

# Bioaktywne kompozyty w regeneracji kości. Przegląd

## Bioactive Composites for Bone Regeneration. Review

Krzysztof H. Włodarski<sup>(E,F)</sup>, Paweł K. Włodarski<sup>(E,F)</sup>, Ryszard Galus<sup>(E,F)</sup>

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa  
Department and Division of Histology and Embryology, Center for Biostructure Research, Medical University of Warsaw

### STRESZCZENIE

Do wypełniania ubytków kości oraz do przyspieszenia regeneracji tkanki kostnej, obok przeszczepów auto- i allogenicznej kości szeroko stosuje się materiały ceramiczne, naturalne lub sztucznie otrzymane hydroksyapatyty i amorficzne fosforany wapnia, polimery kwasów alfa-hydroksylowych. Materiały te stosowane w czystej postaci mają dobre własności osteokondukcyjne, a niekiedy osteoindukcyjne. Materiały te, z osadzonymi komórkami kościotwórczymi, najczęściej uzyskanymi ze zrzębu szpiku, tworzą tzw. "konstrukty" lub "kompozyty", które w warunkach hodowli *in vitro* wykazują różne biochemiczne i morfologiczne parametry osteogenezy, a przeszczepione *in vivo* są miejscem kości otworzenia typu mezenchymatycznego.

**Słowa kluczowe:** biokompozyty, ceramika, regeneracja kości

### SUMMARY

Beside auto- and allogeneic bone chips used for filling bone lesions or to enhance bone regeneration, various types of ceramics, natural and synthesized bone mineral hydroxyapatite and tricalcium phosphate, as well as numerous polymers and co-polymers of alpha-hydroxy acids are widely used. These materials demonstrate good osteoconductivity in pure form, but very rarely are osteoinductive. However, deposition of osteogenic cells on their surface, most frequently derived from bone marrow stroma, enables such "constructs" or "composites" to maintain osteogenic differentiation, both *in vitro*, where expression of several types of osteogenic markers, such as alkaline phosphatase expression, collagen type I synthesis, osteocalcin expression, mineralization is detected, and *in vivo*, where they form sites of histogenesis of bone and later of bone marrow.

**Key words:** biocomposites, ceramics, bone regeneration

## WSTĘP

W chirurgii ortopedycznej i w stomatologii dla potrzeb odtworzenia lub wypełnienia ubytków kostnych, obok przeszczepów auto i allogenicznej kości stosuje się szereg preparatów organicznych i nieorganicznych, niekiedy w kombinacji z komórkami kościotwórczymi, określanymi nazwą „kompozyty” lub „konstrukty”. Niektóre z nich, po przeszczepieniu ulegają biodegradacji, inne nie są resorbowane i zostają trwale włączone w kostne łoże implantu.

Materiał służący do regeneracji kości musi spełniać trzy kryteria:

1. posiadać strukturę przestrzenną, stanowiącą rusztowanie dla osadzających się osteoblastów, zbliżoną do trójwymiarowej struktury kości,
2. osadzone na nim komórki kościotwórcze winny proliferować i różnicować się do postaci, zdolnych syntetyzować składniki macierzy kostnej oraz prowadzić do jej mineralizacji,
3. powinny zawierać czynniki bioaktywne, ukierunkowujące różnicowanie się komórek w pożądanym – osteoblastycznym – kierunku [1].

Klasycznymi materiałami stosowanymi do wypełniania ubytków kostnych są sole wapnia – trójfosforan wapnia  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , dość szybko biodegradowalny, nie wykazujący własności osteoindukcyjnych, jednak posiadający zdolności osteokondukcyjne, tzn. sprzyjające pobudzeniu osteogenezy z otaczającej go tkanki kostnej biorcy oraz hydroksyapatyt  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  – naturalny minerał kości, nie resorbowlany, łatwo wchodzący w kontakt z kością, i podobnie jak fosforan wapnia, wykazujący zdolności osteokondukcyjne, a nie osteoindukcyjne [2].

Obecnie minerały te stosowane są jako dodatek do innych matryc biodegradowalnych i/lub w kombinacjach z osadzonymi na nich komórkami o potencjale kościotwórczym, najczęściej komórkami zrębu szpiku.

Drugą grupą materiałów służących do wypełniania i substytucji tkanki kostnej są sztucznie otrzymane materiały degradowalne, najczęściej w połączeniu z komórkami osteogennymi i/lub czynnikami bioaktywnymi, będącymi aktywatorami osteogenezy, np. białkami morfogenetycznymi kości (BMP) lub czynnikami, ułatwiającymi adhezję komórek, np. proteoglikanami [1]. Grupę tę tworzą głównie polimery kwasów alfa-hydroksylowych [3,4,5,6,7].

Materiałami stosowanymi do osteosyntezy i do uzupełnienia ubytków kości są tzw. matryce metalowe, na których również można osadzać komórki kościotwórcze. Są to stopy lub amorficzne mieszaniny metali ciężkich [8,9,10,11,12,13,14].

Na etapie eksperymentalnym stosowane są również inne kompozyty o własnościach kościotwórczych lub umożliwiających proliferację i różnicowanie oste-

## BACKGROUND

The implantation of auto- and allogeneic bones is employed for the healing of bone defects and activation of bone regeneration in orthopaedic surgery and dentistry. Recently a number of organic and inorganic compounds, often in combination with biomolecules that promote bone repair and regeneration and/or with osteogenic cells, referred to as "composites" or "constructs", have been considered as bone graft substitutes. Some of them are biodegradable, while others are not degraded and are permanently incorporated into the treated bone.

Such tissue-engineered "constructs" for bone regeneration should fulfill the following criteria:

1. Have a three-dimensional structure similar to bone, allowing the adhesion of bone-forming cells to the scaffold;
2. The scaffold should be adhesive for osteogenic cells, and promote their differentiation and the synthesis of mineralizing bone matrix;
3. Should contain bioactive molecules, which direct osteogenic differentiation of adherent cells [1].

