne glavne verige, pri čemer še sami degradacijski produkti polimera delujejo avtokatalitično (71). Zato je smiselna kombinacija dveh monomerov, enega sintetičnega, ki bi dal 3D-strukturi trdnost, in enega biološkega, ki bi zagotavljal biorazgradljivost. Poskusi so že bili narejeni s kombinacijo EHA oziroma tBA in PKL, vendar rezultati niso preveč vzpodbudni (71). PoliHIPE na osnovi EHA ni strukturno stabilen, poleg tega pa ima zelo nehomogeno morfologijo in se zelo hitro razgradi (73). PoliHIPE na osnovi tBA in

dodanim PKL je sicer strukturno obstojnejši, vendar zaradi hidrolize t-butilne skupine pride do razpadanja strukture še pred razgradnjo (71).

Veliko bolj kot PKL je zanimiv propilen fumarat (PF) kot monomer za sintezo poliHIPE. PF se razgradi do dveh neškodljivih produktov, fumarata in propilen glikola (75). Prva spojina je telesu lastna, propilen glikol pa se metabolizira do piruvata, acetata, laktata in deloma do sicer škodljivega propionaldehida. Vendar so za zastrupitev potrebne izjemno velike doze propilen glikola (> 1 g/L v plazmi) (76). Zamreženi polimeri lahko nastanejo samo z uporabo PF, lahko pa uporabimo tudi ostale prečne povezovalce, kot so N-vinil pirolidinon, poli(etilen glikol)-di-metakrilat, poli(propilen fumarat)-diakrilat in dietil fumarat (77–80). Takšne mešanice (ob uporabi ustreznega začetnika) se lahko vbrizgajo in polimerizirajo *in situ*, so biokompatibilne, biorazgradljive in raziskave v biomedicinski namene na njih že potekajo (75). Sinteza pPF (poli(propilen fumarat)) je že znana, ni pa še konkretnih raziskav pri izdelavi poliHIPE-materialov (75). Vendar vsaj pri polimerih tipa poli(propilen fumarat)/poli(propilen fumarat)-diakrilat



Slika 4. Poli(propilen fumarat) (pPF) polimer, prečno povezan s pPF-diakrilatom. Monomerni ostanek v oglatem oklepaju se lahko poljubno ponovi n -krat oziroma m -krat. V praksi običajno velja, da je število n mnogo večje od števila m . (79)

(pPF/pPF-diakrilat) obstaja bolj majhna možnost njihove uporabe, čeprav so mehanske lastnosti obetajoče, so ti polimeri zelo šibko higroskopni (79), kar bi omejevalo impregnacijo monolita v začetnih fazah *in vitro* razvoja tkiva (slika 4).

Kemijske in biokemijske spremembe poliHIPE

Dodatek hidroksiapatita k poliHIPE nedvomno izboljša pritrnitev in proliferacijo celic (61). Dodatek sintetičnega peptida Glu₇-Pro-Arg-Gly-Asp-Thr, ki vsebuje dve funkcionalni peptidni skupini iz BSP-2 (poli-Glu, ki omogoča vezavo na hidroksiapatit, in Arg-Gly-Asp, ki omogoča vezavo na celično površino vseh kostnih celic), bi pritrnitev, migracijo in diferenciacijo celic še dodatno izboljšal (81). Za pravilno organizacijo nastajajočega tkiva izberemo pravilno razmerje posameznih sestavin OGF, ki jih dodajamo ob pravem času.

Uvajanje kemijskih skupin, ki jih na poliHIPE vežemo kovalentno, je bolj obstojno in bolj kontrolirano, vendar se s tem spremenijo fizikalno-kemijske lastnosti tako 3D-nosilca kot vezanih (makro)molekul, slednje še posebej velja za proteine z biološko aktivnostjo. V tem pogledu je primernejša nekovalentna vezava kemijskih skupin na poliHIPE s postopkom impregnacije.

KOMERCIALNA PROIZVODNJA AKRILATNIH poliHIPE MATERIALOV

Izdelavo samih poliHIPE-monolitov bi prevzela obstoječa podjetja, ki se ukvarjajo s proizvodnjo polimerov, gospodarsko zanimiva pa je tudi ustanovitev novih visoko tehnoloških »*spin-off*« podjetij. Inženirski cilj je pripraviti 3D-nosilce po merah in potrebah vsakega bolnika posebej (4). Nove procesne tehnologije hitre izdelave prototipov že omogočajo pripravo 3D-nosilcev na osnovi bolnikovih kliničnih rezultatov in rezultatov CT (86, 87).

