

## Farklı implant materyalleri üzerinde osteoblasta farklılaştırılmış kemik iliği stromal kök hücrelerinin (KİSKH) kemik tamirindeki rolü

The bone repair role of bone marrow stromal cells (BMSC) differentiated to osteoblast on the different implant materials

Özdal Kurt F<sup>1</sup> Vatansever H S<sup>2</sup> Tuğlu İ<sup>2</sup> Deliloğlu Gürhan S İ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Manisa, Türkiye

<sup>2</sup>Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

<sup>3</sup>Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir, Türkiye

### Özet

**Amaç:** Doku mühendisliği yardımı ile materyaller üzerinde kemik iliği stromal kök hücrelerinin etkileşmesinin yeni kemik oluşumuna katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu çalışmada, farklı dolgu materyalleri üzerinde, medyum ile osteoblasta farklılaştırılan kemik iliği stromal kök hücrelerinin, in vivo ortamda kemik yara modeline implantasyonları sonucunda yara iyileşmesindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Erişkin erkek sıçan tibiasından elde edilen kemik iliği hücreleri,  $\alpha$ -MEM, %10 fetal bovine serum, penisilin, streptomisin ve gentamisin içeren kontrol besi ortamında (KBO) üç farklı dolgu materyalleri olan Cellulose Tip I (BM1), Cellulose Tip II (BM2) ve Gelatine (BM3) üzerinde kültüre edildi. Yüzeye tutunmayan hücreler besi ortamının alınmasıyla uzaklaştırıldı ve materyal yüzeyine tutunmuş olan hücreler deksametazone,  $\beta$ -gliserofosfat ve askorbik asit içeren osteoblastik besi ortamı (OBO) ile inkübe edildi. Farklılaşan hücreler, osteonektin (ON) ve osteokalsin (OK) markırları ile osteoblasta dönme yetenekleri, vonkossa (VK) ve alkalen fosfataz (ALP) aktiviteleri ile kemikleşme ve mineralizasyon kapasiteleri saptandı. Tamirdeki etkinlikleri histolojik ve morfometrik yöntemle araştırıldı.

**Bulgular:** Değişik materyaller üzerinde farklılaşan hücrelerin adhesyon, çoğalma ve farklılaşma kapasitelerinin arttığı ve biyomateryallerin üzerlerindeki hücreler ile implantasyonları sonrasında deneysel yara bölgesinde daha iyi tedavi yaptıkları bulundu.

**Sonuç:** Kullanılan materyaller ile hücreler arasındaki olumlu etkileşmenin anlaşılması, gelecekte hastaların yaşam kalitesinde bir umut olacak olan doku mühendisliğinin klinik tedavideki önemi için büyük yarar sağlayacaktır.

**Anahtar Sözcükler:** Kemik iliği stromal kök hücre, biyomateryal, osteonektin, osteokalsin, yara iyileşmesi, doku mühendisliği.

### Summary

**Introduction:** It has been thought that tissue engineering could be helpful in the wound healing of the bone by the bone marrow stromal cells (BMSC) on the biomaterials. In this study, the effect of differentiated BMSC on the different biomaterials for in vivo wound healing of experimental bone defect by the implantation will be investigated.

**Materials and Methods:** Bone marrow stromal cells from mature male rat tibia were cultured on the three different (Cellulose Type I, Cellulose type II, Gelatine) biomaterials with culture medium including  $\alpha$ -MEM, 10% foetal bovine serum, penicillin, streptomycin, amphotericin and gentamycine. Nonadhesive cells were removed by medium change and attach cells in the culture were incubated by osteoblastic medium including ascorbic acid, dexamethasone and  $\beta$ -glycerophosphate. The differentiated cells were determined by osteoblastic markers such as osteonectin and osteocalcin and were analyzed by vonkossa and alkalen phosphates for their mineralization and bone formation capacity. Their healing capacity was investigated by the histologic and morphometric methods.

