

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

MUDr. Tomáš Kučera

2011

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Doktorský studijní program
Chirurgie

Nosiče kostní tkáně s mezenchymálními kmenovými buňkami

Hojení kostních defektů

Bone carriers with mesenchymal stem cells

Healing of bone defects

MUDr. Tomáš Kučera

Školitel: doc. MUDr. Karel Urban, CSc.

Hradec Králové, 30.10. 2011

Obhajoba dne:

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou dizertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 30.10. 2011

Obsah

1. Předmluva	5
2. Použité zkratky	6
3. Úvod do problematiky	7
3.1. Hojení kostní tkáně.....	8
3.2. Mezenchymální kmenové buňky.....	9
3.2.1. Možnosti izolace mezenchymálních kmenových buněk.....	10
3.2.2. Kultivační podmínky pro mezenchymální kmenové buňky.....	10
3.3. Růstové faktory.....	11
3.3.1. Plazmatický destičkový koncentrát.....	13
3.4. Nosiče pro mezenchymální kmenové buňky.....	14
3.4.1. Autologní kostní štěpy.....	14
3.4.2. Alogenní kostní štěpy.....	15
3.4.3. Demineralizovaná kostní matrix.....	16
3.4.4. Kolagen.....	17
3.4.5. Syntetické náhrady kostních štěpů.....	17
3.5. Genetická terapie.....	22
3.6. Shrnutí úvodu.....	23
4. Cíle práce	25
5. Experimentální část	26
5.1. Úvod.....	27
5.2. Metodika.....	30
5.3. Výsledky.....	36
5.3.1. Výskyt osteopenie a osteoporózy.....	36
5.3.2. Počty mezenchymálních kmenových buněk.....	37
5.3.3. Proliferační aktivita mezenchymálních kmenových buněk.....	38
5.3.4. Aktivita mezenchymálních kmenových buněk na testovaných nosičích....	39
5.4. Diskuze.....	48
5.5. Závěr.....	56
6. Klinická část	58
6.1. Úvod.....	59

6.2. Metodika.....	61
6.3. Výsledky.....	64
6.3.1. Obecná charakteristika souboru.....	64
6.3.2. Výplň autologními kostními štěpy.....	65
6.3.3. Výplň porézním β -trikalciumfosfátem.....	67
6.3.4. Výplň směsí autologních kostních štěpů a porézního β -trikalciumfosfátu...	70
6.3.5. Porovnání úrovně trabekulace defektů mezi jednotlivými typy výplní.....	72
6.3.6. Závislost trabekulace defektu na jeho velikosti.....	74
6.3.7. Závislost trabekulace defektu na věku pacienta.....	78
6.3.8. Závislost trabekulace defektu na poloze v kortikální, kortikospongiózní nebo spongiózní kosti.....	78
6.3.9. Závislost trabekulace defektu dolní končetiny na jejím zatěžování a přítomnosti podpůrné dlahové osteosyntézy.....	80
6.3.10. Histologické vyšetření tkáně z původního defektu.....	81
6.3.10. Úspěšnost trabekulace defektu vzhledem k jeho velikosti při porovnání výplní autologními kostními štěpy a β -trikalciumfosfátem.....	82
6.4. Diskuze.....	84
6.5. Závěr.....	92
7. Použitá literatura.....	94

1. Předmluva

V této části bych velmi rád poděkoval svému školiteli, doc. MUDr. Karlu Urbanovi, CSc. za podporu, vedení a cenné rady během mého postgraduálního studia od začátku až po zpracování dizertační práce. Děkuji rovněž přednostům Ortopedické kliniky FN a LF UK Hradec Králové, za jejichž vedení práce vznikala – doc. MUDr. Karlu Karpašovi, CSc. a doc. MUDr. Pavlu Šponerovi, Ph.D.

Zvláštní poděkování patří MUDr. Tomáši Soukupovi z Ústavu histologie a embryologie a jeho spolupracovníkům a dále MUDr. Otakaru Krsovi, CSc. z Anatomického ústavu LF UK Hradec Králové, bez jejichž pomoci by nevznikla experimentální studie dizertační práce. Děkuji vedoucímu lékaři Tkáňové ústředny FN Hradec Králové MUDr. Pavlu Měříčkovi, Ph.D. za uvedení do problematiky alogenních štěpů a MUDr. Alešovi Kohoutovi, Ph.D. z Fingerlandova ústavu patologie FN a LF UK Hradec Králové za histologické zpracování biopsií. Dále děkuji RNDr. Richardu Brodnianskému a ing. Josefu Bukačovi, MS, Ph.D. z Ústavu lékařské biofyziky LF UK Hradec Králové za pomoc při statistickém zpracování výsledků.

V neposlední řadě děkuji své rodině za trpělivost a poskytnutí času ke studiu.

Dizertační práce je rozdělena na tři hlavní části – úvod, experimentální a klinickou studii. Před jejím konečným zpracováním prošly jednotlivé části recenzním řízením v odborných časopisech:

1. Úvodní část byla publikována v časopise *Ortopedie* (KUČERA, T., URBAN, K., SOUKUP, T. Hojení kostních defektů. *Ortopedie*, 2009, roč. 3, č. 5, s. 226-231).
2. Experimentální studie byla recenzním řízením přijata do časopisu *Acta Chir. orthop. Traum. čech.* a očekává se její publikace (KUČERA, T., SOUKUP, T., KRS, O., URBAN, K., ŠPONER, P. Schopnost kostní reparace u pacientů podstupujících implantaci TEP kyčelního kloubu).
3. Klinická studie byla přijata a publikována v impaktovaném časopise *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* (KUCERA, T., URBAN, K., RAGKOU, S. Healing of cavitary bone defects. *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* [online first], 2011, DOI 10.1007/s00590-011-0831-9).

2. Použité zkratky

Alfa-MEM - Eaglovo minimální esenciální médium v alfa modifikaci

β -TCP - β -trikalciumfosfát

BMI - index tělesné hmoty

BMPs - kostní morfogenetický protein

cDNA - komplementární deoxyribonukleová kyselina

CFU-F - kolonie formující jednotka s buňkami vzhledu fibroblastu

DBM - demineralizovaná kostní matrix

DEXA - dvouenergiová rentgenová absorpciometrie

DMEM - Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium

EGF- epidermální růstový faktor

FCS - fetální telecí sérum

FGF-2 - fibroblastový růstový faktor 2

HA150 - lisovaný hydroxyapatit při 150°C

IGF - inzulínu podobný růstový faktor

MKB - mezenchymální kmenové buňky

PDGF-BB - destičkový růstový faktor BB

PRP - plazma bohatá na krevní destičky

RANKL - ligand receptoru aktivujícího nukleární faktor kappa B

rh M-CSF - rekombinantní lidský kolonie-stimulující faktor

SD - směrodatná odchylka

TGF- β - transformující růstový faktor β

VEGF - vaskulární endotelový růstový faktor

3. Úvod do problematiky

Současná ortopedie, stejně jako ostatní lékařské obory, je konfrontována se skutečností, že se prodlužuje průměrný věk a zvyšuje se počet seniorů. Z hlediska pohybového aparátu to znamená narůstající množství degenerativních kloubních onemocnění a zlomenin v osteoporotické kosti. Dosud převládající materiálově mechanický přístup vedl k náhradě poškozené tkáně a rozvoji endoprotetiky. Je tedy nyní nutné minimalizovat rizika selhání implantátů a prodloužit jejich životnost. Zároveň při vědomí náročnosti tohoto úkolu u často polymorbidních pacientů - seniorů je snaha hledat alternativní biologicky založené postupy ve smyslu tkáňové reparační, které by oddálily nutnost implantace endoprotézy. Toto vyžaduje nové poznatky v oblasti fyziologie a molekulární biologie. Jistá omezení ovšem vyvstávají u starších pacientů se sníženou kvalitou kosti. Předkládaná práce se zaměřuje na tento nový směr - tkáňovou reparaci kostních defektů z hlediska využití mezenchymálních kmenových buněk (MKB) a jejich různých nosičů.

S problematikou hojení kostních defektů se setkáváme v každodenní ortopedické a traumatologické praxi. Jsou to zejména primoimplantace u postdysplastických koxartróz, revizní operace endoprotéz, rekonstrukce po infektech, léčba afekcí nádorům podobných, benigních tumorů, spondylochirurgické operace. V traumatologii pohybového ústrojí pak řešení kostních defektů vyžadují některé typy zlomenin, paklobů a rekonstrukce kostních defektů vzniklých úrazem. V ideálním případě je třeba zvolit takovou léčbu, aby byl defekt zcela vyplněn plnohodnotnou kostní tkání s možností její remodelace a byla tak zajištěna její hlavní funkce, mechanická pevnost. V klinické praxi je tento stav obtížně dosažitelný zvláště v případech větších kostních defektů.

Pro optimální výsledek je nezbytné ve zvoleném způsobu léčby respektovat fyziologický proces kostního hojení. Na jeho kvalitě se podílejí biochemické, buněčné, hormonální, biomechanické vlivy a zasahující případné patologické mechanismy. Mezi prvními, kdo se hojením kostí a fyziologií kostních štěpů zabývali a nabytých znalostí užívali v humánní medicíně, byli Phemister, který používal kostní štěpy v léčbě paklobů (Phemister, 1914), a Albee, který využíval kostní štěpy při spinální fúzi (Albee, 1911).

3.1. Hojení kostní tkáně

Obecně lze rozlišit tři fáze hojení kostní tkáně.

Časné zánětové stádium: Intenzita zánětové odpovědi je závislá na typu zvolené výplně, zvláště na jejích imunogenních vlastnostech. Nejmenší je při použití autologních kostních štěpů. Trvá několik hodin až dní. Vzniká hematoma, vytváří se fibrinová síť, která slouží jako dočasné lešení pro migraci a proliferaci buněk, včetně mezenchymálních kmenových buněk a endotelií. Aktivované destičky produkují řadu růstových faktorů a cytokinů, které tuto migraci a proliferaci buněk potencují. Neutrofilů jsou brzy nahrazeny monocyty, které se diferencují v makrofágy, a T-lymfocyty. Výsledkem je vznik granulační tkáně, tedy ještě nespecifické tkáně určené k další diferenciaci. Toto stádium lze ovlivnit negativně i pozitivně. Negativní vliv mají například podávaná nesteroidní antirevmatika, cytostatika, infekce, kouření, malnutrice, diabetes mellitus, revmatoidní artritida, malignita, ozáření. Některá výplň defektu, jako například čerstvý aloštěp, může vyvolat bouřlivou zánětovou a imunitní odpověď. Pozitivně lze do procesu zasáhnout eliminací negativních vlivů a případným podáním autologních růstových faktorů z tzv. plasmatického destičkového koncentrátu (Pietrzak et al.,2005).

Stádium reparace: V této fázi v průběhu týdnů vzniká tkáň specifická pro danou oblast, v tomto případě kost. Ústřední roli zde hrají mezenchymální kmenové buňky. Na jejich proliferaci a diferenciaci v osteoblasty a také zda vznikne kost v celém rozsahu defektu, má vliv mnoho faktorů. Zejména to jsou: počet a distribuce mezenchymálních kmenových buněk v defektu, osteogenní profil růstových faktorů a cytokinů, hormonů, přísun živin a kyslíku, hodnota pH, mechanická stabilita (Muschler et al.,2004). Diferencované osteoblasty pak produkují osteoid a vzniká nejprve vláknitá, poté lamelární kost. Celý proces tvorby kosti je koordinován i prostřednictvím intercelulárních spojů mezi osteoblasty a později i osteocyty, které umožňují látkovou výměnu a přenos elektrického potenciálu (Shapiro,1988). Významnou funkci pro růst tkáně má cévní zásobení a neoangiogeneze. Při použití kostního štěpu nebo resorbovatelného syntetického materiálu k výplni defektu vedle novotvorby kosti přistupuje ještě resorpce nekrotické kosti štěpu nebo použitého materiálu, která může ovlivnit kvalitu hojení.

Pro tuto fázi hojení je z klinického hlediska důležitý dostatečný počet MKB. S touto situací se nejčastěji setkáváme při léčení kostních defektů u mladých jedinců, zejména u dětí s nádorům podobnými afekcemi a benigními tumory. V okolí defektu je v kosti a periostu dostatek

mezenchymálních kmenových buněk. Tam, kde je jich nedostatek, je nutné MKB dodat v autologních kostních štěpech nebo v aspirátu kostní dřevě. Nicméně pro větší kostní defekty přináší přidání aspirátu kostní dřevě k nosiči vyšší riziko vzniku centrální nekrózy pro velké množství buněk soutěžících o nutrienty.

Při dostatečném počtu MKB můžeme terapeuticky působit na jejich diferenciaci v osteoblasty např. růstovými faktory. V opačném případě (např. většina defektů po aseptickém nebo septickém uvolnění endoprotéz, v postinfekčním nebo postiradiačním terénu) je třeba zvýšit počet MKB, poskytnout vhodný nosič a kostní novotvorbu potencovat růstovými faktory. Samotné růstové faktory nemají význam, protože chybí efektor.

Stádium remodelace: Tato fáze trvá měsíce až roky. U větších defektů s centrální nekrózou a následnou fibrózou může být původní místo defektu mechanicky méně pevné a remodelace trvá déle. Zároveň má na toto stádium hojení vliv zátěž kosti a eventuální přítomnost osteosyntetického materiálu. Na remodelaci se podílejí faktory lokální, odpovídající aplikované zátěži kosti, které byly popsány Wolffem (Wolff,1892). Podle tohoto zákona je funkční namáhání kosti, její zevní tvar a vnitřní struktura ve vzájemném souladu, který je-li porušen v některé ze složek, vede k přestavbě kosti a dosažení nové rovnováhy. Hlavním morfogenetickým podnětem pro tvorbu kosti je tlak (Bartoníček et al.,1991). Na buněčné a molekulární úrovni je to autokrinní a parakrinní produkce osteoklastů a osteoblastů, kde nejvýznamnějšími faktory je osteoprotegerin jako inhibitor diferenciacie osteoklastů a RANKL, který naopak působí na tuto diferenciaci pozitivně. Zároveň jsou známy i faktory centrálního řízení cestou hypothalamu (Haberland et al.,2001).

3.2. Mezenchymální kmenové buňky

MKB hrají klíčovou roli v procesu kostního hojení. Jedná se tzv. adultní kmenové buňky odpovědné za tkáňovou homeostázu a regeneraci. Jejich charakteristickým znakem je možnost sebeobnovy. MKB jsou typické významným proliferačním (Colter et al.,2000) a diferenciacním potenciálem, jsou multipotentní, schopné diferenciacie v osteoblasty, chondrocyty, adipocyty a myoblasty (Pittenger et al.,1999). Jejich výskyt lze předpokládat ve většině tkání a orgánů - kostní dřevě, peritrabekulární tkáň spongiózní kosti, periost, chrupavka, sval, tuková tkáň, cévní pericyty (Muschler et al.,2004). Tyto buňky dávají vznik progenitorovým buňkám, které již mají schopnost sebeobnovy omezenou, ale mají možnost

další diferenciaci. V kostní chirurgii je významný vývoj v pre-osteoblasty a osteoblasty. MKB se vykytují v kostní dřeni s frekvencí zhruba 2-5 na 1 milion mononukleárních buněk (Minguel et al.,2001). Přítomnost této nehemopoetické populace kmenových buněk v kostní dřeni poprvé zmiňuje Clonheim (citováno podle Prockop,1997), který se domníval, že kostní dřev může být zdrojem fibroblastů produkujících kolagenní vlákna jako část procesu hojení tkáně. První průkaz toho, že kostní dřev obsahuje buňky, které jsou schopny diferenciaci v mezenchymové tkáni přinesla práce Friedensteina (Friedenstein et al.,1976). MKB mají charakteristický imunofenotyp a povrchové markery HLA-A,B,C, CD29, CD 44, CD 49, CD63, CD 90, CD117, CD166 a jsou negativní na hematopoetické markery CD34 a CD45 (Bruder et al.,1997, Soukup et al.,2006). Bylo prokázáno, že MKB zachovávají svoje funkční vlastnosti po kultivaci a kryopreservaci a jsou tak vhodné pro tkáňové inženýrství (Bruder et al.,1997).

3.2.1. Možnosti izolace MKB

Lidské MKB jsou standardně izolovány z kostní dřev. Získávají se z prstence mononukleárních buněk, který vzniká na rozhraní plazmy a koloidního křemičitého roztoku po tzv. gradientové centrifugaci (Colter et al.,2000). Izolované mononukleáry jsou následně promyty fosfátovým pufrům a resuspendovány v kultivačním médiu většinou s 10% fetálním telecím sérem (FCS). MKB za 24-48 hodin adherují ke dnu plastových kultivačních nádob. Po počáteční lag fázi (jejíž délka závisí na charakteristikách dárce a kultivačních podmínkách) začínají buňky rychle proliferovat (Chamberlain et al.,2007). Rostoucí kolonie buněk sestávají z heterogenní buněčné populace – úzkých vřetenitých buněk a plochých polygonálních buněk. Reyesová a spolupracovníci (Reyes et al.,2001) kombinovali separaci mononukleárních buněk kostní dřev na hustotním gradientu Ficoll-Paque s imunomagnetickou separací CD45 neg. a GlyA neg. buněk. Získali tak kmenové buňky z dospělých tkání, které mají dokonce širší diferenciacní potenciál, který se blíží diferenciacnímu potenciálu embryonálních buněk (Jiang et al.,2002). MKB ze solidních tkání či orgánů jsou nejčastěji izolovány procesem enzymatické disociace - běžně směsí kolagenázy typ I a dispázy (Seo et al.,2004; Shi et al.,2003).

3.2.2. Kultivační podmínky pro MKB

Společným jmenovatelem kultivačních postupů MKB jsou vysoké nároky na čistotu prostředí. Běžný způsob přípravy MKB probíhá tak, že mononukleární buňky z kostní dřev jsou

resuspendovány v živném médiu v plastových či skleněných nádobách a jsou ponechány 1-3 dny adherovat k jejich povrchu. Po této době jsou neadherující buňky odmyty a k adherentním fibroblastoidním elementům je přidáno médium nové, které je dále měněno většinou 2x týdně (Digirolamo et al.,1999; Colter et al.,2000). Při těchto manipulacích v laboratořích tkáňových kultur je nutno nádoby otevírat, což zvyšuje riziko mikrobiální kontaminace. Za cca 2-3 týdny kultivace je dno nádoby pokryto 70-90 % splývavou vrstvou mezenchymových buněk, přičemž pro MKB izolované z kostní dřevě platí, že ze 7,5 -10 miliónů jaderných buněk je možno získat kolem 0,4 – 1,0 milión buněk mezenchymových (Colter et al.,2000). Klasickým prostředím pro pěstování MKB je Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium (DMEM) či Eaglovo minimální esenciální médium v alfa modifikaci (alfa-MEM) s 10-20 % fetálním telecím sérem (Coelho et al.,2000). Použití tohoto postupu v humánní medicíně omezuje skutečnost, že DMEM ani alfa-MEM nejsou t.č. schváleny pro klinické použití a též použití zvířecího séra je v současné době považováno za velmi problematické vzhledem k možnosti přenosu virů a prionů (např. bovinní spongiformní encefalopatie) a vzhledem k možnosti vzniku prudkých anafylaktických reakcí na zvířecí bílkovinu, zejména pokud by byly buňky u téhož pacienta transplantovány opakovaně (Mackensen et al.,2000).

3.3. Růstové faktory

Růstové faktory jsou proteiny produkované některými buňkami, které se podílejí na stimulaci proliferace a diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk a na tvorbě extracelulární matrix. Účinek může být autokrinní (faktory produkované osteoblastem působí na osteoblasty), parakrinní (faktory z osteoblastů působí na nediferencované buňky v okolí), endokrinní (faktory produkované v centrálním nervovém systému působí na osteoblasty).

Mezi nejvýznamnější růstové faktory účastníci se v jednotlivých fázích kostního hojení patří BMPs (bone morphogenetic proteins) (Urist,1965), zejména BMP-2 a BMP-7, TGF- β (transforming growth factor- β), FGF (fibroblast growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), IGF (insulin-like growth factors) – Tab. 1.

Tab. 1 *Přehled růstových faktorů kostního hojení podle Lieberman et al., 2002*

Růstový faktor	Zdroj	Funkce
TGF- β (transforming growth factor- β)	Destičky, kostní extracelulární matrix, chrupavčitá matrix	Stimuluje proliferaci MKB
BMPs (bone morphogenetic proteins)	Osteoprogenitorové buňky, osteoblasty, kostní extracelulární matrix	Podporuje diferenciaci MKB v osteoblasty a chondrocyty, podporuje diferenciaci osteoprogenitorů v osteoblasty
FGF (fibroblast growth factor)	Makrofágy, MKB, osteoblasty, Chondrocyty	Má mitogenní vliv na MKB, osteoblasty, chondrocyty, vliv na angiogenesi
PDGF (platelet-derived growth factor)	Destičky, osteoblasty	Má mitogenní vliv na MKB, osteoblasty, vliv na chemotaxi makrofágů
IGF (insulin-like growth factors)	Osteoblasty, chondrocyty, kostní extracelulární matrix	Podporuje diferenciaci a proliferaci osteoprogenitorových buněk

Účinek TGF- β byl prokazován v experimentálních studiích. Ukázal se vliv na proliferaci MKB v iniciální fázi hojení po uvolnění z destiček, ale jeho osteogenní potenciál je velmi limitovaný. Toto omezení a v případě klinické aplikace nutnost opakovaných vysokých dávek s možnými komplikacemi jeho použití prakticky vylučuje (Lieberman et al., 2002, Critchlow et al., 1995). V experimentu bylo zjištěno, že FGF urychluje kostní hojení a má pozitivní vliv na remodelaci kostního svalku (Kato et al., 1998, Nakamura et al., 1998), nicméně v klinické praxi zatím tento růstový faktor nebyl využit tak, jako BMP. Účinnost užití samotného IGF pro zlepšení kostního hojení nebyla prokázána, uplatňuje se v rámci léčby růstovým hormonem (Carpenter et al., 1992). PDGF má chemotaktické a mitogenní vlastnosti, uvolňuje se z granulí destiček v iniciální fázi hojení. Pozitivní vliv na hojení byl prokázán experimentálně, včetně urychlení hojení při trakční osteogenezi (Hollinger et al., 2008, Moore et al., 2009), avšak ani tento růstový faktor nenalezl širší uplatnění v klinické praxi.

Nejvýznamnější postavení z pohledu klinických aplikací mají BMPs. Protein byl objeven Uristem (Urist, 1965) a následně bylo identifikováno celkem 16 typů BMP-1 až BMP-16, z nichž pouze BMP-2, BMP-7 a BMP-9 mají osteoinduktivní vlastnosti. Klíčový je jejich vliv na diferenciaci MKB v preosteoblasty a spolu s ostatními BMP i preosteoblastů v ostoblasty. Pro tento účinek je důležitá optimální dávka proteinu v místě kostního hojení, menší dávka nemá osteoinduktivní efekt, vysoká dávka naopak může stimulovat resorpci kosti aktivací osteoklastů (Itoh et al., 2001). Vzhledem k rychlému lokálnímu metabolismu růstových

faktorů jsou užívány 10 – 1000x větší dávky než je fyziologická hodnota. Pro postupné uvolňování BMP v místě potřebného kostního hojení a zabránění rychlé difuzi mimo tuto lokalitu jsou hledány vstřebatelné biokompatibilní nosiče s osteokonduktivními vlastnostmi (Termaat et al.,2005). Například se používají demineralizovaná kostní matrix (DBM), kolagen, trikalcium fosfát, polymery – polylaktát, hydrogely a jejich kombinace. Bez nosiče je lokální dostupnost BMP 5 %, s nosičem 15-30 % a při použití speciálního proteinu, který váže BMP (BMP binding protein) až 90 % (Mc Govern et al.,2010). Pro klinické použití jsou dostupné rekombinantní BMP-2 a BMP-7 na kolagenním nosiči. Zvažuje se jejich aplikace ke stimulaci hojení zlomenin, kostních defektů, paklobů a při spinální fúzi. Byly provedeny studie hojení paklobů tibie s rhBMP-2 versus autoštěpy, se srovnatelnými výsledky (Govender et al.,2002) a rhBMP-7 byl použit při léčbě otevřených zlomenin tibie, bylo zjištěno rychlejší hojení zlomeniny, operační rány a méně infekcí (McKee et al.,2002).

Základním problémem pro kliniky je udržení terapeutické dávky růstového faktoru v místě kostního hojení dostatečnou dobu. Vyvinutí účinných nosičů s vazebnými proteiny výrazně zlepšuje farmakokinetiku BMP, snižuje iniciální nutnou dávku, ale na druhé straně také zvyšuje již dost vysokou cenu preparátu. Použití bovinního kolagenu může být také rizikem pro přenos virů a prionů. Je možná i alergická reakce na rhBMP. Je samozřejmostí, že základní podmínkou léčebného úspěchu je dostatečné množství mezenchymálních kmenových buněk v cílové lokalizaci.

3.3.1. Plazmatický destičkový koncentrát (PRP)

Růstové faktory (především PDGF, TGF- β , IGF, VEGF) jsou také obsaženy v α -granulích krevních destiček, z kterých jsou uvolňovány jejich aktivací koagulační kaskádou v iniciální fázi hojení. Tyto faktory ovlivňují především chemotaxi a proliferaci mezenchymálních kmenových buněk, angiogenezi, ale nestimulují přímo tvorbu kostní tkáně a neobsahují BMPs (Pietrzak et al.,2005). Bylo vyvinuto několik systémů, které vytvářejí koncentrát destiček z odebrané krve pacienta (30 – 60 ml) centrifugací a separací. Přidáním trombinu a kalcia vzniká gel, který se aplikuje do postiženého místa. Z hlediska kostního hojení není dosud pozitivní vliv PRP jasně prokázán. V experimentu bylo zjištěno, že vysoké koncentrace TGF- β a PDGF inhibují osteoindukci (Aspenbeg et al.,1996, Ranly et al.,2005). Další studie ukázaly, že PRP v buněčné kultuře inhibuje osteogenní diferenciaci, je snižená aktivita alkalické fosfatázy, zvyšuje růst fibroblastů a snižuje růst osteoblastů (Arpornmaeklong et

al.,2004, Cenni et al.,2005). Choi se spolupracovníky prokázali horší kostní regeneraci při kombinaci PRP a autologního kostního štěpu než u kontrolního autoštěpu bez PRP (Choi et al.,2004). PRP s kolagenním nosičem nemělo žádný vliv na hojení velkého defektu tibie v experimentu (Sarkar et al.,2006). V klinických studiích na posterolaterálních fúzích páteře bylo zjištěno, že při kombinaci autologního kostního štěpu a PRP bylo zhojeno 62 % fúzí, bez PRP 91 % (Weiner et al.,2003), podobně udává Castro více paklobů s posterolaterální fúzí páteře při použití PRP (Castro,2004). Určitým vysvětlením, proč docházelo spíše k inhibici osteogeneze, je skutečnost, že při použití trombinu je najednou uvolněno velké množství růstových faktorů, zejména TGF- β , které mohou být v nadbytku inhibitory. Bez použití trombinu, při předpokládaném pomalém uvolňování růstových faktorů z α -granulí destiček byl efekt PRP na DBM pozitivní (Han et al.,2009).

3.4. Nosiče pro mezenchymální kmenové buňky

Patří sem autologní kostní štěpy, alogenní kostní štěpy v různých formách a syntetické nosiče. Náhrady kostní tkáně fungující též jako nosiče MKB by v ideálním stavu měly mít osteokonduktivní, osteoinduktivní a zvláště osteogenní vlastnosti.

Osteokondukce znamená, že nosič má takové makroskopické a mikroskopické strukturální vlastnosti, které umožňují migraci, proliferaci a diferenciaci všech buněk účastnících se novotvorby kosti a cév a je také umožněn transport nutrientů.

Osteindukce je charakterizována podporou proliferace MKB na a ve stěnách kostního defektu, event. buněk, které se dostaly do kontaktu s vyplňovaným materiálem. Dále je to podpora jejich diferenciaci v osteoprogenitorové buňky se schopností tvořit kost. Tato vlastnost je především vázána na přítomnost růstových faktorů, zejména BMP.

Osteogeneze je novotvorba kosti v souvislosti s přítomností živých osteogenních buněk v nosiči.