PREDKLINIČNE IN VIVO ŠTUDIJE NA ŽIVALIH

Prejšnja poglavja na široko obravnavajo TE kostnih nadomestkov ter poglobljeno predstavljajo zmožnost akrilatnih poliHIPE-materialov na osnovi *in vitro* raziskav. Živalski *in vivo* modeli predstavljajo vmesno stopnjo med *in vitro* in kliničnimi študijami (4). Uporabili so že živali različnih velikosti, od miši in podgane pa do psa, ovce, koze in svine (88). Ne glede na izbiro vrste živali delimo *in vivo* študije na živalih na ektopične (izven mesta poškodbe) in ortotopične (na mestu poškodbe) (4). Razlika med pristopoma je, da pri prvem dobimo pomembne podatke, ki se nanašajo na biokompatibilnost in osteoinduktivnost 3D-nosilca, pri čemer pa ne dobimo nobene informacije o biomehanski ustreznosti nadomestka, ocenitev slednje nam omogoča prav ortotopičen pristop (4).

Z *in vivo* študijami ugotavljamo tudi angiogenetsko sposobnost kostnega nadomestka. Razvoj funkcionalnega žilnega omrežja ni pomemben samo za transport hranil in celičnih metabolitov, ampak tudi za uspešno integracijo kostnega nadomestka v nastajajoče kostno tkivo (če je ta predvidena) ali odtok razgradnih produktov resorpcije 3D-nosilca (če popolna vključitev 3D-nosilca v kostno tkivo ni predvidena) (4). Od oblike kostnega nadomestka je odvisen način zagotavljanja zadostne vaskularizacije nastajajočega tkiva:

- če je razmerje površine proti prostornini relativno veliko, zadostuje z angiogenetskimi rastnimi dejavniki stimulirana rast krvnih žil iz okoliškega zdravega tkiva v kostni nadomestek,
- če pa je omenjeno razmerje majhno, je potrebna uporaba mikrokirurških tehnik za razvoj žilnega omrežja (4, 89).

Pozitiven učinek BMPs v tkivnem inženirstvu je že bil dokazan v predkliničnih *in vivo* študijah (90). Izboljšano regeneracijo kostnega tkiva so pokazale tako celice s čezmernim

izražanjem BMPs kot tudi neposredna per-kutana aplikacija adenovirusnega vektorja z zapisom za BMPs ali kompleksa BMP-prenašalec (91–94). Nadaljnje izboljšanje dosežemo s hkratno uporabo angioinduktivnih rastnih dejavnikov, kot je že bilo dokazano za žilni endotelijski rastni dejavnik (angl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) (94).

KLINIČNE ŠTUDIJE

Klinične študije z uporabo akrilatnih poliHIPE 3D-nosilcev kot kostnih nadomestkov za zdaj še niso bile opravljene. Razlog leži v tem, da se je raziskovanje akrilatnih poliHIPE-materialov začelo šele pred približno desetimi leti in da so bili začetni napori vloženi predvsem v fizikalno-kemijsko izopolnjevanje materialov. Skladno s tem je tudi naš pregled usmerjen predvsem v opis lastnosti akrilatnih poliHIPE-materialov ter predstavitev njihovega potenciala v TE kostnih nadomestkov. Glede na do sedaj zbrane podatke si upamo trditi, da se bodo akrilatni poliHIPE-materiali izkazali kot ustrezni 3D-nosilci za regeneracijo kostnega tkiva, na konkretne rezultate kliničnih študij pa bo treba še počakati.

ZAKLJUČEK

V prejšnjih poglavjih smo podrobno, na osnovi dosedanjih raziskav, razpravljali o TE

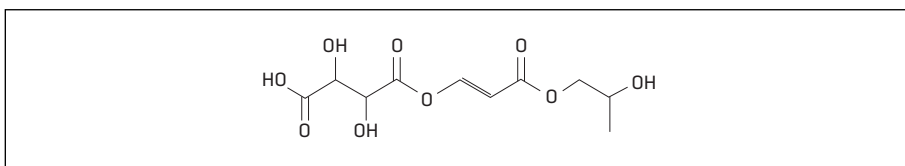
kostnih nadomestkov, s poudarkom na uporabnosti akrilatnih materialov poliHIPE pri iskanju novih rešitev.