Classic materials used for filling bone defects are ceramics: tricalcium phosphate ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , [TCP] and hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , [HA]). Ceramics are defined as refractory, inorganic, and nonmetallic materials. Traditional ceramics include clay products, silicate glass and cement. Ceramics are hard, brittle, heat- and corrosion-resistant materials made by shaping and then firing a nonmetallic mineral at a high temperature. TCP is relatively rapidly biodegraded, lacks osteoinductive properties, but is a good osteoconducting material.

Osteoconduction can be defined as the properties of a scaffold that facilitates migration of cells transplanted in the graft or arising from the neighbouring tissue. Osteoinduction refers to biologic stimulation that induces osteoblastic progenitors to proliferate and differentiate to express osteoblastic phenotype. HA, a natural bone mineral, is unresorbable, is easily incorporated into bone, and, like TCP, is osteoconducting but not osteoinducing [2].

Currently these minerals are used as supplements for biodegradable matrices, in combination with adherent cells with osteogenic potency, most commonly with stromal cells of the bone marrow.

A second group of bone filling or bone substituting agents comprises biodegradable synthetic materials, commonly used together with bone-forming cells and/or with bioactive substances which promote osteogenesis, such as bone morphogenetic proteins (BMPs), or substances which facilitate cell adhesion, for example proteoglycans [1]. These "fillers" are made mostly of alpha-hydroxy acid polymers [3,4,5,6,7].

oblastów w warunkach hodowli in vitro: gąbki kolagenowe, nanowłókna węglowe z polilaktydem, poliwęglanem uretanu, chitozaniem [15,16,17, 18,19].

Other materials used in orthopaedic surgery for bridging bones (osteosynthesis), or as implants in reconstructive dental surgery, are metals, to which osteogenic cells can also adhere. Metals are used as alloys or as amorphous mixtures of heavy metals [8,9,10,11, 12,13,14].

Experimental evaluation is under way of other composites with bone-forming capability or those permitting osteoblastic cell proliferation, differentiation, bone matrix formation and mineralization in in vitro cultures, such as collagenoid sponge, collagen with chitosan, polylactide reinforced with carbon nanofibres [15,16,17,18,19].

## HYDROKSYAPATYT (HA) W FORMIE GĄBCZASTEJ (POROWATEJ)

### A. WŁASNOŚCI KOŚCIOTWÓRCZE BEZKOMÓRKOWYCH IMPLANTÓW HYDROKSYAPATYTU

Jak wspomniano, HA w postaci czystej nie wykazuje własności indukowania osteogenezy u zwierząt doświadczalnych [20,21,22] (Fig. 1). Wyjątek stanowią jedynie małpy naczelne, u których HA, bez wprowadzenia węł komórek kościotwórczych, wszczepiony domięśniowo wywołuje osteogenezę [21]. HA w połączeniu z trójfosforanem wapnia, implantowany domięśniowo, u niektórych gatunków zwierząt

## POROUS FORMS OF HYDROXYAPATITE (HA)

### A. OSTEOGENIC PROPERTIES OF PURE IMPLANTED POROUS HA

As mentioned already, HA does not exhibit osteoinductive potency when implanted into experimental animals (Fig. 1, 2) [20,21,22], but when implanted intramuscularly into primates (baboons) it does induce osteogenesis [21]. Some authors claim that HA combined with tricalcium phosphate (TCP), when implanted into dogs or pigs, induced osteogenesis at sites of implantation, but failed to do so on

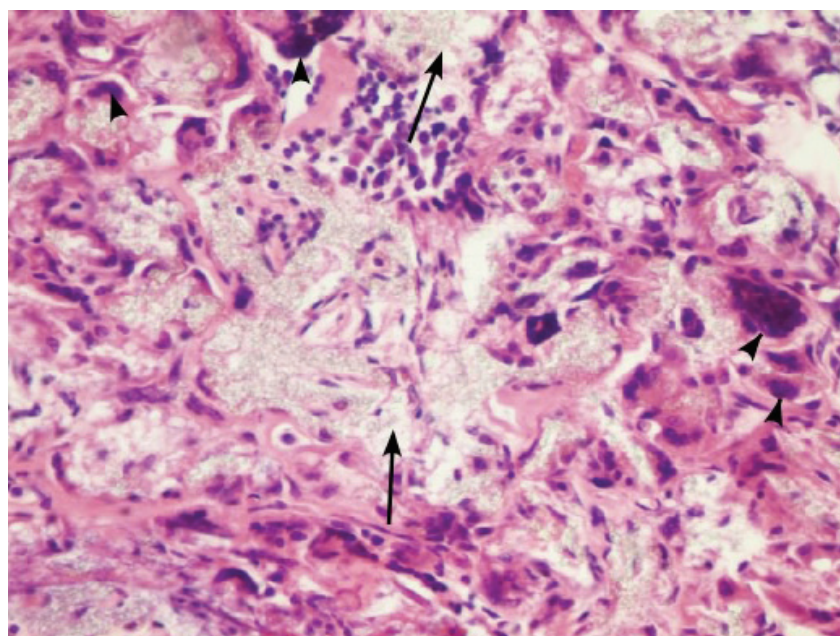


Fig. 1. Ceramika TCA 11 miesięcy po podaniu domięśniowym myszy. Resztki ceramiki (strzałki) otaczają liczne komórki wielojądrowe – symplasty (główki strzałek). Bogatokomórkowy odczyn tkanki łącznej bez śladów kościotworzenia. Barwienie HE – rycina własna

Fig. 1. Intramuscular implant of powdered tricalcium phosphate (TCA) ceramic into mice, 11 months post implantation. Implanted material is almost completely resorbed, its residuals are marked with arrows. Numerous symplasts (arrowheads) present in well vascularised connective tissue, without osteogenic tissue. HE staining – original figure

okazał się być czynnikiem kościotwórczym (psy, świnię), u innych (koza, królik, szczur) materiał ten nie wykazywał potencjału kościotwórczego [23]. Podobnie kościotworzenie za pomocą domięśniowo przeszczepionej porowatej formy HA z polylaktydem (w proporcji 7:3) zaobserwowano u psów [24]. U szczurów, HA połączony z kolagenem i demineralizowaną macierzą kości, stanowiącą źródło białek morfogenetycznych kości (BMP) po implantacji pod skórę indukował osteogenezę heterotopową, natomiast bez dodatku BMP – nie wykazywał aktywności kościotwórczej [20].

