

REGENERACIJO MOJA...

REGENERATIVNA MEDICINA I TKIVNI INŽENJERING U ORTOPEDIJI

Piše: doc. dr. sc. Alan Ivković, dr. med, specijalist ortopedije
 Odjel za ortopediju, KB Sveti Duh, Zagreb
 Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci

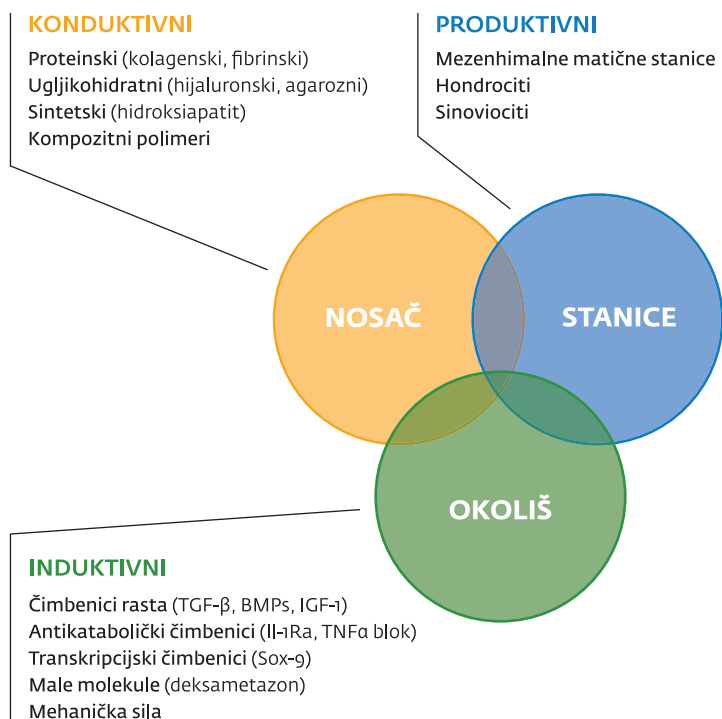
Mitska ptica Feniks ima životni vijek od 500 do 1000 godina, a pred kraj životnog ciklusa gradi gnijezdo od suhih grančica. Ptica i gnijezdo se potom u velikom plamenu pretvaraju u pepeo, da bi iz njega nastao mladi Feniks koji započinje novi životni ciklus. Ovaj mit nalazimo u svim drevnim kulturama od Perzije do Rima i Egipta, a sveprisutan je i u modernoj civilizaciji kao motiv u djelima Williama Shakespearea, D. H. Lawrencea, Mozarta, Queena i DJ Tiësta. Sličan primjer nalazimo i u grčkoj mitologiji gdje zbog prevare Zeus stavlja Prometeja u neprobojne okove na brdu Kavkaz i šalje orla Etona koji mu ključa jetru. Jetra se svakoga dana obnavlja, a Prometejeve muke se nastavljaju sve dok ga ne oslobađa Heraklo izvršavajući svoje zadatke. Univerzalna simbolika ponovnog rađanja i besmrtnosti nema samo religijsku, filozofsku ili umjetničku konotaciju već i vrlo čvrsto uporište u suvremenoj medicini, a granu koja se bavi proučavanjem i primjenom principa regeneracije tkiva i organa nazivamo regenerativnom medicinom. Radi se o interdisciplinarnom području u kojem se koriste najsuvremenija dostignuća iz područja molekularne i stanične biologije, kemije, kliničke medicine, inženjeringa i znanosti o materijalima, a s osnovnim ciljem uspostavljanja i kontroliranja prirodnih procesa cijeljenja koji u konačnici rezultiraju regeneracijom oštećenih tkiva i organa. Prvi puta je termin regenerativna medicina upotrebljen, ne tako daleke, 1992. godine, u članku Lelanda Kaisera o tehnologijama budućnosti i njihovom utjecaju na poslovanje bolnica (1). Iako se radi o sasvim novom području, već je sada jasno kako su principi regenerativne medicine iz temelja promijenili naše poimanje moderne medicine.