Yazışma Adresi: Feyzan ÖZDAL KURT

Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Manisa, Türkiye

Makalenin Geliş Tarihi : 11.01.2011 Kabul Tarihi : 22.07.2011

**Results:** The capacity of adhesion, proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells was positively enhanced by these biomaterials and implantation of these biomaterials with differentiated cells produced better healing on the experimental bone defect.

**Conclusion:** Understanding of the positive interactions between used biomaterials and cells will be helpful for the importance of tissue engineering on the clinical treatment which will promise a better quality of life for patients in the future.

**Key Words:** Bone marrow stromal cell, biomaterial, osteonectin, osteocalcin, wound healing, tissue engineering.

## Giriş

Kök hücre ve buna bağlı uygulamalar son zamanlarda ortaya çıkan ve tedavide sağlayacağı yararlar nedeni ile büyük önem kazanan yeni bir konudur. Kemik dokusu ise insan ve hayvan yaşamında özellikle kırıklar ve menapoz sonrası osteoporoz gibi patolojik durumlarda, yara tamiri ve iyileşme sürecinde uzun süreli tedavi gerektiren problemlerle bir süreçte yer almaktadır (1). Kemik iliği, hematopoietik ve stromal hücreleri içermektedir. Pluripotent stromal hücreler çeşitli hücrelere, örneğin fibroblastlara, kondrositlere ve adipositlere farklılaşabilmektedir. Bu değişim sürecinde biyomateryallerin *in vivo* ve *in vitro* etkileri avantaj ve dezavantajları ile araştırılarak etkin tedaviye yönelik protokoller aranmaktadır. *In vivo* çalışmalarda kemik iliği stromal kök hücrelerinin (KİSKH) davranışı orada bulunan ve kontrol edilemeyen çevre şartları tarafından düzenlenmektedir. Bu nedenle kontrol edilebilir şartlarda yapılan *in vitro* çalışmalar *in vivo* uygulamalar için önemli bilgiler sağlamaktadır (2).

Son zamanlarda doku mühendisliği alanında geliştirilmekte olan biyomateryal kullanımı ile KİSKH'nin daha aktif ve etkin olarak kemik yara tamirinde kullanılmalarını amaçlayan çalışmalar yapılmaktadır (3). Bu materyallerin fiziksel, kimyasal ve mekanik özellikleri kök hücrelerinin *in vivo* şartlarda davranışını etkilemekte ve iyileşmeyi anlamlı şekilde artırmaktadır (4).

Bu çalışmada sıçan KİSKH'nin kültür ortamında kemik hücrelerine farklılaşma mekanizması incelenecek ve bu mekanizmada rol oynayan faktörlerin hücre davranışını yönlendirmesi araştırılacaktır; ayrıca, kırık tedavisinde üç dolgu materyalinin kemik hücreleri ile etkileşimi karşılaştırmalı olarak incelenecektir. Bu çalışmadan çıkan sonuçların ortopedi alanında kemik yara iyileşmesi uygulamalarına destek olacağı düşünülmektedir.

## Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada 200±50 gr ağırlığındaki Wistar sıçanlar kullanılarak sıçanın femur ve tibiasından KİSKH'leri alınarak besi ortamı içinde toplandı. Bu kültür çalışmaları için beş hayvan kullanıldı. Aynı anneden olma yavrular arasında alınan KİSKH transplante edildi. Femur ve tibianın epifiz hattından yapılan kesiler sonrasında kemik iliği boşluğuna enjektör aracılığı ile uygulanan basınçlı