Vsi do sedaj naštetih pristopi pri uporabi akrilnih materialov poliHIPE v TE kostnih nadomestkov so sicer daleč od popolnosti, vendar so že v fazi raziskovanja. Na osnovi zbranih podatkov iz literature in naše kritične presoje predlagamo predlog povsem novega materiala poliHIPE.

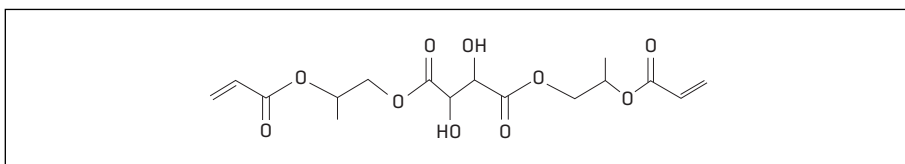
Polimer propilenglikol akrilotartarna kislina

Predlagamo izdelavo povsem novega poliHIPE-materiala s polimerizacijo tako imenovane propilenglikol akrilovinske kisline (PGAT) (sestavljene iz vinske kisline, akrilne kisline in propilen glikola) (slika 5), prečno povezane z dipropilen tartrat-diakrilatom (dPT-dA) oziroma poli(propilen tartrat)-diakrilatom (pPT-dA) (slika 6).

Pri teoretičnem razvoju predloga smo izhajali iz polimerizacije pPF/pPF-diakrilat, raziskava He s sodelavci pa predstavlja naše izhodišče (79). Ti polimeri so šibko higroskopi, kar je najverjetneje posledica pomanjkanja stranskih polarnih funkcionalnih skupin (slika 3). Zato namesto fumarata uporabimo tartrat, in sicer v L-stereokemijski obliki, ki je biološkega izvora. Z uporabo tartrata sicer pridobimo dve hidroksilni skupini,



Slika 5. Struktura predlaganega monomera, imenovanega propilenglikol akrilovinska kislina.

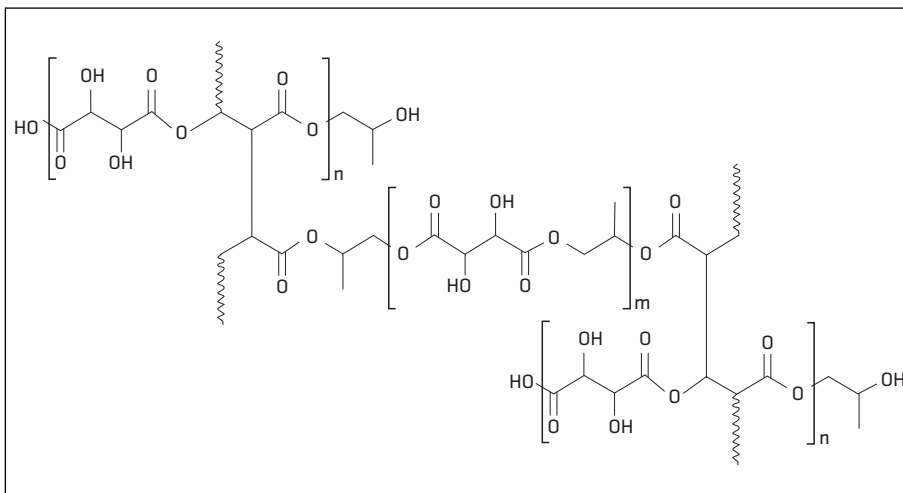


Slika 6. Struktura predlaganega prečnega povezovalca, imenovanega dipropilen tartrat-diakrilat.