#### B. POROWATA POSTAĆ HYDROKSYAPATYTU JAKO NOŚNIK DLA ADHEZJI, PROLIFERACJI I RÓŻNICOWANIA OSTEOLASTÓW IN VITRO

Wiele doniesień wskazuje, że porowata postać HA jest dobrym podłożem dla adhezji komórek osteogennych, wyprowadzonych ze szpiku lub z okostnej. Komórki te proliferują, różnicują się i podejmują syntezę elementów macierzy kostnej we wnętrzu porów [25,26]. Komercyjny preparat PYROST, będący odbiałczoną kością wołową (nieorganiczna macierz kostna) jest naturalną postacią takiego hydroksyapatytu [27]. Pokrycie nieorganicznej macierzy kostnej kolagenem typu I oraz hyaluronianem ułatwia adhezję i wzmacnia różnicowanie się osteoblastów in vitro [28].

Dodanie do HA bisfosfonianów nie tylko pozwala na różnicowanie się zrębowych komórek szpiku do osteoblastów, syntetyzujących macierz kostną oraz jej mineralizację, ale jednocześnie hamuje proliferację komórek prekursorowych dla osteoklastów, tym samym zwiększając ilość tkanki kostnej [29].

Gąbka z HA i kaprolaktonu, o porowatości 60-70% i wielkości porów 450 lub 750  $\mu\text{m}$  cechuje się dobrą plastycznością, łatwością mechanicznej obróbki celem nadania jej pożądanego kształtu i stanowi dobre podłoże dla różnicowania się osteoblastów [30].

Różnicowanie się komórek osteogennych na ww. podłożach ocenia się analizując ekspresję wielu markerów osteogenezy: syntezy kolagenu I, aktywności fosfatazy zasadowej, ekspresji genów dla osteokalcyny, stopnia mineralizacji osteoidu oraz o analizie mikroskopową zawartości porów.

#### C. POROWATA POSTAĆ HYDROKSYAPATYTU Z OSADZONYMI KOMÓRKAMI OSTEOGENNYMI JAKO BIOAKTYWNE IMPLANTY KOŚCIOTWÓRCZE

Opracowano metodę pozwalającą na wzbogacanie porów HA komórkami osteogennymi szpiku przy zastosowaniu niewielkiego nadciśnienia [31]. Taki wzbogacony preparat przewyższał HA nasączony

grafting into other species (goat, rabbit, rat) [23]. In dogs, however, porous forms of HA combined with polylactide (at a ratio of 7:3) has induced osteogenesis [24]. In rats, a composite of HA, collagen and demineralized bone matrix, being a source of bone morphogenetic proteins, has induced osteogenesis, but when demineralized bone matrix was not used in the composite, no bone induction took place [20].

#### B. POROUS HA AS A SCAFFOLD FOR ADHESION, PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF OSTEOGENIC CELL CULTURES

Numerous reports have pointed out that the porous form of HA is a good substrate for adhesion of bone marrow or periosteal membrane-derived osteogenic cells. These cells proliferate, differentiate and synthesize bone matrix inside the pores [25,26]. Commercially available Pyrost, which is deproteinized bovine bone (inorganic bone matrix) can be considered as a natural form of HA [27]. Coating such inorganic bone matrix with collagen type I and with hyaluronate enhances in vitro attachment and differentiation of osteoblasts [28]. An addition of bisphosphonates to HA enhances bone marrow-derived osteoblast activation and mineralization of formed osteoid, and decreases the number of osteoclasts by inhibiting proliferation of their precursors [29].

A composite sponge of HA and caprolactone with porosity of 60-70% and pore size of 450-750  $\mu\text{m}$  has good mechanical parameters permitting it to be easily trimmed to a desired shape. Osteoblasts adhere and differentiate on the surface of such a scaffold [30].

Differentiation of adherent osteogenic cells grown in vitro on porous HA was monitored by the expression of markers of osteogenesis, such as synthesis of collagen type I, activity of alkaline phosphatase, osteocalcin gene expression, osteoid mineralization, and by histological evaluation of the cellular content of the pores.

#### C. POROUS HA AS A SCAFFOLD FOR OSTEOBLASTS CULTURED IN VITRO AND A BONE-FORMING IMPLANTS.

"Loading" more marrow-derived osteogenic cells into porous HA can be achieved by using a low pressure system during subculture [31]. Such cell-enriched porous material produced more bone post



biernie komórkami osteogennymi szpiku ilością wyprodukowanej tkanki kostnej po domięśniowej implantacji [32,33].

Zmineralizowana macierz kostna (= HA) wraz z macierzą zdeminalizowaną, stanowiącą dostępne źródło białek morfogenetycznych kości (= BMP), spójone skrzepem autogenego szpiku znalazły zastosowanie do połączenia wyrostków kolczystych kręgosłupa [34]. Skrzep szpiku spełniał w tym układzie wielorakie funkcje: stanowił źródło komórek osteogennych i miejsce adhezji innych komórek biocyta implantu, ułatwiał stabilizację miejsca przeszczepu, stanowił bogate źródło różnych czynników wzrostu (PDGF, EGF, FGF, TGF-beta), uwalnianych z płytek krwi podczas ich degranulacji, a produkty fibrynolizy skrzepu uwalniały czynniki angiogenne.

Dodanie do porowatej matrycy z hydroksyapatytu, na którym osadzone były komórki osteogenne szpiku białka morfogenetycznego kości (BMP) znacznie zwiększało potencjał kościotwórczy takiego domięśniowego implantu [35,36].