Napredak u primjeni regenerativnih principa dramatično je utjecao na različita područja kliničke medicine poput kardiologije i dijabetologije, no ortopedija se pojavljuje kao jedna od najatraktivnijih grana za primjenu regenerativne medicine i tkivnog inženjeringa. Trauma, bolesti i malformacije mišićno-koštanog sustava često dovode do strukturalnih oštećenja hrskavice, kostiju i mišića, uzrokujući bol i nesposobnost milijuna ljudi širom naše planete. Procjenjuje se kako se samo u SAD-u godišnje obavi preko 450.000 transplantacija koštanih presađaka te ugradi 250.000

Regenerativna medicina je interdisciplinarno područje u kojem se koriste najsuvremenija dostignuća iz područja molekularne i stanične biologije, kemije, kliničke medicine, inženjeringa i znanosti o materijalima.

totalnih endoproteza koljena, a zbog starenja populacije predviđa se da će ova brojka u budućnosti samo rasti (2).

Osnovni koncept regenerativne ortopedije temelji se na razumijevanju i preciznom usklađivanju međuodnosa tri osnovne sastavnice ovog područja: stanica, okoline i nosača (tzv. regenerativni trijas) (Slika 1). Stanice su temeljne biološke jedinice koje upravljaju svim procesima regeneracije tkiva, okolina sadržava različite bioaktivne signale (faktore rasta, transkripcijske faktore, male molekule, mehaničku silu) koji moduliraju stanični odgovor, a trodimenzionalni nosači služe kao privremena 'skela' (engl. *scaffold*) koja sadržava i orijentira stanice na samom mjestu oštećenja.



SLIKA 1. Shematski prikaz međuodnosa tri osnovne sastavnice regenerativne ortopedije: stanice su produktivni, okolina induktivni, a nosači konduktivni dijelovi ovog sustava



SLIKA 2. Regeneracija hrskavice genskom terapijom (animalni model ovce)

(a) Prilagođenim instrumentima načinjeno je hrskavično oštećenje na medijalnom kondilu femura ovce (b) Oštećenje je isključivo hrskavično bez zadiranja u subhondralnu kost (c) Autologna koštana srž dobivena punkcijom ilijačne kosti miješa se s adenoviralnim vektorom koji nosi gen za kodiranje TGF- β 1 (d) Genetski modificirana koštana srž se zgrušava (e) Implantacija genski promijenjenog ugruška u oštećenje (f) Ugrušak je na mjestu, slijedi šivanje zgloba

Stanice

U regenerativnoj ortopediji koristimo se dvjema osnovnim vrstama stanica: diferenciranim i matičnim stanicama. Diferencirane stanice proizvode samo specifičnu vrstu tkiva i u ortopediji se najčešće koriste u postupku tzv. autologne transplantacije hondrocita. Matične stanice su prema definiciji nespecializirane stanice koje imaju sposobnost samoobnavljanja, odnosno stvaranja identičnih kopija, te koje se, pod određenim uvjetima, mogu diferencirati u terminalne stanice specifične za određeni organ ili tkivo. Upravo zbog tih svojstava matične stanice predstavljaju idealnu platformu za razvoj i primjenu metoda regenerativne medicine i tkivnog inženjeringa. Termin 'matične stanice' danas se vrlo često nekritički koristi (osobito u medijima) te je za njihovu uspješnu upotrebu nužno poznavati razliku između određenih vrsta matičnih stanica. Ključna je podjela na **embrionalne matične stanice** (EMS) i **adultne ili postnatalne matične stanice** (AMS).

Embrionalne matične stanice prvi je put iz unutrašnjeg sloja stanica mišjeg embrija izolirao nobelovac sir Martin Evans još daleke 1981. godine, dok je za izolaciju humanih EMS trebalo čekati do kraja 90-ih (3,4). Ove stanice su istinski pluripotentne i barem teoretski se mogu diferencirati u stanice podrijetla sva tri zametna listića. Iako se čini da su idealne za potrebe regenerativne medicine, postoji čitav niz etičkih i praktičnih problema koji značajno usporavaju i otežavaju njihovu upotrebu. Tako se primjerice postavlja pitanje je li etički ispravno koristiti stanice ljudskih embrija koji ostaju kao višak nakon postupka umjetne oplodnje u svrhu istraživanja ili liječenja. Praktičniji problemi su vezani za mogućnost nastanka