3.4.1. Autologní kostní štěpy

Tyto štěpy jsou označovány jako zlatý standard při výplni kostních defektů. Mohou být použity jako spongiózní, kortikální, v úzkých indikacích také vaskularizované. Protože štěp nemá odlišnou imunologickou charakteristiku, je zánětová reakce v úvodu inkorporace štěpu mírná. Přežívající osteogenní buňky a růstové faktory se zapojují do kostní novotvorby. Autologní kostní štěp má osteokonduktivní, osteoinduktivní a částečně i osteogenní vlastnosti.

Nicméně přežívá jen část buněk na povrchu štěpu, které mohou být vyživovány difúzí (Heiple et al.,1963). I přesto je výhodné zvětšení počtu osteoprogenitorových buněk v místě hojení jejich transplantací, zejména tam, kde je jich nedostatek. Spongiózní štěpy se rychle inkorporují s relativně rychle vzniklými cévními anastomózami a ukládáním nové kosti na již přítomné trabekuly s následnou remodelací (Khan et al.,2005). Spongiózní struktura umožňuje difúzi živin. Nevýhodou je malá mechanická pevnost štěpu, která se po inkorporaci štěpu obnovuje za 6 až 12 měsíců (Gazdak et al.,1995). Kortikális má především osteokonduktivní vlastnosti a jejich hlavní výhodou je počáteční mechanická pevnost zejména u trikortikálních štěpů. Tyto štěpy se používají nejčastěji jako nevascularizované, ale lze je použít i s cévní stopkou. Do povrchu tohoto štěpu prorůstají cévy z okolí a přítomné osteoklasty odpovědné za resorpci zvyšují porozitu kortikální kosti. Následuje aktivace osteoblastů a novotvorba kosti s postupnou remodelací (Heiple et al.,1963). Nevascularizovaný štěp tak ztrácí původní pevnost po prvních 6 týdnech. Jako prevence zlomeniny nebo komprese štěpu je nutná vnitřní nebo zevní fixace po dobu hojení (Stevenson,1999). Spongiózní kostní štěp svou osteointegrací a remodelací přispívá postupem času od minimální k dobré mechanické pevnosti místa hojení, zatímco kortikální štěp je mechanicky odolný na začátku, pak mechanickou pevnost ztrácí do doby své remodelace. Autologní kostní štěpy odebíráme nejčastěji z lopaty kosti kyčelní, přičemž je možný odběr z distálního radia, tibie, fibuly. Nevýhodou je nedostatečné množství, obtíže pacientů v místě odběru, riziko infekce, prodloužení operačního času a možnost vyšší krevní ztráty (Banwart et al.,1995).

3.4.2. Alogenní kostní štěpy

Jsou dostupné prakticky v různých tvarech a velikostech, odpadá riziko morbidity po odběru štěpu. Můžeme si vybrat spongiózní, kortikospongiózní nebo kortikální štěpy, strukturální aloštěpy, případně celé osteochondrální segmenty. Teoreticky je možnost použít čerstvé štěpy. Pro riziko přenosu infekce a imunitní reakce se prakticky nevyužívají, přestože jejich výhodou je přítomnost živých osteoprogenitorových buněk. Alogenní štěpy jsou zpracovávány ve tkáňových bankách a setkáváme se nejčastěji se zmrazenými štěpy, lze je lyofilizovat a demineralizovat. Zpracovávání aloštěpu včetně sterilizace snižuje jeho imunogenní vlastnosti, ale zmenšuje se i jeho mechanická pevnost (zejména v torzi a ohybu) a částečně se zhoršují i biologické vlastnosti. Na rozdíl od čerstvého autoštěpu jsou

osteogenní buňky neživé a je zachována jen limitovaná osteoinduktivní schopnost, o jejímž faktickém významu se vedou spory (De Long et al.,2007). Integrace aloštěpu je na bázi osteokondukce, je pomalejší než u autoštěpu, imunologické faktory ruší proces revaskularizace a reosifikace štěpu (Heiple et al.,1963). Strukturální aloštěp se nepřestavuje v celém objemu (Bishop,1999). Kvalita inkorporace je hlavně závislá na dostatku osteoinduktivních a osteogenních faktorů v místě transplantace. Ke zlepšení osteointegrace aloštěpu jako osteokonduktivní matrice může vést přidání osteoinduktivních substancí jako rekombinantní BMP-2, případně i aspirát kostní dřevě s potenciálními osteogenními vlastnostmi (Fiala et al., 1977, Jones et al.,2006).

3.4.3. Demineralizovaná kostní matrix

Vyrábí se kyselou extrakcí z aloštěpů. Obsahuje síť z kolagenu I. typu, nekolagenní proteiny včetně osteoinduktivních růstových faktorů (zejména BMPs). Kromě demineralizace se také snižuje obsah tuku. Ve srovnání s nedemineralizovanými aloštěpy má nejmenší imunogenní vlastnosti, ale také mnohem menší mechanickou odolnost. Velkým příslibem byl prokázaný obsah osteogenních růstových faktorů a tedy předpokládané osteoinduktivní vlastnosti (Urist,1965). Ty jsou přesvědčivě prokázány v experimentu na zvířatech (De Long et al.,2007), ale ne dosud u pacientů. Příčin může být několik – různá kvalita kosti od jednotlivých dárců, proměnlivé a předem nestanovené množství růstových faktorů, různá technologie výroby demineralizované kostní matrix. Úspěchy při experimentech na zvířatech mohou být dány menšími defekty ve srovnání s klinickou praxí. DBM nabízí kolagenní síť, která je velmi dobrým nosičem pro migraci, proliferaci a diferenciaci buněk, navíc se jedná o nebovinní kolagen. Ve snaze zlepšit vlastnosti DBM byly zkoušeny kompozitní materiály. Např. Tiedman se spolupracovníky kombinoval DBM s kostní dřeví u poranění skeletu. Jednalo se však o nehomogenní skupinu pacientů bez kontrolní skupiny, kdy z 39 sledovaných pacientů došlo ke zhojení u 30, v nezhojených případech převažovaly paklouby (Tiedman et al.,1995). Protichůdné klinické výsledky byly uvedeny při užití kombinace DBM a PRP (Han et al.,2009).

3.4.4. Kolagen

Kolagen I tvoří základ extracelulární matrix kosti. Samotný kolagen není vhodný jako náhrada kosti, ale mohou být na něj navázány růstové faktory, včetně BMP. Dále může být součástí kompozitních materiálů s kalciumfosfátovou keramikou, kde usnadňuje její osteointegraci (například Collagraft, Zimmer, USA). Tyto kompozitní materiály mohou být obohaceny též autologní kostní dření. Nevýhodou většiny kolagenních materiálů je bovinní původ kolagenu s riziky přenosu infekce a alergické reakce.

3.4.5. Syntetické náhrady kostních štěpů

Ve snaze eliminovat nevýhody autologních štěpů – nutnost odběru dalším operačním přístupem a jejich omezené množství, a alogenních kostních štěpů – riziko přenosu infektu a imunologické reakce, jsou k dispozici syntetické náhrady kostních štěpů, které se liší složením, strukturou a vlastnostmi. Jedná se o trojrozměrné matrice, které musí být se svými chemickými, fyzikálními a biologickými vlastnostmi v souladu s fyziologickým prostředím.

3.4.5.1. Kalciumfosfátové náhrady kostní tkáně

Jsou nejpoužívanější syntetickou náhradou kostní tkáně. Obecně můžeme biokeramiku dělit na bioinertní, povrchově aktivní a vstřebatelnou. V klinické praxi se používají hydroxyapatit, trikalciumfosfát, bifazický kalciumfosfát (kombinace hydroxyapatitu a trikalciumfosfátu) nebo tzv. nízkoteplotní kalciumfosfátové cementy. Neporézní (denzní) materiály jsou mechanicky pevnější, porézní méně pevné, mají strukturu, která tvoří velmi dobrou osteokonduktivní matrix k tvorbě kosti za přítomnosti osteogenních buněk a růstových faktorů příjemce. Nejprve byl kalciumfosfát používán ve formě prášku (Ferraro,1979). Naše pracoviště má dlouholeté zkušenosti s experimentálním i klinickým použitím bioaktivní sklokeramiky ve spolupráci s výrobcem - firmou Lasak Praha, s.r.o. Nejprve to byl nevstřebatelný materiál BAS-O, kdy první klinické zkušenosti byly publikovány v roce 1993 (Urban et al.,1993). Materiál byl používán k výplni defektů při revizních operacích totálních endoprotéz kyčelního kloubu (Urban et al.,1998). Bioaktivní sklokeramika byly využívána nejen jako náhrada kostní tkáně, ale také jako nosič antibiotik (Zítka et al.,1998). Výsledky těchto aplikací byly zhodnoceny v delším časovém odstupu od implantace (Šponer et al., 1998). Zároveň však probíhaly experimenty pro vývoj vstřebatelného trikalciumfosfátu (Urban et al.,1996), který je v klinické praxi používán na našem pracovišti od roku 2002 -

Poresorb®, Lasak Praha, s.r.o. (porézní β -trikalciumpfosfát). Trikalciumpfosfát se jeví jako vhodná náhrada spongiózní kosti. Je k dispozici v různých formách. Pro osteokondukcí je podstatná jeho porézní struktura s interporézními spoji.

Nízkoteplotní kalciumfosfátové cementy vznikají smícháním prášku a roztoku při pokojové teplotě za vzniku tuhnoucí směsi. Jsou charakterizovány velkým aktivním povrchem – 100 m²/g oproti 1 m²/g u denzního hydroxyapatitu (Frankenburg et al.,1998), jsou tedy biologicky daleko více aktivní. Mikrostruktura je porézní s interporézními spoji, jejichž velikost je nicméně okolo 1 μ m a neumožní tak vrůst kosti. Jejich význam však spočívá v adsorpci molekul proteinů, zvláště pak těch, které stimulují osteogenezi (intrinsic osteoinduction). Tyto materiály jsou odbourávány vrstva po vrstvě a úplná resorpce je zdlouhavá. Mají však lepší mechanické vlastnosti, zejména v kompresi a jsou zdokumentována úspěšná využití v kostní traumatologii (Larsson et al.,2002). Nevýhodou cementu je možnost zatečení mimo požadované ohraničení, tedy např. do kloubní dutiny nebo páteřního kanálu.

Kalciumfosfátové náhrady kostní tkáně jsou používány k výplni kostních defektů po exkochleaci benigních tumorů, nádorům podobných afekcí, u defektů při aseptickém uvolnění endoprotéz, u některých zlomenin v oblasti epifýz a metafýz s nutností nahradit komprimovaný kostní objem.

3.4.5.2. Kalciumsulfát

Použití kalciumsulfátu, respektive sádry k výplni kostních defektů bylo poprvé popsáno Dressmannem v roce 1892 (Dressmann,1892). V současné době je dodáván ve formě krystalů stejné velikosti a tvaru, které se rozpouštějí během 30 až 60 dní (například OsteoSet, Wright Medical Technology, USA). Kyselé prostředí vznikající při jeho poměrně rychlém rozpouštění může být výhodné při léčbě kostního infektu a také proto, že lze na kalciumsulfát navázat antibiotika. Byly však popsány zánětové a alergické reakce na výplň (Robinson et al.,1999).

3.4.5.3. Inertní keramika

Bioinertní keramika je založena na bázi oxidů α - Al₂O₃, ZrO₂, Y₂O₃ a TiO₂, které v kontaktu s živou tkání nevyvolávají zánětové reakce. Tato keramika je používána hlavně na mechanicky namáhané aplikace (korund, zirkoničitá keramika, zirkoničito korundová keramika) nebo jako nízkootěrové povlaky (pyrolytický uhlík, resp. „diamond-like carbon“), využití nachází v kloubních implantátech.

3.4.5.4. Polymery

Syntetické polymery nejsou vyráběny přímo z látek obsažených v kosti. Jejich výhodou je možnost výroby přímo v prostorovém tvaru defektu a přesně definovaná vnitřní struktura včetně mechanických vlastností odpovídajícím živé kosti. Určitým problémem mohou být degradační produkty polymerů – možnost toxicity nebo významné změny pH. Udává se možnost polyglykolem indukovaného zánětu a synovialitidy (Ceonzo et al.,2006). Jedním z materiálů je PLGA [poly(lactic-co-glycolic acid)] s trojrozměrnou porézní strukturou, kde však byla zjištěna migrace osteoprogenitorů do materiálu pouze do vzdálenosti 200 μm a je tedy doporučováno v humánní medicíně použití jen u malých defektů (Ishaug-Riley et al., 1997). Dále byly zkoušeny kombinované materiály polymerů s kalciumfosfátovou keramikou, např. kombinace polylaktátu a trikalciumfosfátu s mechanickými vlastnostmi podobnými živé kosti (Kikuchi et al., 1999), kombinace polylaktátu s hydroxyapatitem s dobrou migrací buněk dovnitř materiálu (Zhang et al.,1999), dále kombinace bifazického kalciumfosfátu s methylhydroxypropylcelulózou – možnost aplikovat v injekční formě. Oddifundováním methylcelulózy vzniká prostor pro novotvořenou kost (Daculsi et al.,1999). Novými materiály jsou degradabilní polyuretany, např. DegraPol-foam (Ab Medica, Itálie), u kterých byl prokázán velmi dobrý růst osteoblastů uvnitř materiálu a prakticky žádná toxicita degradačních produktů (Kikuchi et al.,1999). Materiál Polyactive (Octo Plus, Nizozemí) na bázi polymeru polyetylénoxidu a polybutylen tereftalátu má vlastnosti hydrogelu. Tlak vznikající jeho nabobtnáním může mimikovat nitrokostní fyziologický tlak. Jiným řešením jsou polymery, které jsou degradovány pouze na povrchu vrstvu po vrstvě, udržují si tak delší dobu dobré mechanické vlastnosti (polyortoestery, polyfosfazený, polyanhydridy-ko-imidy) (Attawia et al.,1999). V neposlední řadě je snaha obohatit polymery růstovými faktory, např. polylaktát s BMP-2 a kolagenem (Winn et al.,1999).

3.4.5.5. Kovy

K náhradě kostní tkáně, zejména v oblasti endoprotetiky, lze použít i kovy. Historicky nejstarším používaným kovem je zlato, které nevyvolává alergické reakce. V současnosti jsou používány korozivzdorná ocel, slitiny kobaltu, chromu, molybdenu, titanu, pro výplně kostních defektů je vyráběn porézní tantal. Porézní tantal s přítomnými interporézními spoji umožňuje rychlý kostní vrůst. Potažení kovů hydroxyapatitem podporuje přímou vazbu kosti

v pórech (Tisdell et al.,1994). Vzhledem k technologii výroby jsou použitelné tyto náhrady v přesně definovaných pravidelných defektech a pro vysoké výrobní teploty není možné přidání biologicky aktivních látek jako jsou růstové faktory. Dalším typem jsou kompozitní materiály, kdy kov s dobrými mechanickými vlastnostmi je pokryt vrstvou bioinertní (slitina kobaltu a nitrid titanu) nebo bioaktivní (slitina kobaltu a hydroxyapatit) keramiky.

3.4.5.6. Struktura materiálu

Struktura biomateriálu určuje jeho mechanické vlastnosti a vytváří prostředí k přichycení, proliferaci, migraci a diferenciaci mezenchymálních kmenových a osteoprogenitorových buněk. Zároveň předurčuje vhodné podmínky pro angiogenezi, transport metabolitů a obecně pro následnou remodelaci kosti. Efektivní remodelace je závislá na novotvorbě kosti v celém rozsahu defektu. Jednotlivé matrice se liší svou makro-, mikro- a nanostrukturou.

Jsou k dispozici biomateriály s různou makrostrukturou od pravidelných geometrických tvarů jako jsou například bločky po amorfní strukturu různých granulí a vláken, které umožní výplň i velmi nepravidelných defektů.

Z hlediska mikro- a nanoarchitektury je preferována porézní struktura, kdy jsou makropóry určité velikosti ještě propojeny mikropóry. Velikost, objem a hustota pórů má vliv na kvalitu kostního vrůstu, spoje mezi makropóry slouží zejména k transportu metabolitů. Optimální velikost pórů pro vrůst a přežití kostní tkáně je diskutována a od různých autorů je uváděna v rozmezí 50 až 500 μm , u mikropórů $\leq 10 \mu\text{m}$ (Kuhne et al.,1994, Galois et al.,2004, Karageorgiou et al.,2005, von Doernberg et al.,2006).

Novým směrem je vývoj nanomateriálů, jejichž povrch je tvořen částicemi o velikosti 1 až 100 nm. Takovýto povrch je výhodný pro adsorpci proteinů, adhezi buněk, jejich diferenciaci a tvorbu extracelulární matrix. Tento předpoklad vychází ze skutečnosti, že kostní buňky jsou fyziologicky adaptovány na takovéto prostředí – krystaly hydroxyapatitu (délka 20 až 80 nm a tloušťka 2 až 5 nm) a kolagenní vlákna o průměru menším než 500 nm (Sato et al.,2004). Experimentálně bylo prokázáno, že nanomateriály mohou pozitivně ovlivnit aktivitu osteoblastů a osteoklastů, mohou vázat růstové faktory a mají tak potenciál k výraznému zlepšení osteointegrace biomateriálů. Při použití stříbra se vykazují i antibakteriálními vlastnostmi (Nair et al.,2008).

Mechanické vlastnosti matrice jsou dané druhem biomateriálu a jeho strukturou. Je důležité, aby nedošlo k mechanickému selhání a kolapsu matrice dříve, než bude dosaženo zhojení.

Stejně tak důležité je i určité napětí v matrici, neboť mechanické podněty jsou nezbytné pro kostní diferenciaci a remodelaci. Matrice z kovů a nevstřebatelné keramiky udržují svou mechanickou pevnost, ale chybí možnost remodelace, je vysoká koncentrace napětí mezi rigidním materiálem a okolní kostí vedoucí k bolestem a zvyšuje se riziko zlomeniny. V současné době je dáována přednost vstřebatelným materiálům. Zvýšené nároky na mechanickou pevnost jsou často řešeny podpůrnou osteosyntézou. Nicméně při vývoji nových materiálů by byla optimální tzv. kontrolovaná degradace materiálu tak, aby bylo jasné, za jak dlouho ztrácí matrix své mechanické vlastnosti, kdy je zcela vstřebána, jaké látky vznikají degradací matrix. Přesné stanovení, kdy dojde k signifikantní ztrátě mechanické pevnosti biomateriálu, není možné, protože na této ztrátě se podílí nejen biodegradace materiálu, ale také individuální nahromadění sil vedoucích k jeho únavě a kolapsu (Muschler et al.,2004).

3.4.5.7. Biochemická charakteristika materiálu

Po implantaci jsou biomateriály pokryty proteiny a lipidy, které se adsorbují na povrch a po tomto kontaktu mohou měnit svou strukturu, včetně případné denaturace. Exponují se tak různé proteiny, které reagují s povrchovými receptory buněk a modifikují tak interakci biomateriál – okolní tkáň (Altankov et al.,2000). Je známa dobrá afinita hydroxyapatitu a kalciumfosfátu k růstovým faktorům BMPs (Uludag et al.,2000). Využití je možné v klinice, kdy je snaha pokrýt matrice růstovými faktory již před implantací. Takto jsou na kolagen navázány BMP-2 (Infuse; Medtronic Sofamor Danek, USA) nebo BMP-7 (OP-1 Device; Stryker Biotech, USA).

Pro přežití buněk v matrici je nutné udržení fyziologického prostředí, zejména ve smyslu osmolarity a pH. Vhodná je hydratace biomateriálu izotonickým roztokem před implantací. Problematický může být kalciumsulfát (CaSO_4), který se poměrně rychle rozpouští a vytváří tak hyperosmolární prostředí. Vliv na pH a osmolaritu mají i degradační produkty matrice, např. negativně mohou působit produkty hydrolýzy polylaktátů a polyglykolů. Výhodné spojení degradace matrice a kostního vrůstu je popsán Lutolfem a spolupracovníky. Gel na bázi polyethylen oxidu obsahující peptidy včetně buněčných adhezivních proteinů, které jsou uvolňovány při degradaci gelu (Lutolf et al.,2003).

3.5. Genetická terapie

Třebaže se dosud jedná o experimentální aplikace, je nutné zmínit možnost genetické terapie. Pozornost se obrací zejména na růstové faktory, které jsou nyní klinicky používány na kolagenním nosiči a je nutné je dávkovat až v milionkrát větších dávkách, než jsou fyziologické koncentrace. Je zde tedy reálná možnost nežádoucích účinků a zároveň nelze zaručit postupné uvolňování růstového faktoru z nosiče po dobu nutnou ke zhojení defektu nebo zlomeniny. Genetická léčba spočívá v přenosu genetických sekvencí kódujících růstové faktory do buněk v místě zlomeniny, které pak budou tyto faktory produkovat pouze v této lokalitě a ve fyziologických dávkách.

Komplementární deoxyribonukleová kyselina (cDNA) kódující růstový faktor je přenesena vektorem do cílové buňky. Při použití virového vektoru hovoříme o transdukci, při nevirovém vektoru o transfekci. Léčba může být realizována *in vivo*, kdy je podán vektor celkově nebo lokálně pacientovi, nebo *ex vivo*, kdy jsou cílové buňky nejprve odebrány, kultivovány, je provedena transdukce a buňky jsou zpět transplantovány na požadované místo. *In vivo* technika byla použita experimentálně například Baltzerem a spolupracovníky. Vytvořili segmentální defekt femuru u králíků a lokálně injekčně aplikovali adenovirový vektor nesoucí cDNA BMP-2. Během 12 týdnů se defekt zhojil dle radiologického i histologického nálezu u všech takto léčených defektů, zatímco v kontrolní skupině bez aplikace vektoru vznikl fibrózní paklob (Baltzer et al., 2000). Betz se spolupracovníky aplikovali stejný vektor do kritických defektů femurů u potkanů a hodnotili nejen radiologické a histologické známky hojení, ale i mechanické vlastnosti zhojených femurů. Zjistili, že k radiologickým známkám zhojení došlo u 75 % defektů, nicméně tyto dle rentgenových snímků zahojené defekty vykazovaly pouze 25% mechanickou pevnost oproti zdravým femurům, zároveň lepší výsledky byly v případě podání vektoru v odstupu 5 až 10 dnů od vytvoření defektu (Betz et al., 2007). Z nevirových vektorů jsou používány plazmidy. Výhodou *in vivo* přístupu je jednodobá procedura, nižší cena. Nevýhodou je nižší účinnost, nejistota zasažení cílových buněk, imunitní reakce na virový vektor, případně virulence. Výhodou *ex vivo* přístupu je vyšší účinnost, jistota zasažení cílových buněk, není riziko virové inokulace. Nevýhodou je dvoudobý postup, vyšší cena. Možná je též kombinace dvou růstových faktorů jako např. BMP-2 a VEGF (Peng et al., 2005).

3.6. Shrnutí úvodu

Závěrem úvodní části lze shrnout dosud nevyjasněné otázky v oblasti kostního hojení a v možnostech naší léčebné intervence. Některé z nich jsou předmětem naší experimentální a klinické části a podíl na jejich řešení jsme si dali jako cíle dizertační práce.

Podle našeho názoru je třeba výzkum v těchto oblastech:

- Pokračující studium fyziologie kostního hojení a možností jeho ovlivnění, přičemž je nutné vytvořit takové experimentální modely, které se budou co nejvíce přibližovat klinickým podmínkám v humánní medicíně:
 - vliv množství MKB a jejich proliferačních schopností v místě hojení, otázka potenciálu kostní regenerace ve vyšším věku,
 - otázky spojené s izolací a kultivací MKB – vyřešení bezpečnosti metodiky z hlediska kultivačních médií, rizika infekční kontaminace, ztráty schopnosti jejich diferenciaci a také ekonomických nákladů,
 - porovnání účinnosti zvýšení počtu osteogenních buněk v místě hojení ve formě aspirátu kostní dřeně, monocytárního koncentrátu a nakultivovaných MKB,
 - možnosti podpory diferenciaci MKB v proosteogenní buňky,
 - problematika spojená s aplikací růstových faktorů – které druhy, otázka nejvhodnějšího nosiče, dávky a farmakokinetiky,
 - ověření terapeutické účinnosti autologních růstových faktorů v PRP,
 - problematika nosičů MKB, interakce MKB s jednotlivými nosiči od autologních štěpů přes různé formy alogenních štěpů až k jejich umělým náhradám,
 - možnosti a přínos genetické terapie.

- Hojení kostních defektů v terénech s různě příznivými podmínkami pro kostní hojení z hlediska přítomnosti MKB, růstových faktorů a vaskularity:
 - problematika fyziologie hojení kostního defektu s možnými pozitivními a negativními vlivy,
 - možnosti ovlivnění neoangiogeneze, případně využití nosičů kyslíku,
 - otázka volby typu výplně defektu a operační techniky,
 - dosažení optimální mechanické pevnosti kosti v místě defektu, vliv podpůrné osteosyntézy na hojení defektu,
 - ovlivnění kostní remodelace, vliv zátěže končetiny, fyzikální terapie.

4. Cíle práce

Experimentální studie:

- **Vyšetření kostní denzity u starších pacientů s koxartrózou podstupujících implantaci totální endoprotézy kyčelního kloubu.**
- **Zjištění koincidence koxartrózy a nižší kostní denzity.**
- **Odběr kostní dřeně od těchto pacientů, izolace a kultivace MKB.**
- **Stanovení počtu, viability a proliferační schopnosti MKB, porovnání nálezů u pacientů s normální a nižší kostní denzitou.**
- **Interakce MKB s vybranými nosiči – hodnocení tvorby kolagenu a extracelulární mineralizované matrix:**
 - **porovnání aktivity MKB v aspirátu kostní dřeně a monocytárním koncentrátu,**
 - **porovnání aktivity MKB na alogenních štěpech a umělých kostních náhradách.**

Klinická studie:

- **Hodnocení hojení kostních defektů v závislosti na jejich velikosti, poloze v kosti kortikální, kortikospongiózní a spongiózní a také na věku pacienta.**
- **Vyhodnocení resorpce výplně a trabekulace defektu při použití autologních kostních štěpů, porézního β -TCP a jejich kombinace.**
- **Zhodnocení vlivu současné osteosyntézy a zátěže končetiny na hojení defektů.**
- **Zjištění indikací pro použití β -TCP jako náhrady kostních štěpů.**

5. Experimentální studie

5.1. Úvod

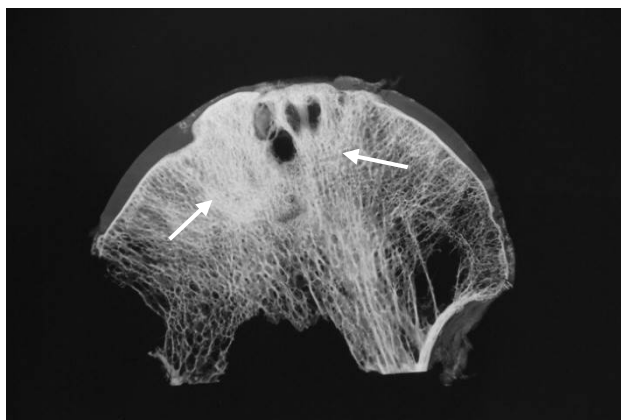
U dětí a mladších dospělých lze předpokládat dostatečné množství MKB i jejich dobrou proliferační aktivitu a hojení kostní tkáně zpravidla za standardních podmínek nebývá problematické. Na druhé straně obtíže mohou nastat u seniorů. Na kostní hojení mají vliv nejen fyziologické změny v rámci stárnutí, ale také přidružená onemocnění. Důležitost zkoumání vlivů na kostní regeneraci v této věkové kategorii je umocněna rovněž již v úvodu uvedeným obecným trendem zvyšování počtu seniorů, prodlužování věku, zvyšováním nároků na funkční pohybový aparát a s tím související nutnost řešení zlomenin a kostních defektů v osteoporotickém terénu nebo v rámci revizních operací aloplastik.

Na intenzitu a kvalitu kostního hojení má vliv mnoho faktorů. Počet a proliferační schopnost MKB a jejich interakce s nosičem jsou významné. Málo je však prozkoumaný jejich vztah k osteopenii nebo osteoporóze. Často navíc není snížená kostní denzita u pacientů odhalena. Je tedy otázka skutečného výskytu snížené kostní denzity u starších pacientů, případně její koincidence s artrózou a její vliv na reparační schopnost kostní tkáně.