medyum içersine alınan kemik iliği örneği, santrifüj tüpüne boşaltıldı. Santrifüj tüpü içine alınan kemik iliği pipetlenerek hücre süspansiyonu haline getirildi. Kemik iliği, primer besi ortamı ( $\alpha$ -MEM + %10 fetal bovine serum + penicilin (100U/ml) + streptomisin (100U/ml) + gentamisin (100U/ml) içinde 5 dk. süreyle 1000 rpm'de santrifüj edilerek iki kez yıkandı. Santrifüj sonunda süpernatant dökülerek hücreler primer besi ortamı ile süspansiyon edildi ve ayrıştırmayı takiben biyomateryaller 24 gözlü kültür kaplarında, Cellulose Tip I (BM1), Cellulose Tip II (BM2) ve Gelatine (BM3) üstüne yerleştirildi ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Üçüncü günde besi ortamı değişikliği yapılarak kan hücreleri ve yüzeye tutunmayan hücreler uzaklaştırıldı. Hücre kültüründe çoğaltılan kemik iliği stromal hücrelerinin osteoblast hücrelerine farklılaşması için, üçüncü gün kültür ortamına 50 µg/ml askorbik asit, 10mM  $\beta$ - gliserofosfat ve 10<sup>-8</sup>M deksametazon içeren osteojenik besi ortamı (OBO) ilavesi yapıldı. Kültür kabının yüzeyine yapışan kemik iliği stromal hücrelerinin üremesi inverted mikroskopta gözlenip, fotoğrafları çekilerek OBO içermeyen kontrol besi ortamı (KBO) içindeki hücreler ile karşılaştırıldı. Üremelerine göre 2-3 günde bir hücrelerin besi ortamı değiştirildi (5, 6, 7).

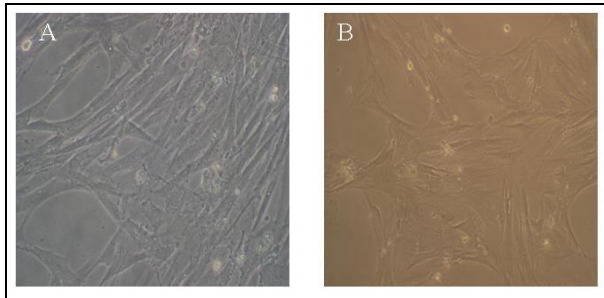
Hücreler konfluent olduklarında, osteonektin (ON) ve osteokalsin (OK) markırları ile osteoblasta farklılaşma, vonkossa (VK) ve alkalen fosfataz (ALP) aktiviteleri ile kemikleşme ve mineralizasyon kapasiteleri saptandı. Aynı hücrelerin *in vivo* deneysel yara oluşturulmuş boşluklara implantasyonları yapılarak, tamirdeki etkinlikleri histolojik ve morfolometrik yöntemle araştırıldı. Hücre grubu her yara defekti için 24 gözlü kültür kabının konfluent olmuş bir gözü kullanıldı. Sıçanların, operasyon yapılacağı sağ bacakları tıraşlanıp povidon iyodür (Baticon, Türkiye) solüsyonu ile silinip temizlendi. Biyomateryalleri implante etmek için ilk önce tibianın proksimali üstündeki deride yapılan 2 cm uzunluğundaki kesi ve künt diseksiyon ile kemik yüzeyine ulaşıldı. Periost, steril pens yardımıyla kaldırılıp, kasla birlikte geri çekilerek kemik açığa çıkarıldı. Dakikada 15000 devirli asma motorlu tur aletiyile (Üniversal Motor; tip:BM9, Türkiye) cerrahi frez kullanılarak çapı 1 mm olan kavite açıldı. Delme işlemi sırasında frez ucu serum fizyolojikle sürekli soğutuldu. Kaviteyi yıkanarak kanama kontrol altına alındıktan sonra kaviteye implant materyali yerleştirildi. Deney

grupları olarak matkap ile oluşturulan 1mm çaplı tibial defekt üzerine sadece malzeme ve hücre+malzeme grupları kullanıldı. Her grupta 5 tane olmak üzere 6 grup için 30 sıçan kullanıldı. İmplantasyon sonrası birinci hafta sonunda deney sonlandırılarak yara bölgesi kesit alınmak üzere çıkarıldı. Bu amaçla %10 formalin solüsyonu içerisinde tespit edilen örnekler, 0.01 M EDTA solüsyonu ile dekalsifiye edildikten sonra rutin parafin takibe alındı. Elde edilen kesitler hematoksilin-eosin ile boyandı. Morfometrik yöntem ile kemikteki yara iyileşmesine materyallerin etkisi incelendi (8).