tumora te na potencijalnu imunološku nepodudarnost. Iako se čini kako su ovi problemi nerješivi, nedavno senzacionalno otkriće japanskog ortopeda i znanstvenika Saita Yamanake i njegovog tima, zauvijek bi moglo promijeniti način na koji razmišljamo o matičnim stanicama. Uz pomoć genskog transfera četiri transkripcijska faktora (Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc) on je uspio reprogramirati fibroblast kože da postane pluripotentna matična stanica! Ove stanice se nazivaju inducirane pluripotentne matične stanice (ips) i u potpunosti bi mogle zamijeniti embrionalne, kako u istraživanju tako i u terapijskoj primjeni (5).

Adultne ili postnatalne matične stanice izoliraju se iz organizma pojedinca nakon rođenja, i iako imaju puno manji diferencijacijski potencijal, imaju puno više prednosti kada je u pitanju njihova primjena u regenerativnoj medicini. U ortopediji se najviše koriste mezenhimalne matične stanice koje se pod određenim biološkim uvjetima mogu diferencirati u bilo koje tkivo mišićno-koštanog sustava (osteoblaste, hondrocite, adipocite itd.) (6).

Okolina

Bioaktivni signali iz okoline moduliraju i usmjeravaju stanični odgovor i na taj način kontroliraju regenerativne procese oštećenih tkiva. Najčešće korišteni bioaktivni signali spadaju u grupu faktora rasta pa tako za stimulaciju koštane regeneracije koristimo primjerice koštane morfo-genetske proteine (npr. BMP-2 i BMP-7 koji su za sada jedini komercijalno dostupni za primjenu u klinici), dok se za hrskavičnu regeneraciju često koriste TGF- β ili IGF-1 (Slika 2) (7). S obzirom na

činjenicu kako se transkripcijski faktori vežu za promotore koji kontroliraju ekspresiju određenih gena i na taj način reguliraju stanični fenotip, njihova upotreba u regenerativnoj ortopediji dobiva sve veći značaj. Tako je primjerice Runx2 ključan transkripcijski faktor koji kontrolira diferencijaciju osteoblasta, dok je tzv. Sox trio (Sox-5, -6 i -9) važan za čitav niz koraka koji se odvijaju tijekom hondrogeneze. Od ostalih važnih bioaktivnih signala valja izdvojiti djelovanje mehaničke sile te primjenu malih molekula (npr. steroida).

Nosači

Nosači predstavljaju trodimenzionalne biokompatibilne strukture čija je osnovna funkcija omogućiti prijanjanje stanica koje potom sintetiziraju ekstracelularni matriks koji postupno zamjenjuje nosač koji se resorbira (8). Idealan nosač za primjenu u ortopediji mora biti biokompatibilan, njegovi razgradni produkti ne smiju biti toksični

za tkivo i mora imati dobre biomehaničke osobine. Osim toga, idealan nosač mora biti porozan kako bi se stanice mogle ravnomjerno rasporediti unutar samoga nosača te kako bi se nesmetano mogla odvijati difuzija hranjivih tvari. Također, nosač bi trebao biti jednostavan za proizvodnju, rukovanje i skladištenje kako bi se olakšala njegova primjena. Iako su mnogi materijali upotrebljeni za izradu nosača u ortopediji, osnovna podjela je na prirodne, sintetske i mješovite. U prirodne materijale za izradu nosača spadaju kolagen, hialuronska kiselina, fibrin, kitosan i sl., i odlikuje ih odlična biokompatibilnost, ali i slabije biomehaničke osobine. S druge strane, sintetski materijali poput polilaktične kiseline, hidroksiapatita ili teflona imaju izvanredne biomehaničke osobine, no nešto slabiju biokompatibilnost. S obzirom na to kako se pojedina tkiva mišićno-koštanog sustava međusobno znatno razlikuju, nemoguće je dizajnirati univerzalan nosač koji bi bio pogodan za sve namjene (Slika 3). Dizajn nosača je stoga potrebno prilagoditi biološkim i strukturalnim osobinama tkiva koje regeneriramo.