Z hlediska matric pro proliferaci a diferenciaci MKB jsou autologní kostní štěpy považovány za standard. Alogenní kostní štěpy v různé formě se též osvědčily. Používány jsou nejen zmrazené kostní aloštěpy, ale i demineralizovaná kostní matrix. DBM nabízí kolagenní síť, ale za cenu dalších technologických úprav. Nabízí se tedy otázka, zda tím neztrácí některé významné biologické vlastnosti. Zároveň není plně prostudována problematika interakcí MKB s těmito aloštěpy. Tématem k řešení je i indikace a forma transplantace MKB – v aspirátu kostní dřeně, monocytárním koncentrátu nebo jako kultivované MKB. Příklad úspěšného použití masivního aloštěpu z materiálu našeho pracoviště dokumentují Obrázky 1a a 1b.



Obr. 1a

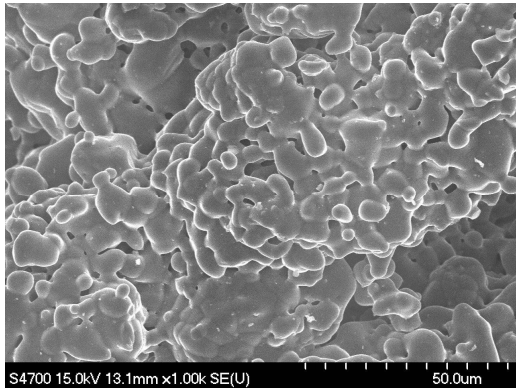


Obr. 1b

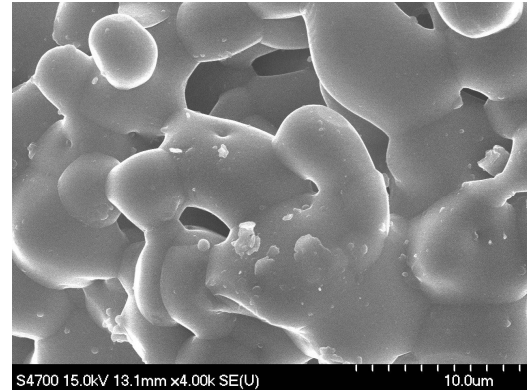
1a/ Rentgenový snímek kyčelního kloubu pacienta (roč. 1961) z roku 2007, kterému byl transplantován masivní aloštěp v roce 1981 pro parciální nekrózu hlavice femuru (vyznačen úsečí), klinicky byl bez obtíží. Po 28 letech byla implantována totální endoprotéza kyčelního kloubu.

1b/ Rentgenový snímek histologického řezu hlavici femuru dokládá výbornou integraci štěpu s přestavbou na okrajích aloštěpu (šipky), centrální část aloštěpu je sklerotická s vytvořenými pseudocystami.

V současné době je k dispozici celá řada umělých náhrad kostních štěpů. Na naší klinice byla testována ve spolupráci s firmou Lasak Praha, s.r.o. především kalciumfosfátová keramika. Byly prováděny testy *in vitro*, experimenty na zvířatech a proběhly implantace do kostních defektů u pacientů. Trendem je použití vstřebatelných materiálů, na našem pracovišti porézního β -TCP. Obrázky 2a a 2b zobrazují jeho porézní strukturu.



Obr. 2a



Obr. 2b

Porézní struktura β -TCP (Poresorb, Lasak Praha, s.r.o.), obr 2a při zvětšení 1000x, obr 2b při zvětšení 4000x v elektronovém mikroskopu.

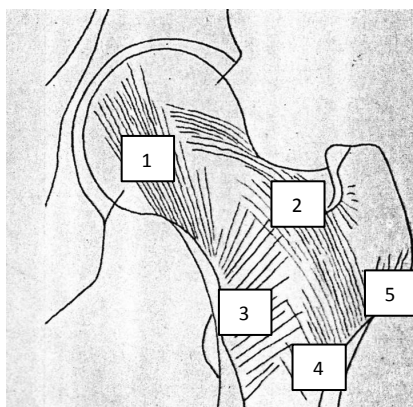
Jedním z cílů experimentální práce bylo zjištění interakcí MKB s tímto materiálem (zjištění tvorby kolagenních vláken a extracelulární mineralizované matrix) a porovnání s aloštěpy a některými dalšími umělými náhradami kostních štěpů.

5.2. Metodika

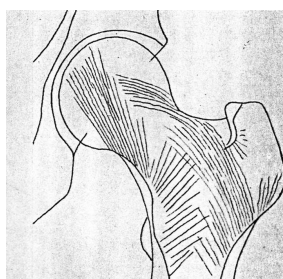
V experimentální části byla k testům MKB použita kostní dřev 24 pacientek odebraná z trochanterické krajiny kosti stehenní během implantace totální endoprotézy kyčelního kloubu pro diagnózu primární artrózy IV. stupně. Jejich průměrný věk byl 70 let (interval 60 až 81 let, medián 69 let). Z hlediska vlivu osteopenie/osteoporózy bylo provedeno předoperační denzitometrické vyšetření v den nástupu k hospitalizaci na přístroji Discovery (Hologic, USA) metodou dvouenergií rentgenové absorpciometrie (DEXA). Zároveň byl stanoven body-mass index (BMI).

V tomto souboru byla sledována koincidence artrózy a osteopenie/porózy, izolovány byly MKB a stanoven jejich počet, viabilita a proliferační schopnost. Dále bylo vyšetřováno, jakým způsobem se MKB chovají na vybraných náhradách kostní tkáně užívaných v naší ortopedické praxi při léčbě kostních defektů. Jejich charakteristika je uvedena v další části textu.

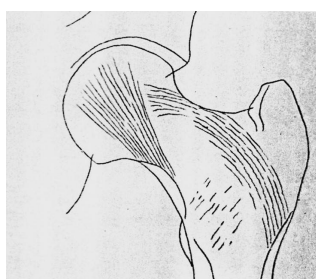
Odběr kostní dřevě od pacientek, kterým byla implantována totální endoprotéza kyčelního kloubu po seznámení a podepsání informovaného souhlasu, byl schválen etickou komisí. Vyloučeny byly pacientky s anamnézou nádorového nebo infekčního onemocnění, nemocné podstupující dialyzační léčbu a nemocné po transplantaci, dále pacientky s farmakologickou anamnézou kortikosteroidní, cytostatické a imunosupresivní terapie. Před vlastní operací byly pacientky dle výsledku denzitometrie rozříděny na skupiny s normální a nízkou kostní denzitou dle T-skóre, kdy se naměřená hodnota srovnává s průměrnou hodnotou u mladých zdravých jedinců (30 roků věku). Výsledky jsou vyjádřeny pomocí směrodatné odchylky (SD), kde každá 1 SD je asi 10 % kostního minerálu (Broulík, 2007). Kritéria pro hodnocení osteoporózy dle T-skóre: do -1,0 SD zdravá populace, -1,0 až -2,5 SD osteopenie, rovno nebo větší než -2,5 SD osteoporóza a těžká osteoporóza je definovaná jako T-skóre větší než -2,5 SD s kompresivními zlomeninami (WHO, 1994). Před operací byl vždy proveden za standardních podmínek předozadní rentgenový snímek kyčelního kloubu. Metodikou dle Singha a spolupracovníků byl na základě patrné trabekulace proximálního femuru stanoven tzv. Singhův index, který na tomto principu vyjadřuje stupeň úbytku kostní tkáně. Hodnota indexu se určuje od 1 do 6, kdy stupeň 6 je norma a stupeň 1 je těžká osteoporóza. Mezi pro osteoporózu je stupeň 3 (Singh et al., 1970) (Obr. 3). Místa měření kostní denzity při DEXA znázorňuje Obrázek 4.



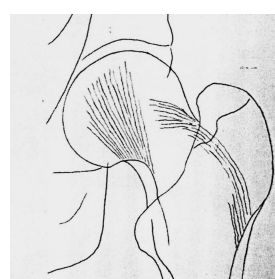
- 1 – primární mediální tlakový systém
- 2 – primární laterální tahový systém
- 3 – sekundární mediální tlakový systém
- 4 – sekundární laterální tahový systém
- 5 – trámce velkého trochanteru



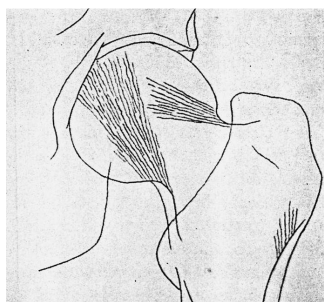
*Stupeň 6
Všechny skupiny trámců
dobře patrný*



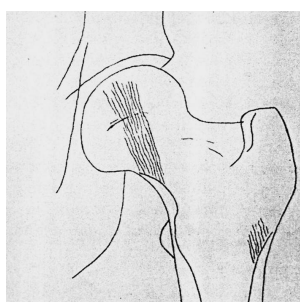
*Stupeň 5
Dominují primární
mediální a laterální
trámce*



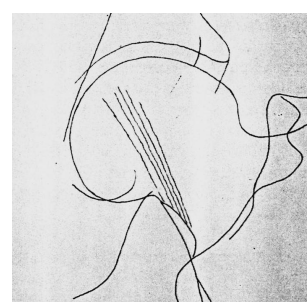
*Stupeň 4
Redukce primárních
laterálních trámců bez
poruchy kontinuity*



*Stupeň 3 – osteoporóza
Porucha kontinuity
primárních laterálních
trámců*

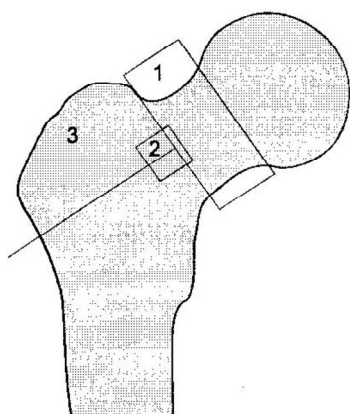


*Stupeň 2 – osteoporóza
Patrné jsou pouze
primární mediální
trámce*



*Stupeň 1 – osteoporóza
Redukované primární
mediální trámce*

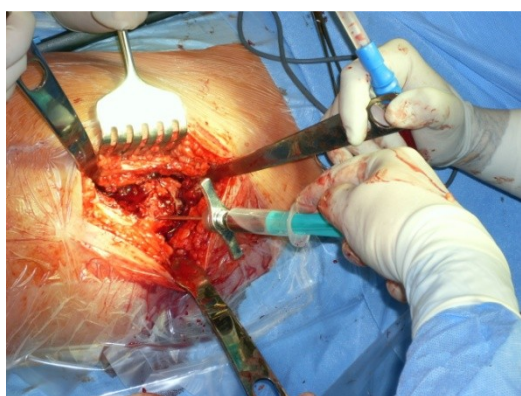
Obr. 3 Měření Singhova indexu na základě trabekulace proximálního femuru,
podle Singh et al., 1970



1 – krček femuru
2 – Wardův trojúhelník
3 – velký trochanter

Obr. 4 Místa měření kostní denzity při DEXA podle Koota et al., 1996

Implantace totální endoprotézy kyčelního kloubu probíhala standardním postupem. Všechny pacientky byly operovány ve spinální anestézii. Zvolen byl anterolaterální přístup. Po incizi kůže, podkoží a fascia lata byl částečně uvolněn úpon gluteálního svalstva z velkého trochanteru a založena Hohmannova elevatoria – za horní a dolní okraj krčku femuru a za přední okraj acetabula. Dále následovala excize kloubního pouzdra a ozřejmění trochanterické oblasti. Před provedením osteotomie krčku stehenní kosti byla standardním způsobem pomocí Jamshidiho jehly (Jamshidi Monoject, 13G x 3 ½ ″, Kendall, USA) aspirována z trochanterické oblasti femuru kostní dřev v množství 2 x 10 ml do předem heparinizovaných stříkaček (10 ml). Roztok heparinu (Heparin Forte, Léčiva, Česká republika) byl po protažení stříkačkou ponechán v jejím kónusu (Obr. 5).



Odběr kostní dřevě pomocí Jamshidiho jehly z trochanterické oblasti femuru během implantace totální endoprotézy kyčelního kloubu. Odběr před provedením osteotomie krčku femuru.

Obr. 5 Odběr kostní dřevě

Buněčná suspenze byla přidána k vychlazenému (4°C) PBS pufru (Invitrogen, USA) ředěného s aqua pro inj. v poměru 1:10. Poměr kostní dřevě a PBS pufru byl 1:1 (Obr. 6).



Obr. 6 Smíchaná kostní dřevě s PBS pufrem připravená k transportu

Takto připravená kostní dřevě byla transportována do laboratoře tkáňových kultur Ústavu histologie a embryologie. Zde byla část dřevě oddělena, z části byl získán mononukleární koncentrát a izolovány MKB. Mononukleární buňky byly separovány centrifugací 30 minut při 2800 ot/min. na základě Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Švédsko) vztlakového gradientu a byla využita jejich adherence k plastům v případě nasazení plné kostní dřevě a k hodnocení schopnosti tvořit kolonie (CFU). Buňky byly kultivovány na TPP Petriho miskách (Nunc, Dánsko) při 37°C za aerobních podmínek (5% CO₂) v expanzním médiu obsahujícím 2 % fetálního telecího séra. Toto expanzní médium se skládalo z Eaglova minimálního esenciálního média v alfa modifikaci - alpha-MEM (Invitrogen, USA), fetálního telecího séra (PAA, Rakousko), 2-fosfátu kyseliny askorbové (Sigma, USA), dexametazonu (Sigma, USA), L-glutaminu (Invitrogen, USA), penicilinu a streptomycinu (Invitrogen, USA). Po dosažení 70% splývavosti byly buňky uvolněny 0,25% trypsinem-EDTA (Invitrogen, USA). Buňky byly počítány pomocí přístroje Z2 Counter (Beckman Coulter, USA). Viabilita byla analyzována přístrojem Vi-Cell XR (Beckman Coulter, USA), který ji stanovuje pomocí barvení trypanovou modří, která barví cytoplazmu, ale neprochází přes intaktní buněčnou membránu - barví se tedy pouze mrtvé buňky. Primokultura byla pasážována mezi 7. až 14. dnem, podle vzhledu kolonií. Další pasáže byly indikovány vždy po dosažení 70% splývavosti.

V průběhu dlouhodobé kultivace v základních médiích byly pro každou pasáž stanovovány dvě základní biologické charakteristiky:

- počet populačních zdvojení (number of population doublings),
- čas potřebný na zdvojnásobení populace (doubling time).

K výpočtu byly použity tři základní parametry:

- počet nasazených buněk,
- počet buněk v kultuře po pasáži,
- čas, který uplynul mezi pasážemi.

Izolované MKB byly vizualizovány mikroskopií s fázovým kontrastem.

V další fázi bylo testováno chování MKB od vybraných dárců s normální kostní densitou na trojrozměrných nosičích kostní tkáně. Vzhledem k tomu, že v současné době není povoleno použití nakultivovaných MKB v klinické praxi, bylo nanášeno na připravené nosiče buď 3 ml aspirované kostní dřevě nebo 3 ml monocytárního koncentrátu. Kultivace probíhala v expanzním médiu 2 týdny, poté byly vzorky zpracovány pro elektronovou mikroskopii - trojrozměrné agregáty byly fixovány 24 hodin ve 4% roztoku formaldehydu, po promytí destilovanou vodou byly vzorky odvodněny vzestupnou etanolovou řadou, převedeny do 100% hexametyldisilazanu a vysušeny na vzduchu v digestoři při teplotě laboratoře (Slížová et al., 2003). Potom následovalo pokovení naprášením zlata v tloušťce 15 nm v přístroji Polaron SC 7620 (Quorum Technologies, Velká Británie). Vzorky byly pozorovány a fotografovány v rastrovacím elektronovém mikroskopu Tesla BS 301 (Tesla, Česká republika) při zobrazení v módu sekundárních elektronů při urychlovacím napětí 25 kV. Hodnotili jsme novotvorbu mineralizované extracelulární matrix a přítomnost kolagenu. Tam, kde nebyla jeho tvorba dostatečná, bylo použito sérové diferenciační médium s 10 % FCS a přídavkem kyseliny L-askorbové (Sigma, USA) 0,5 mM/l, beta-glycerofosfátu (Sigma, USA) 10 mM/l a dexametazonu (Sigma, USA) 0,1 M/l.

Z nosičů byly testovány - **zmrazený alogenní spongiózní kostní štěp** z proximální tibie a **demineralizovaná kostní matrix** vyrobená z alogenní hlavice femuru. Oba certifikované nosiče byly získány z Tkáňové ústředny Fakultní nemocnice Hradec Králové. Čerstvý autologní kostní štěp nebyl použit, protože zvolenou metodou hodnocení přítomnosti kolagenu by nebyl odlišen původní a nově vytvořený kolagen. Dále byl testován **porézní β -trikalciumpfosfát** (Poresorb-TCP®, Lasak Praha, s.r.o., Česká republika), **lisovaný**

hydroxyapatit při 150 °C (HA 150, Lasak Praha, s.r.o., Česká republika)*, **kalciumsulfát** bez porézní struktury (Osteoset®, Wright Medical, USA). Přehled nosičů je uveden v Tab. 2.

Tab. 2 *Nosiče MKB použité v experimentální části*

Nosič	Charakteristika
Alogenní spongiózní kostní štěp	Mražený štěp z proximální tibie dle standardů Tkáňové ústředny
Demineralizovaná kostní matrix	Vyrobená kyselou extrakcí z alogenní hlavice femuru dle standardů Tkáňové ústředny
Porézní β -trikalcium fosfát	β -Ca ₃ (PO ₄) ₂ , velikost granulí 1,3±0,7 mm, velikost makropórů 100 μ m, velikost mikropórů 3±2 μ m, porozita 35±5 %, specifická hustota 3050±50 kg/m ³ , teplota sinterování 1180 °C
Lisovaný hydroxyapatit při 150 °C	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ , velikost granulí 0,6 – 1 mm, velikost makropórů > 100 μ m, střední velikost mikropórů 5 nm, porozita 83 %, měrný povrch 78,3 m ² /g
Kalciumsulfát	Alfa hemihydrát CaSO ₄ s krystalickou strukturou ve formě 4,8 mm pelet

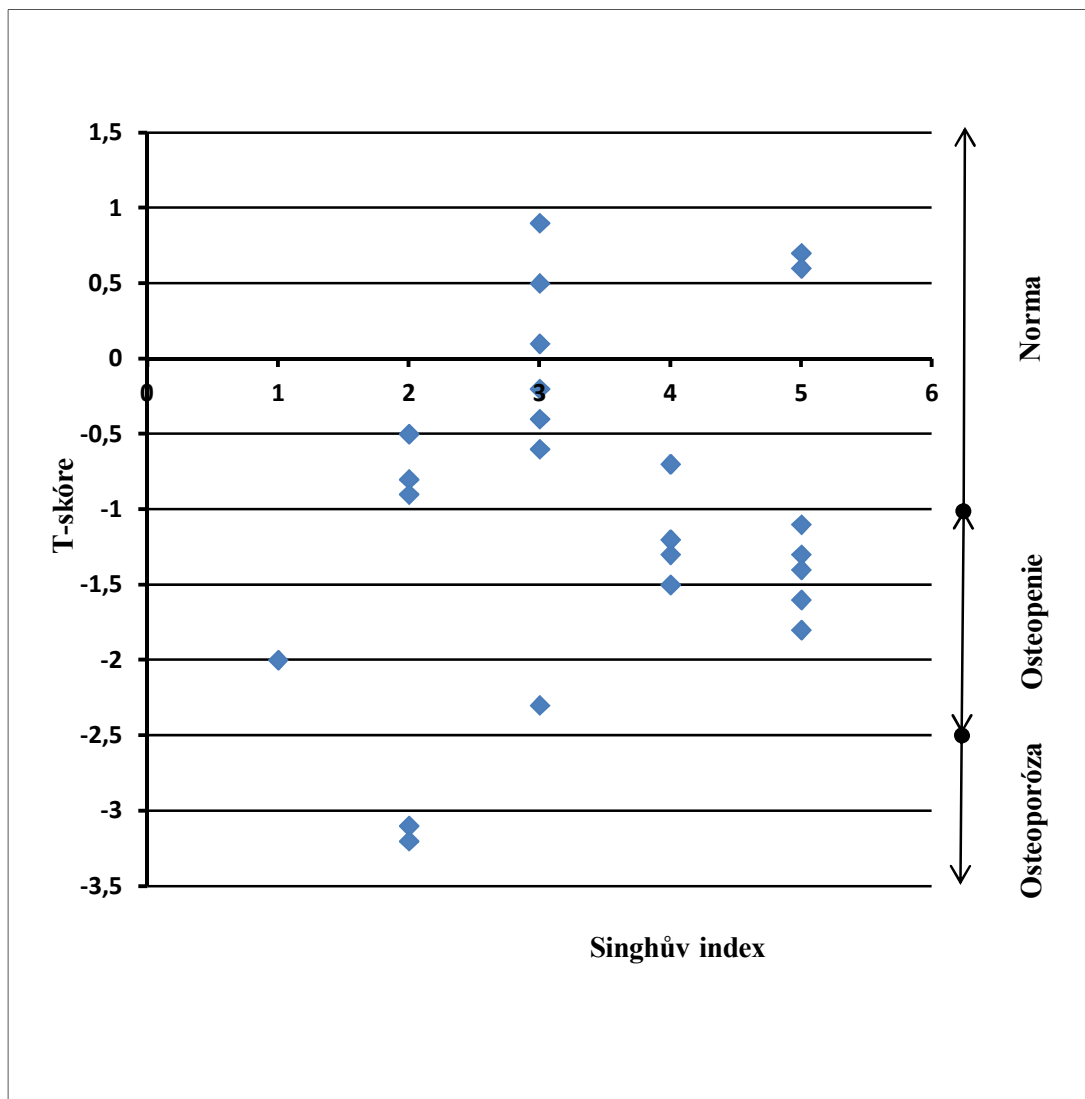
* HA 150 byl nově vyroben v době již probíhajících experimentů, proto byl zařazen až v další fázi testování v diferenciačním médiu.

5.3. Výsledky

5.3.1. Výskyt osteopenie a osteoporózy

Dle výsledku denzitometrie byly ženy rozděleny na pacientky s normální denzitou (12 žen) a nižší denzitou, resp. osteopenií (10 žen) a osteoporózou (2 ženy). U žen byla tedy koincidence artrózy a osteopenie nebo osteoporózy 50 %. Interval menopauza – operace byl ve skupině s normální kostní denzitou 15 let, ve skupině s nižší kostní denzitou 24 let. Body-mass index (BMI) u pacientek s normální denzitou byl průměrně 29,4, u pacientek s nižší denzitou 24,2. Zjištěný Singhův index se shodoval s výsledky denzitometrie pouze u 7 z 24 žen (Graf 1).

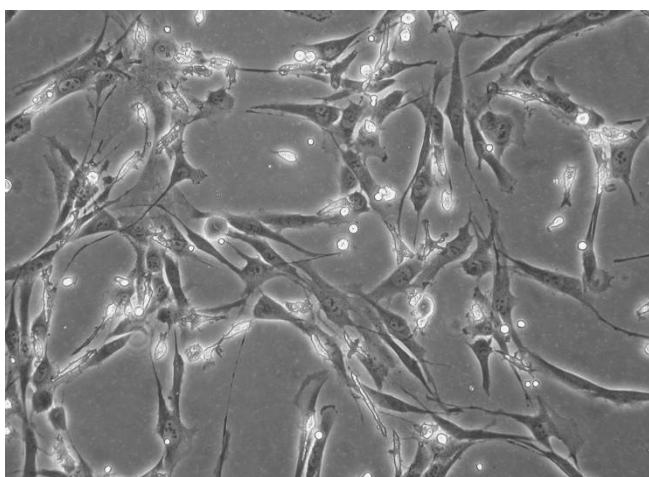
Graf 1 *Vztah T-skóre a Singhova indexu*



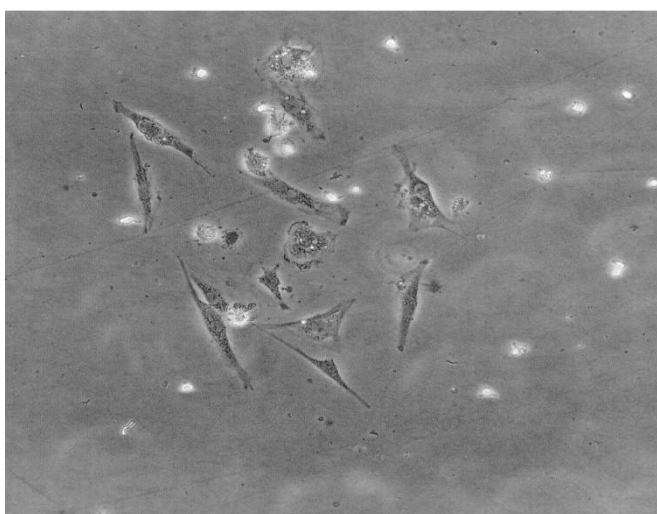
5.3.2. Počty MKB

Na vztakovém gradientu Ficoll-Paque bylo izolováno v průměru při přímém měření 23×10^6 ($11,6 \times 10^6 - 125 \times 10^6$) mononukleárních buněk. Z těchto buněk adherovalo na dno kultivačních nádob 123 ($10 - 1100$) buněk, což odpovídá 1230 CFU-F/ml.

Viabilita kultivovaných buněk byla dlouhodobě průměrně 95 % (85 % - 99 %). U pacientek s nižší kostní denzitou byla stejná viabilita buněk, ale mezenchymální buňky se odlišovaly od pacientek s normální denzitou menším počtem (počet CFU/ml u pacientek s normální denzitou 1235 ± 550 , u pacientek s nižší denzitou 239 ± 150). Tato situace je dokumentována na Obr. 7 a 8, graficky pak vyjádřena počtem CFU/ml v Grafu 2.



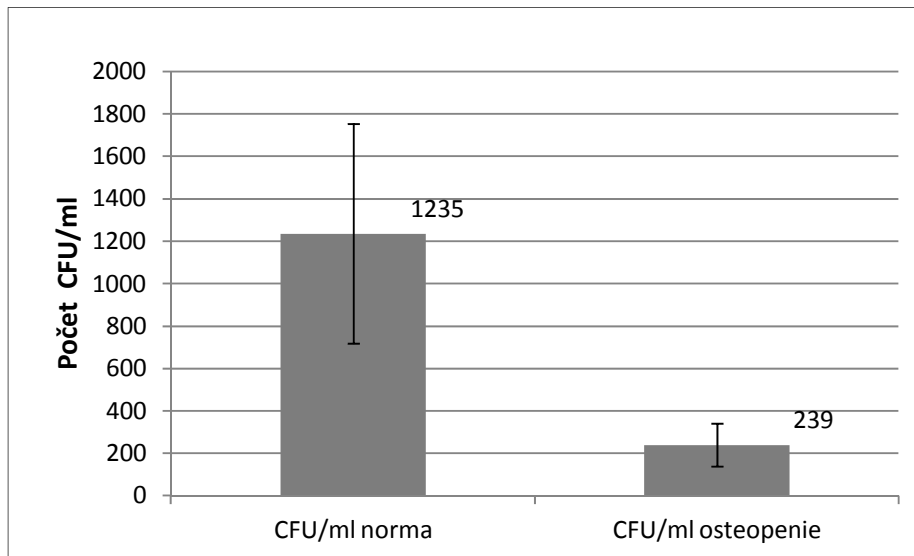
Obr. 7 MKB u pacientů s normální denzitou



Obr. 8 MKB u pacientů s osteoporózou

Typický vřetenovitý tvar kultivovaných MKB, na Obr. 7 od pacienta s normální denzitou, na Obr. 8 výrazně menší počet buněk od pacienta s osteoporózou, mikroskopie s fázovým kontrastem, zvětšeno 200

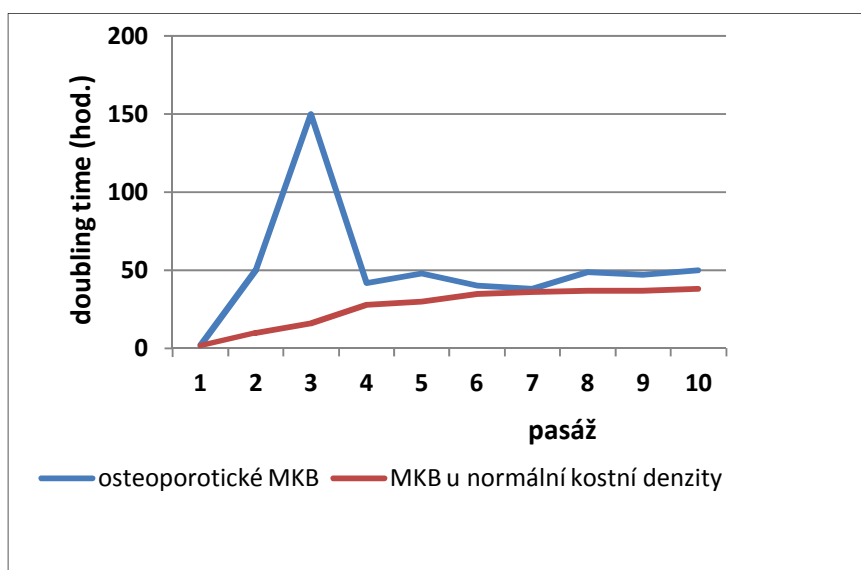
Graf 2 Srovnání počtu CFU/ml u normální a nižší denzity kosti



5.3.3. Proliferační aktivita MKB

Další rozdíl mezi MKB pacientek s normální a nižší kostní denzitou byl v proliferační aktivitě. Nejvýrazněji se to projevilo ve třetí pasáži, kdy MKB z osteoporotické kosti potřebovaly ve třetí pasáži až 10 x delší čas ke zdvojení populace než buňky od pacientů s normální denzitou, v dalších pasážích se rozdíly vyrovnávaly (Graf 3).

