

**HISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE MEKIH TKIVA POSLE  
IMPLANTACIJE BIOKERAMIČKIH MATERIJALA I PROCENA  
BIOKOMPATIBILNOSTI\***

*HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SOFT TISSUE AFTER  
IMPLANTING BIOCERAMICAL MATERIALS AND ESTIMATION  
OF BIOCOMPATIBILITY*

**Danica Marković, Anita Radovanović, Milica Kovačević-Filipović,  
Jelena Francuski, Vera Todorović\*\***

*Histološko ispitivanje reakcije mekih tkiva u odnosu na biomaterijal je davno ustanovljena metoda procenjivanja biokompatibilnosti. To je istovremeno i veoma važna metoda koja je primenjiva na sve oblike biomaterijala, bilo da su namenjeni za kontakt sa mekim tkivom ili ne, ali i metoda koja ima ograničeni značaj za predviđanje kliničkih performansi. Rasprostranjenost korišćenja ove metode proizilazi iz činjenice da je potkožna ili intramuskularna implantacija potencijalnog biomaterijala na životinje jednostavna, a dalja ispitivanja reakcije osnovnog i susjednih tkiva su u principu jednostavan skrining test za određivanje iritacije tkiva i interakcije tkiva i biomaterijala.*

*Skrining tehnike (testovi procenjivanja) uključuju implantaciju materijala na različitim lokalizacijama, kao i različite načine obrade tkiva, primenu imunohistohemijskih metoda bojenja, transmisione, skening i konfokalne mikroskopije i primenu drugih sofisticiranih metoda u obradi i interpretaciji podataka.*

*Interakcija mekog tkiva sa biokeramikom i procena tkivnog i ćelijskog prikaza u procesu inflamacije i imunološkom odgovoru prvi je korak u određivanju njihove biokompatibilnosti.*

*Ključne reči: biokeramika, biokompatibilnost, histologija, regenerativna medicina*

\* Rad primljen za štampu 12. 12. 2011. godine

\*\* Dr sc. med. vet. Marković Danica, asistent, dr sc. med. vet. Radovanović Anita, docent, Katedra za histologiju i embriologiju; dr sc. med. vet. Milica Kovačević-Filipović, vanredni profesor, Katedra za patofiziologiju; Francuski Jelena, dipl. vet. doktorant, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; dr sc med. Todorović Vera, profesor, Stomatološki Fakultet, Pančevo, Univerzitet privredna akademija, Novi Sad

## Uvod / Introduction

Procenjeno je da godišnje više od milion bolesnika širom sveta ima potrebu za medicinskim tretmanom zbog koštano-zglobnih oboljenja, a zbog produženja životnog veka i povećane fizičke aktivnosti savremenog čoveka, smatra se da će se taj broj uskoro povećati na 10% ljudske populacije. Bez transplantacije tj. nadoknade kosti, danas se ne može zamisliti rad u oblasti rekonstruktivne, ortopedske i kraniofacijalne hirurgije, spinalne artrodeze i dentalne implantologije (Ozbas i sar., 2003; Zerbo i sar., 2005; Zaffe i sar., 2005; Danilović i sar., 2007; Le Nichouannen i sar., 2007; Vitala i sar., 2009).

Veliki napredak u nauci o materijalima i biologiji matičnih ćelija (Kovačević-Filipović i sar., 2011) omogućio je da se postupkom tkivnog inženjerstva, kombinacijom matičnih ćelija koje mogu da se diferenciraju u osteoblaste i umnože *ex vivo* u bioreaktorima i sintetskih trodimenzionalnih nosača, uključujući i one napravljene na bazi kalcijum-fosfatne biokeramike, u uslovima *in vitro* dobije adekvatan ekvivalent kosti i hrskavice (Vunjak-Novaković i sar., 2002; Guo i sar., 2006; Le Nihouannen i sar., 2007; Xu i sar., 2008; Macchetta i sar., 2009). Danas su u tkivnom inženjerstvu poznate tri strategije putem kojih se od sopstvenih matičnih ćelija iz koštane srži pacijenta može dobiti autologi osteogeni kalem. Prva mogućnost je da se ćelije izolovane iz koštane srži polože na sintetski nosač i brzo implantiraju u koštani defekt (Malard i sar., 2005). Kod druge mogućnosti, izolovane ćelije koštane srži kultivisu se u toku 1-2 nedelje u cilju izolacije mezenhimalnih matičnih ćelija, koje se potom postavljaju na sintetski nosač i neposredno nakon toga implantiraju (Arinze i sar., 2005). Treća strategija sastoji se u uzimanju koštane srži, izolaciji iz nje i ekspanziji osteoprogenitornih ćelija u toku 1-2 nedelje, nakon čega sledi njihovo postavljanje na sintetski nosač, gde se kultivisu u toku sledeće 2 nedelje, što dovodi do formiranja koštanog sloja na sintetskom nosaču, a tek potom se ovakav hibrid transplantira istom pacijentu/životinji (Maccacci i sar., 2007).