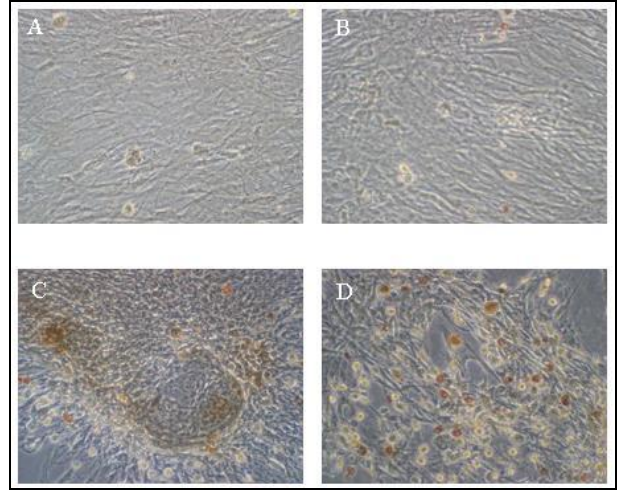
Morfometrik inceleme için bilgisayar ortamına alınan görüntülerde açılan yara yüzey alanının tamir sonrası kapanan yüzey oranına değeri üç ayrı deneyde alınan sonuçların ortalama  $\pm$  standart sapma yüzdeleri olarak gösterildi. Graphpad programı ve ANOVA yöntemi ile ortalamaların istatistiği yapılarak  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi.

### Bulgular

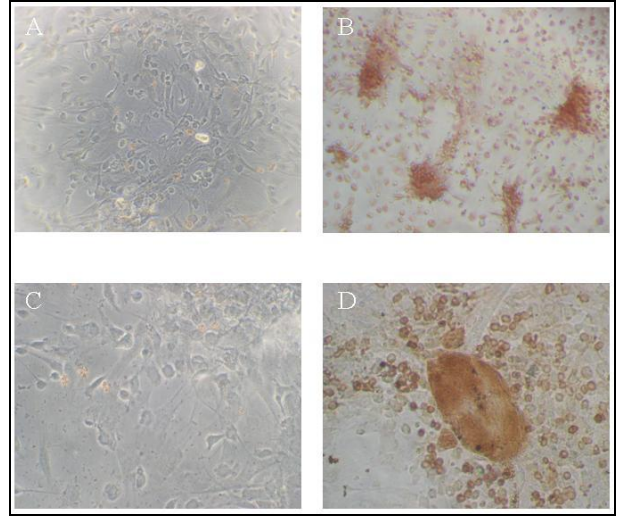
Kültür ortamında yaşayan hücrelerin üredikleri, zaman içerisinde OBO etkisi ile fibroblast benzeri yapıdan osteoblast morfolojisine döndükleri (Şekil 1A-B), konfluent olduklarında ON (Şekil 2A-B) ve OK (Şekil 2C-D) markırlarını etkin bir şekilde tanımladıkları saptandı. Benzer şekilde ALP (Şekil 3A-B) ve VK (Şekil 3C-D) pozitifliğinin KBO ile karşılaştırıldığında OBO içindeki hücrelerde belirgin bir şekilde arttığı bulundu.