Graf 3 Doubling time v jednotlivých pasážích

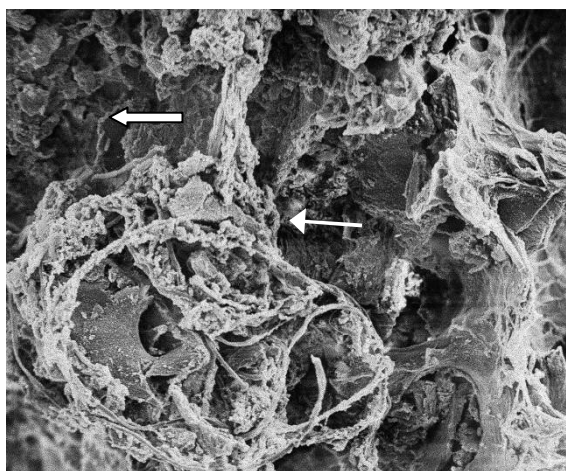


5.3.4. Aktivita MKB na testovaných nosičích

5.3.4.1. Alogenní kostní štěp

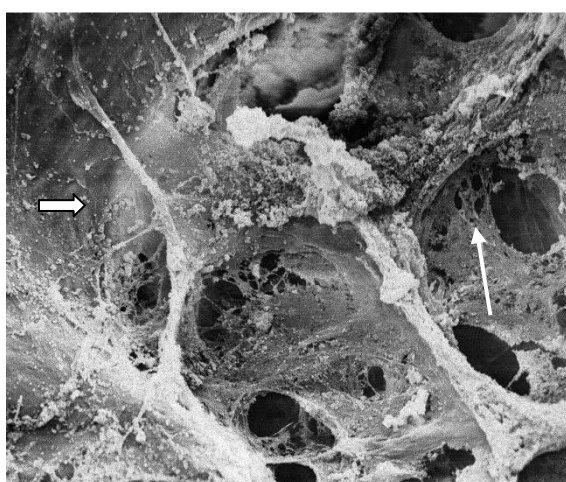
Při nanesení kompletní kostní dřeně i monocytárního koncentrátu byla patrná výrazná tvorba mineralizované extracelulární matrix a kolagenu již v expanzním médiu.

Obrázky 9a-c: Novotvořená mineralizovaná extracelulární matrix a vlákna kolagenu po nanesení kompletní kostní dřeně na aloštěp v různých zvětšeních v expanzním médiu.



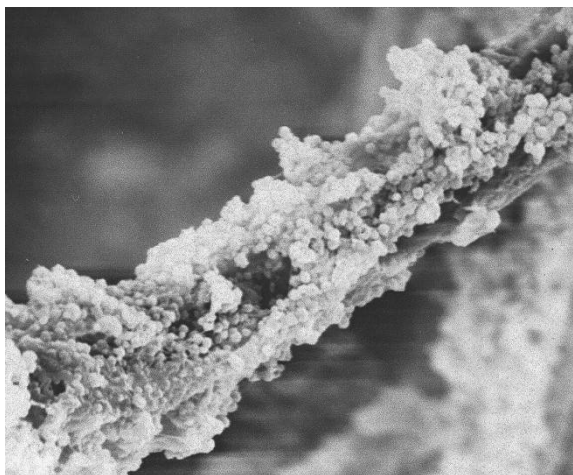
Tmavší struktura (silná šipka) je původní aloštěp, světlejší struktura (slabá šipka) ukazuje novotvořenou mineralizovanou extracelulární matrix. Silná vlákna odpovídají kolagenu I.

Obr. 9a Aloštěp, zvětšeno 100 x.



Výrazná tvorba kolagenu v celém zorném poli. Je patrná nejen na povrchu (silná šipka), ale také proniká dovnitř aloštěpu (slabá šipka).

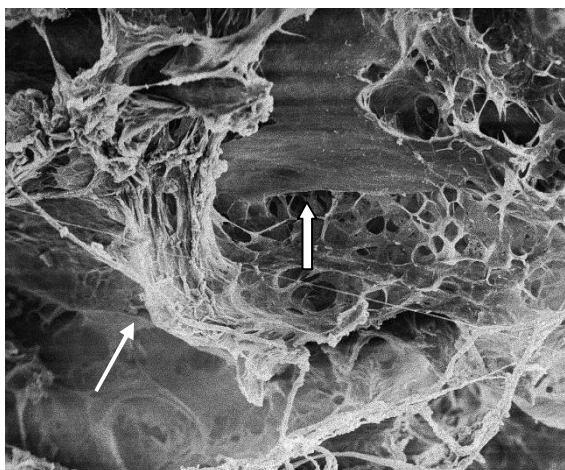
Obr. 9b Aloštěp, zvětšeno 600 x.



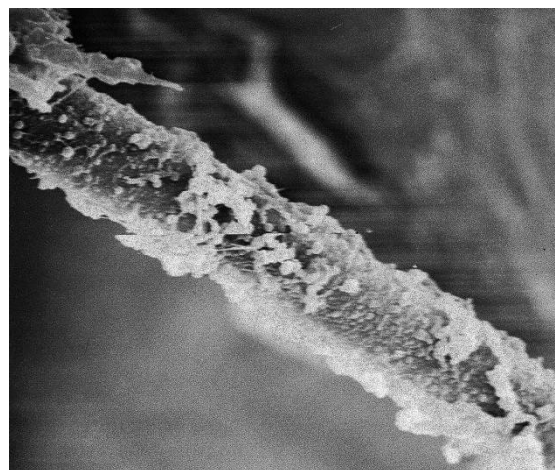
Detail silného vlákna kolagenu I a mineralizované extracelulární matrix s drobnými depozity.

Obr. 9c Aloštěp, zvětšeno 2000 x.

Obrázky 10a-b: Dokumentace podobného výsledku při nanesení monocytárního koncentrátu, avšak tvorba extracelulární mineralizované matrix je méně výrazná ve srovnání s nanesením kompletní kostní dřeně, použito rovněž expanzní médium.



Obr. 10a Aloštěp, zvětšeno 100 x.



Obr. 10b Aloštěp, zvětšeno 2000 x.

Dobrá novotvorba kolagenu (slabá šipka) na původním aloštěpu (silná šipka).

Detail silného vlákna kolagenu I s méně zastoupenou mineralizovanou extracelulární matrix

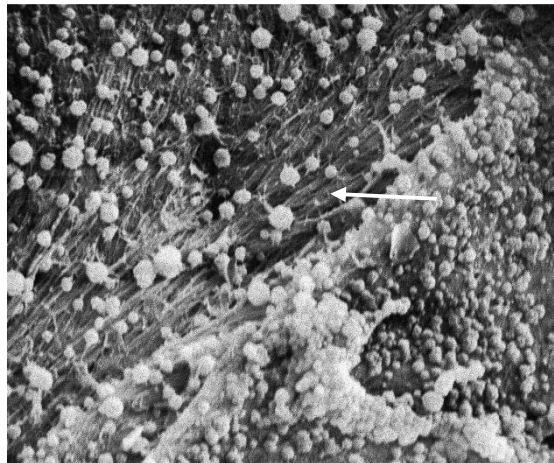
5.3.4.2. Demineralizovaná kostní matrix

Při aktivitě MKB na demineralizované kostní matrix byla pozorována rovněž tvorba kolagenu v expanzním médiu, ale novotvořená vlákna byla ve srovnání s aloštěpem jemnější a byla tedy patrná až při větším zvětšení (Obr. 11a-b).



Obr. 11a DBM, zvětšeno 600 x.

*Dobrá adherence buněk na matrix
jemná kolagenní vlákna nejsou
při tomto zvětšení patrná.*

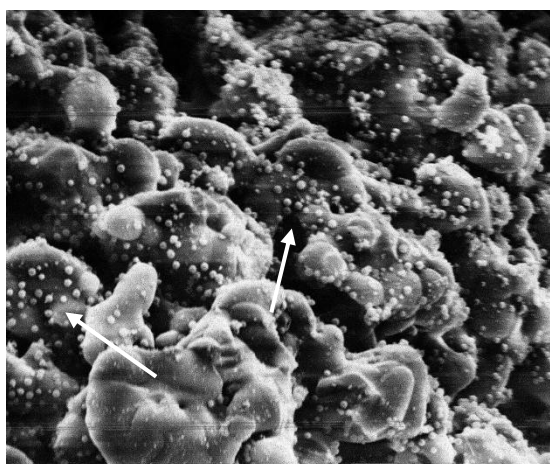


Obr. 11b DBM, zvětšeno 3000 x.

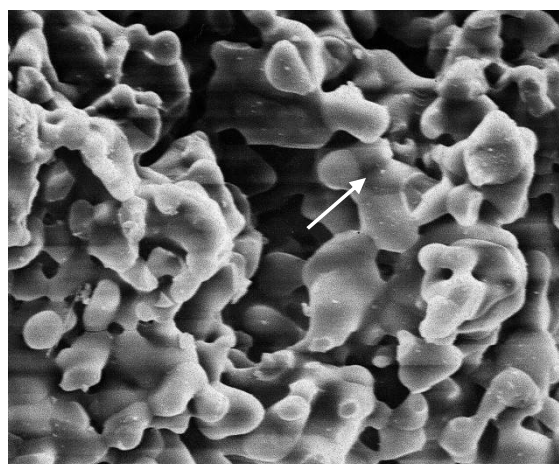
*Výborná adherence buněk s tvorbou
kolagenních vláken (šipka), hojně
zastoupená mineralizovaná
extracelulární matrix.*

5.3.4.3. Umělé náhrady kostních štěpů

Pro umělé náhrady kostních štěpů bylo společné, že novotvorba kolagenu po nanesení kostní dřeně i monocytárního koncentrátu nebyla prakticky patrná v **expanzním médiu**. Obrázky 12a-b zobrazují β -TCP (Poresorb-TCP®) a obrázky 13a-b kalciumsulfát (Osteoset®).



Obr. 12a β -TCP a kompletní kostní dřeň, zvětšeno 2000 x.



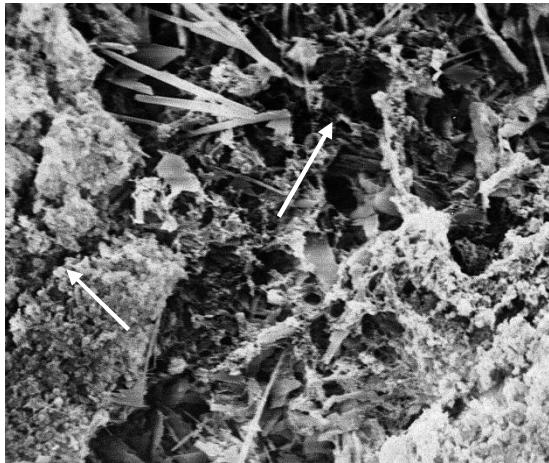
Obr. 12b β -TCP a monocytární koncentrát, zvětšeno 2000 x.

Mnohočetné ostrůvky mineralizované extracelulární matrix na β -TCP, ale bez patrné tvorby kolagenních vláken (šipky).

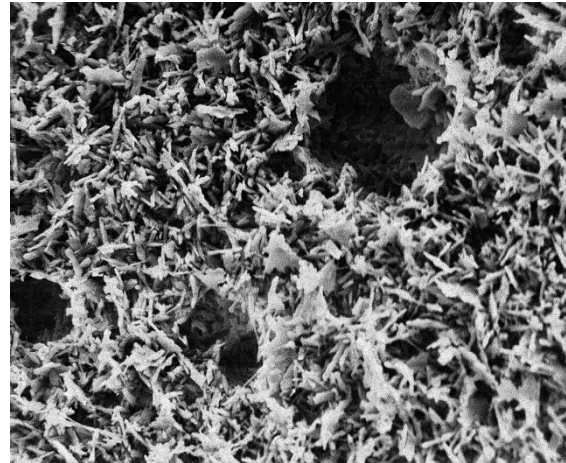
Ojedinelé ostrůvky mineralizované extracelulární matrix (šipka), bez patrné tvorby kolagenu.

Na obrázcích 12a a 12b je rovněž patrná porézní struktura β -TCP: jak makroporozita, tak mikroporozita. Mineralizovaná extracelulární matrix adhezuje k povrchu materiálu, ale je zřetelná rovněž v pórech.

V elektronové mikroskopii byl patrný rozdíl v četnosti ostrůvků extracelulární matrix při nanesení kompletní kostní dřeně a monocytárního koncentrátu. Při nanesení monocytárního koncentrátu je jejich tvorba ojedinělá.



Obr. 13a *Kalciumsulfát a kompletní kostní dřev, zvětšeno 2000 x.*



Obr. 13b *Kalciumsulfát a monocytární koncentrát, zvětšeno 600 x.*

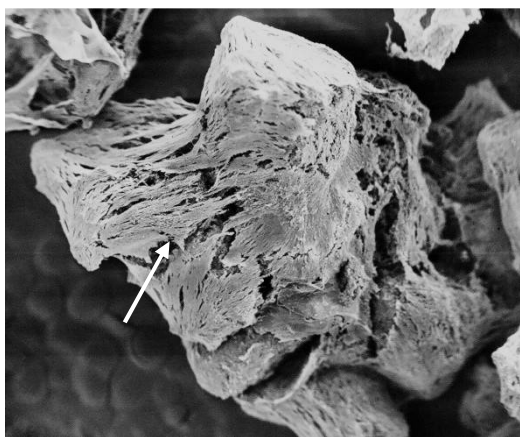
Tvorba mineralizované extracelulární matrix ani tvorba kolagenu nejsou zřejmé. Jsou patrné nerovnosti a prolákliny materiálu, který nemá porézní strukturu (šipky).

Bez zřejmé tvorby kolagenních vláken a mineralizované extracelulární matrix. Při menším zvětšení patrné defekty a nerovnosti materiálu.

Při zvětšení 2000 x je zřejmý rozdíl ve struktuře obou materiálů. Zatímco Poresorb-TCP® má jasnou porézní strukturu, Osteoset® vytváří v průběhu své resorpce spíše nerovnosti a prolákliny, zároveň při tomto zvětšení je patrný výrazný rozdíl v tvorbě mineralizované extracelulární matrix, na Osteosetu® prakticky chybí.

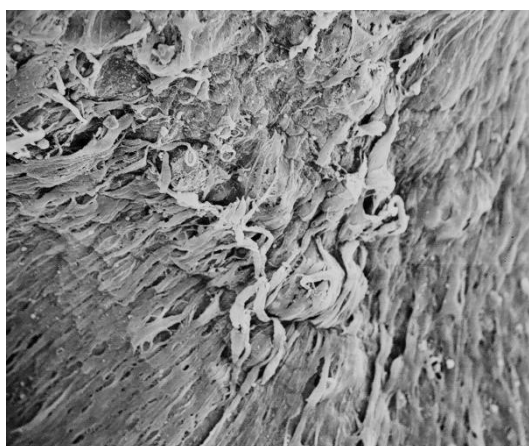
Vzhledem k nedostatečné tvorbě kolagenu na umělých náhradách kostních štěpů v expanzním médiu byly na tyto náhrady nanášené kompletní kostní dřev a monocytární koncentrát, kultivované v proosteogenním sérovém diferenciačním médiu. K oběma předchozím testovaným materiálům (porézní β -trikalciumfosfát a kalciumsulfát) byl ještě přidán lisovaný nízkoteplotní HA 150 (Lasak Praha, s.r.o., Česká republika) vzhledem k dobré adhezenci buněk na kalciumfosfátové materiály. Tento materiál s předpokládanými výbornými bioaktivními vlastnostmi byl ve firmě Lasak Praha s.r.o. vyroben až v době probíhajících experimentů, proto nebyl zařazen v předchozí fázi.

Obrázky 14a-c dokumentují vytvořená kolagenní vlákna po nanesení kompletní kostní dřevě na porézní β -TCP (Poresorb-TCP®) v **diferenciačním médiu** v různých zvětšeních.



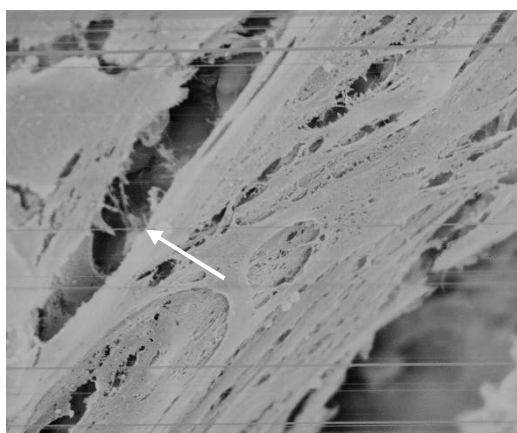
Obr. 14a β -TCP, zvětšeno 55 x.

Při nanesení kompletní kostní dřevě na porézní β -TCP je zřejmá výrazná tvorba silných kolagenních vláken typu I na povrchu i uvnitř materiálu (šipka).



Obr. 14b β -TCP, zvětšeno 540 x.

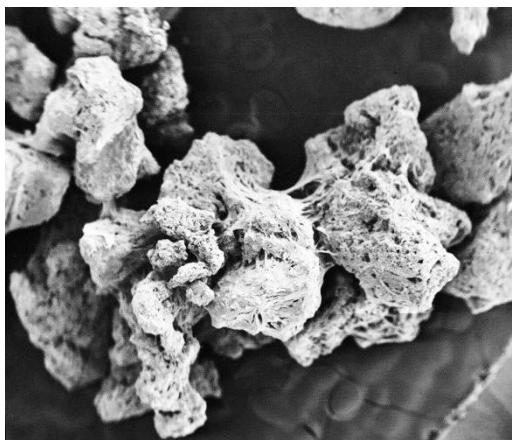
Při větším zvětšení je patrná hustá síť kolagenních vláken typu I překrývající původní materiál.



Obr. 14c β -TCP, zvětšeno 2400 x.

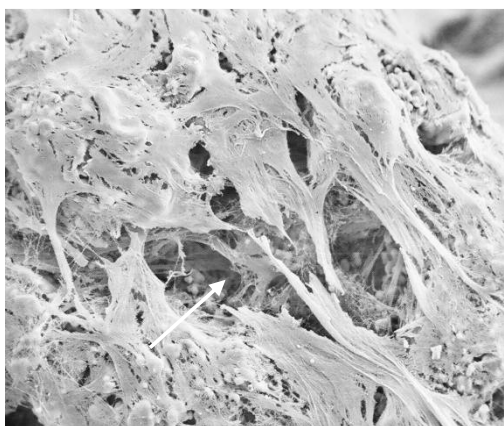
Detail kolagenních vláken pokrývajících materiál a zasahujících i do jeho nitra (šipka).

Obrázky 15a-c zobrazují novotvořenou síť kolagenních vláken po nanesení monocytárního koncentrátu na porézní β -TCP a kultivaci v **diferenčním médiu** v různých zvětšeních.



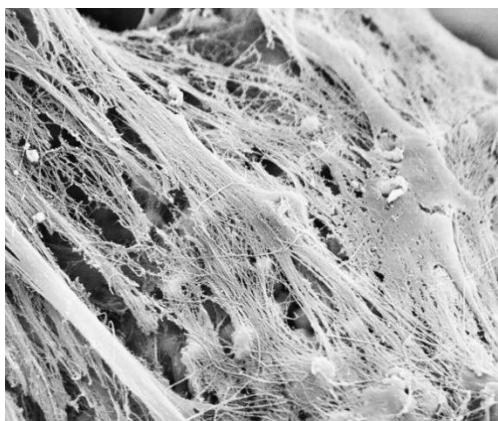
Novotvorba kolagenních vláken typu I pokrývající porézní β -TCP.

Obr. 15a β -TCP, zvětšeno 54 x.



Při větším zvětšení je zřejmá tvorba kolagenních vláken typu I i uvnitř materiálu (šipka).

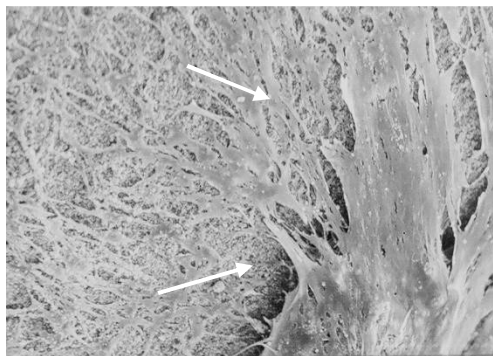
Obr. 15b β -TCP, zvětšeno 580 x.



Detailně patrná hustá kolagenní síť kolagenu I zasahující do nitra biomateriálu.

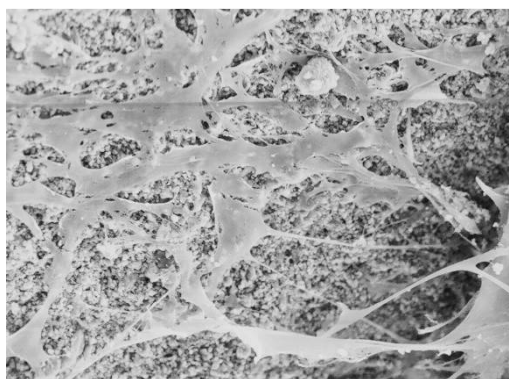
Obr. 15c β -TCP, zvětšeno 2300 x.

Obrázky 16a-c: Po nanesení monocytárního koncentrátu na lisovaný HA 150 v **diferenciačním médiu** byla základním znakem dobrá tvorba kolagenních vláken, ale pouze na povrchu materiálu. Zároveň byl i jiný charakter vláken – tvořily plošné útvary z retikulárních vláken, která odpovídala makroskopicky kolagenu III.



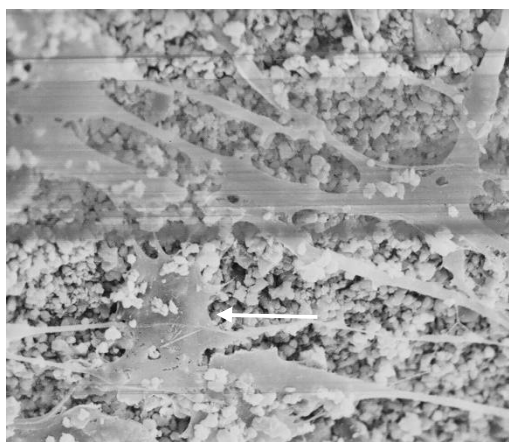
Výrazná tvorba plošných útvarů z kolagenu na lisovaném HA 150 (šipky).

Obr. 16a HA 150, zvětšeno 130 x.



Při větším zvětšení byly pozorovány kolagenní vlákna pouze na povrchu materiálu. Měly charakter retikulárních vláken, resp. sítě z kolagenu III.

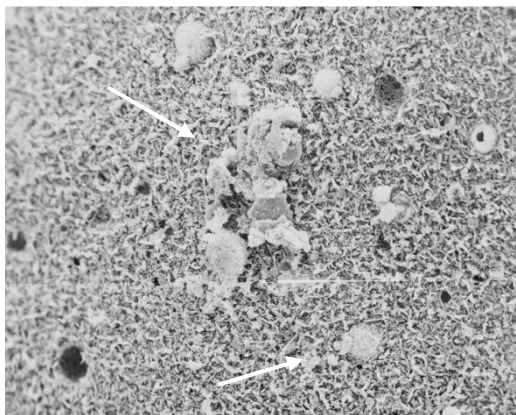
Obr. 16b HA 150, zvětšeno 550 x.



Na detailu dobře patrný biomateriál a retikulární kolagenní vlákna, která nezasahují do jeho nitra (šipka).

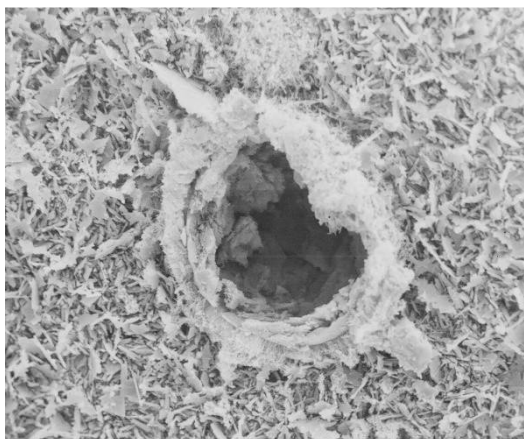
Obr. 16c HA 150, zvětšeno 1480 x.

Obrázky 17a-b: Po nanesení monocytárního koncentrátu v **diferenciačním médiu** na kalciumsulfát (Osteoset®) byla ojedinělá tvorba kolagenních vláken na povrchu a v okolí otvorů. Tento materiál nemá porézní strukturu.



Patrná tvorba kolagenu pouze v místech některých defektů materiálu (šipky).

Obr. 17a Kalciumsulfát, zvětšeno 200 x.



Tvorba kolagenu buňkami kolem otvoru v materiálu.

Obr. 17b Kalciumsulfát, zvětšeno 630 x.

5.4. Diskuze

Kvalita kostní reparační je ovlivněna celou řadou faktorů. Jednou z podmínek je dostatečný počet a kvalita MKB v místě předpokládaného hojení. Dále to jsou přítomnost signálních faktorů, dobrá vaskularizace, mechanická stabilita, místní a celková onemocnění, užívané léky. Z místních vlivů jsou to zejména: přítomnost infektu, nekrózy, stav po ozáření a z celkových: podvýživa, imunosupresivní a maligní onemocnění. Svůj vliv mají věk a pohlaví pacienta (Muschler et al.,2001). U starších pacientů, u kterých indikujeme totální endoprotézu kyčelního kloubu, se mohou tyto vlivy vyskytovat a ovlivňovat tak následnou integraci endoprotézy do kosti nebo v případě revizních výkonů obecně hojení kostních defektů. Protože většina pacientů má v anamnéze běžná onemocnění odpovídající jejich věku (hypertenze, diabetes mellitus, ischemická choroba srdeční), soustředili jsme se na faktor osteopenie/osteoporózy, u kterého jsme předpokládali vyšší prevalenci ve srovnání s výše uvedenými rizikovými faktory, a snažili jsme se zjistit jeho vliv na počet a kvalitu MKB.