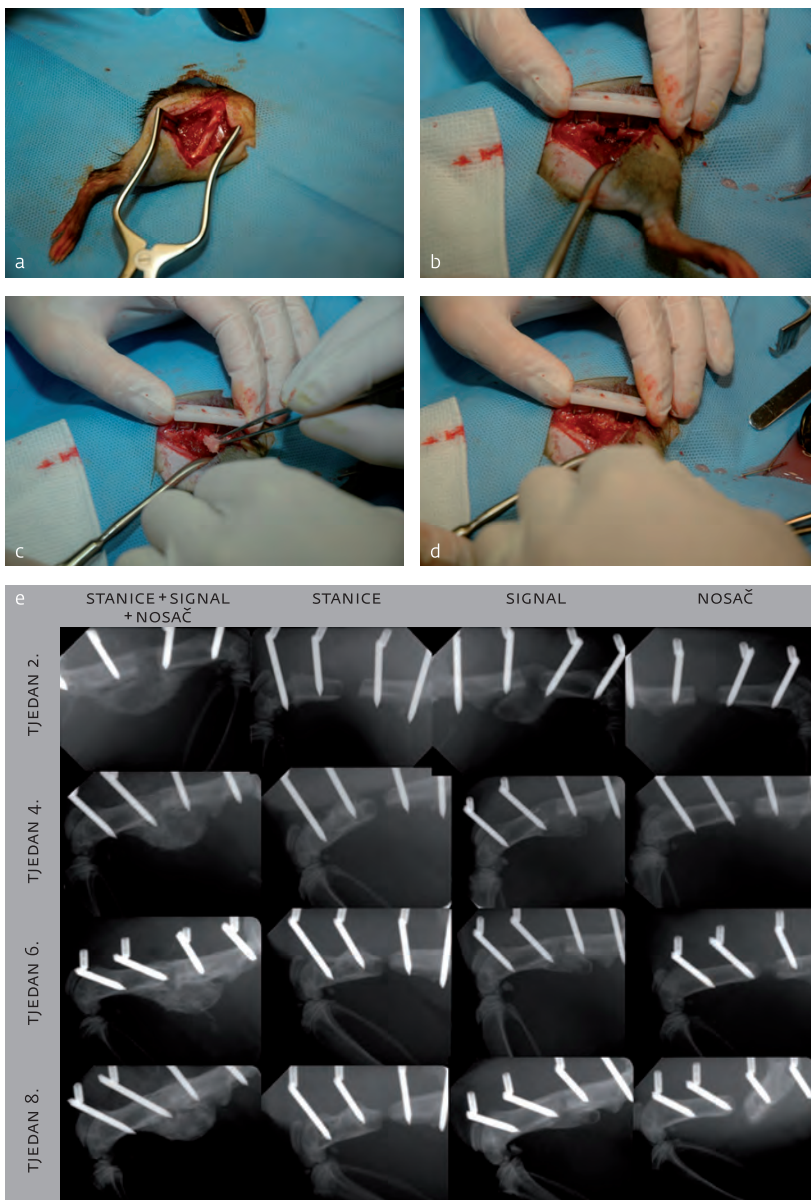
Potencijal za kliničku translaciju

Napredak kirurških tehnika, kao i inovacije na području primjene novih materijala, revolucionarizirale su ortopediju. Ugradnja umjetnih zglobova (endoproteza), kao i primjena modernih osteosintetskih implantata najočitiji su primjeri ove tvrdnje. Iako je nedvojbeno kako su ova rješenja značajno unaprijedila i spasila mnoge živote, ona nisu bez ograničenja. Umjetni materijali ne mogu u potpunosti obnoviti biološku funkciju, niti mogu stvoriti prirodno biološko okruženje oštećenog tkiva. Veliki napredak temeljnih znanosti u području regenerativne medicine i tkivnog inženjeringa otvara velike mogućnosti za adekvatno

Osnovni koncept regenerativne ortopedije temelji se razumijevanju i međusobnom usklađivanju regenerativnog trijasa – stanica, okoline i nosača.