**Şekil-1.** Sıçan KİSKH'nin mikroskopik görüntüsü. Konfluent olduğunda KBO etkisinde fibroblast benzeri görünüm izlenirken (A), OBM etkisinde yarı konfluent durumda bile osteoblast morfolojisine dönüş izlendi (B). X 200

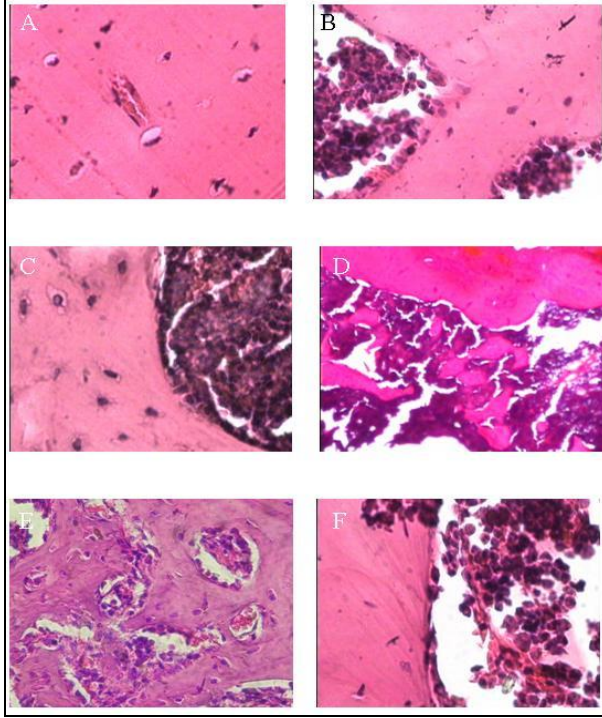


**Şekil-2.** KİSKH konfluent olduklarında osteoblast markırları için immunohistokimyasal boyanması. Her iki markır eşit şekilde eksprese edilirken OBO etkisindeki kolonilerin özellikle merkezlerindeki yoğunlaşma alanlarında oldukça artmışlardır. A: OBO etkisinde olmayan hücrelerin ON boyanması. B: OBO etkisinde olmayan hücrelerin OK boyanması. C: Kültür ortamında OBO etkisinde olan hücrelerin ON boyanması. D: OBO etkisinde olan hücrelerin OK boyanması. X 200



**Şekil-3.** ALP boyamasında KBO (A) etkisindeki hücelere göre OBO (B) etkisindekilerin daha etkin boyandığı ve nadir nodül formasyonuna benzer yoğunlaşmalar bulunduğu izlendi. VK boyamasında ise hücrelerin KBO (C) ile OBO (D) karşılaştırıldığında hem genel boyamada hem de nodül formasyonuna bağlı koyu boyanmış alanlar olarak belirgin artış izlendi. X 200

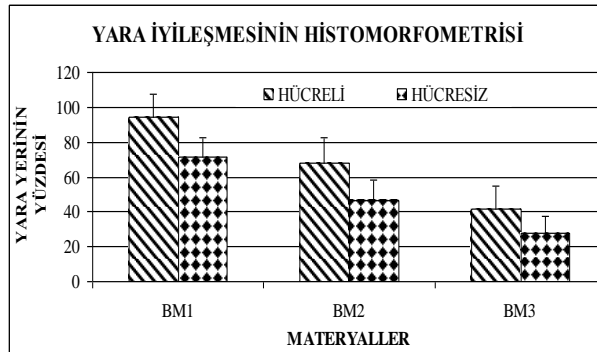
Osteoblasta farklılanmaları markırlar ile gösterilen hücrelerin materyaller üzerinde kültürleri sonrasında yapılan implantasyonlarında farklı şekilde yara iyileşmesini etkiledikleri görüldü. BM1 (Şekil 4A-B) üzerinde implante edilen hücrelerin, sırası ile BM2 (Şekil 4C-D) ve BM3'e (Şekil 4E-F) göre hem hücreli hem de hücreli olmayan implantlar ile karşılaştırıldıklarında mikroskopik olarak daha etkin bir yara iyileşmesi sağladıkları izlendi.