D'Ippolito se spolupracovníky odebíral kostní dřev z obratlových těl a zkoumal počet MKB ve vztahu k věku pacientů. Zjistili pokles počtu CFU-F produkujících alkalickou fosfatázu při zvyšujícím se věku, od čehož odvodili nižší počet osteoblastů a tak možnou souvislost s osteoporózou (D'Ippolito et al.,1999). Muschler se spolupracovníky odebíral kostní dřev z lopaty kosti kyčelní od pacientů různého věku. Zjistil pokles počtu CFU-F produkujících alkalickou fosfatázu nejen v závislosti na zvyšujícím se věku, ale zároveň byl tento pokles patrnější u žen, což bylo hodnoceno jako souvislost s postmenopauzální osteoporózou (Muschler et al.,2001). Faktor osteopenie/osteoporózy je tak z hlediska kostní reparační velmi významný. Vzhledem k významnosti tohoto faktoru se tedy nabízí otázka, jaký je vůbec výskyt osteopenie/osteoporózy. Studie NORA (National Osteoporosis Risk Assessment) se účastnilo více než 200 tisíc postmenopauzálních žen starších 50 let, u nichž nebyla dosud diagnostikována osteoporóza. Všem účastnicím byla změřena kostní denzita. Osteopenie byla nalezena u 39,4 procenta, osteoporóza u 7,2 procenta sledované populace (Siris et al.,2001). Pokud bychom přičetli léčené ženy s osteoporózou, její prevalence by byla ještě vyšší. Osteoporóza často není diagnostikována a léčená (Broulík,2007).

V rámci experimentální práce byla odebírána kostní dřev u starších pacientek s koxartrózou IV. stupně. Jedním z předpokladů, které se dříve ukázaly jako mylné, byla domněnka, že osteopenie/osteoporóza se nevyskytuje zároveň s artrózou. Healey et al. porovnávali skupinu

50 žen s primární koxartrózou a 50 žen s osteoporózou s průměrným věkem 69 ± 5 let. Zjistili, že pacienti s osteoporózou mohou mít i artrózu, ale pacienti s artrózou mají jen zřídka osteoporózu (Healey et al.,1985). Naproti tomu Glowacki et al. našli až 25% výskyt osteopenie u koxartrózy v souboru 68 žen s průměrným věkem 69 let (Glowacki et al.,2003). V našem souboru byla tato koincidence (50 % žen) adekvátní tomuto výsledku při menším počtu sledovaných pacientek, přičemž dominovala osteopenie. Zjištěný větší výskyt osteopenie/osteoporózy u artrózy je dán metodikou, kdy byla použita denzitometrie na rozdíl od Healeyho et al., kteří vyhodnocovali rentgenové snímky. Stejnou zkušenost jsme získali i my při vyhodnocování Singhova indexu, který neodpovídal výsledkům denzitometrie. Salamat et al porovnávali hodnocení rentgenových snímků 72 pacientů třemi ortopedy, kteří stanovovali Singhův index a dále byla provedena denzitometrie. Hodnoty Singhova indexu se lišily od jednotlivých lékařů a neodpovídaly výsledkům denzitometrie (Salamat et al.,2010).

Výskyt osteopenie/osteoporózy u pacientek s nízkým BMI a delším odstupem od menopauzy v našem souboru odpovídá údajům publikovaných Broulíkem: riziko osteoporotické zlomeniny u BMI < 22 a dále udává, že po počátečním odbourávání trabekulární kosti dochází po 14 - 15 letech od menopauzy k odbourávání kosti kortikální (v našem souboru průměrný BMI u pacientek s nižší denzitou kosti byl 24 a odstup od menopauzy průměrně 23 let) (Broulík,2007).

Jak již bylo uvedeno v teoretickém úvodu, za normálních okolností se v kostní dřeni vyskytuje 2 až 5 MKB na 1 milion mononukleárních buněk (Minguel et al.,2001). U našich pacientů odpovídala hodnota 5 MKB na 1 milión. Dle Cuomo et al. existuje široká variabilita koncentrace MKB v aspirátu kostní dřeni – 1010 ± 960 CFU-F/ml, v koncentrátu 6150 ± 6660 CFU-F/ml. Počet monocytárních buněk v aspirátu kostní dřeni je $21\,000 \pm 7\,000/\mu\text{l}$, v koncentrátu $91\,000 \pm 19\,000/\mu\text{l}$ (Cuomo et al.,2009). V Connollyho studii obsahoval aspirát kostní dřeni 1,4 až 2,6 miliónů monocytárních buněk v jednom mililitru a v koncentrátu 3,0 až 8,6 miliónů monocytárních buněk v jednom mililitru (Connolly et al.,1989). Námí zjištěný průměrný počet CFU-F/ml u pacientů s normální kostní denzitou (1235 ± 500 CFU-F/ml) odpovídá výše uvedeným literárním údajům. Na druhé straně průměrný počet CFU-F/ml u pacientů s nízkou kostní denzitou byl výrazně nižší (239 ± 150 CFU-F/ml).

Skutečnost, že proliferační aktivita MKB u osteopenické kosti je výrazně nižší než u kosti s normální denzitou, není příliš diskutována. Touto problematikou se zabýval Soukup

se spolupracovníky (Soukup et al.,2006). Maximální rozdíl v čase potřebného ke zdvojení populace byl ve třetí pasáži. Od čtvrté pasáže se proliferační aktivita MKB z osteopenické kosti blížila aktivitě MKB z kosti s normální denzitou. Dle Soukupa by se tak otevírala možnost léčby osteoporózy případnou zpětnou transplantací takto pasážovaných MKB.

Z výše uvedených skutečností vyplývá, že u určitého pacienta nemusí být zaručen v místě hojení dostatek MKB jak co do počtu, tak co do proliferační schopnosti. V klinické praxi by bylo s výhodou obohatit toto místo hojení MKB.

Z klinického hlediska je technicky nejjednodušší odběr kostní dřeně, prakticky jako aspirát z lopaty kosti kyčelní, který MKB obsahuje. Tento aspirát je 20x až 40x zředěn periferní krví, proto je důležitá technika odběru – z jednoho místa aspirace maximálně 2 ml (Muschler et al.,1997). Při spondylochirurgických výkonech je možný odběr kostní dřeně přímo z obratlového těla. Bylo prokázáno, že tato kostní dřeň obsahuje více jaderných buněk než z lopaty kosti kyčelní (McLain et al.,2005). Další možností, jak zvýšit koncentraci mezenchymálních kmenových buněk, je centrifugace získaného aspirátu kostní dřeně, kterou lze provést v uzavřeném systému v rámci jednoho operačního výkonu. Metoda aspirace kostní dřeně vylučuje nutnost dalšího operačního řezu a výrazně tak snižuje morbiditu. Connoly se spolupracovníky popsal použití aspirátu kostní dřeně jako alternativu k autolognímu kostnímu štěpu (Connoly et al.,1986 et 1998). Dobré výsledky této metody prezentovali i další autoři, ale vždy se jednalo o nekontrolované, nerandomizované studie (Wientroub et al.,1989, Grag et al.,1993, Goel et al.,2005). Práce Connolyho jsou citovány jako první ohledně použití aspirátu kostní dřeně, nicméně již o několik let dříve popsal použití tohoto aspirátu v experimentální i klinické praxi Fiala z Ortopedické kliniky v Hradci Králové (Fiala et al.,1977,1980).

Z hlediska koncentrace MKB v aspirátu kostní dřeně vyjádřených v počtu CFU-F/ml je nastolena otázka, jaký je vlastně dostatečný počet MKB pro úspěšné zhojení, pomineme-li další nezbytné faktory. Hernigou et al. užívali monocytární koncentrát z aspirátu kostní dřeně (350 ml!) do 60 pakloubů tibie a uvedli zhojení u 53, přičemž byl pozitivní vztah mezi objemem svalku ve 4 měsících od aplikace a počtem CFU-F. Stanovili minimální počet 30000 progenitorových buněk nutných v místě hojení, resp. koncentraci vyšší než 1500 CFU-F/ml. Nelze tedy plně zaručit dostatečný počet MKB i při poměrně velkém množství odebraného aspirátu (Hernigou et al.,2005). Podle našich výsledků by koncentraci vyšší než 1500 CFU-F/ml dosáhla pouze část našich pacientů vyššího věku s normální kostní denzitou.

Nelze tedy spolehlivě předpovědět, zda konkrétní aspirát nebo koncentrát obsahuje dostatečný počet MKB a zda tyto MKB mají dobrou proliferační schopnost.

Možným řešením by byl nejprve odběr kostní dřeně, izolace a kultivace dostatečného množství MKB, nanesení na nosič s růstovými faktory a transplantace do postiženého místa. V průběhu jednorázové expanze není možné získat dostatečné množství MKB pro klinické účely. Buňky je proto nutné 1-2x pasážovat, což zvyšuje riziko kontaminace buněčné kultury a též prodlužuje dobu mezi odběrem dřeňové krve a získáním konečného produktu pro buněčnou terapii na přibližně 4-6 týdnů.

Pro klinické využití je nejprve třeba MKB rychle expandovat z kostní dřeně. To předpokládá kultivaci MKB v nádobách schválených k tomuto účelu, v médiích schválených ke klinickému použití a v certifikovaných prostorách (v ČR schválených Státním ústavem pro kontrolu léčiv). V České republice toho času není možno připravovat MKB *in vitro* ke klinickým účelům, a to především z důvodů současné metodiky přípravy mezenchymových buněk. V současnosti probíhají experimentální studie, které se snaží odstranit jednotlivé překážky ke klinickému použití.

Základní překážky klinického použití kultivovaných MKB jsou:

- riziko infekční kontaminace při manipulaci v laboratoři,
- používání FCS s rizikem anafylaktické reakce a přenosu infekce,
- používání kultivačních médií neschválených pro klinickou praxi,
- dlouhá doba mezi odběrem dřeně a získáním dostatečného množství MKB,
- riziko ztráty schopnosti diferenciací ve specializované tkáni během pasážování MKB (Sugaira et al. 2004),
- potencionálně také selekce určitého klonu buněk s rizikem kancerogeneze.

Z naší zkušenosti je jisté riziko infekční kontaminace při manipulaci významné. Odběr kostní dřeně byl sice proveden za aseptických kautel na operačním sále, ale následovala série manipulací se vzorky včetně transportu do vzdálené laboratoře, kde byl systém několikrát otevřen při opakovaných pasážích. Nami používaná kultivační média nejsou t.č. schválena pro klinické použití. Využití zvířecího séra je v současné době považováno za velmi problematické vzhledem k možnosti přenosu virů a prionů (např. bovinní spongiformní encefalopatie) a vzhledem k možnosti vzniku prudkých anafylaktických reakcí na zvířecí

bílkovinu, zejména pokud by byly buňky u téhož pacienta transplantovány opakovaně (Mackensen et al.,2000). Dle našich výsledků se mění některé vlastnosti MKB během pasážování (viz změny času potřebného ke zdvojení populace u osteopenických MKB) a existuje tedy i potenciální riziko selekce určitého klonu buněk s rizikem kancerogeneze.

Uvedená omezení se snažila vyřešit celá řada autorů. V první řadě to bylo využití růstových faktorů a suplementů. Gronthos a Simmons zjistili, že nejlepšího růstu MKB je možno docílit kombinací kyseliny askorbové, dexametazonu, destičkového růstového faktoru BB (PDGF-BB) a epidermálního růstového faktoru (EGF) (Gronthos et Simmons,1995). Tsutsumi dále prokázal, že MKB expandované s fibroblastovým růstovým faktorem 2 (FGF-2) si zachovávají vyšší schopnost diferenciaci ve srovnání s MKB expandovanými bez tohoto faktoru (Tsutsumi et al.,2001). Z uvedeného vyplývá, že užití některých růstových faktorů může být výhodné jak pro zvýšení množství MKB, tak i pro zachování jejich schopnosti vytvářet specializované tkáně.

Další autoři se snažili obejít se bez přítomnosti fetálního telecího séra v kultivačním médiu. Pěstování MKB ve zcela bezsérových podmínkách nemělo úspěch (Hankey et al.,2001). Dobrých výsledků bylo dosahováno s lidským sérem (Stute et al.,2004) a lidskou plazmou (Schecroun et Delloye,2004). Studie Kuznetsova však tyto výsledky nepotvrdila (Kuznetsov et al., 2000). Velice slibnou metodou se jeví práce českých autorů Pytlíka a spolupracovníků. Jedná se o jednorázovou expanzi velkého množství MKB s kultivačním médiem bez použití zvířecích bílkovin, s lidským sérem, rekombinantními růstovými faktory a suplementy během 2 týdnů bez separace hemopoetických buněk (Pytlík et al.,2009). Není tedy použito FCS, je zkrácený interval odběr dřeně – transplantace, menší riziko infekční kontaminace vzhledem k neprováděné separaci buněk, zároveň je prokázáno zachování proliferačního a diferenciačního potenciálu. Úspěšné použití pasážovaných MKB v budoucnosti bude tedy vyžadovat kladné vyřešení těchto problémů.

Druhou možností, jak dosáhnout dostatečného počtu MKB v místě hojení, je poskytnout buňkám vhodné trojrozměrné matrice, na kterých adherují a proliferují. Některé tyto matrice byly testovány v druhé části experimentální práce.

Vzhledem k možnostem současné klinické praxe v České republice jsme tedy na připravené nosiče aplikovali kompletní aspirovanou kostní dřeň nebo monocytární koncentrát. Tento koncentrát lze připravit v rámci operačního výkonu, avšak i přesto to znamená určitou

manipulaci s rizikem kontaminace a jistě též představuje prodloužení doby operace. Zajímal nás tedy také rozdíl výsledků v nanesení kompletní kostní dřevě a tohoto koncentrátu. Otázkou bylo, zda výše uvedená omezení jsou nahrazena vyšší účinností koncentrátu.

V případě alogenního štěpu jsme pozorovali velmi dobrou tvorbu extracelulární mineralizované matrix a kolagenu typu I při nanesení kompletní kostní dřevě již v expanzním médiu. Tato novotvorba byla patrná nejen na povrchu aloštěpu, ale i v hlubších vrstvách. Při nanesení monocytárního koncentrátu bychom očekávali větší koncentraci MKB a intenzivnější tvorbu extracelulární matrix včetně kolagenních vláken, ale výsledek byl opačný. Můžeme předpokládat, že pro osteogenezi je sice počet MKB důležitý, ale zrovna tak jsou důležité i další faktory obsažené v kompletní neseparované kostní dřevě. Monocytární koncentrát se tak nejevil jako výhodnější. Empiricky je skutečnost dobré osteogeneze při použití aloštěpu úspěšně prokazována již dlouhodobě při léčbě defektů kostí po resekcii tumorů, u primárních a revizních náhrad kloubů spojených s kostními defekty, v léčbě pakloubů. Námí použitý spongiózní aloštěp tvořil vhodnou matici pro MKB. V současné době je snaha zlepšit a zejména zrychlit osteointegraci aloštěpů tvorbou kompozitních materiálů. Je to zejména na základě požadavků řešit segmentální defekty kostí, často v oblasti diafýz, kdy vzhledem k mechanické pevnosti by byl vhodný kortikální aloštěp, který však, jak bylo uvedeno v úvodu, tuto vlastnost během osteointegrace postupně ztrácí. Experimentálně jsou zkoušeny impregnované aloštěpy MKB (Nather et al.,2010), stejná kombinace s růstovým faktorem osteogenním proteinem 1 (Di Bella et al.,2010). Zlepšení angiogeneze a remodelace štěpu je zkoušeno jeho potažením geneticky upraveným adeno-associated virem kódující růstový faktor VEGF a RANKL (Ito et al.,2005). I přes dobré výsledky v experimentech je přenesení těchto metod do běžné klinické praxe ještě vzdálené. Je otázka, jaké by byly výsledky v humánní medicíně, kdy se mohou přidávat další faktory nutné k osteointegraci aloštěpu. I v našem experimentu dávala lepší výsledky kompletní kostní dřevě ve srovnání s monocytárním koncentrátem. Významná je též ekonomická stránka těchto metod. Klinické použití kombinace aloštěpu a růstového faktoru ukazuje práce Jonese a spolupracovníků v rámci studie *BMP-2 evaluation in surgery for tibial trauma-allograft (BESTT-ALL) study group*. Porovnávali hojení zlomenin tibie v diafýze s přítomným kortikálním defektem, 15 pacientů bylo léčeno autologními kostními štěpy a 15 pacientů kombinací BMP-2 v bovinním kolagenu a spongiózními aloštěpy. Bez další intervence se zhojilo 10 pacientů z první skupiny a 13 pacientů z druhé skupiny. Zároveň byly zjištěny

přechodné protilátky proti bovinnímu kolagenu I u jednoho pacienta druhé skupiny (Jones et al.,2006). Výhodami druhé skupiny byly uváděny nižší krevní ztráta a vyhnutí se rizikům při odběru autologních štěpů. Nicméně rizika použití bovinního kolagenu a vysoká cena této metody favorizují spíše první postup v rutinní praxi.

Na demineralizované kostní matrix v našem experimentu byla vykazována tvorba extracelulární mineralizované matrix a kolagenu také v expanzním médiu, ale vlákna byla jemnější a v menší míře než u kompletního aloštěpu. Cuomo et al. prokázali, že užití samotné kostní dřeně s demineralizovanou kostní matrix nezvyšuje osteogenezu a zároveň zjistili, že nanesení monocytárního koncentrátu na DBM nemá lepší výsledky než použití kompletní kostní dřeně (Cuomo et al.,2009). Výsledky naší práce se s tímto shodují. Nicméně DBM je komerčně dostupná od různých firem: liší se velikostí, tvarem, reziduálním množstvím minerálů a přítomností dalšího nosiče: s glycerolem GraftonTM (Osteotech, USA), s kalciumsulfátem AlloMatrixTM (Wright Medical Technology, USA), s hyaluronovou kyselinou DBX® (Synthes, Švýcarsko), s kolagenem OsteofilTM (Regeneration Technologies, USA), s karboxymethylcelulózou DynagraftTM (Gen-Sci OrthoBiologics, USA). Avšak není zatím známa randomizovaná kontrolovaná studie, která by srovnala použití autologních kostních štěpů a DBM. DBM je v USA doporučována ne jako kostní náhrada, ale expander štěpů (Novicoff et al., 2008). Příkladem klinického použití DBM a aspirátu kostní dřeně je práce Docquiera a Delloyeho, kteří vyplnili tímto materiálem 13 aneurysmatických kostních cyst a u 11 zaznamenali zhojení (Docquier et Delloye,2005).

Společnou vlastností testovaných umělých náhrad kostních štěpů byla jen nepatrná tvorba kolagenu v expanzním médiu. Naproti tomu v diferenciacním médiu jsme pozorovali tvorbu kolagenu různé intenzity závislou na vlastnostech biomateriálu. β -TCP byl ve formě porézní, HA150 lisovaný, kalciumsulfát měl na svém povrchu nepravidelnosti, prolákliny bez typického porézního povrchu. Nejméně intenzivní tvorba mineralizované extracelulární matrix a kolagenu byla právě na kalciumsulfátu. V diferenciacním médiu jsme tuto tvorbu zaznamenali pouze v oblasti proláklín. Možným vysvětlením je nejen neporézní struktura, ale i rychlé rozpouštění kalciumsulfátu se vznikem hyperosmolárního prostředí a kyselého pH (Muschler et al.,2004). U lisovaného hydroxyapatitu jsme zaznamenali tvorbu kolagenu a extracelulární mineralizované matrix pouze na povrchu vzhledem ke struktuře materiálu v diferenciacním médiu. Zajímavým nálezem byla tvorba plošných sítí jemných kolagenních vláken odpovídající kolagenu III, který se vyskytuje spíše v oblasti měkkých tkání – svaly,

kůže apod. O tvorbě tohoto kolagenu na lisovaném hydroxyapatitu jsme v naší dostupné literatuře nenalezli zmínku a bude předmětem dalšího výzkumu již mimo rámec této dizertační práce. Nejlepší výsledky vykazoval porézní β -TCP. V expanzním médiu nebyla patrná tvorba kolagenních vláken, ale pouze extracelulární mineralizovaná matrix. Opět byl rozdíl v nanesení kompletní kostní dřevě a monocytárního koncentrátu, u kterého tato tvorba byla výrazně menší. V diferenciacním médiu jsme zaznamenali výraznou tvorbu kolagenu I jak při kompletní kostní dřevě, tak při nanesení monocytárního koncentrátu. Tato tvorba byla patrná na povrchu i uvnitř materiálu. Erbe se spolupracovníky také kombinoval β -TCP s kostní dřevě a zjistil v experimentu na psech, že buňky z kostní dřevě výborně adherují na povrch materiálu, pronikají s nutrienty dovnitř, jsou viabilní a je novotvořena kostní tkáň (Erbe et al.,2001). Naše poznatky odpovídají i dalším dlouhodobým dobrým zkušenostem s porézním β -TCP (Knaack et al.,1998, Wiltfang et al.,2002, Szpalski et Gunzburg,2002). Fredericks se spolupracovníky zkoumal interakce porézního trikalciumfosfátu v buněčné kultuře a dále jej implantoval do segmentálního defektu kosti u králíka s dobrými výsledky a doporučením tohoto materiálu jako možné alternativy pro autoštěpy (Fredericks et al.,2004). Porézní β -TCP se tak jeví vhodnou náhradou kostních štěpů, i když ještě lepší výsledky vykazoval alogenní kostní štěp vzhledem k výrazné tvorbě kolagenu již v expanzním médiu.

Jsme si vědomi, že při velkém množství různých faktorů ovlivňujících osteogenezi je složité vytvořit experimentální model *in vitro* nebo na zvířeti, jehož výsledky by byly spolehlivě transformovatelné do humánní medicíny. Proto jsou nutné klinické studie. Zhodnocení výsledků hojení kostních defektů vyplněných porézním β -TCP nebo autologními kostními štěpy nebo jejich kombinací je předmětem klinické části disertační práce. Jedním z cílů je určit indikace pro výplň defektu porézním β -TCP.

5.5. Závěr

Schopnost kostní regenerace a hojení jsou ovlivněny řadou faktorů. U seniorů, zejména postmenopauzálních žen je tato schopnost ovlivněna častým výskytem osteopenie/osteoporózy. Zjistili jsme, že u těchto žen je významný výskyt nízké kostní denzity. Je možná koincidence artrózy a osteopenie/osteoporózy, zejména u žen s delším odstupem od menopauzy a nízkým BMI, což odpovídá publikovaným údajům. K určení osteopenie/osteoporózy je nutné provést denzitometrické vyšetření, relativně jednoduchá metoda stanovení Singhova indexu z rtg kyčelního kloubu není spolehlivá.

V osteopenické/osteoporotické kosti je nízký počet MKB vyjádřený počtem CFU-F a tyto buňky mají nižší proliferační aktivitu, naproti tomu viabilita buněk byla stejná jako u MKB z kosti s normální denzitou. Maximální rozdíl v čase potřebným ke zdvojení populace byl ve třetí pasáži. Od čtvrté pasáže se proliferační aktivita MKB z osteopenické kosti blížila aktivitě MKB z kosti s normální denzitou. Zároveň u seniorů s normální kostní denzitou byla zjištěna poměrně široká variabilita v počtu MKB v aspirátu kostní dřeně vyjádřená v CFU-F. Dle literárních údajů o nutném minimálním počtu CFU-F pro úspěšné zhojení by toho dosáhla jen část z těchto pacientů. Nelze tedy spolehlivě předem říci, zda konkrétní aspirát nebo koncentrát obsahuje dostatečný počet MKB a zda tyto MKB mají dobrou proliferační schopnost. Možným řešením je obohacení místa hojení MKB. Prakticky to lze v klinické praxi provést aspirátem kostní dřeně nebo případně monocytárním koncentrátem. Úskalím obou metod je nejasné množství odebraných buněk. Odběr kostní dřeně s izolací, kultivací MKB a jejich zpětnou transplantací do místa hojení by tento problém vyřešil, ale v současné době není v klinické praxi tento postup možné provést.

Jinou alternativou je poskytnutí MKB vhodnou trojrozměrnou maticí, na kterou adherují a proliferyjí do dostatečného počtu s následnou osteogenezí. V případě alogenního štěpu jsme pozorovali velmi dobrou tvorbu extracelulární mineralizované matrix a kolagenu typu I při nanesení kompletní kostní dřeně již v expanzním médiu. Tato novotvorba byla patrná nejen na povrchu aloštěpu, ale i v hlubších vrstvách. Při nanesení monocytárního koncentrátu bychom očekávali vyšší koncentraci MKB a intenzivnější tvorbu extracelulární matrix včetně kolagenních vláken, ale výsledek byl opačný. Námi použitý spongiózní aloštěp tvořil vhodnou maticí pro MKB. Na demineralizované kostní matrix v našem experimentu byla vykazována tvorba extracelulární mineralizované matrix a kolagenu také v expanzním médiu, ale vlákna byla jemnější a v menší míře než u kompletního aloštěpu.

Společnou vlastností testovaných umělých náhrad kostních štěpů byla jen nepatrná tvorba kolagenu v expanzním médiu. Naproti tomu v diferenciacním médiu jsme pozorovali tvorbu kolagenu různé intenzity závislou na vlastnostech biomateriálu. Nejméně intenzivní tvorba mineralizované extracelulární matrix a kolagenu byla právě na kalciumsulfátu. V diferenciacním médiu jsme tuto tvorbu zaznamenali pouze v oblasti proláclin. U lisovaného hydroxyapatitu jsme zaznamenali tvorbu kolagenu a extracelulární mineralizované matrix pouze na povrchu vzhledem ke struktuře materiálu v diferenciacním médiu. Zajímavým nálezem byla tvorba plošných sítí jemných kolagenních vláken odpovídající kolagenu III, který se vyskytuje spíše v oblasti měkkých tkání. Nejlepší výsledky vykazoval porézní β -TCP. V expanzním médiu nebyla patrná tvorba kolagenních vláken, ale pouze extracelulární mineralizované matrix. Opět byl rozdíl v nanesení kompletní kostní dřeně a monocytárního koncentrátu, u kterého tato tvorba byla výrazně menší. V diferenciacním médiu jsme zaznamenali výraznou tvorbu kolagenu I jak při kompletní kostní dřeni, tak při nanesení monocytárního koncentrátu. Tato tvorba byla patrná na povrchu i uvnitř materiálu.

Aktivita MKB vyjádřená tvorbou mineralizované extracelulární matrix a kolagenních vláken byla vyšší na aloštěpech než na umělých kostních náhradách.

Obecně lepší výsledky byly pozorovány při použití aspirátu kompletní kostní dřeně než monocytárního koncentrátu, což ukazuje na nutnou přítomnost dalších faktorů k úspěšné osteogenezi.

Dle literárních údajů, tak jak bylo uvedeno v teoretickém úvodu, lze osteogenezi podpořit přidáním proosteogenních a proangiogenních faktorů, tvorbou kompozitních materiálů či užitím genetické terapie. Jedná se však zatím spíše o experimentální práce. Zavedení těchto metod do klinické praxe brání také finanční náročnost léčby.

6. Klinická studie

6.1. Úvod

Chirurgická léčba kostních defektů má za cíl obnovení funkce postiženého skeletu, jeho tvar, strukturu, pevnost, odolnost vůči stresu (mechanické faktory) a schopnost remodelace, reakce na změny zátěže, produkce signálních proteinů (biologické faktory).

Hojení kostních defektů z biologického hlediska představuje složitou problematiku – zdroj buněk účastnících se reparačního procesu, signální proteiny a růstové faktory, osteokondukční materiál a to vše provázené včasnou angiogenezou k poskytnutí energetických zdrojů a kyslíku pro náročný metabolický proces, se kterým neoddelitelně souvisí nutnost eliminace vznikajících katabolitů.

Vada v kostní tkáni, která je přiměřeně zatěžovaná, může (podle velikosti a rozsahu) způsobit patologickou zlomeninu či uvolnění implantátu (např. endoprotézy). V ortopedické praxi nejčastěji řešíme nádorům podobné afekce a benigní kostní nádory, ve vyšším věku problémy posttraumatické, defekty po zánětech nebo v okolí implantovaných endoprotéz uvolněných v důsledku nemoci z otěrových polyetylenových částic.

Pro rentgenologické sledování postupu hojení kostních defektů jsme zvolili skupinu nádorům podobných afekcí a benigních kostních nádorů zejména proto, že lze k zobrazení použít standardní rentgenologické projekce. V oblasti endoprotéz je zobrazení obtížnější.

Na našem pracovišti ke kostní substituci používáme kostní štěpy autologní, morselizované štěpy alogenní a za určitých okolností porézní resorbovatelný β -TCP Poresorb-TCP®.