Mogućnosti korišćenja matičnih ćelija, sa biomaterijalom ili bez njega, još uvek su u najvećem delu u eksperimentalnoj fazi istraživanja, gde je nužno odrediti njihove osnovne biološke karakteristike (Kovačević-Filipović i sar., 2007). Veoma je vazno utvrditi i mogućnosti njihove konzervacije (Kovačević-Filipović i sar. 2008), pre nego se one deklarišu kao bezbedne za kliničku upotrebu.

## Biokompatibilnost / Biocompatibility

Utvrđivanje biokompatibilnosti je bitna stepenica u nauci o biomaterijalima. S obzirom na specifičnost svakog materijala i njegovog pojedinačnog uticaja na živu materiju, biokompatibilnost se uvek definiše i prilagođava pojedinačnim slučajevima. Postoji nekoliko ravnopravno prihvaćenih definicija biomaterijala. Jedna od njih je „**biomaterijal** je neživa materija korišćena u medicinskim napravama, namenjena da reaguje sa biološkim sistemom“, a „**biokompatibil-**

**nost** je mogućnost materijala da pokaže karakterističnu reakciju u određenoj primeni“ (Williams, 1986).

Prva testiranja biokompatibilnosti bila su tzv. skrining testiranja (testovi procenjivanja). Skrining testovi mogu da se koriste za procenu podobnosti primene materijala sa gledišta biokompatibilnosti i tada se niz jednostavnih i standardizovanih postupaka sprovode *in vitro* ili *in vivo* testovima (Marković, 2011). Druga funkcija ovih testova je *in vivo* evaluacija koja opisuje promene u tkivima indukovane biomaterijalima, ali i uticaj tkiva na materijale, a isto tako i *in vitro* ponašanje materijala u simuliranim fiziološkim uslovima u odnosu na okolinu ili pojedine njene komponente.

### **Biomaterijal – biokeramički materijali hidroksiapatit (HAP) i trikalcijumfosfat (TCP) / Biomaterial-Bioceramic material hydroxyapatite (HAP) and tricalciumphosphate (TCP)**

Hidroksiapatit je kao veštački zamenik za koštani kalem najčešće upotrebljavan i najbolje proučen polikristalni kalcijum-fosfatni keramički mineral. Već je istaknuto da kost odraslih osoba sadrži 60–70% kalcijum-fosfata u odnosu na suhu masu. HAP je glavni sastojak mineralne koštane supstance skeletnog sistema kod vertebrata, u koju je inkorporisan organski matriks.

U kostima se minerali HAP indirektno vezuju za kolagen preko nekolagenih proteina, kao što su osteokalcin, osteopontin ili osteonektin. Ovi nekolageni proteini čine 3–5% mase kosti i predstavljaju aktivna mesta mineralizacije, ali i vezivanja ćelija (Šupova, 2009).

Poznato je da je sintetski HAP apsolutno biokompatibilan, netoksičan i osteokonduktivan. Međutim, iako je HAP bioaktivan, on u *in vivo* uslovima pokazuje sporu osteokondukciju. Stoga je u poslednjoj dekadi usmerena pažnja na proizvodnju visokoporoznog HAP/TCP u vidu blokova ili granula, koji će imati sposobnost da bolje indukuje urastanje kosti, stvori prisniji kontakt sa okolnim tkivom i pojača osteoindukciju. (Hsu i sar., 2007; Macchetta i sar., 2009).

U cilju reparacije koštanog defekta, tj. stimulacije regeneracije i reparacije, postupkom **tkivnog inženjerstva** moguće je kombinovati ćelije koje imaju osteogeni potencijal (mezenhimalne adultne matične ćelije) i odgovarajuće nosače. Naime, dokazano je da ukoliko se HAP, kao i TCP ili BCP kombinuju sa ćelijama koštane srži, dolazi do razvoja osteogeneze na heterotopičnom mestu (npr. u supkutisu ili u mišiću) (Zhang i sar., 2005).

Veoma ohrabruju prvi klinički podaci o uspešnoj primeni mezenhimalnih matičnih ćelija poreklom iz koštane srži i nosača od makroporozne hidroksiapatitne keramike u dugotrajnom lečenju pacijenata sa velikim koštanim defektima dijafize. Već je u ranijem tekstu istaknuto da kod ovih pacijenata nisu primećene rane ni pozne postoperativne komplikacije, a sedmogodišnje praćenje je pokazalo da postoji dobra integracija implanta i da nema fraktura u zoni implantacije (Marcacci i sar., 2007). Takođe, pokazana je uspešna primena kombinovanja hu-