**Şekil-4.** Sıçan tibiasındaki yara iyileşmesinin histolojik görüntüleri. BM1 (A, B), BM2 (C, D) ve BM3 (E, F) üzerindeki hücrelerin (A, C, E) ve hücre olmayan (B, D, F) ile karşılaştırıldıklarında daha etkin bir yara iyileşmesi sağladıkları mikroskopik olarak bulundu. X400.

Yapılan morfometrik incelemede histolojik bulguları destekleyen biçimde materyallerin etkinliği saptandı (Tablo-1). Hücreli BM1 implantının, hücreli ve sırası ile hem hücreli hem de hücreli BM2 ve BM3 implantlar ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak çok daha etkin olduğu bulundu. Yara iyileşmesinde materyal ve hücrelerin hem boşluk doldurma hem de kemik oluşumu açısından farklı etkinlikte oldukları bulundu.

**Tablo-1.** Üç farklı materyalin implantasyon sonrasında yara iyileşmesine etkilerinin histomorfometrik incelemesi. BM1'in BM2 ( $p < 0.05$ ) ve BM3 ( $p < 0.001$ )'e göre hem hücre aktivasyonunda hem de yara boşluğunun doldurulması açısından daha etkin yara iyileşmesine neden olduğu görülmektedir.



## Tartışma

Bu çalışmada materyal üzerinde osteoblasta yönlendirilmiş KISKH sıçan tibiasında oluşturulmuş deneysel yara modelindeki etkinlikleri araştırıldı. Makroskobik, mikroskopik ve morfometrik olarak sırası ile BM1, BM2 ve BM3 şeklinde etkinlik gösterdikleri ve bu etkinin hücrelerin materyal ile etkileşmesine bağlı olduğu bulundu. Önceki çalışmalarda ideal bir yara iyileşmesi için iyi bir osteoblast öncülü olabilecek bir hücre, osteoblasta yönlenmeyi etkinleştirecek faktörler ve osteojenik yapımı arttıracak taşıyıcı materyallere gereksinim olduğu saptanmıştır (9). Doku mühendisliği bu üç faktörü en iyi şekilde kombine ederek en etkin kemik oluşumunu amaçlamaktadır. KISKH ise kolaylıkla elde edilebilmesi, etik sorunlara neden olmaması ve doku reddi problemini ortadan kaldırması ile diğer kök hücrelerden daha uygun görünmekte ve oldukça potansiyele sahip özellikleri nedeni ile bu süreçte büyük rol oynamaktadır (10, 11).

Biyomateryaller etkisinin hem yer kaplama ile hacimsel hem de bir substrat olarak hücre davranışını yönlendirmesi gibi iki şekilde olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir (12, 13). Biyomateryallerin bu tür çalışmalarda her iki etkiyi de göstererek yara iyileşmesini hızlandırdıkları bilinmektedir (14). Hücre eklenmemiş biyomateryallerin hücre eklenmişler ile karşılaştırıldığında etkin kemik yapımını sağlamadıkları görülmektedir (15). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde hücre etkisinin yara tamirinde etkinlik sağlayan önemli bir faktör olduğu saptanmıştır.