Biologií autologních kostních štěpů se dlouhodobě zabývá řada studií, v popředí zájmu o bioaktivní sklokeramické materiály je v posledních desetiletích právě β -TCP, materiál resorbovatelný, s osteokondukčními vlastnostmi, ale bez schopnosti osteoindukce. Autologní štěp do defektu dodává osteokondukční matrix – minerální i proteinovou, signální proteiny a buněčnou složku, která přežije odběr a transplantaci. β -TCP porézní s mikropóry a spojí mezi nimi tvoří „lešení s osteokondukčním povrchem,“ ale osteoindukce a osteogeneze musí vycházet ze stěn a okolí defektu. Postupně, jak je rozkládán a resorbován, je nahrazován vlastní kostní tkání.

Na rentgenových snímcích můžeme sledovat postup této resorpce u uvedeného materiálu, ale i autologních kostních štěpů. V tomto procesu hraje významnou roli plocha kontaktu

a hloubka, resp. vzdálenost středu výplně od stěn defektu. Zároveň se novotvoří kostní trabekuly a defekt se zmenšuje. Studium těchto problémů je náplní klinické studie, která sleduje hojení kostních defektů vyplněných autologními spongiózními štěpy, β -TCP a kombinací obou uvedených výplňových materiálů.

6.2. Metodika

Klinická studie se zabývá hodnocením výsledků léčby kostních defektů za období 2003 až 2009 u 87 pacientů (49 mužů, 38 žen) a průměrného věku 26 let (rozmezí 3 až 77 let, medián 17 let).

Do studie byli zařazeni pacienti léčení na naší klinice s kostním defektem na horní nebo dolní končetině vzniklým na podkladě benigního nádoru nebo nádoru podobné afekce. Zároveň byl vyžadován časový odstup nejméně jeden rok od operace a plně zachovaná rentgenová dokumentace. Vyloučeni byli pacienti s maligními tumory, imunosuprimovaní, užívající kortikosteroidy a/nebo cytostatika, kuřáci.

Před operací byly zaznamenány: věk a pohlaví pacientů, předpokládaná diagnóza, která byla ověřena histologickým vyšetřením, postižená kost, dominantní typ kosti v okolí ložiska (spongiózní, kortikospongiózní nebo kortikální) a byl vypočítán objem ložiska.

Metodika měření objemu defektů byla použita dle Anker a spolupracovníků (Anker et al., 2005). Za standardních podmínek byly zhotoveny dvě na sebe kolmé rentgenové projekce postižené lokality. Na těchto snímcích byl změřen maximální kраниokaudální, transverzální a předozadní rozměr kostního defektu a jeho objem byl vypočítán jako objem kváдру v cm^3 (Obr. 18a-b).



Obr. 18a,b Měření maximálních rozměrů defektu ve třech rovinách k vypočítání jeho objemu

Operace probíhaly v celkové anestézii ze standardních operačních přístupů. V místě léze byla provedena trepanace kosti. Obsah ložiska byl pečlivě exkochleován do makroskopicky zdravé kosti a odeslán na histologické vyšetření. Defekty byly vyplňovány autologními kostními štěpy odebranými v rámci téhož operačního výkonu z lopaty kosti kyčelní nebo β -TCP (Poresorb-TCP®). Část defektů byla vyplněna směsí autologních kostních štěpů a β -TCP (Poresorb-TCP®) v poměru 1:2. V 10 případech byla provedena dlahová osteosyntéza kosti (ve 4 případech pro přítomnou patologickou zlomeninu v defektu, v 6 případech pro výrazné oslabení kosti defektem a riziko vzniku zlomeniny zejména při namáhání v ohybu). Stehy byly odstraňovány 12. pooperační den a plné zatěžování končetin bylo povoleno v pooperačním období za 6 týdnů až 3 měsíce v závislosti na velikosti defektu, postupu hojení a pacientových obtížích. Při odstraňování kovového materiálu po 12 měsících byla možnost odebrat vzorek tkáně z původního defektu k histologickému vyšetření výplně a jejího okolí, které bylo provedeno ve Fingerlandově ústavu patologie FN a LF UK Hradec Králové.

V pooperačním období byli pacienti sledováni klinicky a radiologicky bezprostředně po operaci, v 6 týdnech, 3 měsících, 6 měsících, v 1 roce a dále v ročních intervalech. Byly zaznamenány komplikace hojení, včetně komplikací při odběru autologních kostních štěpů. Rovněž byla dokumentována ordinovaná zátěž dolních končetin v průběhu rekonvalescence. Při každé kontrole pacienta byly zhotoveny za stejných podmínek dvě standardní kolmé rentgenové projekce operované oblasti. Na pooperačních snímcích byla hodnocena kompletnost výplně a případná lokalizace částic β -TCP v měkkých tkáních. Opět podle Anker a spolupracovníků byl vypočítán objem defektu, přičemž rozměry defektů byly získány jako průměr ze dvou měření. Byla sledována resorpce materiálu výplně, případné radiolucentní zóny v okolí, trabekulace defektu, vazba rostoucích trabekul na výplňový materiál. Trabekulaci defektu rozumíme dle Anker přítomnost kostních trabekul na rentgenovém snímku, které znamenají novotvořenou kostní tkáň v původním defektu (Anker et al., 2005). Zmenšování objemu defektu bylo hodnoceno jak v absolutních číslech v cm^3 , tak v procentuálním vyjádření ve vztahu k původní velikosti.

Výsledky byly statisticky zpracovány. Při těchto výpočtech jsme pracovali s hladinou významnosti $p = 0,05$. Byl vyhotoven histogram velikostí defektů. Resorpci výplně a trabekulaci defektu jsme sledovali zvlášť pro jednotlivé skupiny, výsledek byl zaznamenán graficky včetně standardních odchylek v jednotlivých časových odstupech od operace. Dále

jsme porovnali výsledky trabekulací defektů v jednom roce od operace v jednotlivých skupinách. Nejprve analýzou rozptylu (ANOVA) a poté dvouvýběrovým t-testem.

Regresní analýzou byla hodnocena závislost hojení, resp. zmenšování defektu na jeho původní velikosti a pacientově věku pro tři typy výplně v absolutním i procentuálním vyjádření objemu. Ke statistickému výpočtu byly použity hodnoty původní velikosti defektu a hodnoty trabekulace v 1 roce od operace. Stanovovali jsme koeficienty determinace s grafickým vyjádřením včetně lineární spojnice trendu. Stejnou metodu regresní analýzy jsme použili k určení závislosti dosažené trabekulace defektu v 1 roce od operace na věku pacienta.

Porovnávali jsme trabekulaci defektů 6 týdnů, 3, 6 a 12 měsíců po operaci vzhledem k jejich poloze v kosti (převaha spongiózní, kortikospongiózní a kortikální kosti). Nejprve byla provedena analýza rozptylu (ANOVA) a poté dle výsledku byl použit neparametrický test.

U 10 pacientů s defekty vyplněnými Poresorbem-TCP® byl sledován vliv přídatné osteosyntézy a povolované zátěže dolní končetiny na trabekulaci defektu. V jednotlivých časových odstupech od operace byla vypočítána průměrná trabekulace defektů a vyznačena graficky.

Vzorky tkáně získané při extrakci kovu z místa původního defektu byly barveny hematoxylinem-eosinem a dle Gömöriho na retikulin, byl hodnocen výskyt pletivové či trabekulární kosti. Prohlíženy byly při zvětšení 200x.

Za úspěšné zhojení kostního defektu byla považována jeho nejméně 80% trabekulace v 12. měsících po operaci. Graficky jsme znázornili počty defektů splňujících toto kritérium zvláště pro výplň autologními kostními štěpy a Poresorb-TCP® se zohledněním původní velikosti defektů.

6.3. Výsledky

6.3.1. Obecná charakteristika souboru

Základní diagnózou byly nádorům podobné afekce nebo benigní kostní tumory.

V Tabulce 3 jsou uvedeny počty defektů způsobené patologickými stavy.

Tab. 3 *Přehled patologických stavů s přítomnými kostními defekty*

Příčina kostního defektu	Počet
Kostní cysta	44
Enchondrom	24
Neosifikující fibrom	9
Fibrózní dysplázie	6
Intraosseální ganglion	2
Intraosseální lipom	1
Chondroblastom	1

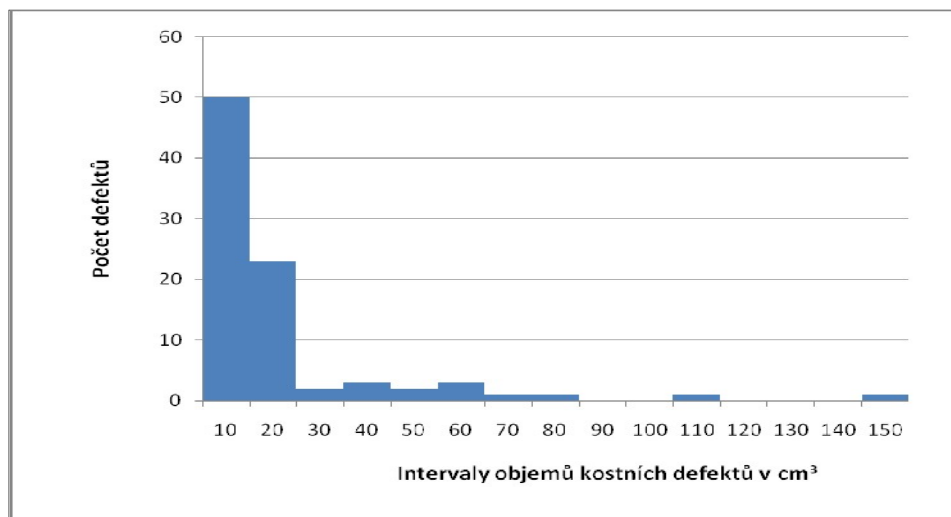
Přehled postižených kostí je uveden v Tabulce 4, přičemž převažovalo umístění defektu v kortikospongiózní kosti (40 x), dále ve spongiózní (21 x), nejméně v kortikální kosti (16 x).

Tab. 4 *Přehled postižených kostí*

Postižená kost	Počet
Femur	14
Tibie	18
Fibula	3
Talus	3
Kalkaneus	9
Humerus	12
Radius	2
Metakarpy	8
Falangy	18

Průměrný objem kostního defektu byl 15 cm³ (interval 0,4 – 144 cm³, medián 9 cm³). Graf 4 znázorňuje četnosti jednotlivých velikostí objemů v intervalech po 10 cm³.

Graf 4 *Histogram velikostí defektů*



Autologními kostními štěpy bylo vyplněno 28 defektů, 44 porézním β -TCP (Poresorb-TCP®) a 15 směsí obou biomateriálů v poměru 1:2 ve prospěch β -TCP.

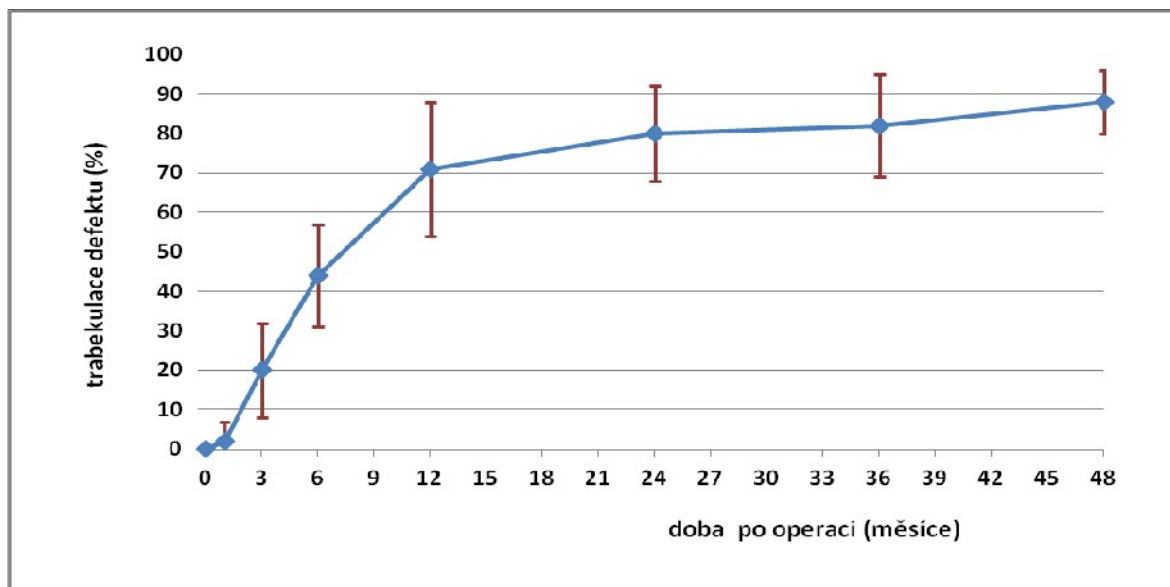
Průměrná doba sledování pacientů byla 4 roky (interval 1 až 6 let) od operace.

6.3.2. Výplň autologními kostními štěpy

U 43 pacientů byl prováděn odběr autologních kostních štěpů z lopaty kosti kyčelní. U těchto pacientů jsme zaznamenali 2 případy přechodných dysestezií v inervační oblasti nervus cutaneus femoris lateralis, ostatní odběry byly bez komplikací.

U 28 pacientů, když byly k výplni použity pouze autologní kostní štěpy, jsme během doby sledování zaznamenali v prvních 6 týdnech od operace jejich mírnou resorpci – průměrně 19 % (rozsah byl 10 až 40 %). Dominantní byla trabekulace kostního defektu, která měla dvě fáze: rychlou, trvající první rok od operace, následovanou pomalou fází. Tuto situaci zobrazuje Graf 5 včetně znázorněných směrodatných odchylek. 12 měsíců od operace byla průměrná trabekulace kostního defektu 71 % (SD = 17 %).

Graf 5 Trabekulace kostního defektu vyplněného autologními kostními štěpy v čase



Na následujících rentgenových snímcích 12-leté dívky s defektem distální tibie způsobené neosifikujícím fibromem demonstrujeme pooperační trabekulaci defektu, když k výplni byly použity autologní kostní štěpy (Obr. 19a-d).



Obr. 19a



Obr. 19b



Obr. 19c



Obr. 19d

Rentgenogramy a,b zobrazují předoperační nález, c,d je stav po 4 letech. Je patrná velmi dobrá trabekulace, kostními trámečky je původní defekt téměř zaplněn. Šipky označují místa projasnění, kde byla kortikalis původně perforovaná.

6.3.3. Výplň porézním β -TCP

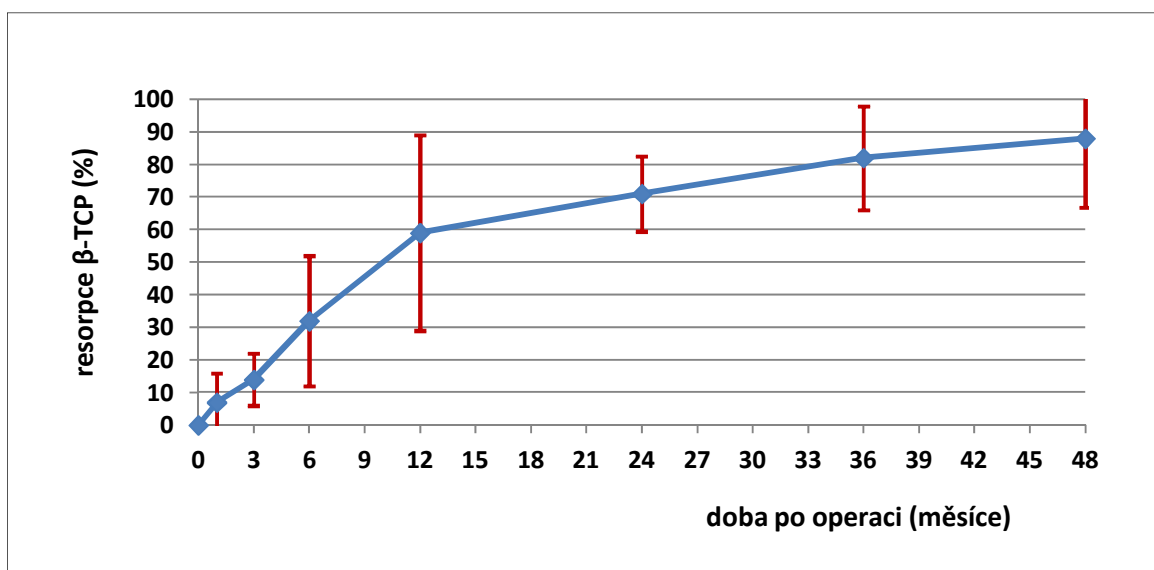
Při použití β -TCP (Poresorb-TCP®) jako náhrady kostní tkáně jsme nezaznamenali nežádoucí vedlejší reakce.

Resorpce Poresorbu-TCP® v defektu byla pomalá, zejména u větších defektů. V 12 měsících od operace bylo průměrné množství resorbovaného materiálu 59 % (SD = 30 %), což je široké rozmezí závislé zejména na množství implantovaného materiálu. Uvedený proces zobrazuje Graf 6.

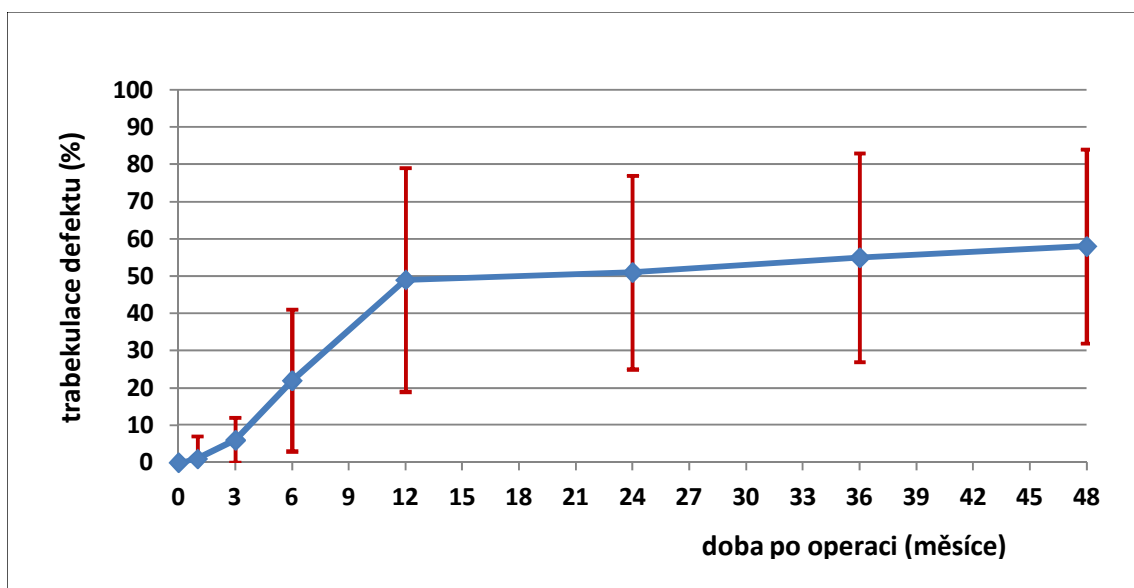
Trabekulace v kostním defektu postupovala rovněž pomalu. V 12 měsících od operace byla průměrně 49 % (SD = 30 %) a dále se tato hodnota v čase příliš nezvyšovala. Situace se lišila defekt od defektu a úspěšnost trabekulace byla rovněž závislá na velikosti kostního defektu. Tento stav ukazuje Graf 7.

Poresorb-TCP® byl velmi dobře tolerován, na rentgenogramech v žádném případě nebyly nalezeny radiolucenční oblasti kolem materiálu. Zato jsme pozorovali přímou vazbu novotvořených trabekul na něj.

Graf 6 Resorpce porézního β -TCP vyplňujícího kostní defekt



Graf 7 Trabekulace kostního defektu vyplněného porézním β -TCP



Příkladem celé resorpce β -TCP a prakticky kompletní trabekulace defektu je rentgenová dokumentace případu 17-leté dívky s enchondromem základního článku palce během 12 měsíců po operaci (Obr. 20a-c).



Obr. 20a

Obr. 20b

Obr. 20c

a/ Předoperační snímek. Defekt způsobený enchondromem byl vyplněn porézním β -TCP.

b/ Pooperační snímek. Na snímku je patrná prakticky kompletní výplň a malé množství granulí Poresorb-TCP® v měkkých tkáních (šipka).

c/ Snímek po 12 měsících. Poresorb-TCP® je kompletně vstřebaný jak v měkkých tkáních, tak v kosti, jejíž struktura se obnovila.

Následně je demonstrován případ neúplné resorpce β -TCP (Poresorb-TCP®) na konci 12. měsíce pooperačně (Obr. 21a-b).



Obr. 21a



Obr. 21b

a/ Pooperační snímek Poresorbem-TCP® vyplněného defektu po exkochleaci neosifikujícího fibromu u 17-leté dívky.

b/ Rentgenogram po 12 měsících. Materiál je zčásti ještě přítomen. Je patrná jeho resorpce a trabekulace defektu z periferie směrem do centra původního defektu.

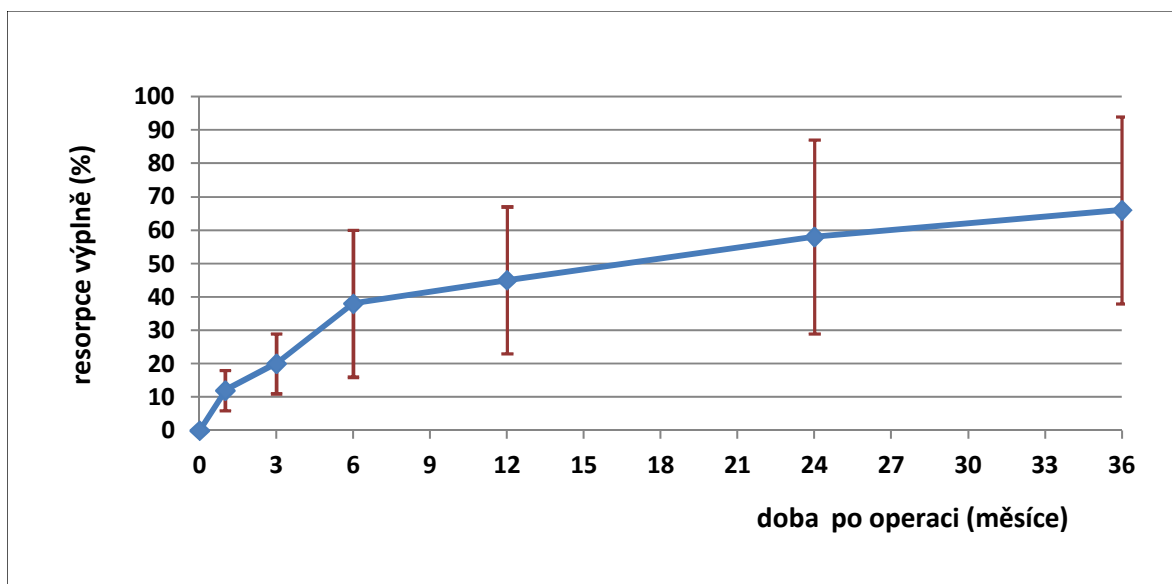
U 11 pacientů jsme granule materiálu našli v měkkých tkáních, kam se dostaly při operaci, v žádném případě nebyly v prostoru kloubu. U všech pacientů tato ektopická lokalizace biomateriálu nezpůsobila žádné nežádoucí vedlejší účinky (ve smyslu bolestí, otoků, zarudnutí, infektu apod.) a mezi 6. až 12. týdnem pooperačně byl materiál kompletně vstřebaný.

6.3.4. Výplň směsí autologních kostních štěpů a porézního β -TCP

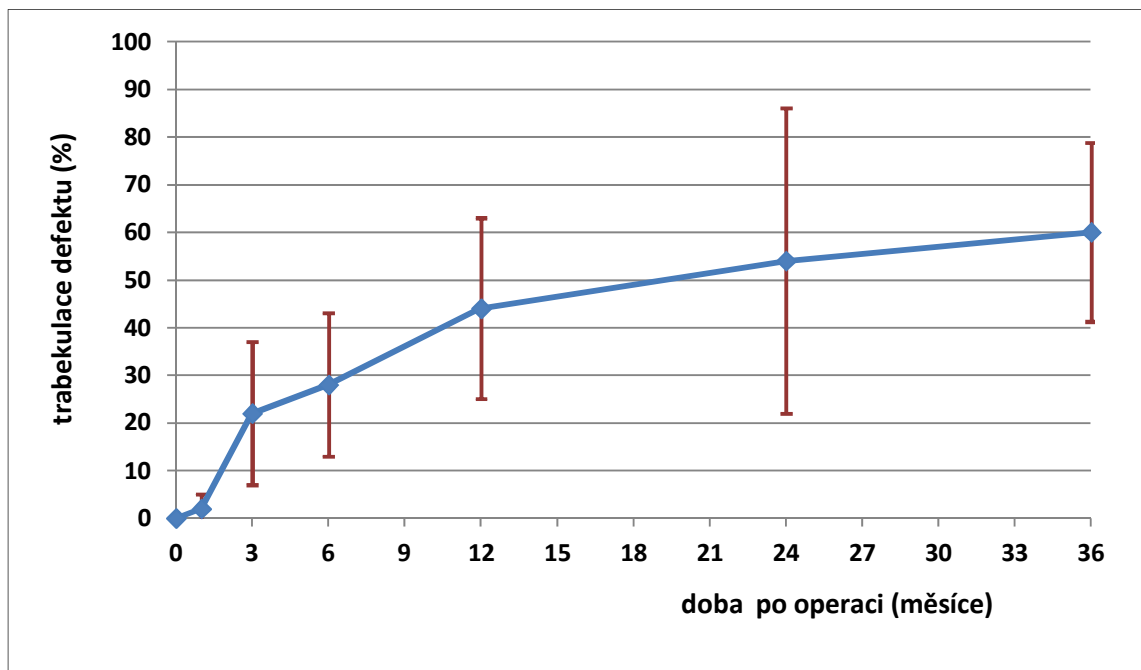
V případě kombinace výplňového materiálu (poměr 1:2 ve prospěch β -TCP) jsme v prvních 6 měsících od operace pozorovali rychlejší resorpci materiálu i trabekulaci kostního defektu než při výplni samotným Poresorbem-TCP®.

V dalším časovém průběhu byly vykázané obdobné výsledky v resorpci materiálu, úroveň dosažené trabekulace byla nižší. Nicméně směrodatné odchylky ukazují poměrně velký rozptyl hodnot. Situace je zobrazena na Grafech 8 a 9.

Graf 8 Resorpce směsi autologních štěpů a porézního β -TCP v defektu



Graf 9 Trabekulace kostního defektu vyplněného autologními kostními štěpy a porézním β -TCP



Na Obrázcích 22a-d demonstrujeme rentgenové snímky 21-letého pacienta s cystickým útvarem v oblasti krčku femuru, histologická diagnóza byla fibrózní dysplázie. Po exkochleaci byly k výplni použity autologní kostní štěpy v kombinaci s Poresorbem-TCP®.



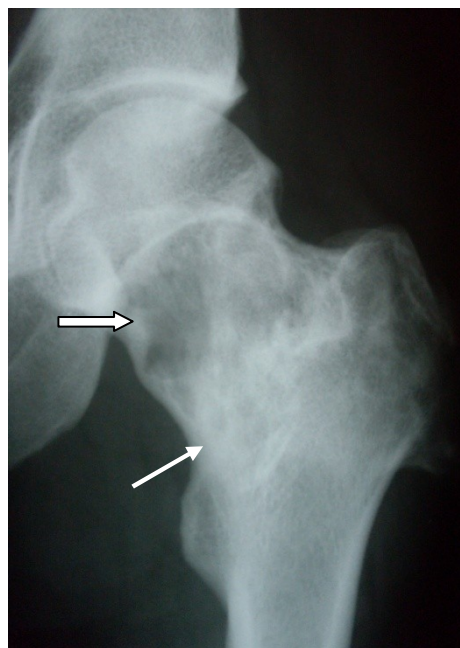
Obr. 22a



Obr. 22b



Obr. 22c



Obr. 22d

a/ Rozsah léze v krčku femuru před operací.

b/ Kompletní vyplnění defektu bez reziduí fibrózní dysplázie (pooperační snímek).