Gąbki poliuretanowo-hydroksyapatytowe, o porowatości ok. 77% i wielkości porów ok. 500  $\mu\text{m}$ , w których znajdowały się komórki osteoblastyczne szpiku, po podskórnym wprowadzeniu syngenicznym szczurom były miejscem intensywnej osteogenezy [37], podobnie jak HA, opłaszczony glikoproteinami: lamininą i fibronektyną [38].

W przytoczonych pracach nie wspomina się o zaobserwowaniu chondrogenyzy w procesach prowadzących do osteogenezy. Wyjątek stanowi doniesienie, iż wypalona kość bydlęca, powleczona kolagenem i stanowiąca podłoże dla hodowli osteoblastów, wprowadzona do myszy bezgrasicznych nu/nu, a więc pozbawionych odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego, stawała się siedliskiem zarówno osteogenezy, jak i chondrogenyzy [39]. Zapewne miała tu znaczenie modulacja immunologiczna tego układu.

#### D. KOMPOZYTY HYDROKSYAPATYTU

Hydroksyapatyt wzmocniony polimerami kwasów alfa-hydroksylowych lub kolagenem nazywane są kompozytami. Kompozyty posiadają strukturę przypominającą kość, są resorbowalne, osteokondukcyjne i łatwo integrują się z kością [40].

Drobnowłóknisty kompozyt polylaktyd/HA okazał się dobrym podłożem dla hodowli osteoblastów in vitro, lepszym, niż czysty polylaktyd [41,42,43]. Kompozyt taki, z osadzonymi in vitro komórkami zrębowymi szpiku obcogatunkowego, wszczepiony myszom bezgrasicznym nu/nu był miejscem intensywnej osteogenezy [44]. Kompozyt, cechujący się parametrami mechanicznymi jak naturalna tkanka kostna – polimetakrylan/HA i polietylen HA [45] i jego ko-

implanting into rat muscles than a scaffold passively soaked with a bone marrow cell suspension [32,33].

A mixture of mineralized bone matrix (HA) and of demineralized bone matrix as a source of BMP, sealed with coagulated bone marrow (clot), was used for spinal fusion [34]. The addition of a bone marrow clot to such composite graft resulted in a significant improvement of graft performance. Marrow clot sealing has numerous benefits: promoting stabilization of the graft site, representing a source of osteogenic cells, and functioning as an adhesion site for other cells from the graft bed. Moreover, the marrow clot is a rich source of a variety of growth factors released from blood platelets, such as PDGF, EGF, FGF, and TGF-beta. In addition, the products of fibrin degradation are angiogenic factors.

The introduction of BMP into porous HA serving as a scaffold for osteogenic cell cultures significantly enhances the yield of bone tissue following intramuscular implantation [35,36].

Osteogenic cells cultured in vitro on composite polyurethane/HA sponge, having porosity of ca 70% and pore size of ca. 500  $\mu\text{m}$  become a site of marked osteogenesis when grafted into syngeneic rats [37], with similar results noted with cultures of osteogenic cells on a HA sponge coated with the glycoproteins laminin and fibronectin [38].

In the papers reported above no chondrogenesis was mentioned as a component of heterotopic osteogenesis by composite grafts. We found only one report of chondrogenesis by composite implants of calcinated bone coated with collagen on which xenogeneic osteogenic cells were cultured and then grafted into muscles of athymic nu/nu mice [39]. Possibly the lack of cellular response of the host animal was involved in the chondrogenesis by osteogenic cells.

#### D. HYDROXYAPATITE COMPOSITES

Combinations of HA reinforced with alpha-hydroxy acid polymers or with collagen are referred to composites. The three-dimensional structure of composites resembles that of cancellous bone, they are resorbable, osteoconductive, and firmly integrate with the bone bed [40]. The nanofibrous polylactide/HA composite is a better substrate for osteoblast cell cultures than polylactide alone [41,42,43]. Such composites, with xenogeneic osteoblasts grown in them, become the site of intense osteogenesis when implanted into athymic mice [44].

Polymethacrylate/HA composite and polyethylene HA [45] (its commercial form Hapex), [46] have mechanical properties like bone [47], and are good

mercyjna postać HAPEX [46] – pozwalają na różnicowanie się na tym podłożu komórek osteogennych, a stopień ekspresji osteoblastycznej na nich był proporcjonalny do zawartości HA w kompozycie [47].

Porowaty (porowatość 91%) kompozyt HA/chitozan (polisacharyd zwierzęcy) także stanowi dobre podścielisko dla proliferujących i ulegających różnicowaniu komórek osteogennych zrębu szpiku [48].

Podobne cechy wykazuje kompozyt polylaktydo-co-glikolidu z HA [49,50] oraz polyhydroksymaślan-co-hydroksywalerian z HA [51]. Ten ostatni nie tylko sprzyja in vitro ekspresji osteoblastów, ale także wykazuje działanie przeciwzapalne i hamuje rozwój osteoklastów [51].

### **TRÓJFOSFORAN WAPNIA (TCP)**

Porowaty spiek HA z fosforanem wapnia (HA/TCP), wzbogacony witaminą D, stanowi dobre podłoże dla różnicowania się ludzkich osteoblastów szpiku [52]. Podobnie dobrym podłożem jest biodegradowalny kompozyt polypropyleny z TCP [53] oraz polycaprolakton z 20% zawartością TCP, zezwalających na długotrwałe (do 4 tygodni) hodowanie osteoblastów [54].

Porowata postać TCP, zasiedlona in vitro komórkami szpiku przepiórki, wprowadzona podskórnie bezgranicznym myszom nu/nu, stanowiła miejsce żywej osteogenezy. Dzięki charakterystyce jąder komórkowych tego ptaka udało się zidentyfikować pochodzenie tkanki kostnej indukowanej takim konstruktem. Okazało się, że w pierwszej fazie kościotworzenia komórki kostne pochodziły od komórek przepiórki, natomiast faza późniejsza osteogenezy była wynikiem aktywności osteoblastycznej komórek biorcy [55].