Histolojik olarak makroskobik iyileşme ile uyumlu bir şekilde yara iyileşmesinin gerçekleşmesi materyal yanı sıra hücre aktivasyonunun etkinliğine işaret etmektedir. Ancak önceki çalışmalarda da gösterildiği gibi (16-18) implante edilen hücreler ile kemiğin kendi tamir hücrelerinin ne oranda iyileşmede yer aldıkları bilinmemektedir. Bu sorun iki şekilde aşılabılır. Birincisi, aynı deneysel şartlarda yara yerinden *in vivo* kök hücreleri öldürecek ilaç uygulaması yapılarak endojen osteoblastik aktiviteyi ortadan kaldırmaktır. İkinci olarak, işaretlenmiş hücreleri biyomateryaller üzerinde implante ederek *in vivo* yara iyileşmesindeki rollerini izlemektir. Çalışmamızda bu fark saptanamamasına rağmen materyallerin ve daha da önemlisi biyomateryal üzerindeki hücrelerin farklı şekilde etkiledikleri gösterilmiş ve histomorfometrik inceleme ile doğrulanmıştır. Tedavi edici etkiye hücre yoğunluğunun da büyük etkisi ve önemi gösterilmiş ve artan yoğunluğun hücrenin çevresi ile olan etkileşimini hem osteoblasta farklılaşma anlamında hem de fonksiyon yönünden olumlu etkilediği ortaya konmuştur. Bu çalışma ile gösterilen büyük farklar, materyaller yanı sıra hücre yoğunluğuna da bağlı

olabilir. Yoğunluğun artırılması ile kemik yapımı hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak mineralize matriks oluşumundan etkilenmektedir (19). Ayrıca yara büyüklüğü de tedavideki etkinliği önemli ölçüde değiştirebilmektedir (20). Çalışmamızda tibianın kırılmadan yapılabilecek en büyük yara açılmasına dikkat edilmiş ve iyileşme sürecinin uzun tutulması ile materyaller arasındaki farklar ortaya konmaya çalışılmıştır. Önceki çalışmalarda ortaya çıkan farklılıklar bu tür yara büyüklüğü, hücre yoğunluğu ve yara yerinin derinliği ile açıklanabilir (21, 22).

Kök hücre tedavisinin her geçen gün önem kazandığı tıp uygulamalarında hücrelerin çoğalması, göç etmesi, farklılaşması ve fonksiyonel etkilerinin farklı biyomateryaller üzerinde incelenmesi hücre davranışının anlaşılmasına önemli katkılar sağlamaktadır (23, 24). Moleküler düzeydeki etkisi farklı olan büyüme

faktörlerinin bu davranışa katkısı ile değişik yüzeylerin bu katkılar ışığında yönlendirilmesi, istenilen mükemmel fonksiyonun sağlanmasında en önemli rolü oynamaktadır (26). Kök hücrelerin etik kaygılar olmaksızın elde edilebilmesi, çoğaltılabilmesi ve doku mühendisliğinin desteği ile kemikteki yara tamirinde etkin bir şekilde uygulanması mümkün olmaktadır (27-29).

Farklı materyallerin kullanılması ile *in vitro* ve *in vivo* şartlarda KİSKH aktivasyonunun optimize edilmesi kemik iyileşmesini hızlandırarak hem daha çabuk yara iyileşmesine hem de özellikle osteoporoz gibi iyileşmenin zorlandığı durumlarda tedavide bir umut olarak kullanılmasını sağlayacaktır. Bu tedavi sırasında hücrelerin kullandıkları mekanizmaların anlaşılması, kök hücre uygulamalarının klinikteki yararını artırarak daha etkin, ucuz ve kaliteli iyileşmenin sağlanmasına olanak tanıyacaktır.