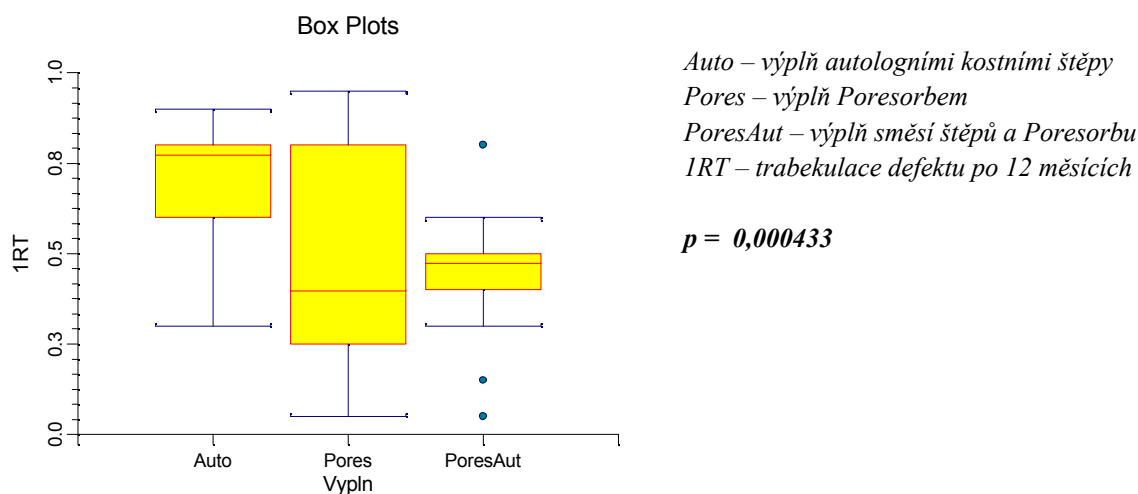
c/ Resorpce autologních štěpů 5 měsíců po operaci. Výplň je značně nehomogenní.

d/ Osteointegrace β -TCP 24 měsíců po operaci - trabekulární struktura je jen málo patrná (slabá šipka), v místě po resorpci štěpů je část trabekulována, zčásti je reziduální dutina (silná šipka).

6.3.5. Porovnání úrovně trabekulace defektů mezi jednotlivými typy výplní

Byla porovnána trabekulace defektů při jednotlivých výplních analýzou rozptylu (ANOVA) (Graf 10) a dvouvýběrovým testem 12 měsíců po operaci (Tab. 5).

Graf 10 *Analýza rozptylu*



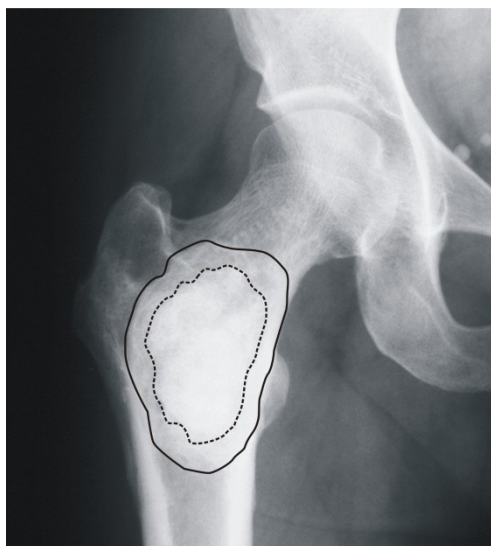
Tab. 5 *Porovnání trabekulací defektů dvouvýběrovým t-testem 12 měsíců po operaci*

Hodnocení	p
Autologní kostní štěpy - Poresorb	0,000215
Autologní kostní štěpy - Poresorb + Autologní kostní štěpy	0,000025
Poresorb - Poresorb + Autologní kostní štěpy	0,457053

Analýzou rozptylu bylo zjištěno, že skupiny nejsou stejné a dvouvýběrovým t-testem byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi výplní autologními kostními štěpy a Poresorbem. Také mezi výplní autologními kostními štěpy a směsí štěpů s Poresorbem byl významný rozdíl. Statisticky významný rozdíl ve výplni Poresorbem a směsí štěpů s Poresorbem nebyl prokázán.

Z grafů trabekulací je zřejmé, že v 12 měsících po operaci byla ve všech třech typech výplní ukončena rychlejší fáze trabekulace kostního defektu. Vzhledem ke vstupnímu kritériu doby sledování minimálně rok bylo na konci 12. měsíce pooperačně nejvíce údajů o trabekulaci defektů. Proto byla zjišťována závislost trabekulace dosažená v jednom roce od operace na jednotlivých proměnných.

β -TCP se v kostních defektech resorbuje od periferie do centra a stejným směrem postupuje na stěnách defektu začínající novotvorba kostních trámečků (Obr. 23). Relativně častým nálezem byl neresorbovaný β -TCP v centrální části, jak je patrné na již dříve uvedeném Obr. 21a-b. Proto bylo objemové zmenšování defektu hodnoceno v absolutních číslech v cm^3 . Tato hodnota zohledňovala objem defektu (čím větší defekt, tím více biomateriálu se na periferii resorbuje) a v míře jeho zhojování v procentech.



50-ti letá pacientka s neosifikujícím fibromem dle histologického vyšetření. Provedena exkochleace a výplň autologními štěpy a Poresorbem-TCP®. Plná čára označuje původní velikost kostního defektu, přerušovaná čára je stav 12 měsíců po operaci. Resorpce materiálu výplně a trabekulace defektu probíhá od periferie do centra.

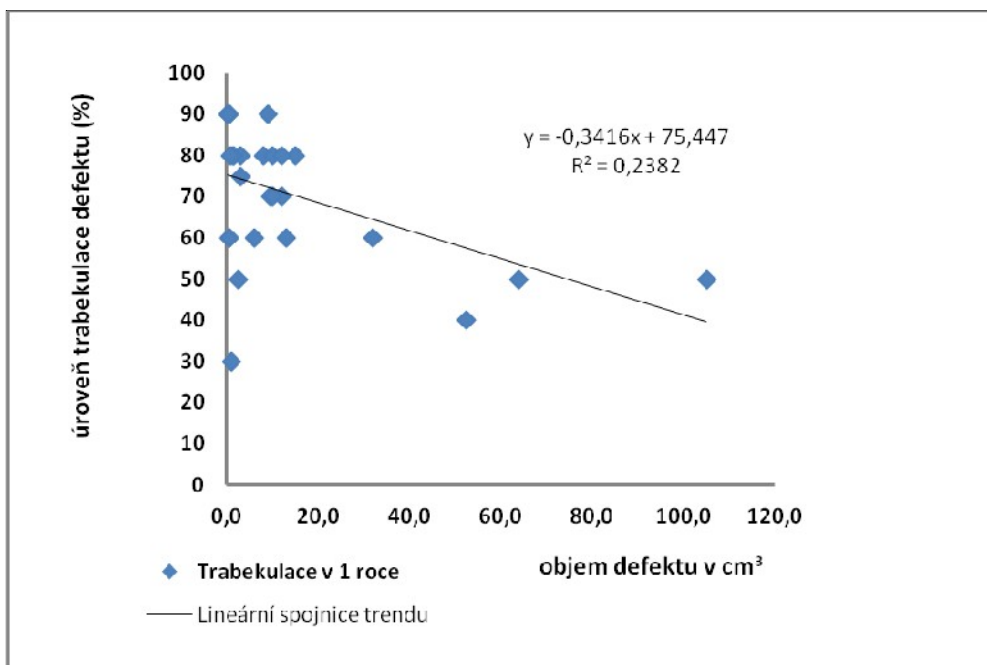
Obr. 23 Postup resorpce výplně a trabekulace defektu

6.3.6. Závislost trabekulace defektu na jeho velikosti

Stanovením koeficientů determinace jsme zjistili závislost trabekulovaného objemu kostního defektu na jeho původní velikosti, což platilo pro všechny tři typy výplně. Nejsilnější závislost byla zjištěna při výplni autologními kostními štěpy. Na druhé straně nebyla nalezena závislost pro všechny tři typy výplně zhojení defektu (míry trabekulace defektu v procentech) na jeho původní velikosti (Grafy 11 – 16).

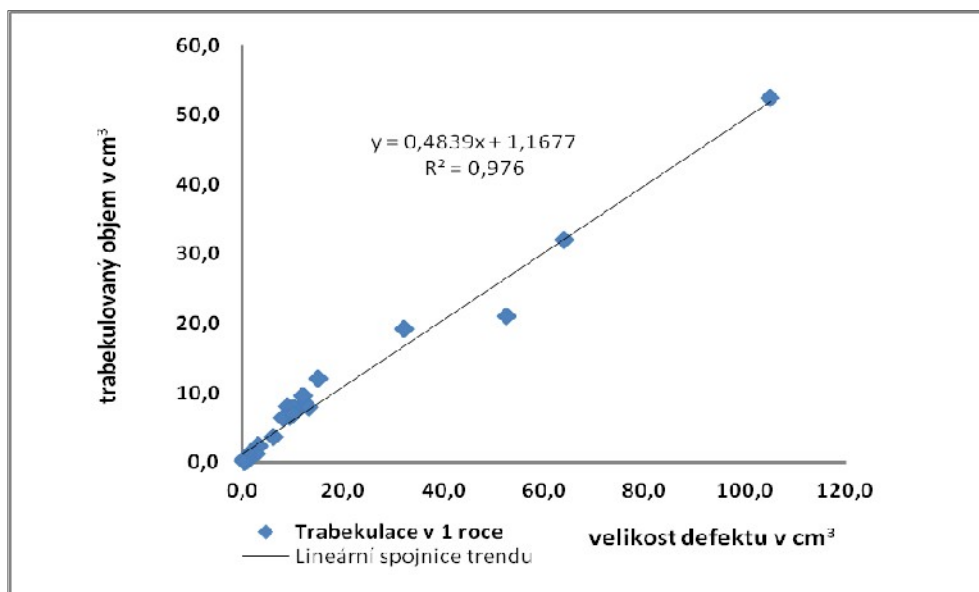
6.3.6.1. Výplň autologními kostními štěpy

Graf 11 Závislost úrovně trabekulace na velikosti defektu



Koeficient determinace $R^2 = 0,2382$

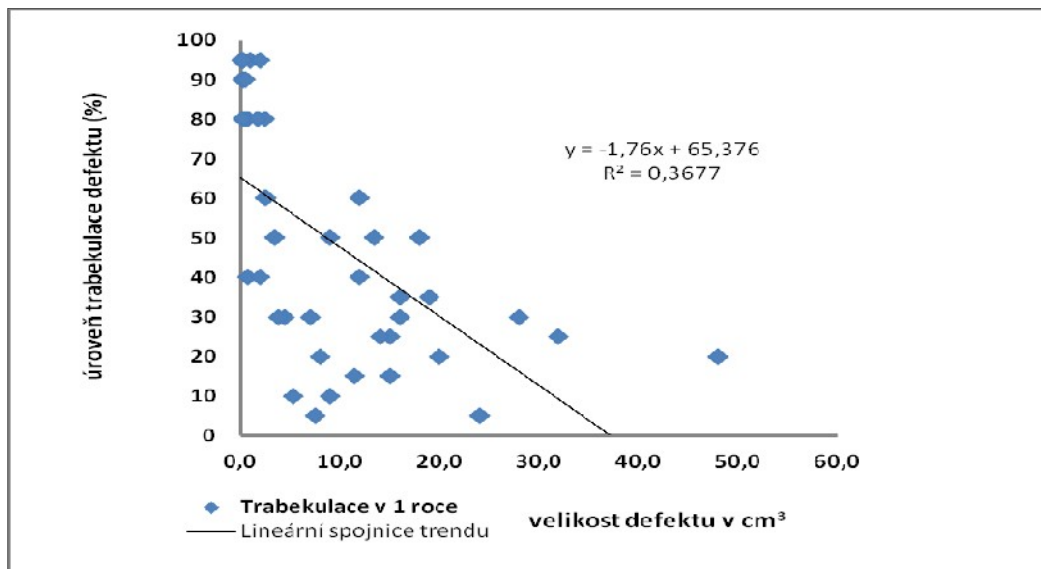
Graf 12 Závislost trabekulovaného objemu defektu na jeho velikosti



Koeficient determinace $R^2 = 0,976$

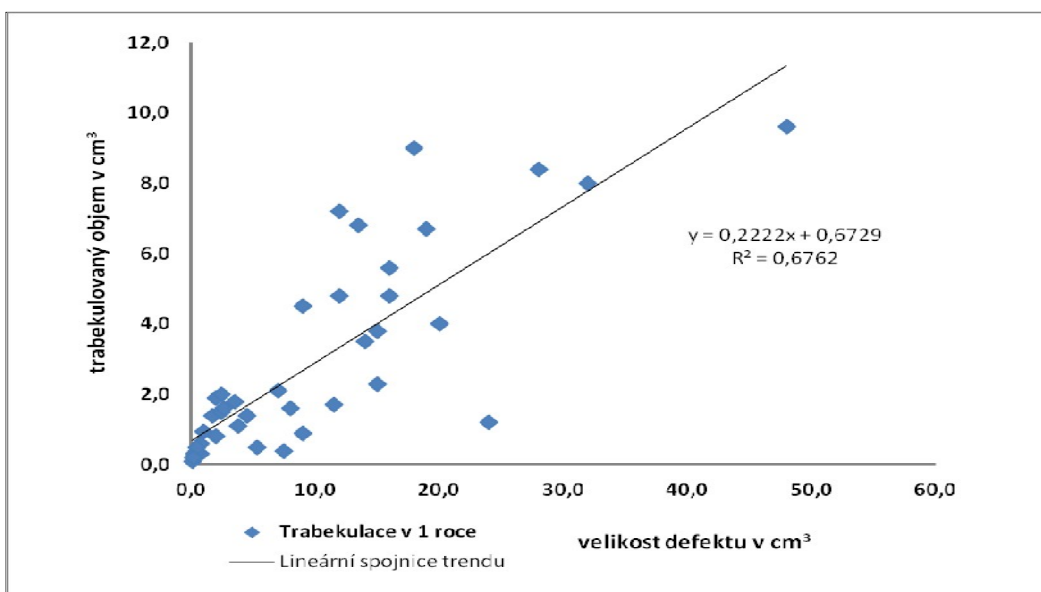
6.3.6.2. Výplň Poresorbem-TCP®

Graf 13 Závislost úrovně trabekulace na velikosti defektu



Koeficient determinace $R^2 = 0,3677$

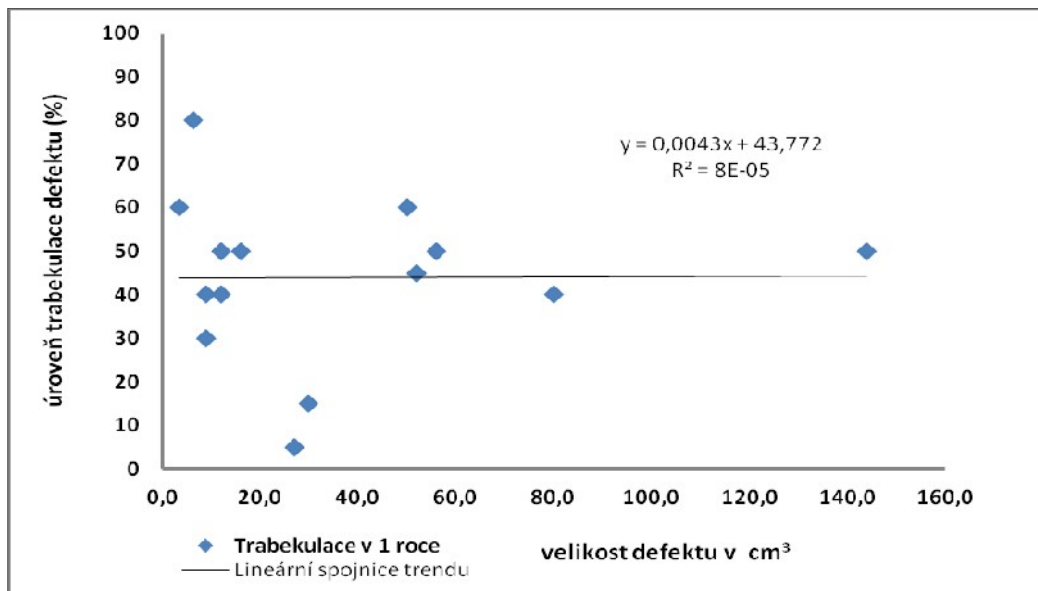
Graf 14 Závislost trabekulovaného objemu defektu na jeho velikosti



Koeficient determinace $R^2 = 0,6762$

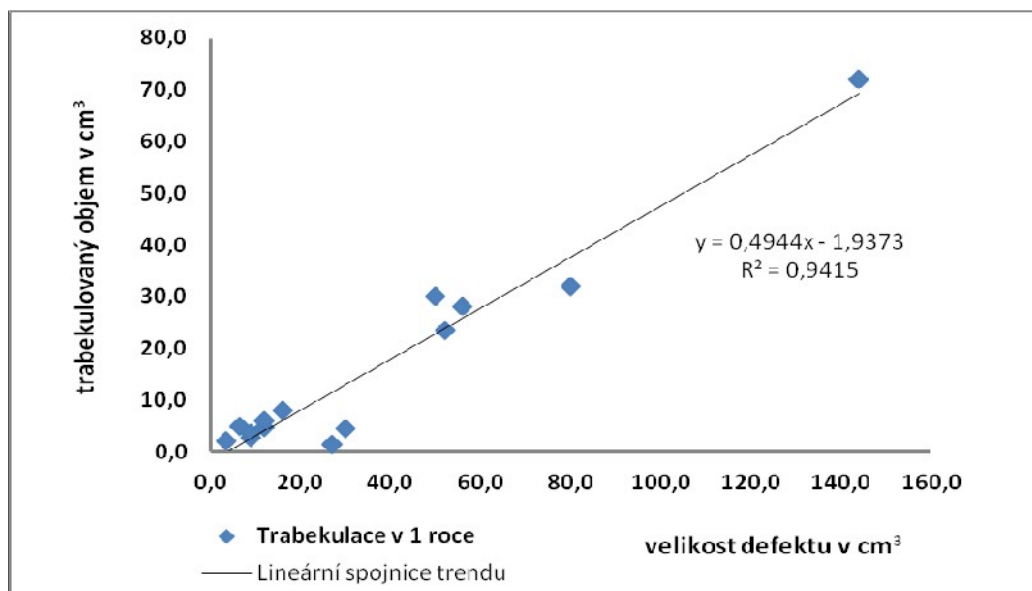
6.3.6.3. Výplň směsí autologních kostních štěpů a porézního β -TCP

Graf 15 Závislost úrovně trabekulace na velikosti defektu



Koeficient determinace $R^2 = 8 \times 10^{-5}$

Graf 16 Závislost trabekulovaného objemu defektu na jeho velikosti

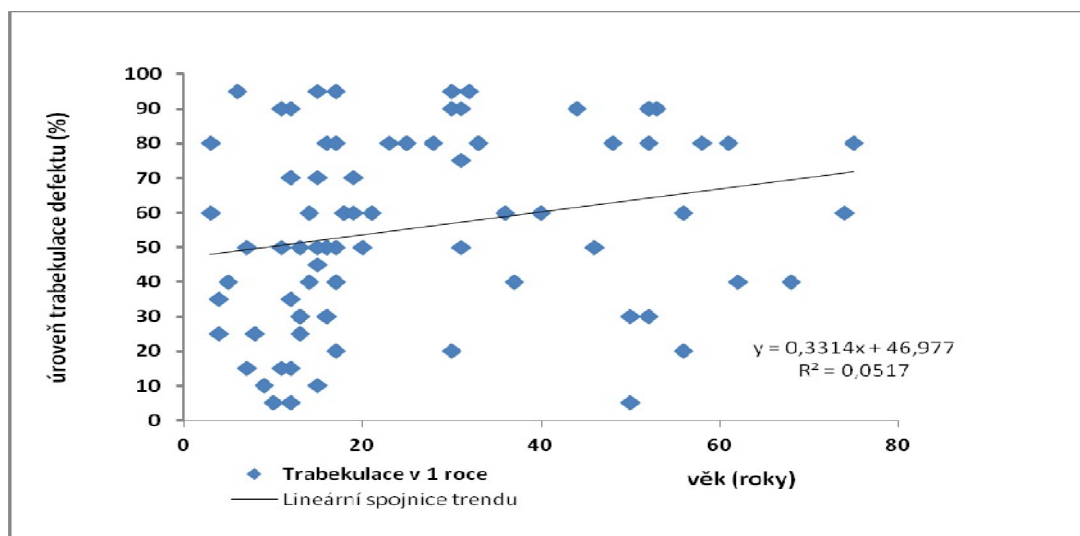


Koeficient determinace $R^2 = 0,9415$

6.3.7. Závislost trabekulace defektu na věku pacienta

Regresní analýzou nebyla zjištěna praktická závislost zhojení defektu (úroveň trabekulace defektu vyjádřená v procentech) na věku pacienta ($p = 0,037$ určuje jistou závislost, ale koeficient determinace $R^2 = 0,0517$ ji specifikuje jako velmi volnou, pro predikci prakticky nepoužitelnou (Graf 17).

Graf 17 Závislost úrovně trabekulace defektu na věku



Koeficient determinace $R^2 = 0,0517$

6.3.8. Závislost trabekulace defektu na poloze v kortikální, kortikospongiózní nebo spongiózní kosti

Při sledování hojení defektu v závislosti na jeho poloze v kortikální, kortikospongiózní nebo spongiózní kosti jsme zaznamenali obdobné výsledky trabekulace ve všech třech typech po dobu 12 měsíců od operace. Pro časová období od operace: 6 týdnů, 3, 6 a 12 měsíců byla provedena analýza rozptylu a nebyla zjištěna normalita rozdělení. Proto byl použit neparametrický test a potvrzena hypotéza, že není rozdíl v trabekulaci defektu dle jeho polohy v kosti (Tab. 6).

Tab. 6 *Hladina významnosti v časových intervalech při testování hypotézy stejné úrovně trabekulace defektu v kosti kortikální, kortikospongiózní nebo spongiózní*

Doba od operace	6 týdnů	3 měsíce	6 měsíců	12 měsíců
p	0,604533	0,078782	0,401594	0,883205

Nicméně při hodnocení rentgenových snímků jsme pozorovali pomalejší resorpci výplně a trabekulaci defektu zasahujícího do kortikální kosti v oblasti diafýzy (Obr. 24a-b). Zaznamenali jsme dvě zlomeniny u kostních defektů vyplněných β -TCP v oblasti s převahou kortikální kosti, 12 měsíců po výplni, druhou 24 měsíců po výplni a zároveň 12 měsíců po odstranění dlahy.



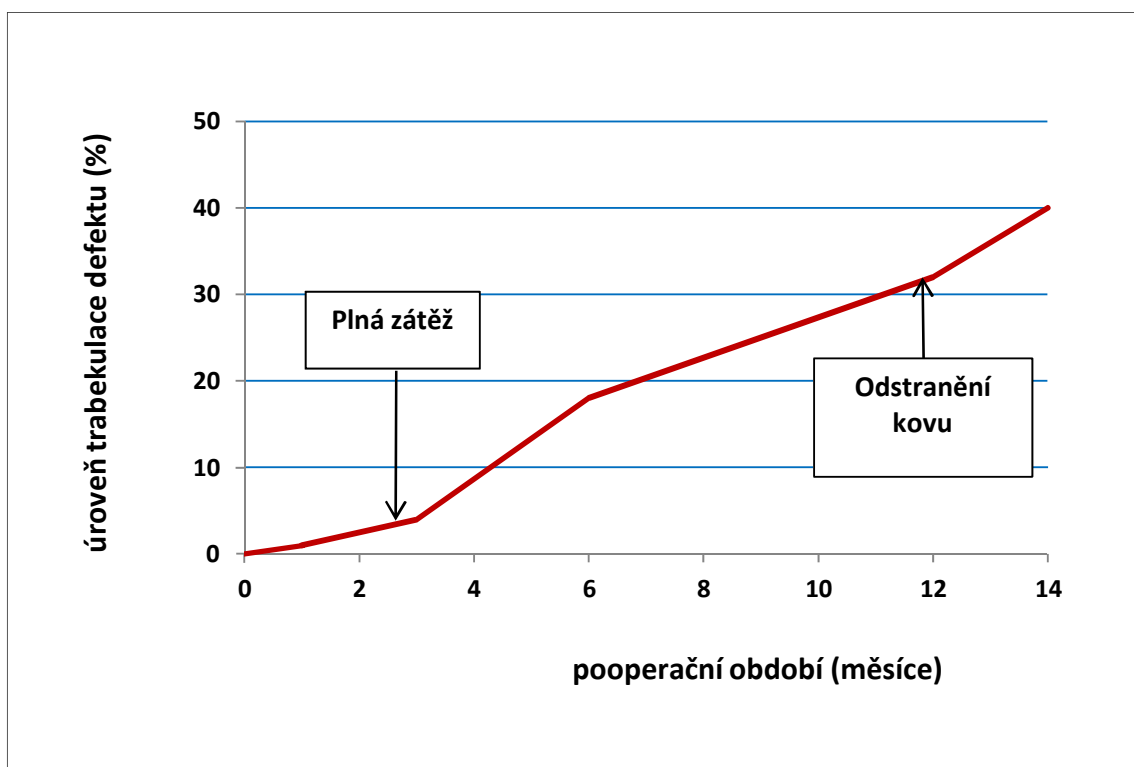
Obr. 24a *Pooperační snímek* Obr. 24b *Snímek 12 měsíců po operaci*

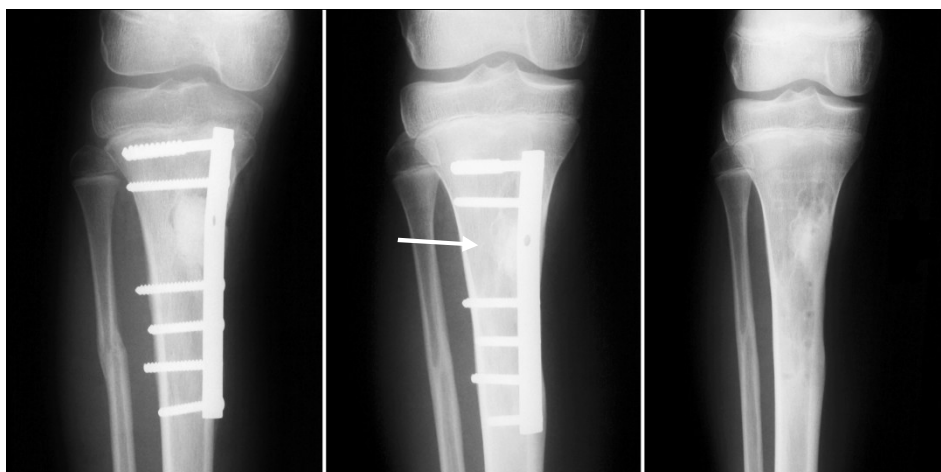
- a/ *Solitární kostní cysta humeru u dvanáctileté dívky. Provedena exkochleace, výplň Poresorbem-TCP®.*
- b/ *V oblasti metafýzy kompletní trabekulace defektu, v oblasti diafýzy je resorpce implantovaného materiálu pomalejší, je však dobře integrován. Kompletní resorpce β -TCP, který byl v měkkých tkáních.*

6.3.9. Závislost trabekulace defektu dolní končetiny na jejím zatěžování a přítomnosti podpůrné dlahové osteosyntézy

Sledovali jsme závislost trabekulace defektu dolní končetiny, kde byla zároveň provedena dlahová osteosyntéza, na progredující povolené zátěži končetiny. Takto bylo ošetřeno 10 pacientů a byla nalezena poměrně rychlá akcelerace trabekulace po povolení plné zátěže mezi třetím až šestým měsícem po operaci a dále mírná akcelerace trabekulace po 12 měsících od operace po vyjmutí kovu (Graf 18, Obr. 25a-c).