manih mezenhimalnih matičnih ćelija (hMSC) sa keramičkim nosačem od BCP, u kombinaciji 60% HAP – 40% TCP, u lečenju velikih koštanih defekata. Međutim, u ovim slučajevima je nemoguća potpuna reparacija zbog lošeg remodelovanja materijala od HAP/TCP. Studija Arinze i sar. (2005) na mišjem ektopičnom modelu je pokazala da kombinacija 20% HAP – 80% TCP indukuje osteogenu diferencijaciju hMSC *in vivo* sporije u odnosu na druge kombinacije materijala, a da u *in vitro* uslovima stimuliše osteogenu diferencijaciju ovih ćelija determinacijom ekspresije osteokalcina. Međutim, rezultati drugih studija su pokazali da u uslovima *in vitro* direktna interakcija hMSC i partikula BCP ili hidroksiapatita siromašnog u kalcijumu, čija je veličina takva da mogu da se fagocituju, inhibira sazrevanje osteoblasta, putem modifikacije koncentracije solubilnih faktora u medijumu, pre svega jona  $Ca^{2+}$ , koji iz medijuma ulazi u hMSC (Saldána i sar., 2008).

U novije vreme razvijena je nova biokeramika – kalcijum fosfatni cement, tj.  $\alpha$ TCP (Janačković i sar., 2003; Jokić i sar., 2007). Ovaj cement je dobijen modifikovanom hidrotermalnom metodom, pa osim  $\alpha$ TCP sadrži i malu količinu kalcijum-hidroksiapatita, kao zaostale faze, koja može da deluje kao centar stvaranja novog HAP. U svakom slučaju, HAP/ $\alpha$ -TCP jedinjenje utiče na bržu regeneraciju kosti od samog HAP (Jokić i sar., 2007).

Za razliku od  $\beta$ -TCP koji je dobro poznat kao bioaktivni i biodegradibilni materijal u koštanoj regeneraciji (Chazono i sar., 2004; Jensen i sar., 2006; Ni i sar., 2009),  $\alpha$ -TCP je slabo proučen materijal (Durukan i Brown, 2000; Marković i sar 2009 b).

### **Standard / Standard**

U prekliničkim eksperimentalnim istraživanjima na pacovima primenjene su preporuke Međunarodne organizacije za standardizaciju – Biološke evaluacije biološke opreme (ISO 10993), pre svega odeljak ISO 10993-6, **za lokalne efekte** posle implantacije (ANSI/AAMI), kao i ISO 10993-10, uz određene modifikacije (tabela 1). Na taj standardizovan način je procenjen tzv. iritacioni indeks (tabela 2). Međutim, osim ovog standarda za histološku procenu biokompatibilnosti koriste se i druge metode (imunohistohemijske, stereološke i morfolometrijske, automatska kompjuterizovana obrada podataka) (Marković, 2009c; 2011) uz pomoć kojih se na precizan način određuje stepen inflamatornog/imunološkog odgovora, angiogeneze i reparatornih procesa.

Tabela 1. Semikvantitativna procena histoloških promena u koži pacova s implantatom /  
Table 1. Semiquantitative evaluation of histological changes in skin of rats with implants

Reakcija / <i>Reaction</i>	Numeričko ocenjivanje / <i>Numerical evaluation</i>
<b>Epitel / <i>Epithelium</i></b> normalni, intaktni / <i>normal, intact</i> ćelijska degeneracija ili stanjivanje / <i>cellular degeneration or thinning</i> metaplazija / <i>metaplasia</i> fokalna erozija / <i>focal erosion</i> generalizovana erozija / <i>general erosion</i>	0 1 2 3 4
<b>Leukocitna infiltracija / <i>Leucocyte infiltration</i></b> (na velikom uveličanju) / <i>(with large magnification)</i> odsutna / <i>absent</i> minimalna (manje od 25 ćelija) / <i>minimal (less than 25 cells)</i> blaga (od 26 do 50 ćelija) / <i>slight (26-50 cells)</i> umerena (od 51 do 100 ćelija) / <i>moderate (51-100 cells)</i> izrazita (preko 100 ćelija) / <i>extreme (more than 100 cells)</i>	0 1 2 3 4
<b>Vaskularna kongestija / <i>Vascular congestion</i></b> odsutna / <i>absent</i> minimalna / <i>minimal</i> blaga / <i>slight</i> umerena / <i>moderate</i> izrazita, sa pucanjem krvnog suda / <i>extreme, with burst blood vessel</i>	0 1 2 3 4
<b>Edem / <i>Oedema</i></b> odsutan / <i>absent</i> minimalan / <i>minimal</i> blagi / <i>slight</i> umeren / <i>moderate</i> izrazit / <i>extreme</i>	0 1 2 3 4
<b>Kapsula / <i>Capsule</i></b> odsutna / <i>absent</i> minimalna / <i>minimal</i> tanka / <i>thin</i> umereno debela / <i>moderately thick</i> debela / <i>thick</i>	0 1 2 3 4

Tabela 2. Procena iritacionog indeksa kože pacova nakon implantacije biokeramičkog materijala /