vendar izgubimo dvojno vez, ki je pri polimeru pPF/pPF-diakrilat služila za prečno povezavo. To vlogo sedaj igra dvojna vez akrilata, ki je s terminalnim ogljikom dvojne vezi kovalentno vezan na hidroksilni kisik karboksilne skupine tartrata. Ker pa akrilat nima alkoksi hidroksilne skupine, ki bi omogočala polimerizacijo s tvorbo estrske vezi z drugo karboksilno skupino tartrata, predlagamo še uvedbo propilen glikola, in sicer estrsko vezavo le-tega z eno izmed obeh hidroksilnih skupin na karboksilno skupino akrilata. Morda največji izziv pri sintezi te spojine, ki smo jo poimenovali propilenglikol akrilovinska kislina, bi bila vezava vinske in akrilne kisline na predlagan način, vendar upravičeno domnevamo, da je s pomočjo sodobne organske sinteze moč najti učinkovit in komercialno zanimiv način. Za prečno povezovanje prav tako predlagamo novo spojino, dipropilen tartrat-diakrilat, in sicer kot tako ali pa v njeni polimerni obliki poli(propilen tartrat)-diakrilata. Tudi tukaj smo, glede na izhodiščno raziskavo, zamenjali fumarat s tartratom ravno zaradi dodatnih hidroksilnih skupin, poleg tega pa tako omejimo število produktov razgrad-

nje. Če pripravimo takšno polimerizacijsko mešanico, da je razmerje dvojnih vezi monomerov in dvojnih vezi prečnega povezovalca 1 : 1, potem naj bi dobili strukturo, ki je shematsko prikazana na sliki 7.

Mehanske lastnosti reguliramo z razmerji dvojnih vezi med PGAT in dPT-dA oz. pPT-dA. Večje kot je razmerje, večja sta kompresivna napetost (sposobnost materiala upirati se aksialno usmerjenim silam) in kompresivni modulus (sposobnost materiala upirati se silam, ki enakomerno delujejo na njegovo površino). Mehanske lastnosti lahko prilagajamo tudi z dodatkom β -trikalcijevega fosfata (β -TCP), ki skladno s povečanjem vsebnosti povečuje oba omenjena parametra (79). Možno je doseči kompresivno napetost do približno 50 MPa in kompresivni modulus do približno 100 MPa. β -TCP se uporablja kot prehransko dopnilo (oznaka E341), prav tako pa so ga že uspešno uporabljali pri regeneraciji kosti s kostnimi nadomestki, saj ima tudi osteoinduktiven učinek. Njegov dodatek je v našem primeru priporočljiv tudi zato, ker je dober prekursor za tvorbo hidroksiapatita. Slednjega namreč zaradi njegove slabe topnosti pri



Slika 7. Shematski prikaz polimerne strukture poli(propilen glikol akrilotartrat)/poli(propilen tartrat)-diakrilata (pPAT/pPT-dA). Monomerni ostanek v oglatem oklepaju se lahko poljubno ponovi n-krat oz. m-krat. V praksi običajno velja, da je število n mnogo večje od števila m.

nevtralnem pH ne moremo dodati (dobro je topen le v kislem). Nevtralen pH preparata je pred vbrizganjem pomemben zato, da se izognemo *ex situ* degradaciji polimera in možnim negativnim posledicam na bolnikovo zdravje. Poleg tega je znano, da nizek pH negativno vpliva na regeneracijo tkiva, kar še dodatno pogojuje uporabo nevtralnega pH (95). Če bi do padca pH med pripravo vseeno prišlo, je za korekcijo pH možna uporaba bazičnih soli, kot sta kalcijev karbonat in natrijev bikarbonat.

Ne glede na uporabljen material poliHIPE pa je za učinkovitejšo in uspešnejšo regeneracijo kostnega tkiva priporočljiva uporaba demineraliziranega kostnega matriksa, ki je osteoinduktiven in osteokonduktiven komercialni biomaterial. Odobren je s strani FDA, ki ga regulira s sekcijo 510(k). Komercialno je dostopen v različnih oblikah, primernih tudi za injiciranje, in veliko jih že ima opravljene klinične študije na ljudeh (96).

Po temeljitem pregledu aktualne literature uporabe propilenglikol akrilovinske kisline in dipropilen tartrat-diakrilata ter njenih polimerov v omenjene namene nismo

zasledili, zato sklepamo, da ta pristop še ni bil uporabljen. V prihodnje bi bilo treba izvesti obsežne in temeljite fizikalno-kemijske in tehnološke študije, vendar na osnovi do sedaj zbranih podatkov možnost priprave materialov poliHIPE ter njihova uporabnost pri pripravi TE-kostnih nadomestkov obstaja.