rješavanje čitavog niza izazova iz kliničke prakse. Stoga je i prelazak iz 'laboratorija do bolesničkog kreveta' (engl. *from bench to bedside*), odnosno *translacija* – ključan, no često i vrlo kompliciran korak u primjeni ovih tehnologija. Upravo je nevjerojatan nesrazmjer između velikog broja kreativnih i uspješnih temeljnih istraživanja i vrlo malog broja kliničkih istraživanja koja iz njih proizlaze. Razlozi za ovakvo stanje su brojni i uključuju kompliciranu logistiku potrebnu za primjenu ovih metoda u klinici (izolacija stanica, njihovo umnožavanje u laboratoriju i sl.), skupu proizvodnju modernih biokompatibilnih nosača, enormne regulatorne prepreke te velika cijena samih kliničkih istraživanja.

Danas se u ortopediji rutinski koristi samo autologna transplantacija hondrocita (ATH) za liječenje lokaliziranih oštećenja zglobne hrskavice.



SLIKA 3. Regeneracija koštanog tkiva upotrebom mezenhimalnih matičnih stanica, gela-tinskog nosača i rhBMP-2

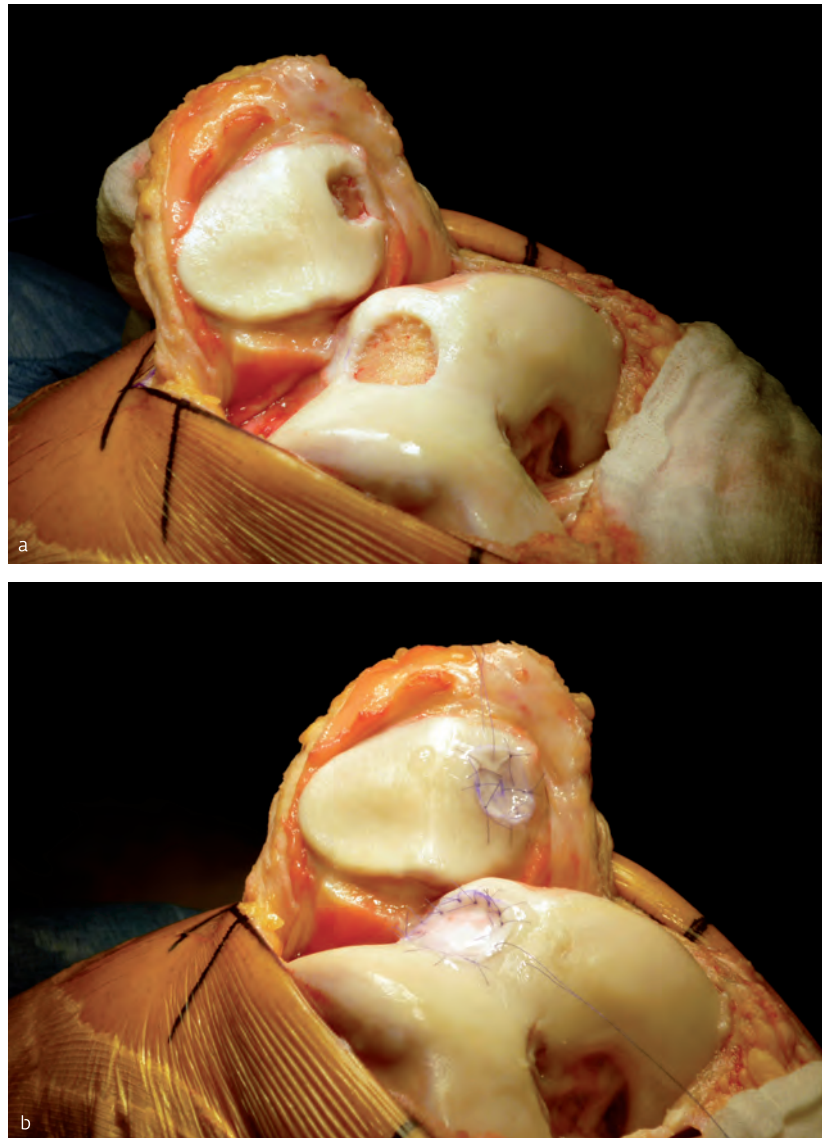
(a) Kritični koštani defekt (ne cijeli samostalno) na modelu imunodeficientnog štakora (b) Stabilizacija defekta vanjskim fiksatorom (c) Implantacija konstrukta (d) Rana prije zatvaranja (e) RTG različitih pokusnih grupa pokazuju najbolje cijeljenje u grupi tretiranoj sa svim sastojcima regenerativnog trijasa (stanice, nosač, signal)