### **POLIMERY KWASÓW ALFA-HYDROKSYLOWYCH JAKO PODŚCIELISKO KOMÓREK OSTEOGENNYCH**

Polimery kwasów: mlekowego (polylaktydy, PL) lub glikolidowego (polyglikolidy, PG) lub kopolimery tych kwasów (polylaktyd-co-polyglikolid, PLG), wprowadzone do medycyny jako biodegradowalne nici chirurgiczne, okazały się być dobrymi nośnikami dla hodowli osteoblastów i mogą być wykorzystywane do konstrukcji biologicznych materiałów wypełniających ubytki kostne [49,50,7].

Polylaktyd-co-glykolid z naniesionym HA (PLG/HA) lub z kolagenem stanowią dobre podłoże dla hodowli osteoblastów, umożliwiając im różnicowanie się [3,4], a gąbka PLG z osadzonymi osteoblastami po 56 dniach hodowli in vitro wypełniała się zmineralizowaną macierzą kostną [6]. Ponadto, gąbka

adhesives for osteogenic cells, and the expression of osteoblastic markers was proportional to its HA content [47].

The porous biodegradable composite chitosan/HA with 91% porosity is also a good scaffold for marrow stromal cells attachment, differentiation and bone matrix synthesis [48]. Similar observations were made with composites of polylactide-co-glycolid/HA [49,50] and polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate [51]. The latter is a good support for osteoblast growth and differentiation, and it also reduces the proinflammatory response of macrophages and thus inhibits osteoclast adhesion and resorption [51].

### **TRICALCIUM PHOSPHATE (TCP)**

Sintered porous HA and TCP enriched with vitamin D promotes human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation into osteoblasts [52]. Equally good as a substrate is a biodegradable composite of propylene/TCP [53] and polycaprolactone supplemented with 20% TCP [54].

Porous TCP colonized with quail bone marrow cells on transplantation into athymic nude mice was the site of marked osteogenesis. Due to the unique characteristics of nuclear morphology of quail cells it was possible to identify the origin of bone cells in the composite grafts. Ceramic-associated osteogenesis is a biphasic phenomenon: the donor (quail) cells are largely responsible for osteogenesis in the early phase; at later stages host cell actions predominate [55].

### **BIODEGRADABLE POLYMERS OF ALPHA HYDROXY ACIDS AS CARRIERS FOR OSTEOGENIC CELLS**

Polymers of lactic (polylactide, PL) or of glycolic (polyglycolide, PG) acids or their copolymers (polylactide-co-polyglycolide, PLG) were originally used in medicine as biodegradable sutures. They turned out to be good carriers for osteoblast cell cultures and could be employed for the construction of biologic material filling gaps in bone [49,50,7].

PLG with HA (PLG/HA) or with collagen (PLG/collagen) are good substrates for osteoblast cell culture and differentiation [3,4], and a sponge of PLG seeded with stromal marrow osteoblasts was filled with mineralized bone matrix within 56 days of culturing in vitro [6]. The sponge was also an excellent carrier for bone morphogenetic proteins (BMP) [7].

z tego materiału okazała się być także doskonałym nośnikiem dla białek morfogenetycznych kości [7].

Opracowana została także iniekcyjna postać PLG – mikrokuleczki, opłaszczone HA, na których można hodować komórki kościotwórcze. Taki kompleks, podany podskórnym w formie iniekcji myszom bezgrasiczym nu/nu wywoływał w miejscu podania kościotworzenie [5].

### **INNE KOMPOZYTY JAKO NOŚNIKI KOMÓREK OSTEOTWÓRCZYCH**

Polylaktyd i poliwęglan uretanu, wzmocnione włóknami węglowymi są dobrym podłożem dla adhezji komórek osteoblastycznych [18,19]. Włókna węglowe nadają pożądane własności mechaniczne, a ponadto włókna węglowe wykazują dobre przewodnictwo elektryczne. Przyłożenie napięcia do takiego podłoża stymuluje proliferację i różnicowanie komórek kościotwórczych, zwiększając potencjał osteogeny konstruktu [19].

Kolagen także jest wykorzystywany jako nośnik dla przeszczepianych komórek kościotwórczych. Porowaty materiał mieszaniny mikrogranulek kolagenu i polisacharydu chitozanu, z dodatkiem czynnika wzrostu TGF-beta stanowił dobre podłoże dla różnicowania się komórek osteogeny in vitro [16,17], a ponadto miał dobre własności osteokondukcyjne.

Mieszanina DNA z mleczu łososia oraz kolagenu wołowego została wykorzystana jako nośnik białka morfogenetycznego kości (BMP). Wprowadzona podskórnym wywoływała u szczurów osteogenezę [56]. Podobny efekt można uzyskać stosując wszczepianie gąbki kolagenowej, związanej z BMP [15].

### **METALE JAKO PODŁOŻA DO HODOWLI OSTEOLASTÓW**

Metale ciężkie oraz ich stopy znalazły szerokie zastosowanie jako materiał protetyczny i do osteosyntezy, aczkolwiek ich wpływ na komórki może być w pewnych warunkach niepożądany. Mikrocząsteczki stopu wolfram: nikiel: kobalt lub wolfram: nikiel: żelazo (91-93%: 3-5%: 2-4%) o wymiarach 1-3  $\mu\text{m}$  wywoływały transformację nowotworową prawidłowych komórek osteoblastycznych człowieka, zmieniając ich charakter wzrostu w hodowli (utrata zahamowania kontaktowego wzrostu), wywołując aberracje chromosomalne, powstawanie mikrojąder, ekspresję onkogenu ras, a także nabycie zdolności guzotwórczych po przeszczepieniu zwierzęciu [8]. Także cząsteczki tytanu o średnicy ok. 3  $\mu\text{m}$ , fagocytowane in vitro przez osteoblasty, hamowały w nich ekspresję genów dla kolagenu I [14].