V tem kratkem pregledu biokompatibilnih akrilnih poliHIPE-materialov v tkivnem inženirstvu kostnih nadomestkov smo prikazali njihov potencial v regenerativni medicini. Iz relativno majhega števila enostavnih monomerov je moč sintetizirati številne različne polimerne strukture, funkcionalno pestrost pa lahko še povečamo z uporabo različnih kombinacij tehnoloških parametrov. Po našem prepričanju so tako fizikalno-kemijske in tehnološke osnove priprave akrilatnih poliHIPE-nosilcev kot tudi *in vitro* študije njihove uporabnosti v regenerativni medicini kostnega tkiva že dovolj poznane, da lahko v kratkem pričakujemo najprej množico *in vivo* in kliničnih študij, nato pa še širšo komercialno uporabo na različnih področjih, predvsem v športni in vojaški medicini.

LITERATURA

1. Puppi D, Chiellini F, Piras AM, et al. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Prog Polym Sci.* 2010; 35: 403–40.
2. Langer RS, Vacanti JP. Tissue engineering: the challenges ahead. *Sci Am.* 1999; 280: 86–9.
3. Cortesini R. Stem cells, tissue engineering and organogenesis in transplantation. *Transpl Immunol.* 2005; 15: 81–9.
4. Drosse I, Volkmer E, Capanna R, et al. Tissue engineering for bone defect healing: An update on a multi-component approach. *Injury.* 2008; 39 Suppl 2: S9–20.
5. Jang JH, Castano O, Kim HW. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009; 61: 1065–83.
6. Health, Medicine and Anatomy Reference Pictures [internet]. HealthFavo.Com; 2013 [citirano 2013 Jun 14]. Dosegljivo na: <http://healthfavo.com/wp-content/uploads/2013/12/cancellous-bone-tissue.jpg>
7. Bab I, Ashton BA, Gazit D, et al. Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo*. *J Cell Sci.* 1986; 84: 139–51.
8. Skerry TM, Bitensky L, Chayen J, et al. Early strain-related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading *in vivo*. *J Bone Miner Res.* 1989; 4: 783–8.
9. Vaes G. Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts. *Clin Orthop Relat Res.* 1988; 231: 239–71.
10. Baron R. Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast. *Anat Rec.* 1989; 224: 317–24.
11. Baron R. Polarity and membrane transport in osteoclasts. *Connect Tissue Res.* 1989; 20: 109–20.
12. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999; 285: 1028–32.
13. Klein-Nulend J, Bacabac RG, Veldhuijzen JP, et al. Microgravity and bone cell mechanosensitivity. *Adv Space Res.* 2003; 32: 1551–9.
14. Shi S, Kirk M, Kahn AJ. The role of type I collagen in the regulation of the osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res.* 1996; 11: 1139–45.
15. Price PA, Otsuka AA, Poser JW, et al. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976; 73: 1447–51.
16. Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, et al. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev.* 1989; 69: 990–47.
17. Hoang QQ, Sicheri F, Howard AJ, et al. Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature.* 2003; 425: 977–80.
18. Butler WT. The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res.* 1989; 23: 123–36.
19. Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *Faseb J.* 1993; 7: 1475–82.
20. Prater CA, Plotkin J, Jaye D, et al. The properdin-like type I repeats of human thrombospondin contain a cell attachment site. *J Cell Biol.* 1992; 112: 1031–40.
21. Baht GS, Hunter GK, Goldberg HA. Bone sialoprotein-collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation. *Matrix Biol.* 2008; 27: 600–8.
22. Tye CE, Hunter GK, Goldberg HA. Identification of the type I collagen-binding domain of bone sialoprotein and characterization of the mechanism of interaction. *J Biol Chem.* 2005; 280: 13487–92.
23. Goldberg HA, Warner KJ, Li MC, et al. Binding of bone sialoprotein, osteopontin and synthetic polypeptides to hydroxyapatite. *Connect Tissue Res.* 2001; 42: 25–37.
24. Karadag A, Ogbureke KU, Fedarko NS, et al. Bone sialoprotein, matrix metalloproteinase 2, and alpha(v)beta3 integrin in osteotropic cancer cell invasion. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96: 956–65.
25. Fedarko NS, Fohr B, Robey PG, et al. Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack. *J Biol Chem.* 2000; 275: 1666–72.
26. Gordon J, Sampaio A, Underhill TM, et al. Bone sialoprotein expression affects osteoblast differentiation and matrix mineralization *in vitro*. *Bone.* 2007; 41: 462–73.
27. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, et al. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell.* 1982; 26: 99–105.
28. Sarvestani AS, He X, Jabbari E. Osteonectin-derived peptide increases the modulus of a bone-mimetic nanocomposite. *Eur Biophys J Biophys Lett.* 2008; 37: 229–34.

29. Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, et al. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2: 793–805.
30. Globus RK, Doty SB, Lull JC, et al. Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts. *J Cell Sci.* 1998; 111: 1385–93.
31. Dolatshahi-Pirouz A, Jensen T, Foss M, et al. Enhanced surface activation of fibronectin upon adsorption on hydroxyapatite. *Langmuir.* 2009; 25: 2971–8.
32. Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60: 184–98.
33. Wei X, Yang X, Han ZP, et al. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharm Sinic.* 2013; 34: 747–54.
34. Ciapetti G, Ambrosio L, Marletta G, et al. Human bone marrow stromal cells: In vitro expansion and differentiation for bone engineering. *Biomaterials.* 2006; 27: 6150–60.
35. Vacanti CA, Bonassar LJ, Vacanti MP, et al. Replacement of an avulsed phalanx with tissueengineered bone. *N Engl J Med.* 2001; 344: 1511–4.
36. Stangenberg L, Schaefer DJ, Buettner O, et al. Differentiation of osteoblasts in three-dimensional culture in processed cancellous bone matrix: quantitative analysis of gene expression based on realtime reverse transcription-polymerase chain reaction. *Tissue Eng.* 2005; 11: 855–64.
37. Marolt D, Knezevic M, Novakovic GV. Bone tissue engineering with human stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2010; 1: 10.
38. Mageed AS, Pietryga DW, DeHeer DH, et al. Isolation of large numbers of mesenchymal stem cells from the washings of bone marrow collection bags: characterization of fresh mesenchymal stem cells. *Transplantation.* 2007; 83: 1019–26.
39. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002; 13: 4279–95.
40. Peng H, Huard J. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transpl Immunol.* 2004; 12: 311–9.
41. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, et al. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 2001; 153: 1133–40.
42. Banfi A, Muraglia A, Dozin B, et al. Proliferation kinetics and differentiation potential of *ex vivo* expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol.* 2000; 28: 707–15.
43. Bocker W, Yin Z, Drosse I, et al. Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer. *J Cell Mol Med.* 2008; 12: 1347–59.
44. FDA: Clinical Trials and Human Subject Protection [internet]. Silver Spring: US food and drug administration [citirano 2013 Jun 14]. Dosegljivo na <http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/RunningClinicalTrials/default.htm>
45. Doerr HW, Cinatl J, Sturmer M, et al. Prions and orthopedic surgery. *Infection.* 2003; 31: 163–71.
46. Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, et al. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: Choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells.* 2005; 23: 1357–66.
47. Dutta RC, Dutta AK. Comprehension of ECM-Cell dynamics: A prerequisite for tissue regeneration. *Biotech Adv.* 2010; 28: 764–9.
48. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification *Cell.* 2006; 126: 677–89.
49. Cukierman E, Pankov R, Yamada KM. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol.* 2002; 14: 633–9.
50. Nieponice A, Soletti L, Guan J, et al. Development of a tissue-engineered vascular graft combining a biodegradable scaffold, muscle-derived stem cells and a rotational vacuum seeding technique. *Biomaterials.* 2008; 29: 825–33.
51. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am.* 2004; 86-A: 1541–58.
52. Volkmer E, Drosse I, Otto S, et al. Hypoxia in static and dynamic 3D culture systems for tissue engineering of bone *Tissue Eng Part A.* 2008; 14: 1331–40.
53. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965; 150: 893–9.
54. Jiang X, Gittens SA, Chang Q, et al. The use of tissueengineered bone with human bone morphogenetic protein-4-modified bone-marrow stromal cells in repairing mandibular defects in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 35: 1133–9.