Metoda se temelji na uzimanju uzorka hrskavice iz zgloba pacijenta u prvom aktu, a koja se potom šalje u laboratorij gdje se izoliraju i umnažaju hondrociti. Potom se u drugom aktu takvi hondrociti transplantiraju u samo oštećenje (Slika 4). Originalna metoda je opisana 1994., od tada do danas je doživjela čitav niz poboljšanja, tako da danas koristimo tzv. treću generaciju АТН-a kod koje se hondrociti stavljaju na kolagenski nosač koji se fibrinskim ljepljivom fiksira u samo

Danas se u ortopediji rutinski koristi samo autologna transplantacija hondrocita (АТН) za liječenje lokaliziranih oštećenja zglobne hrskavice.

oštećenje (9). Na pomolu je i četvrta generacija АТН-a gdje se umjesto hondrocita koriste mezenhimalne matične stanice, a nosači su impregnirani bioaktivnim molekulama koje potiču hondrogenezu. Za regeneraciju koštanog tkiva danas su za upotrebu u kliničkoj praksi odobrene dvije molekule (BMP-2 i BMP-7), a ohrabrujući su i rezultati prvih kliničkih studija kojima je testirana primjena hidroksiapatitnog nosača u kombinaciji s mezenhimalnim matičnim stanicama za cijeljenje oštećenja dugih kostiju. Nedavno je i grupa s njujorškog sveučilišta Columbia proizvela potpuno funkcionalan, anatomski oblikovan temporomandibularni zglob kultivacijom mezenhimalnih matičnih stanica u bioreaktoru (10).

Na kraju ovog pregleda treba istaknuti kako regenerativna medicina i tkivni inženjering iz temelja mijenjaju lice medicine 21. stoljeća i nakon početnih 'dječjih bolesti' ulaze u svoju zrelu fazu čime postaju dio svakodnevice modernih odjela i operacijskih sala širom naše planete.



SLIKA 4. Autologna transplantacija hondrocita

(a) Hrkavične lezije na pateli i trohleji koljena nakon debridementa, neposredno prije transplantacije hondrocita (b) Isto koljeno nakon transplantacije hondrocita. Oštećenja su prekrivena kolagenskom membranom ispod koje se nalazi suspenzija autolognih hondrocita

LITERATURA

- 1) Kaiser LR. The future of multihospital systems. *Topics in Health Care Financing* 1992;18(4): 32-45.
- 2) Laurencin CT, Khan Y, Kofron M, El-Amin S, Botchwey E, Yu X, Cooper Jr. JA. The ABJS Nicolas Andry Award: Tissue engineering of bone and ligament: a 15-year perspective. *Clin Orthop Relat Res.* 2006;447:221-36.
- 3) Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819):154-6.
- 4) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282(5391):1145-7.
- 5) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126(4):663-76.
- 6) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143-7.
- 7) Ivkovic A, Pascher A, Hudetz D, Maticic D, Jelic M, Dickinson S, Loparic M, Haspl M, Windhager R, Pecina M. Articular cartilage repair by genetically modified bone marrow aspirate in sheep. *Gene Ther.* 2010;17(6):779-89.
- 8) Bonzani IC, George JH, Stevens MM. Novel materials for bone and cartilage regeneration. *Curr Opin Chem Biol.* 2006;10(6):568-75.
- 9) Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1994;331(14):889-95.
- 10) Grayson WL, Frohlich M, Yeager K, Bhumiratana S, Chan ME, Cannizzaro C, Wan LQ, Liu XS, Guo XE, Vunjak-Novakovic G. Engineering anatomically shaped human bone grafts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(8):3299-304.