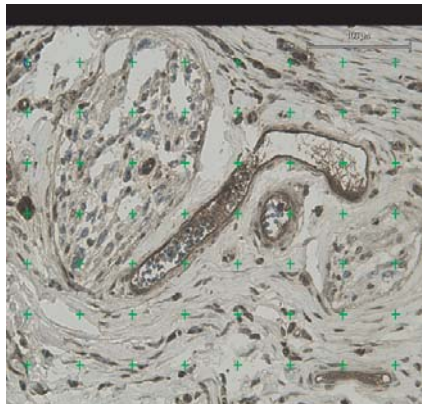
Table 2. Evaluation of irritation index in rat skin following implantation of bioceramic material

Iritacioni indeks (Iri) / <i>Irritation index (Iri)</i>	
Prosečan odgovor / <i>Average response</i>	Opis odgovora <i>Response description</i>
0	nema / <i>none</i>
1-5	minimalan / <i>minimal</i>
6-10	blag / <i>slight</i>
11-15	umeren / <i>moderate</i>
16-20	snažan / <i>strong</i>

## Interakcije ćelija i tkiva sa biokeramikom / *Interaction of cells and tissue with bioceramics*

Interakcija ćelija sa biomaterijalima počinje od momenta ugradnje. U prvim minutima već počinju da se adsorbuju proteini na površinu stranog tela i stvaraju proteinski monosloj na većem delu površine. Adhezija proteina se odigrava pre adhezije ćelija na površinu biomaterijala, pri čemu ćelije pre prepoznaju i prihvataju proteine kao podlogu za svoje pričvršćivanje, nego kao pravu površinu biomaterijala. Pošto ćelije specifično odgovaraju na proteine, ovaj međupovršinski proteinski film može biti faktor koji kontroliše narednu bioreakciju na implantatu (Ratner i sar., 2004).

Nakon razmeštanja ćelija na površini implantata, one se mogu diferencirati, umnožavati, komunicirati sa ostalim vrstama ćelija i organizovati u tkiva izgrađena od jedne ili više vrsta ćelija. Ćelije ekstracelularnog matriksa (ECM) luče molekule koji popunjavaju prostore između ćelija i služe kao strukturalna veza za proteine i ćelije. Pojavljuju se novoformirani mali krvni sudovi (*angiogenesis*) (Marković, 2009d), a zatim i veći (*vasculogenesis*) kao ključni momenat za ishranu ovog novog tkiva i njihovo širenje na veća područja (slika 1).



Slika 1. *Prikaz merenja volumenske gustine krvnih sudova u vezivnom tkivu ispod kutanog mišića, oko implantiranog hidroksiapatita-HAP*  
*Imunohistohemija-IHH-eNOS, obeležavanje angiogeneze; x 40*

Figure 1. *Measurements of volumetric density of blood vessels in connective tissue under cutaneous muscle, around implanted hydroxyapatite-HAP*  
*Immunohistochemistry-IHH-eNOS, marking angiogenesis; x 40*

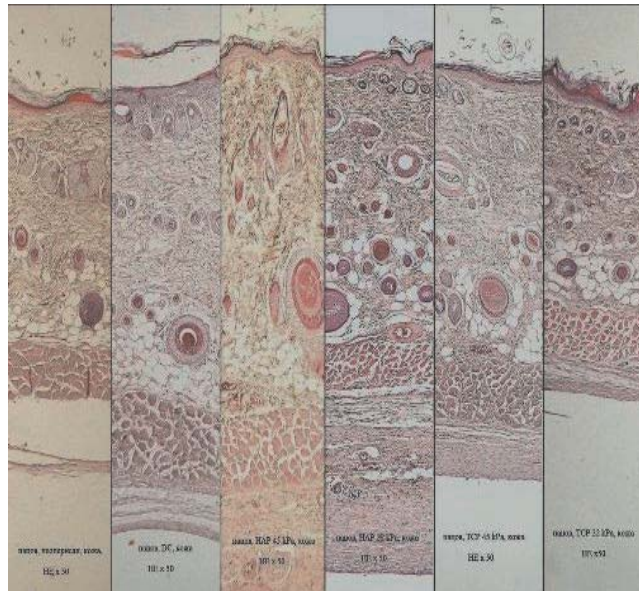
Ovakvo povezivanje ćelija u okviru ECM potpomognuto je preko integrinskih receptora i na taj način je ostvarena kontrola ćelijskog rasta putem mehaničkih sila koje menjaju oblik ćelije vršeći pritisak na citoskelet (Ingber, 2002). Integrinski receptori na površini ćelije olakšavaju ćelijsko pričvršćivanje za supstrate, a posebno one obložene sa ekstracelularnim proteinima fibronektinom i vitronektinom (Schoen, 2004). Ovi receptori prenose biohemijske signale do jedra aktivacijom istih intracelularnih signalnih puteva koje koriste receptori za faktore rasta. Sposobnost proliferacije direktno zavisi od stepena fizičke raširenosti, a ne od aktuelne površine za vezivanje supstrata. Karakteristike sastava i oblika površinski vezanog ECM za supstrat i svojstva supstrata mogu regulisati interakcije ćelija sa biomaterijalom. Kruti supstrati olakšavaju ćelijsko širenje i rast u



prisustvu solubilnih mitogena. Suprotno tome, fleksibilni skeleti, koji ne mogu pružati otpor citoskeletnim silama, pospešuju ćelijsku retrakciju, inhibišu rast, a pospešuju diferencijaciju (Ingber, 2002).