Microspheres of PLG coated with HA can be a substrate for osteoblast cell cultures, and, as a suspension could serve as an injectable scaffold for bone tissue engineering [5].

### **OTHER COMPOSITES AS OSTEOLAST CELL CARRIERS**

Poly lactide and polycarbonate urethane reinforced with carbon nanotubes are a good scaffold for osteoblasts adhesion and growth [18,19]. Carbon nanotube elements in this composites are conductors of electricity. Thus osteoblasts cultured on such a substrate could be exposed to alternate electric stimulation, which promotes osteoblastic activity.

Collagen was also used as a carrier for osteogenic cells. Porous composites of collagen microgranules and of chitosan (animal polysaccharide) supplemented with transforming growth factor-beta were good substrates for in vitro growth and differentiation of osteogenic cells [16,17], and also good osteoconductive materials.

A composite of salmon milt DNA and pepsin-digested collagen I was effectively used as a carrier for bone morphogenetic protein (BMP). When implanted into rats, it was a site of BMP dose-dependent bone induction [56]. Similar results were obtained when collagen sponge was used as a carrier for BMP [15].

### **HEAVY METALS AS SUBSTRATES FOR OSTEOLAST CELL CULTURES**

Heavy metals and their alloys are widely used as prosthetic materials in dentistry and orthopaedics. However, there are reports of their harmful effects on bone forming cells.

Exposure of normal human osteoblasts to micro-particles (1-3  $\mu\text{m}$  in diameter) of alloys of tungsten: nickel and either cobalt or iron (91-93%: 3-5%: 2-4%) transformed these cells into neoplastic ones. Transformed by these alloy particles, osteoblasts lost contact inhibition of growth, demonstrated numerous chromosomal aberrations, developed micronuclei, expressed the oncogene ras, and were tumorigenic on transplantation into animals [8]. Titanium particles with a diameter of 3  $\mu\text{m}$  inhibited the expression of the collagen I gene when phagocytosed by osteoblasts [14].

Metale ciężkie lub ich stopy mogą być podłożem dla wzrostu komórek kościotwórczych. I tak na amorficznej mieszaninie (nie stopie!) tytanu: cyrkonii: niklu (45:38:17) osadzały się prekursorzy osteoblastów, proliferowały i ulegały różnicowaniu, wytwarzając elementy macierzy kostnej [11]. Adhezja osteoblastów do metali ciężkich odbywa się przy udziale integryn [13].

Pokrycie tytanu HA oraz amelogeniną (białko macierzy szkliwa zębów) poprawia różnicowanie się hodowanych na tym podłożu komórek osteoblastycznych, zwiększając ekspresję markerów osteogenezy: kolagenu I, fosfatazy alkalicznej i osteonektyny [9].

Tytan, powleczony plazmą stanowi lepsze podłoże dla proliferacji i różnicowania się osteoblastów, niż powleczony HA [50], a kompozyt siatki tytanowej, wypełnionej koralem (naturalna ceramika) na którym hodowano osteoblasty, po wprowadzeniu do zwierzęcia stał się miejscem aktywnej osteogenezy oraz myelogenezy [10].

Czysty tytan, który pasywuje się na powierzchni do tlenków, jest dobrym materiałem do implantów stomatologicznych, a powleczony HA – jeszcze lepszym.

Heavy metals or their alloys can be substrates for bone cell cultures [11]. The adhesion of these cells to this substrate is mediated by integrins [13].

Covering of titanium with HA and amelogenin (the enamel protein) improves the differentiation of adherent osteogenic cells, as indicated by increased expression of osteogenesis markers: collagen I, alkaline phosphatase and osteonectin [9]. Titanium coated with plasma is a better adhesive substrate for proliferation and differentiation of osteoblasts than when coated with HA [50], and the construct made of titanium mesh filled with coral beads (a natural ceramic) covered with cultured osteoblasts was a site of active osteogenesis and of myelopoiesis when implanted into muscles [10]. Plain titanium which is oxidised on the surface is a good material for dental implants, and covering with HA made it an excellent material as tooth implants.

This work was funded from Medical University of Warsaw grant no. 1M15/WB4/07

Praca wykonana w ramach grantu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego nr 1M15/WB4/07

## PISMIENICTWO / REFERENCES

1. Hutmacher DW, Cool S. Concepts of scaffold-based tissue engineering--the rationale to use solid free-form fabrication techniques. *J Cell Mol Med* 2007; 11(4): 654-69.
2. Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 1991; 2(3): 187-208.
3. Santos-Ruiz L, Mowatt DJ, Marguerie A, Tukiainen D, Kellomäki M, Törmälä P, Suokas E, Arstila H, Ashammakhi N, Ferreri P. Potential use of craniosynostotic osteoprogenitors and bioactive scaffolds for bone engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1(3): 199-210.
4. Lee SJ, Lim GJ, Lee JW, Atala A, Yoo JJ. In vitro evaluation of a poly(lactide-co-glycolide)-collagen composite scaffold for bone regeneration. *Biomaterials* 2006; 27(18): 3466-72.
5. Kang SW, Yang HS, Seo SW, Han DK, Kim BS. Apatite-coated poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres as an injectable scaffold for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2007; Sep 26 [Epub ahead of print]. Dostępny pod adresem URL: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/116324233/ABSTRACT>
6. Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 1997; 36(1): 17-28.
7. Hollinger JO, Leong K. Poly(alpha-hydroxy acids): carriers for bone morphogenetic proteins. *Biomaterials* 1996; 17(2): 187-94.
8. Miller AC, Mog S, McKinney L, Luo L, Allen J, Xu J, Page N. Neoplastic transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by heavy metal-tungsten alloy particles: induction of genotoxic effects. *Carcinogenesis* 2001; 22(1): 115-25.
9. Du C, Schneider GB, Zaharias R, Abbott C, Seabold D, Stanford C, Moradian-Oldak J. Apatite/amelogenin coating on titanium promotes osteogenic gene expression. *J Dent Res* 2005; 84(11): 1070-4.
10. Chen F, Feng X, Wu W, Ouyang H, Gao Z, Cheng X, Hou R, Mao T. Segmental bone tissue engineering by seeding osteoblast precursor cells into titanium mesh-coral composite scaffolds. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007; 36(9): 822-7.
11. Lefaix H, Asselin A, Vermaut P, Sautier JM, Berdal A, Portier R, Prima F. On the biocompatibility of a novel Ti-based amorphous composite: structural characterization and in-vitro osteoblasts response. *J Mater Sci Mater Med* 2007; Oct 4 [Epub ahead of print]. Dostępny pod adresem URL: <http://www.springerlink.com/content/17q6592727661284>
12. Locci P, Becchetti E, Pugliese M, Rossi L, Belcastro S, Calvitti M, Pietrarelli G, Staffolani N. Phenotype expression of human bone cells cultured on implant substrates. *Cell Biochem Funct* 1997; 15(3): 163-70.
13. Gronowicz G, McCarthy MB. Response of human osteoblasts to implant materials: integrin-mediated adhesion. *J Orthop Res* 1996; 14(6): 878-87.