#### Kaynaklar

1. Justesen J, Stenderup K, Kassem MS. Mesenchymal stem cells. Potential use in cell and gene therapy of bone loss caused by aging and osteoporosis. *Ugeskr Laeger* 2001;163:5491-5.
2. Shao XX, Hutmacher DW, Ho ST, Goh JC, Lee EH. Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits. *Biomaterials* 2006;27(7):1071-80.
3. Gao J, Dennis JE, Solchaga LA, Goldberg V M, Caplan AI. Tissue-engineered fabrication of an osteochondral composite graft using rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2001;4:363-71.
4. Zein DW, Hutmacher DW, Tan KC, Teoh SH. Fused deposition modeling of novel scaffold architecture for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2002;4:1169-85.
5. Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop* 1995;313:8-18.
6. Gebhart M, Lane JA. Radiographical and biomechanical study of demineralized bone matrix implanted into a bone defect of rat femurs with and without bone marrow. *Acta Orthop Belg* 1991;57:130-43.
7. Gerszten PC, Moosy JJ, Flickinger JC, Gerszten K, Kalend A, Martinez AJ. Inhibition of peridural fibrosis after laminectomy using low-dose external beam radiation in a dog model. *Neurosurgery* 2000;46:1478-85.
8. Ekholm E, Hankenson KD, Uusitalo H, et al. Diminished callus size and cartilage synthesis in 1β1 integrin-deficient mice during bone fracture healing. *Am J Pathol* 2002;160:1779-85.
9. Lane JM, Tomin E, Bostrom MP. Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop* 1999;367:S107-17.
10. Derubeis AR, Cancedda R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: Limitations and recent advances. *Ann Biomed Eng* 2004;32:160-5.
11. Cancedda R, Mastrogiacomo M, Bianchi G, Derubeis A, Muraglia A, Quarto R. Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone. *Novartis Found Symp* 2003;249:133-43.
12. Dolder J, Farber E, Spauwen PH, Jansen JA. Bone tissue reconstruction using titanium fiber mesh combined with rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2003;24:1745-50.
13. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000;24:2529-43.
14. Krebsbach PH, Mankani MH, Satomura K, Kuznetsov SA, Robey PG. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. *Transplantation* 1998;66:1272-8.
15. Kon E, Muraglia A, Corsi A, et al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* 2000;49:328-37.
16. Schaefer D, Martin I, Jundt G, et al. Tissue engineered composites for the repair of large osteochondral defects. *Arthritis Rheum* 2002;9:2524-34.
17. Vehof JWM, Haus MTU, Ruijter JE, Spauwen PHM, Jansen JA. Bone formation in transforming growth factor beta-1-loaded titanium fiber mesh implants. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:94-102.
18. Yuehuei HA, Friedman RJ. Animal models of bone defect repair. *Anim Models Orthop Res* 1999;13:241-60.
19. van den Dolder J, Vehof PHM, Spauwen PH, Jansen JA. Bone formation by rat bone marrow cells cultured on titanium fiber mesh: Effect of in vitro culture time. *J Biomed Mater Res* 2002;62:350-8.
20. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80:985-96.
21. Kon E, Muraglia A, Corsi A, et al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* 2000;49:328-37.
22. Arinzeh TL, Peter SJ, Archambault MP, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85:1927-35.

23. Haasper C, Breitbart A, Hankemeier S, et al. Influence of fibrin glue on proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells seeded on a biologic3-dimensional matrix. *Technol Health Care* 2008;16:93-101.
24. Schaeren S, Jaquiéry C, Wolf F, et al. Effect of bone sialoprotein coating of ceramic and synthetic polymer materials on in vitro osteogenic cell differentiation and *in vivo* bone formation. *J Biomed Mater Res A* 2010;92:1461-7.
25. Tang Y, Tang W, Lin Y, et al. Combination of bone tissue engineering and BMP-2 gene transfection promotes bone healing in osteoporotic rats. *Cell Biol Int* 2008;32:1150-7.
26. van den Dolder J, Farber E, Spauwen PH, Jansen JA. Bone tissue reconstruction using titanium fiber mesh combined with rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2003;24:1745-50.
27. Cancedda R, Mastrogiacomo M, Bianchi G, Derubeis A, Muraglia A, Quarto R. Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone. *Novartis Found Symp* 2003;249:133-43.
28. Kim SH, Kim KH, Seo BM, et al. Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in a canine peri-implant defect model: A pilot study. *J Periodontol* 2009;80:1815-23.
29. Wang C, Wang Z, Li A, et al. Repair of segmental bone-defect of goat's tibia using a dynamic perfusion culture tissue engineering bone. *J Biomed Mater Res A* 2010;92:1145-53.