Lokalne interakcije tkiva sa biomaterijalima dešavaju se na mestu kontakta tkiva sa biomaterijalom i odnose se na efekte materijala na tkiva domaćina i njihovo povezivanje; moguće zapaljenje, moguću toksičnost materijala, probleme u zarastanju rane, infekcije ili mogućnost tumorogeneze. Tkivo, takođe deluje na materijal preko fizičkih efekata (habanje, zamor, korozija, stres-korozivno lomljenje) i bioloških efekata (adsorpcija tkivnih komponenata na implantat, enzimska razgradnja, kalcifikacija) (Shoen, 2004).

Sistemske interakcije tkiva sa biomaterijalima odnose se na opšte reakcije organizma na prisustvo stranog tela. One obuhvataju veliki broj reakcija, od kojih su najvažnije: 1) tromboembolijske reakcije; 2) alergijske reakcije ili reakcije hipersenzibiliteta; 3) povećanje nivoa implantnih elemenata u krvi; i 4) transport implantatnih čestica limfotokom (Shoen, 2004).



Slika 2. Uporedni prikaz kompletnog preseka kože i potkožnih tkiva oko implantata od različitih biokeramičkih materijala

*K* – kontrolna neoperisana životinja; *DC*, *HAP45*, *HAP22*, *TCP45*, *TCP22* – životinje sa implantatima;

*ed* – epidermis; *d* – dermis, *hd* – hipodermis; *km* – kutani mišić, *vkm* – vezivno tkivo ispod kutanog mišića, *c* – kapsula

Figure 2. Comparative figures of complete section of skin and subcutaneous tissue around implants made of different bioceramic materials

*K* – control unoperated animal; *DC*, *HAP45*, *HAP22*, *TCP45*, *TCP22* – animals with implants;

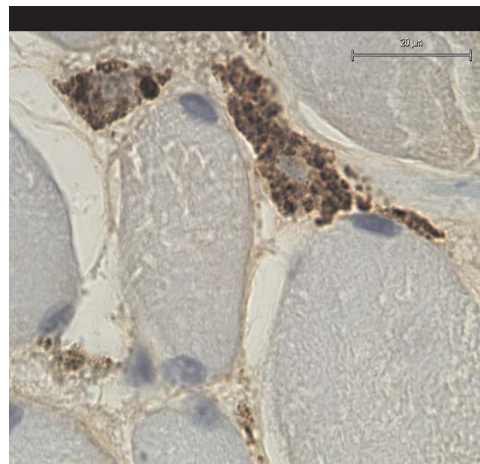
*ed* – epidermis; *d* – dermis; *hd* – hypodermis; *km* – cutaneous muscle, *vkm* – connective tissue under cutaneous muscle, *c* – capsule

Pridružene komplikacije interakcija tkiva sa biomaterijalima su prateći elementi ugradnje biomaterijala i predstavljaju mešavinu lokalnih i sistemskih reakcija, koje se mogu pažljivom pripremom i odgovarajućim preventivnim merama svesti na minimum. Najčešće se u praksi susreću sledeće komplikacije: tromboza i/ili tromboembolija; infekcija; neadekvatno zarastanje rane; odbacivanje biomaterijala; sporedne lokalne tkivne reakcije; i sporedni sistemski efekti (Shoen, 2004).

Ćelije u interakciji sa biokeramikom detektovane skening elektronskom mikroskopijom u našem istraživanju ukazuju na adherirane elemente vezivnog tkiva sa приметnim strukturama kolagenih vlakana i ćelijama koje odgovaraju morfologiji fibrocita, limfocita, makrofaga i džinovskih ćelija (Marković, 2009a).

### **Inflamacija i imunološki odgovor / *Inflammation and immunological response***

Specifičan odgovor na strano telo vidno se razlikuje nakon implantacije različitih biokeramičkih materijala i analizira se na histološkim uzorcima (slika 2). Takve specifičnosti su posledica imunološkog odgovora koji počinje stadijumom zapaljenja ili inflamacije, nastavlja se u stadijum zarastanja rane sa učešćem raznih tipova ćelija kao specifičnih indikatora u kojoj fazi oporavka se tkivo nalazi (Todorović, 2008). Neutrofili i mononuklearne ćelije neposredno, nakon adhezi-onih proteina, infiltriraju kontaktne površine tkivo-material i pridružuju se akutnom zapaljenju. Već nakon petog-šestog dana ovu ćelijsku postavku udruženu sa edemom tkiva, narušenim integritetom vlakana, i promenama na nivou vaskularne mreže smeniće hronično zapaljenje praćeno smanjenjem broja neutrofila i pojavom monocita koji adheriraju na površinu implantata i diferenciraju se u makrofage. Limfociti takođe postaju dominantni tokom hronične faze zapaljenja. Ukupan broj inflamatornih ćelija opada sa smanjenjem zapaljenskog procesa, dok proces zarastanja rane ide ka stvaranju granulacionog tkiva i fibrozne inkapsula-