55. Tu Q, Valverde P, Li S, et al. Osterix overexpression in mesenchymal stem cells stimulates healing of critical-sized defects in murine calvarial bone. *Tissue Eng.* 2007; 13: 2431–40.
56. Menner A, Powell R. Open porous polymer foams via inverse emulsion polymerisation: Should the definition of high internal phase (ratio) emulsions be extended?. *Macromol.* 2006; 39: 2034–5.
57. Lissant KJ. The geometry of high-internal-phase-ratio emulsions. *J Colloid Interface Sci.* 1966; 22: 462–8.
58. Cameron NR. High internal phase emulsions templating as a route to well-defined porous polymers. *Polymer.* 2005; 46: 1439–49.
59. Kimmins SD, Cameron NR. Functional porous polymers by emulsion templating: Recent advances. *Adv Funct Mater.* 2011; 21: 211–25.
60. Sušec M, Liska R, Pulko I, et al. Tiol-en klik polimerizacije v makro emulzijah. In: Kravanja Z, Brodnja-Vončina D, Bogataj M, eds. Slovenski kemijski dnevi 2012, Portorož, 12.–14. september 2012. Maribor: FKKT, 2012; 1: 1–6.
61. Akay G, Birch MA, Bokhari MA. Microcellular polyHIPE polymer supports osteoblast growth and bone formation in vitro. *Biomaterials.* 2004; 25: 3991–4000.
62. Williams JM, Gray AJ, Wilkerson MH. Emulsion stability and rigid foams from styrene or divinylbenzene water-in-oil emulsions. *Langmuir.* 1990; 6: 437–44.
63. Williams JM, Wroblewski DA. Spatial distribution of the phases in water-in-oil emulsions. Open and closed microcellular foams from cross-linked polystyrene. *Langmuir.* 1988; 4: 656–62.
64. Barbetta A, Cameron NR. Morphology and surface area of emulsion-derived (polyHIPE) solid foams prepared with oil-phase soluble porogenic solvents: span 80 as surfactant. *Macromolecules.* 2004; 37: 3188–201.
65. Patton CD, Schulman ES. Surfactant – clinical application. *Am Family Physician.* 1992; 46: 233–6.
66. Hainey P, Huxham IM, Rowatt B, et al. Synthesis and ultrastructural studies of styrene-divinylbenzene poly-HIPE polymers. *Macromolecules.* 1991; 24: 117–21.
67. Sevšek U, Krajnc P. Funkcionalizacije poliHIPov preko prostih vinilnih skupin. In: Kravanja Z, Brodnja - Vončina D, Bogataj M, eds. Slovenski kemijski dnevi 2012, 2012 Sep 12–14; Maribor: FKKT; 2012; 1. p. 1–5.
68. Edwards CJC, Gregory DP, Sharples M. Eur Pat Application 239360. 1987.
69. Krajnc P, Štefanec D, Pulko I. Acrylic acid »reversed« polyHIPes. *Macromol Rapid Commun.* 2005; 26: 1289–93.
70. Webster I, West PJ. Adhesives for Medical Application. In: Dumitriu S, Dekker M, eds. *Polymeric Biomaterials.* 2nd ed. Marcel Dekker, Inc: New York; 2002. p. 703–38.
71. Lumelsky Y, Lalush-Michael I, Levenberg S, et al. A degradable, porous, emulsion-templated polyacrylate. *J Polym Sci A Polym Chem.* 2009; 47: 7043–53.
72. Bokhari M, Carnachan RJ, Przyborski SA, et al. Emulsion-templated porous polymers as scaffolds for three dimensional cell culture: effect of synthesis parameters on scaffold formation and homogeneity. *J Mater Chem.* 2007; 17: 4088–94.
73. Lumelsky J, Silverstein MS. Biodegradable porous polymers through emulsion templating. *Macromolecules.* 2009; 42: 1627–33.
74. David D, Silverstein MS. Porous polyurethanes synthesized within high internal phase emulsions. *J Polym Sci A: Polym Chem.* 2009; 47: 5806–14.
75. Kasper FK, Tanahashi K, Fisher JP, et al. Synthesis of poly(propylene fumarate). *Nat Protoc.* 2009; 4: 518–25.
76. Flanagan RJ, Braithwaite RA, Brown SS, et al. The International Programme on Chemical Safety: Basic Analytical Toxicology. Ženeva: WHO; 1995.
77. Peter SJ, Kim P, Yasko AW, et al. Crosslinking characteristics of an injectable poly(propylene fumarate)/beta-tricalcium phosphate paste and mechanical properties of the crosslinked composite for use as a biodegradable bone cement. *J Biomed Mater Res.* 1999; 44: 314–21.
78. He S, Yaszemski MJ, Yasko AW, et al. Injectable biodegradable polymer composites based on poly(propylene fumarate) crosslinked with poly(ethylene glycol)-dimethacrylate. *Biomaterials.* 2000; 21: 2389–94.
79. He S, Timmer MD, Yaszemski MJ, et al. Synthesis of biodegradable poly(propylene fumarate) networks with poly(propylene fumarate)-diacrylate macromers as crosslinking agents and characterization of their degradation products. *Polymer.* 2001; 42: 1251–60.
80. Fisher JP, Dean D, Mikos AG. Photocrosslinking characteristics and mechanical properties of diethyl fumarate/poly(propylene fumarate) biomaterials. *Biomaterials.* 2002; 23: 4333–43.
81. Fujisawa R, Mizuno M, Nodasaka Y, et al. Attachment of osteoblastic cells to hydroxyapatite crystals by a synthetic peptide (Glu7-Pro-Arg-Gly-Asp-Thr) containing two functional sequences of bone sialoprotein. *Matrix Biol.* 1997; 16: 21–8.