14. Yao J, Cs-Szabó G, Jacobs JJ, Kuettner KE, Glant TT. Suppression of osteoblast function by titanium particles. *J Bone Joint Surg Am* 1997; 79(1): 107-12.
15. Hou LT, Liu CM, Liu BY, Chang PC, Chen MH, Ho MH, Jehng SM, Liu HC. Tissue engineering bone formation in novel recombinant human bone morphogenetic protein 2-atelocollagen composite scaffolds. *J Periodontol* 2007; 78(2): 335-43.
16. Lee JY, Kim KH, Shin SY, Rhyu IC, Lee YM, Park YJ, Chung CP, Lee SJ. Enhanced bone formation by transforming growth factor-beta1-releasing collagen/chitosan microgranules. *J Biomed Mater Res A* 2006; 76(3): 530-9.
17. Arpornmaeklong P, Suwatwirote N, Pripatnanont P, Oungbho K. Growth and differentiation of mouse osteoblasts on chitosan-collagen sponges. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007; 36(4): 328-37.
18. Price RL, Waid MC, Haberstroh KM, Webster TJ. Selective bone cell adhesion on formulations containing carbon nanofibers. *Biomaterials* 2003; 24(11): 1877-87.
19. Supronowicz PR, Ajayan PM, Ullmann KR, Arulanandam BP, Metzger DW, Bizios R. Novel current-conducting composite substrates for exposing osteoblasts to alternating current stimulation. *J Biomed Mater Res* 2002; 59(3): 499-506.
20. Pettis GY, Kaban LB, Glowacki J. Tissue response to composite ceramic hydroxyapatite/demineralized bone implants. *J Oral Maxillofac Surg* 1990; 48(10): 1068-74.
21. Ripamonti U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials* 1996; 17(1): 31-5.
22. Włodarski PK, Haberko K, Haberko M, Pyda A, Włodarski KH. Implantation of natural hydroxyapatite from porcine bone into soft tissues in mice. *Folia biologica (Kraków)* 2005; 53: 183-7.
23. Yang Z, Yuan H, Tong W, Zou P, Chen W, Zhang X. Osteogenesis in extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals. *Biomaterials* 1996; 17(22): 2131-7.
24. Shikinami Y, Okazaki K, Saito M, Okuno M, Hasegawa S, Tamura J, Fujibayashi S, Nakamura T. Bioactive and bioresorbable cellular cubic-composite scaffolds for use in bone reconstruction. *J R Soc Interface*. 2006; 3(11): 805-21.
25. Nordström E, Ohgushi H, Yoshikawa T, Yokobori AT Jr, Yokobori T. Osteogenic differentiation of cultured marrow stromal stem cells on surface of microporous hydroxyapatite based mica composite and macroporous synthetic hydroxyapatite. *Biomed Mater Eng* 1999; 9(1): 21-6.
26. Yoshikawa T, Ohgushi H, Dohi Y, Davies JE. Viable bone formation in porous hydroxyapatite: marrow cell-derived in vitro bone on the surface of ceramics. *Biomed Mater Eng* 1997; 7(1): 49-58.
27. Tsuang YH, Lin FH, Sun JS, Hang YS, Liu HC. In vitro cell behavior of osteoblasts on Pyrost bone substitute. *Anat Rec* 1997; 247(2): 164-9.
28. Nguyen H, Qian JJ, Bhatnagar RS, Li S. Enhanced cell attachment and osteoblastic activity by P-15 peptide-coated matrix in hydrogels. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311(1): 179-86.
29. Boanini E, Torricelli P, Gazzano M, Giardino R, Bigi A. Alendronate-hydroxyapatite nanocomposites and their interaction with osteoclasts and osteoblast-like cells. *Biomaterials* 2008; 29(7): 790-6.
30. Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions in vitro. *Biomaterials* 2007; 28(35): 5291-7.
31. Dong J, Uemura T, Kikuchi M, Tanaka J, Tateishi T. Long-term durability of porous hydroxyapatite with low-pressure system to support osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng* 2002; 12(2): 203-9.
32. Okumura M, Ohgushi H, Dohi Y, Katuda T, Tamai S, Koerten HK, Tabata S. Osteoblastic phenotype expression on the surface of hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res* 1997; 37(1): 122-9.
33. Vuola J, Göransson H, Böhling T, Asko-Seljavaara S. Bone marrow induced osteogenesis in hydroxyapatite and calcium carbonate implants. *Biomaterials* 1996; 17(18): 1761-6.
34. Muschler GF, Nitto H, Matsukura Y, Boehm C, Valdevit A, Kambic H, Davros W, Powell K, Easley K. Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells. *Clin Orthop Relat Res* 2003; 407: 102-18.
35. Noshi T, Yoshikawa T, Dohi Y, Ikeuchi M, Horiuchi K, Ichijima K, Sugimura M, Yonemasu K, Ohgushi H. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 potentiates the in vivo osteogenic ability of marrow/hydroxyapatite composites. *Artif Organs* 2001; 25(3): 201-8.
36. Noshi T, Yoshikawa T, Ikeuchi M, Dohi Y, Ohgushi H, Horiuchi K, Sugimura M, Ichijima K, Yonemasu K. Enhancement of the in vivo osteogenic potential of marrow/hydroxyapatite composites by bovine bone morphogenetic protein. *J Biomed Mater Res* 2000; 52(4): 621-30.
37. Dong J, Kojima H, Uemura T, Kikuchi M, Tateishi T, Tanaka J. In vivo evaluation of a novel porous hydroxyapatite to sustain osteogenesis of transplanted bone marrow-derived osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res* 2001; 57(2): 208-16.
38. Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan AI. Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant* 1992; 1(1): 23-32.
39. Gu WW, Xu YH, Cao HQ, Zhang BD, Lu KB. In vivo osteogenic properties of the composite of periosteal-derived osteoblast and collagen-coated true bone ceramics. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2002; 22(6): 518-20.
40. Kikuchi M, Itoh S, Ichinose S, Shinomiya K, Tanaka J. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. *Biomaterials* 2001; 22(13): 1705-11.
41. Jeong SI, Ko EK, Yum J, Jung CH, Lee YM, Shin H. Nanofibrous Poly(lactic acid)/Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Guided Tissue Regeneration. *Macromol Biosci* 2007 Dec 28. 1[Epub ahead of print]. Dostępny pod adresem URL: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/117874117/ABSTRACT>
42. Ma PX, Zhang R, Xiao G, Franceschi R. Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly(alpha-hydroxy acids)/hydroxyapatite composite scaffolds. *J Biomed Mater Res* 2001; 54(2): 284-93.