Slika 3. CD68+ ćelije u koži i potkožnom tkivu pacova sa implantatom oko trikalcijumfosfata-TCP  
Imunohistohemija, IHH, x100.  
Zreli makrofazi oko mišićnih vlakana

*Figure 3. CD68+ cells in skin and subcutaneous tissue of rat with implant around tricalciumphosphate - TCP  
Immunohistochemistry, IHH, x100.  
Mature macrophage around muscle fibres*



cije implantiranog materijala. Mada je formiranje ove kapsule oko stranog tela korisno za implantat, ćelije već adherirane na njegovoj površini mogu u nekim okolnostima prouzrokovati disfunkciju biomaterijala. Ove adherentne ćelije sastoje se od transformisanih monocita u makrofage (slika 3), koji se mogu spojiti u gigantske multinuklearne ćelije, koje koncentrišu degradaciona i fagocitna svojstva težeći da dovedu do fizikohemijskih i strukturnih oštećenja implantata (Saidan i sar., 2003; Schilling i sar., 2004; Rouahi i sar., 2006; Vallés i sar., 2008).

### **Zaključak / Conclusion**

Kalcijumfosfatni biomaterijali (DC/dentalna keramika,  $\alpha$ -TCP/trikalcijumfosfat i HAP/hidroksiapatit) obrađeni skrining testom pokazuju različite stepene biokompatibilnosti, ali su sve vrednosti dobijene proverom iritacionog indeksa u granicama dozvoljenim standardom i ne dovode do oštećenja tkiva, pa su pogodni za različite kliničke upotrebe u veterinarskoj i humanoj medicini.

U naučno istraživačkom radu i industriji implantata teži se razvijanju brojnih metoda kojima se na minimum svodi korišćenje životinja u eksperimentima. Zbog toga se biokompatibilnost materijala određuje brojnim *in vitro* tehnikama kao i sve razvijenijim matematičkim modelovanjem. Ipak u pretkliničkoj proceni reakcije tkiva i organizma na ugrađeni implantat, histološke karakteristike reakcije tkiva su nezaobilazan korak koji mora da da definitivnu procenu kvaliteta ugrađenog materijala.

### **NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:**

Ovaj rad je pripremljen u sklopu projekta 175061. /  
*This work was prepared within Project 175061*

### **Literatura / References**

1. Arinze TL, Tran T, McAlary J, Daculsi G. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cells-induced bone formation. *Biomaterials* 2005; 26: 3631-8.
2. Chazono M, Tanaka T, Komaki H, Fujii K. Bone formation and bioresorption after implantation of injectable b-tricalcium phosphate granules-hyaluronate complex in rabbit bone defects. *Int J Biomed Mat Res* 2004; 70: 542-9.
3. Danilovic V, Krsljak E, Lackovic V. Histological evaluation of odontoblast-like cells response after capping application of calcium hydroxide and hydroxiapatite in dogs pulp. *Acta Vet* 2007; 6: 573-84.
4. Durucan C, Brown PW.  $\alpha$ -Tricalcium phosphate hydrolysis to hydroxyapatite at and near physiological temperature. *J Mater Sci Mater Med* 2000; 11: 365-71.
5. Guo X, Zheng Q, Kulbatski I, Yuan Q, Yang S, Shao Z, Wang H, Xiao B, Pan Z, Tang S. Bone regeneration with active angiogenesis by basic fibroblast growth factor gene transfected mesenchymal stem cells seeded on porous  $\beta$ -TCP ceramic scaffolds. *Biomed Mater* 2006; 1: 93-9.