82. Fonseca KB, Granja PL, Barrias CC. Engineering proteolytically-degradable artificial extracellular matrices. *Prog Polym Sci.* 2014; 39: 2010–29
83. Kim S, Healy KE. Synthesis and characterization of injectable poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) hydrogels with proteolytically degradable cross-links. *Biomacromolecules.* 2003; 4: 1214–23.
84. Lee SH, Miller JS, Moon JJ, et al. Proteolytically degradable hydro-gels with a fluorogenic substrate for studies of cellular proteolytic activity and migration. *Biotechnol Prog.* 2005; 21: 1736–41.
85. Lee SH, Moon JJ, Miller JS, et al. Poly(ethylene glycol) hydrogels-conjugated with a collagenase-sensitive fluorogenic substrate to visualize collagenase activity during three-dimensional cell migration. *Biomaterials.* 2007; 28: 3163–70.
86. D'Urso PS, Atkinson RL, Lanigan MW, et al. Stereolithographic (SL) biomodelling in craniofacial surgery. *Br J Plast Surg.* 1998; 51: 522–30.
87. Seitz H, Rieder W, Irsen S, et al. Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005; 74: 782–8.
88. Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials.* 2007; 28: 4240–50.
89. Arkudas A, Beier JP, Heidner K, et al. Axial prevascularization of porous matrices using an arteriovenous loop promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts. *Tissue Eng.* 2007; 13: 1549–60.
90. Regauer M, Jurgens I, Kotsianos D, et al. New-bone formation by osteogenic protein-1 and autogenic bone marrow in a critical tibial defect model in sheep. *Zentralbl Chir.* 2005; 130: 338–45.
91. Peterson B, Zhang J, Iglesias R, et al. Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Eng.* 2005; 11: 120–9.
92. Betz OB, Betz VM, Nazarian A, et al. Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am.* 2006; 88: 355–65.
93. Fu YC, Nie H, Ho ML, et al. Optimized bone regeneration based on sustained release from threedimensional fibrous PLGA/HAp composite scaffolds loaded with BMP-2. *Biotechnol Bioeng.* 2008; 99: 996–1006.
94. Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater.* 2008; 15: 100–14.
95. Kohn DH, Sarmadi M, Helman JI, et al. Effects of pH on human bone marrow stromal cells in vitro: Implications for tissue engineering of bone. *J Biomed Mater Res.* 2002; 60: 292–9.
96. Gruskin E, Doll BA, Futrell FW, et al. Demineralized bone matrix in bone repair: History and use. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012; 64: 1063–77.

Prispelo 1. 8. 2013