43. Tsigkou O, Hench LL, Boccaccini AR, Polak JM, Stevens MM. Enhanced differentiation and mineralization of human fetal osteoblasts on PDLA containing Bioglass composite films in the absence of osteogenic supplements. *J Biomed Mater Res A* 2007; 80(4): 837-51.
44. Yang XB, Webb D, Blaker J, Boccaccini AR, Maquet V, Cooper C, Oreffo RO. Evaluation of human bone marrow stromal cell growth on biodegradable polymer/bioglass composites. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342(4): 1098-107.
45. Moursi AM, Winnard AV, Winnard PL, Lannutti JJ, Seghi RR. Enhanced osteoblast response to a polymethylmethacrylate-hydroxyapatite composite. *Biomaterials* 2002; 23(1): 133-44.
46. Zhang Y, Tanner KE, Gurav N, Di Silvio L. In vitro osteoblastic response to 30 vol% hydroxyapatite-polyethylene composite. *J Biomed Mater Res A* 2007; 81(2): 409-17.
47. Di Silvio L, Dalby MJ, Bonfield W. Osteoblast behaviour on HA/PE composite surfaces with different HA volumes. *Biomaterials* 2002; 23(1): 101-7.
48. Zhao F, Yin Y, Lu WW, Leong JC, Zhang W, Zhang J, Zhang M, Yao K. Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds. *Biomaterials* 2002; 23(15): 3227-34.
49. Attawia MA, Herbert KM, Laurencin CT. Osteoblast-like cell adherence and migration through 3-dimensional porous polymer matrices. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213(2): 639-44.
50. Elgendy HM, Norman ME, Keaton AR, Laurencin CT. Osteoblast-like cell (MC3T3-E1) proliferation on bioerodible polymers: an approach towards the development of a bone-bioerodible polymer composite material. *Biomaterials* 1993; 14(4): 263-9.
51. Cool SM, Kenny B, Wu A, Nurcombe V, Trau M, Cassady AI, Grondahl L. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) composite biomaterials for bone tissue regeneration: in vitro performance assessed by osteoblast proliferation, osteoclast adhesion and resorption, and macrophage proinflammatory response. *J Biomed Mater Res A* 2007; 82(3): 599-610.
52. Toquet J, Rohanizadeh R, Guicheux J, Couillaud S, Passuti N, Daculsi G, Heymann D. Osteogenic potential in vitro of human bone marrow cells cultured on macroporous biphasic calcium phosphate ceramic. *J Biomed Mater Res* 1999; 44(1): 98-108.
53. Peter SJ, Lu L, Kim DJ, Mikos AG. Marrow stromal osteoblast function on a poly(propylene fumarate)/beta-tricalcium phosphate biodegradable orthopaedic composite. *Biomaterials* 2000; 21(12): 1207-13.
54. Rai B, Teoh SH, Ho KH, Hutmacher DW, Cao T, Chen F, Yacob K. The effect of rhBMP-2 on canine osteoblasts seeded onto 3D bioactive polycaprolactone scaffolds. *Biomaterials* 2004; 25(24): 5499-506.
55. Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. *Clin Orthop Relat Res* 1991; 269: 274-83.
56. Murata M, Arisue M, Sato D, Sasaki T, Shibata T, Kuboki Y. Bone induction in subcutaneous tissue in rats by a newly developed DNA-coated atelocollagen and bone morphogenetic protein. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2002; 40(2): 131-5.

---

Liczba słów/Word count: 5683

Tabele/Tables: 0

Ryciny/Figures: 1

Piśmiennictwo/References: 56

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Prof. dr hab. med. Krzysztof H. Włodarski, e-mail: kwlodar@ib.amwaw.edu.pl

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Centrum Biostruktury, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
02-004 Warszawa, ul. Chałubińskiego 5, tel./fax: (0-22) 628-10-41 wew. 21

Otrzymano / Received

02.02.2008 r.

Zaakceptowano / Accepted

26.04.2008 r.