6. Hsu YH, Turner IG, Miles AW. Mechanical characterization of dense calcium phosphate bioceramics with interconnected porosity. *J Mater Sci Mater Med* 2007; 18: 2319-29.
7. Ingber DE. Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Cir Res* 2002; 91: 877-87.
8. Janačković Đ, Janković I, Petrović R, Kostić-Gvozdenović LJ, Milonjić S, Uskoković D. Surface properties of HAP particles obtained by Hydrothermal decomposition urea and calcium-EDTA chelates. *Key Engineering Materials* 2003; 240: 437-40.
9. Jensen SS, Broggini N, Hjørtting - Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and b-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Impl Res* 2006; 17: 237-43.
10. Jokić B, Janković-Castvan J, Veljović Đ, Bučevac D, Obradović-Đuričić K, Petrović R, Janačković Đ. Synthesis and settings behaviour of  $\alpha$ -TCP from calcium deficient hydroxyapatite obtained by hydrothermal method. *J Optoelect Adv Mater* 2007; 9: 1904-10.
11. Kovacević-Filipović M, Petakov M, Hermitte F, Debeissat C, Krstic A, Jovcic G, Bugarski D, Lafarge X, Milenkovic P, Praloran V, Ivanovic Z. Interleukin-6 (IL-6) and low O-2 concentration (1%) synergize to improve the maintenance of hematopoietic stem cells (Pre-CSF). *J Cell Physiol* 2007; 212 (1): 68-75.
12. Kovačević-Filipović M, Radovanović A, Francuski J, Božić T. Matične ćelije – fiziološke osnove kliničke primene, Zbornik predavanja XXXIII Seminara za inovacije znanja veterinarara, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, 18. februar 2011, 79-93.
13. Kovačević-Filipović M, Michel Jeanne, Sizporta M, Vlaski M, Lafarge X, Duchez P, Boiron JM, Praloran V, Ivanovic V. Pozitivan efekat hipoksije i hiperkapnije na kratkotrajnu konzervaciju (4°C) CD34+ ćelija iz produkata cifafereze. XIII Hematološki dani "Transplantacija izazov ili neophodnost". Kragujevac, 26. 11. 2008.
14. Le Nihouannen DL, Duval L, Lecomte A, Julien M, Guicheux J, Daculsi G, Layrolle P. Interactions of total bone marrow cells with increasing quantities of macroporous calcium phosphate ceramic granules. *J Mater Sci Mater Med* 2007; 18: 1983-90.
15. Macchetta A, Turner IG, Bowen CR. Fabrication of HA/TCP scaffolds with a graded and porous structure using a camphene-based freeze-casting method. *Acta Material* 2009 (in press); DOI: 10.1016/j.actbio.2008.11.009.
16. Malard D, Guicheux J, Bouler JM, Gauthier O, de Montreuil CB, Aquado E, Pilet P, LeGeros R, Daculsi G. Calcium phosphate scaffold and bone marrow reconstruction in irradiated area: a dog study. *Bone* 2005; 36: 323-30.
17. Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng* 2007; 13: 947-55.
18. Marković D, Kojić Z, Marinković D, Danilović V, Radovanović A, Janačković Đ. Histological and immunohistochemical evaluations of rat soft tissue response to bioceramical implants. *Acta Veterinaria* 2009a; 59(2-3): 231-43.
19. Marković D, Kojić Z, Todorović V, Mičić M, Manojlović-Stojanoski M, Roksandić D, Aleksić-Kovačević S, Janačković Đ. The using of animal model in histological

- investigation to biocompatibility of bioceramical materials implanted in subcutis. Osmi kongres veterinarara Srbije (sa međunarodnim učešćem), Veterinarska medicina, život i zdravlje. Beograd, 15-19. septembar, 2009b.
20. Marković D, Kojić Z, Todorović V, Lačković V, Petrović V, Stojanović D, Janačković Đ. The using of histological techniques in screening test evaluations at biocompatibility to bioceramical implants. The first International Symposium of clinical and applied Anatomy. Novi Sad, 17-19. septembar, 2009c.
  21. Marković D, Kojić Z, Todorović V, Manojlović-Stojanoski M, Danilović V, Kuburović G, Radovanović A, Janačković Đ. Angiogenesis following the subcutaneous implantation of bioceramical materials (BCM). The first International Symposium of clinical and applied Anatomy. Novi Sad, 17-19. septembar, 2009d.
  22. Marković D, Kojić Z, Kovačević-Filipović M, Radovanović A, Andrić N, Francuski J, Todorović V. Napredak u veterinarskoj regenerativnoj medicini: mogućnosti korišćenja biomaterijala na bazi kalcijum fosfata na eksperimentalnom modelu pacova. 16. savetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske. Teslić, 01-04 juni 2011: 70.
  23. Ni SCJ. *In vitro* degradation bioactivity and cocompatibility of calcium silicate dimagnesium silicate and tricalcium phosphate bioceramics. J Biomater Appl 2009 (in press).
  24. Ozbas H, Yalitic M, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to composites, composite and amalgam root/end filling materials. Int Endod J 2003; 36: 281-7.
  25. Ratner BD. Background Concepts, in: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (editors), Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. Elsevier, Amsterdam, 2004.
  26. Rouahi M, Champion E, Gallet O, Jada A, Anselme K. Physico-chemical characteristics and protein adsorption potential of hydroxyapatite particles: influence on *in vitro* biocompatibility of ceramics after sintering. Colloids Surf B Biointerfaces 2006; 47: 10-9.
  27. Saidan J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spangberg L. Cell and tissue reaction to mineral trioxide aggregate and portland cement. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003; 95: 483-9.
  28. Saldaña L, Sánchez-Salcedo S, Izquierdo-Barba I, Bensiamar F, Munuera L, Vallet-Regí M, Vilaboa N. Calcium phosphate-based particles influence osteogenic maturation of human mesenchymal stem cells. Acta Biomater 2008; doi: 10.1016/j.actbio.2008.11.022.
  29. Schilling FA, Linhart W, Filke S, Gebauer M, Schinke T, Rueger JM, Amling M. Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. Biomaterials 2004; 25: 3963-72.
  30. Schoen FJ, Mitchell RN. Tissue, the extracellular matrix, and cell-biomaterial interactions. In: Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (editors). Elsevier, Amsterdam, 2004.
  31. Šupova M. Problem of hydroxyapatite dispersion in polymer matrices: a review. J Mater Sci Mater Med 2009 (in press); DOI: 10.1007/s10856-009-3696-2.
  32. Todorović V, Peško P, Micev M, Bjelović M, Mičić M, Brašanac D, Ilić-Stojanović O. Insulin-like growth factor-1 in wound healing of rat skin. Res Pept 2008; 150: 7-13.

33. Valles G, Gonyalez-Melendi P, Gonzalez-Carrasco JLI, Saldana L, Sanchez-Sabate E, Munuera L, Vilabba N. Differential inflammatory macrophage response to rutile and titanium particles. *Biomaterials* 2006; 27: 5199-211.
34. Vitala R, Franklin V, Green D, Liu C, Lloyd A, Tighe B. Towards a synthetic osteo-odontokeratoprosthesis. *Acta Biomater* 2009; 5: 438-52.
35. Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Martin I, Freed LE. Bioreactor studies of native and tissue engineered cartilage. *Biorheology* 2002; 39: 259-68.
36. Williams DF. Analysis of soft tissue response to biomaterials (Chapter 4). In: *Technique of Biocompatibility Testing*. Williams DF (editors). Boca Raton, Florida: CRC Press 1986; 84-115.
37. Xu J, Khor KA, Sui J, Zhang J, Tan TL, Chen WN. Comparative proteomics profile of osteoblasts cultured on dissimilar hydroxyapatite biomaterials: an iTRAQ-coupled 2-D LC-MS/MS analysis. *Proteomics* 2008; 8: 4249-58.
38. Zaffe D, Lehissa GC, Pradelli J, Boticelli AR. Histological study on sinus lift grafting by fysiograf and BIO-DSS. *J Mater Sci Mat Med* 2005; 16: 789-93.
39. Zerbo IR, Bronckers ALJ, de Lange G, Burger EH. Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous (beta)-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials* 2005; 26: 1445-51.
40. Zhang Z, Kurita H, Kobayashi H, Kurashina K. Osteoinduction with HA/TCP ceramics of different composition and porous structure in rabbits. *Oral Sci Int* 2005; 2: 85-95.

**ENGLISH**

**HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SOFT TISSUE AFTER IMPLANTING  
BIOCERAMICAL MATERIALS AND ESTIMATION OF BIOCOMPATIBILITY**

**Danica Marković, Anita Radovanović, Milica Kovačević-Filipović,  
Jelena Francuski, Vera Todorović**

Histological evaluations of soft tissue reactions in implanted biomaterials is a long established method of investigating their biocompatibility. It is a very important procedure convenient for various biomaterials, as appropriate for soft as for hard tissue, but at the same time this method is not sufficient for a prediction of their clinic performance. The wide spread practice of this method is in the simplicity of its use in subcutaneous or intramuscular implantations on the animal model, and consequently exploring principal and surrounding tissue is very simple with screening tests for estimating the irritation index and interaction between tissue and biomaterials.

The screening tests (evaluation tests) involve implantation of biomaterials in various locations in the body, different tissue treatment as immunohistochemical tissue analysis, transmissional, scanning and confocal microscopy.

Interactions among soft tissue with bioceramics and the evaluation of their cellular and tissue performance in inflammation and immunological response are the first step in the estimation of biocompatibility.

Key words: bioceramics, biocompatibility, histology, regenerative medicine

**ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕАКЦИИ МЯГКИХ ТКАНЕЙ НА ИМПЛАНТИРОВАННЫЙ БИОКЕРАМИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ И ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ**

**Даница Маркович, Анита Радованович, Милица Ковачевич-Филипович, Елена Француски, Вера Тодорович**

Гистологическое испытание реакции мягких тканей в отношении биоматериала давно установленный метод оценивания биосовместимости. Это одновременно и очень важный метод, применяемый на все формы биоматериала, либо назначены для контакта с мягкой тканью или нет, но и метод, имеющий ограниченное значение для предвидения клинических производительностей. Распространённость пользования этого метода и происходит из факта, что подкожная или внутримышечная имплантация потенциального биоматериала на животных простая, а дальнейшие испытания реакции основной и соседних тканей в принципе простой скрининг тест для определения ирритации тканей интеракции тканей и биоматериала.

Скрининг техники (тесты оценивания) включают имплантацию материала на различных локализациях, словно и различные способы обработки тканей, применение иммуногисто-химических методов крашения трансмиссионной, скенинг и конфокальной микроскопии и применение других софистицированных методов в обработке и интерпретации данных.

Интеракция мягкой ткани с биокерамикой и оценка тканевого и клеточного показа в процессе инфламации и иммунологическом ответе первый шаг в определении их биосовместимости.

Ключевые слова: биокерамика, биосовместимость, гистология, регенеративная медицина