Graf 18 Úroveň trabekulace defektu na dolní končetině s přítomnou dlahovou osteosyntézou





Obr. 25a

Obr. 25b

Obr. 25c

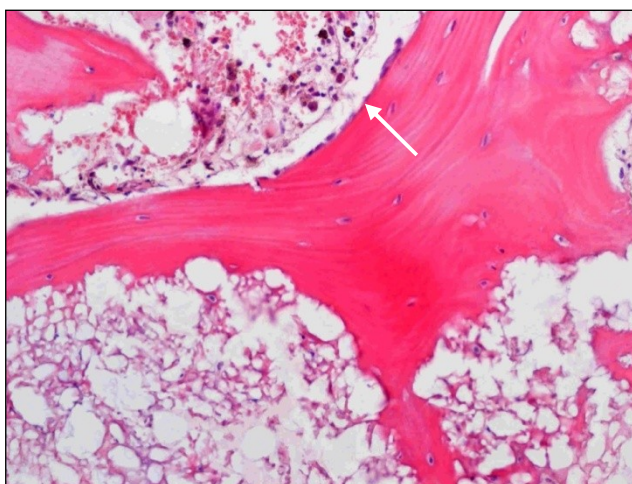
a/ Původně patologická zlomenina bérce u třináctiletého chlapce v ložisku neosifikujícího fibromu. Defekt byl vyplněn Poresorbem-TCP® a provedena dlahová osteosyntéza. Stav před zatěžováním končetiny ve 3 měsících.

b/ Po 6 měsících při plné zátěži – patrná progresse resorpce materiálu a trabekulace defektu (šipka).

c/ Stav bérce za 14 měsíců po první operaci a 2 měsíce po extrakci dlahy. Jsou patrný další resorpce materiálu, který je ještě v centru původního defektu a pokračující trabekulace.

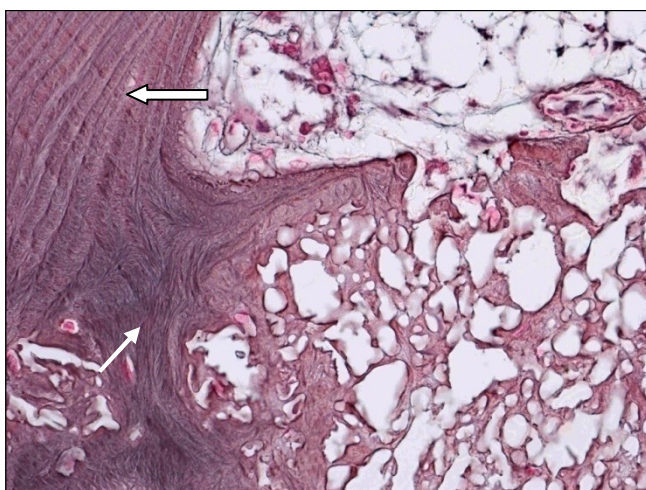
6.3.10. Histologické vyšetření tkáně z původního defektu

Příležitost odebrat část tkáně z vyplněného defektu k histologickému vyšetření jsme měli u 5 pacientů v intervalu 12 až 14 měsíců od operace při extrahování osteosyntetického materiálu. Jednalo se o výplně Poresorbem-TCP® lokalizované v metadiafýzách 3x femuru a 2x tibie. Na Obrázcích 26 a 27 demonstrujeme novotvořenou kostní tkáň v defektu jak vláknitou, tak lamelární, včetně přítomných osteocytů a povrchových osteoblastů.



Tkáň z defektu vyplněném Poresorbem-TCP® 12 měsíců po operaci, odebraná při extrakci kovu. Patrná lamelární struktura kosti s osteocyty a povrchovými osteoblasty (šipka).

Obr. 26 Zvětšeno 200 x, hematoxylin-eosin.



Vzorek tkáně odebraný z defektu při extrakci kovu, který byl vyplněn Poresorbem-TCP®. 13 měsíců po operaci. Patrná novotvorba jak vláknité (slabá šipka), tak lamelární kosti (silná šipka).

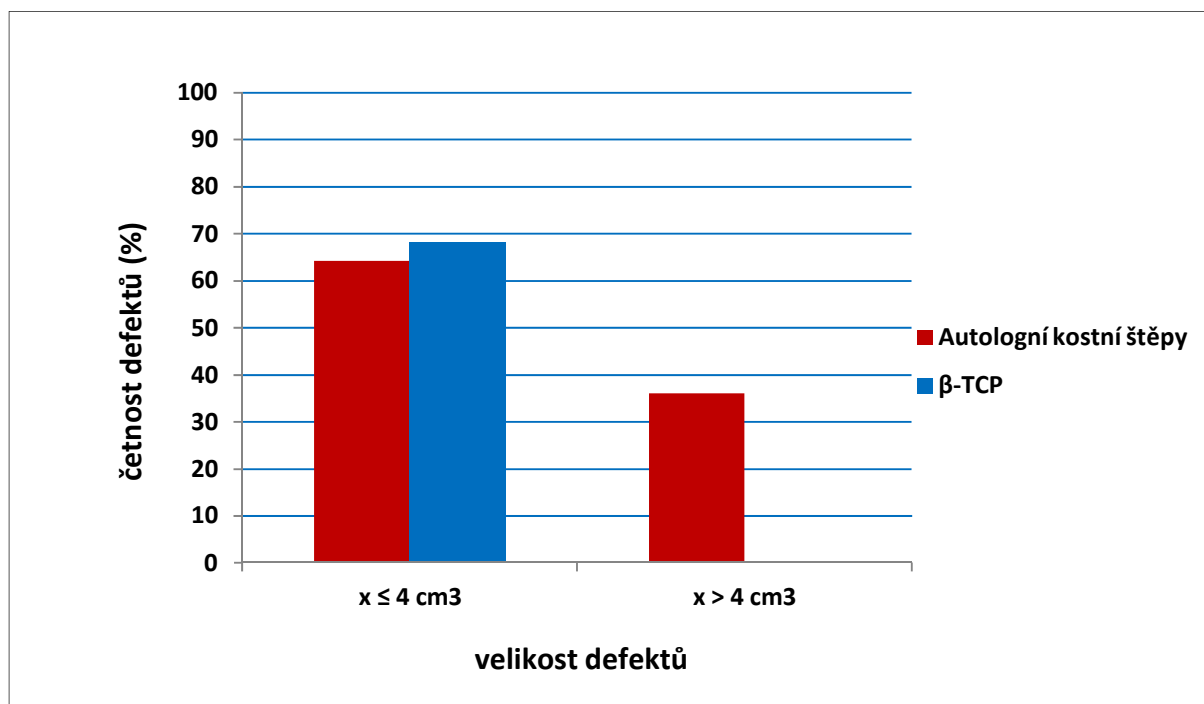
Obr. 27 Zvětšení 200 x, Gömöri na retikulin.

6.3.11. Úspěšnost trabekulace defektů vzhledem k jeho velikosti při porovnání výplní autologními kostními štěpy a β -TCP

Vzhledem k nálezu úrovně trabekulace v 1 roce od operace u defektů vyplněných autologními kostními štěpy, která přesahovala 70 % (Graf 5), jsme za úspěšnou trabekulaci v tomto období považovali trabekulaci 80 a více procent. Zaznamenali jsme četnost defektů vyplněných

autologními kostními štěpy nebo Poresorbem-TCP®, které dosáhly této hranice. Defekty do velikosti 4 cm³ měly obdobné výsledky trabekulace v 12 měsících po operaci při výplni autologními kostními štěpy nebo porézním β -TCP. U defektů velikosti nad 4 cm³ bylo dosaženo podobně úspěšného výsledku pouze tehdy, když byly vyplněny autologními kostními štěpy (Graf 19).

Graf 19 Trabekulace $\geq 80\%$ v 12 měsících po operaci ve vztahu k velikosti defektů



6.4. Diskuze

Tato práce navazuje na dlouholeté zkušenosti Ortopedické kliniky FN a LF UK v Hradci Králové s využíváním kostních štěpů a jejich náhrad (Fiala et al.,1977,1980, Urban et al., 1993,1996,1998, Šponer et al.,1998,2011). K výplni kostních defektů po exkochleaci benigních tumorů a nádorům podobných afekcí se na naší klinice od roku 1990 používal bioaktivní neresorbovatelný sklokeramický materiál BAS-0 (Lasak Praha, s.r.o.), od roku 2002 porézní β -TCP (Poresorb-TCP®, Lasak Praha, s.r.o.). Vzhledem k běžnému výskytu těchto afekcí u dětí nahradil často nedostatečné množství autologních kostních štěpů nebo již opuštěné alogenní štěpy od rodičů (průměrný věk ve sledovaném souboru pacientů 26 let, medián 17 let). Předkládaná práce hodnotí střednědobé výsledky jeho používání a srovnává je s autologními kostními štěpy. Na základě zjištěných výsledků je pak jedním z cílů této práce upřesnění indikací k používání porézního β -TCP.

Na začátku diskuze nutno zmínit některá omezení této klinické studie. Vzhledem k začátku postgraduálního studia v roce 2007 je část údajů hodnocena retrospektivně. S tímto faktem souvisí i nerandomizovanost studie. Do studie byly zařazeny všechny kostní defekty vyplněné porézním β -TCP od roku 2002 a defekty ze stejné indikace vyplněné autologními kostními štěpy nebo kombinací obou.

Důležitým faktem je také skutečnost, že předmětem práce bylo hodnocení hojení kostních defektů jako takových. Práce si neklade za cíl diskutovat různé možnosti léčby u jednotlivých diagnóz benigních tumorů a nádorům podobných afekcí.

Jistou nevýhodou z hlediska statistického hodnocení mohla být i velká šíře velikostí defektů (0,4 až 144 cm³). Medián velikosti defektu byl 9 cm³ a tabulka četností ukazuje, že 70 z 87 defektů dosahovalo 20 cm³. Otázkou bylo, zda v malém počtu vyskytující se větší defekty v rámci větší homogenity souboru ze studie nevyloučit. Protože nás zajímala biologie hojení těchto defektů, které dle našeho soudu budou ve svém počtu přibývat, zejména po uvolněných endoprotézách, byly ve studii ponechány. Anker et al., který měřil kostní defekty stejným způsobem u obdobných indikací měl soubor 24 pacientů rovněž s velkým rozpětím velikostí 1,2 až 171 cm³, medián 24 cm³, přičemž za velké defekty považoval ty, které měřily více než 43 cm³ (Anker et al.,2005).

Se zjištěnou velikostí defektů v klinické praxi souvisejí také otázky porovnání výsledků v experimentech na zvířatech a jejich přenesení do humánní medicíny. V experimentech se používají myši, potkani, králíci, psi, ovce, kozy, primáti. U myši a potkanů jsou vytvářeny defekty kalvy nebo tzv. defekty kritické velikosti, které slouží jako modely hojení. Testují se růstové faktory, peptidy, různé typy výplní, včetně keramických materiálů, metody genetického inženýrství. Studie na větších zvířatech jsou finančně náročné. Objem experimentálních defektů není v těchto studiích velmi často uváděn, když ano, pohybují se dle velikosti experimentálního zvířete od 0,1 do 3 cm³ (Lane et al.,1999, Fredericks et al.,2004, Artzi et al.,2004, Gao et al.,1997, Arts et al.,2005).

Ve většině studií je velikost experimentálních defektů mnohem menší než v naší studii. K tomu nutno ještě poznamenat, že se připojují ještě další vlivy – různé délky hojení v závislosti na druhu a věku zvířete, různé typy hojení, např. převaha enchondrální osifikace u myši a potkanů (Padhraig et al.,2008).

Měření velikostí defektů, resorpce materiálu a trabekulace defektu je vzhledem k jejich nepravidelnosti tvarů jistě ne zcela přesné. Výhodnější pro zjištění hojení defektů by bylo CT vyšetření, eventuálně kvantitativní vyšetření multidetektorovým CT (Riegger et al.,2011). Znamenalo by to ovšem mnohonásobně větší dávku ozáření při opakovaných vyšetřeních, což bylo nepřijatelné i vzhledem k tomu, že většinu pacientů tvořily děti a osoby v reprodukčním věku. Námi sledované kostní defekty byly lokalizované na končetinách, kde bylo možné standardizovat dvě na sebe kolmé projekce a odečtem maximálních rozměrů ve třech rovinách tak objem všech defektů převést na objem kvádrů. Tato technika vyhodnocení byla nejen převzata z původní práce (Anker et al.,2005), ale také přijata v rámci publikace klinické části této práce (Kučera et al.,2011).

Z hlediska výplně kostních defektů bývá jako důvodem pro použití náhrad kostních štěpů udáváno nedostatečné množství autologních kostních štěpů a komplikace vznikající při jejich odběru (Banwart et al.,1995, Goulet et al.,1997). Z naší klinické studie můžeme potvrdit, že zejména u dětí může být jejich množství nedostatečné, na druhou stranu jsme zaznamenali pouze 2 případy přechodných dysestezií v inervační oblasti nervus cutaneus femoris lateralis z 43 odběrů. Podobně jako Ghassemi se spolupracovníky jsme nenalezli významnější komplikace po odběru autologních kostních štěpů (Ghassemi et al.,2009).

Při kontrole po 6 týdnech od operace jsme zjistili resorpci části autologních kotních štěpů v defektu, dále pak byla zaznamenána pouze trabekulace. Resorpci lze vysvětlit tím, že osteogenní buňky přežívají pouze na povrchu štěpu a jsou živeny difuzí. Část štěpu pak podléhá nekróze a resorpci (Heiple et al.,1963). Trabekulace defektu při výplni autologními kostními štěpy probíhala ve své rychlé fázi po celý rok od operace a v dalším období jen pomalu v rámci remodelace kosti, přičemž dosahovala nejlepších výsledků ze všech tří skupin. Obecně jsou autologní kostní štěpy nazývány zlatým standardem pro výplň defektů (Parikh,2002). Je nutné si však uvědomit, že v kostní dřeni nastávají změny ve vztahu k věku a pohlaví pacienta a klesá počet osteoprogenitorových buněk (Muschler et al.,2001), zároveň se uplatňují i další vlivy (velikost defektu, vaskularita, dostupnost signálních molekul). Není tedy zaručeno dokonalé zhojení kostního defektu ani při této výplni.

β -TCP Poresorb-TCP® byl velmi dobře tolerován. Nebyly zjištěny žádné nežádoucí reakce na implantovaný materiál, novotvořené kostní trabekuly na něj přímo navazovaly bez přítomného vazivového interpozita a netvořily se radiolucenční zóny v okolí materiálu. Také v literatuře jsou prezentovány jen velmi ojedinělé komplikace po implantaci β -TCP. Galois se spolupracovníky vyplňoval defekty kostí v traumatologické indikaci β -TCP, zjistil velmi dobrou integraci materiálu bez vzniku fibrózního pouzdra a zaznamenal 3 infekty. Nicméně tyto infekty se vyskytly v defektech u otevřených zlomenin, kde je indikace pro použití této výplně sporná (Galois et al.,2000). Kromě infekční komplikace byla popsána reakce makrofágů na částice keramiky vzniklých její destrukcí během impakčního štěpování defektu acetabula s vytvořením vazivového pouzdra, případně tyto částice mohou být příčinou otěru „třetím tělesem“ endoprotézy nebo iritační synovialitidy při průniku do kloubu (Arts et al., 2005). Dobrou toleranci β -TCP podporuje i jeho vstřebání z měkkých tkání, které jsme pozorovali v několika případech. Pro tyto vlastnosti je snaha využít trikalciumpfosfát jako nosič růstových faktorů (Laffargue et al.,1999), antibiotik – například gentamicinu (Prat-Poiret et al.,1996) nebo cytostatik (Ueda et al.,1997).

Resorpce materiálu a trabekulace defektu byla relativně pomalá, avšak jejich průměrné hodnoty byly doprovázeny významnými směrodatnými odchylkami. Výsledky některých takto vyplněných defektů odpovídaly výplni autologními kostními štěpy. Na intenzitu resorpce má vliv mikrostruktura biomateriálu, která se liší u jednotlivých implantátů vyrobených různými výrobci na bázi porézního β -TCP. Mikrostrukturou se rozumí porozita, velikost makropórů, mikropórů, přítomnost interporézních spojů, specifická plocha (Šponer et

al.,2011). Galois s Mainardem revidovali literární údaje o optimální velikosti pórů pro kostní vrůst. Pohled na tuto problematiku není mezi autory jednotný, nicméně jako optimum je považována velikost 80 až 250 μm (Galois et Mainard,2004). Větší póry umožňují lepší neovaskularizaci a osteogenezi, avšak ztrácí se mechanická pevnost materiálu (Karageorgiou et al.,2005). Vliv porozity zkoumali in vitro a in vivo Kasten se spolupracovníky, kdy porovnávali porozitu 25 %, 65 % a 75 % a došli k závěru, že větší porozita neznamena automaticky větší aktivitu alkalické fosfatázy ve tkáňové kultuře. Více závisí na velikosti pórů a interporézních spojů (Kasten et al.,2007). Poresorb-TCP® má velikost pórů při dolním limitu uváděného rozpětí (100 μm), což může být příčinou pomalejší resorpce a trabekulace defektu. Na druhé straně je však třeba poznamenat, že po implantaci se póry zvětšují rozpouštěním biomateriálu a reakcí makrofágů (Lu et al.,1999). Takto zvětšené póry umožňují vrůst kapilár a osteogenezi, která byla potvrzena histologickými vyšetřeními tkání z původního defektu. Ve větších defektech s objemnější výplní jsme pozorovali neresorbovaný materiál i po několika letech v centrální oblasti. Podobné zkušenosti publikovali také Hirata se spolupracovníky (Hirata et al.,2006) a Nicholas s Langem (Nicholas et Lange,1994).

Směs autologních kostních štěpů a Poresorb-TCP® byla použita k výplni větších defektů, kdy byla snaha obohatit β -TCP o určité množství růstových faktorů a osteoblastů. Arts se spolupracovníky vyplňoval defekty acetabula směsí autologních štěpů a β -TCP v poměru 1:1 s dobrým efektem (Arts et al.,2005). Rovněž byly publikovány dobré výsledky při použití této směsi u spinální posterolaterální fúze (Moro-Barrero et al.,2007). V našem případě převažoval podíl β -TCP (1:2). Převaha trikalciumpfosfátu ve směsi a vyplňování větších defektů se odrazilo na výsledcích relativně pomalé resorpce materiálu a trabekulace defektu. Kombinace byla dobře tolerována, nezjistili jsme žádné nežádoucí reakce. Křivky průběhu resorpce materiálu a trabekulace defektu byly obdobné jako při výplni samotným Poresorbem-TCP®. Rychlejší průběh v prvních 6 měsících vysvětlujeme přítomností autologních kostních štěpů. Vzhledem k těmto nálezům lze dle našeho názoru použít Poresorb-TCP® jako doplnění autologních kostních štěpů tam, kde jejich množství je vzhledem k velikosti defektu nedostatečné.

Statisticky jsme porovnali všechny tři typy výplní. Nejlepší výsledky byly podle očekávání u autologních kostních štěpů. Výplně Poresorbem a směsí autologních kostních štěpů s β -TCP vykazovaly mezi sebou srovnatelné výsledky. Oba postupy byly pomalejší jak v resorpci, tak

v trabekulaci. I přes dobrou osteointegraci a nadějně výsledky nedosahují zatím umělé kostní náhrady kvality kostní tkáně, což je i výsledkem naší experimentální práce. Možnou cestou budou kompozitní materiály, kde osteokonduktivní vlastnosti umělých náhrad by byly potencovány osteoinduktivními, případně osteogenními biologickými součástmi.

Z hodnocení hojení kostních defektů bylo zřejmé, že jednu z klíčových úloh hraje jejich velikost. Resorpce výplně a trabekulace defektu postupovala od periferie do jeho centra. U větších defektů perzistoval Poresorb-TCP® uprostřed původního defektu, resp. při výplni autologními kostními štěpy nebyla v centru patrná trabekulace.

Hlavním důvodem, proč v centru větších kostních defektů nevzniká kostní tkáň, je nedostatečný přívod živin, kyslíku a odstraňování produktů metabolismu. Tkáň v centru nekrotizuje a následně z okolí vrůstá do tohoto místa tkáň vazivová, která má menší nároky na tenzi kyslíku a pomalejší metabolismus. Hlavním mechanismem přísunu kyslíku a živin je pasivní difúze po koncentračním gradientu, přičemž pro pomalou difuzi a velkou spotřebu je limitujícím faktorem transport kyslíku (Muschler et al.,2004). V trabekulární kosti je vzdálenost, kterou musí kyslík difundovat z lumen kapiláry k buněčné stěně maximálně do 200 μm (Chow et al.,2001). Při vzdálenosti 1 cm do centra defektu je tato vzdálenost 50x větší. V hypoxickém prostředí centra pak soutěží o kyslík nejen mezenchymální kmenové buňky mezi sebou, ale i s buňkami zánětlivé odpovědi. Rozsah případné centrální nekrózy je závislý na několika proměnných – koncentrace kyslíku na okraji defektu, koncentrace a distribuce buněk v defektu a jejich spotřeba kyslíku, tok tekutiny v defektu, difuzní konstanta kyslíku a biologická odpověď buněk na hypoxii (Muschler et al.,2004). Metodami tkáňového inženýrství lze spočítat, že např. v defektu 2cm tloušťky vyplněném biomateriálem může být bez rizika vzniku centrální nekrózy maximálně 70 000 buněk na cm^3 . Pro srovnání v aspirátu kostní dřevě, např. pro transplantaci do defektu, je přibližně 40 000 000 buněk na cm^3 (Muschler et al.,2001). Porovnání velikostí kostních defektů vyskytujících se v naší klinické praxi s výše uvedenými fakty vysvětluje obtíže s dosažením kompletního zhojení a remodelace bez ohledu na typ výplně. Potvrzují to také výsledky regresní analýzy. Vzhledem k resorpci od periferie defektu do centra je zřejmé, že čím větší defekt, tím větší množství biomateriálu se na obvodu vstřebá a větší objem defektu trabekuluje (vyjádřeno v absolutních číslech) – prokázaná závislost ve všech třech skupinách. Pokud však zjišťujeme závislost úrovně zhojení defektu na jeho velikosti (vyjádřeno v procentech), nenacházíme závislost ani u výplně autologními štěpy.

S problematikou transportu kyslíku, nutrientů, růstových faktorů, migrace buněk, růstem cév do defektu jistě souvisí kvalita ošetření jeho stěn. Pečlivá exkochleace tkáně z defektu a odstranění sklerotické kosti umožní přímou komunikaci mezi „mateřskou“ kostí včetně cév a výplní. Zvláště důležitý je tento debridement defektu u výplně β -TCP jako osteokondukčního materiálu, který je přímo závislý na přísunu výše uvedených faktorů potřebných pro kostní novotvorbu z okolí defektu.

Nelze obecně tvrdit, že čím menší defekt, tím kompletnější je jeho zhojení. Na druhé straně jsme v našem souboru empiricky zjistili, že určitá závislost existuje. U malých defektů docházelo k velmi dobrému zhojení bez ohledu na typu výplně. Pokud bychom za hlavní příčinu tohoto jevu pokládali výše uvedenou omezenou vzdálenost účinné difuze kyslíku a živin, lze předpokládat, že lze zjistit určitou hraniční velikost kostního defektu pro úspěšné zhojení.

Otázkou bylo, co lze považovat za úspěšné zhojení defektu. V ideálním případě by to znamenalo 100% trabekulaci defektu. V klinické praxi se pravidelně setkáváme s neúplnou trabekulací v centru původního defektu a nezaznamenáváme přitom žádné obtíže pacientů při plné zátěži. Z křivek trabekulace defektů vyplývá, jak již bylo uvedeno, že rychlejší fáze tohoto procesu končí ve 12. měsíci od operace. Dále bylo uvedeno, že nejlepší výsledky byly dosaženy při výplni autologními kostními štěpy. Při této výplni přesahovala průměrná trabekulace defektu 12 měsíců od operace 70 %. Na základě těchto údajů a klinických zkušeností jsme stanovili jako hranici úspěchu hojení 80% trabekulaci defektu 12 měsíců od operace. V dostupné odborné literatuře nebylo nalezeno obdobné kritérium, se kterým bychom mohli naše výsledky porovnat. Zjištěný hraniční objem 4 cm^3 by odpovídal objemu krychle o hraně přibližně 1,6 cm. Při předpokladu difuze živin ze všech stran krychle odpovídá tento rozměr schopnosti nutrientů difundovat do centra defektu dle výše uvedených údajů (Muschler et al.,2004). Objem 4 cm^3 může být tak považován za hraniční pro výplň Poresorbem-TCP®. Obdobné výsledky uvádí i Šponer, který hodnotil množství β -TCP potřebné k výplni defektu a zjistil, že u výplně do 3,5 g Poresorbu-TCP® došlo k úplné resorpci materiálu a zhojení defektu (Šponer et al.,2011). Anker používal k výplni defektů také porézní β -TCP (Vitoss, Orthovita, USA), uvedl obdobné křivky resorpce a trabekulace, nicméně dělil defekty na malé a velké, kde hranice pro rychlou a pomalou resorpci a trabekulaci byla 43 cm^3 , tuto hodnotu však odvodil jako průměrný objem u 24 pacientů (Anker et al.,2005). Objem 43 cm^3 odpovídá krychli o hraně přibližně 3,5 cm. Při těchto

hodnotách lze přijmout možnou resorpci materiálu, ale pro úspěšnou trabekulaci se jeví vzdálenost od periferie do centra defektu vzhledem k možnostem difúze příliš velká. Pokud bychom použili stejnou metodu a vzali průměrnou hodnotu objemu změřených defektů (15 cm³), jistě bychom získali signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami (autologní kostní štěpy versus β -TCP).

Problémem, který vyžaduje optimální řešení, zůstává, jak zlepšit hojení kostních defektů, zejména těch s větším objemem. Obtíže se objevují již na počátku, jak bylo diskutováno výše, kdy je nesnadné vytvořit experimentální model, který by se velikostí defektů a podmínkám hojení co nejvíce blížil humánní medicíně (Buma et al.,2004). Možné obohacení místa hojení MKB a použití rekombinantních růstových faktorů s finanční náročností léčby bylo uvedeno v úvodu do problematiky a diskutováno v experimentální části se všemi možnými problémy. Rovněž využití v současné době populárních autologních růstových faktorů obsažených v PRP pro podporu osteogeneze není dle citovaných studií v úvodu vhodné.

Zvláštní pozornost je věnována posílení angiogeneze v kostním defektu, protože novotvořené cévy jsou klíčové pro transport nutrientů zejména v jeho centrální části, kde je difúze nedostatečná. Probíhají experimentální studie, které využívají metod tkáňového inženýrství a genetické terapie. Využívají růstové faktory vázané na nosiče včetně β -TCP schopné indukovat angiogenezi, zatím však bez možnosti využití v klinické praxi (Zisch et al., 2001, Parikh, 2004, El-Ghannam,2005, Guo et al.,2006). Další možností je preadaptace MKB před transplantací na hypoxické podmínky (Muschler et al.,2004). Možná je i implantace biomateriálu do vysoce vaskularizované tkáně (např. mezenteria) s předpokladem vrůstu cév a následnou transplantací do kostního defektu (Szpalski et al.,2010).

Velikost defektu a možnosti difúze nutrientů do jeho centra hrají podstatnou roli. Podle našeho názoru je tato skutečnost důvodem, proč nebyla zjištěna statisticky významná závislost hojení defektů na věku pacientů. Zejména u dětí bychom předpokládali rychlejší a kompletnější zhojení. Pozitivním zjištěním v souvislosti s věkem pacientů byla výborná osteointegrace Poresorbu-TCP® u dětí bez jakýchkoliv nežádoucích účinků.

Dalším diskutovaným tématem je porovnání hojení defektů ve spongiózní, kortikospongiózní a kortikální kosti. Statisticky nebyl rozdíl v hojení defektů s ohledem na polohu v kosti. Avšak při sledování hojení jednotlivých defektů jsme pozorovali často pomalejší hojení v kortikální kosti. Zejména při výplni β -TCP, kdy je patrná pomalejší resorpce a trabekulace

defektu než u autologních kostních štěpů, se naskýtá otázka indikace výplně tímto materiálem v diafyzárních defektech. V této souvislosti jsme také zaznamenali 2 zlomeniny v diafyzárním defektu vyplněném Poresorbem-TCP® způsobené pádem z kola. Z našich pozorování vyvozujeme, že β -TCP jako náhrada spongiózní kosti je především indikován do defektů ve spongiózní a kostikospongiózní kosti. Na druhé straně také v defektech s převahou kortikální kosti byl Poresorb-TCP® velmi dobře integrován i přes pomalejší resorpci. Vzniklé zlomeniny a obecně riziko jejich vzniku je vztahováno k zevnímu průměru kosti a tloušťce kortiky (Broulík,2007).

Ne zcela vyřešeným problémem je vliv přídatné osteosyntézy a zátěže končetiny na hojení kostních defektů. Osteosyntéza právě v případech zvýšeného rizika zlomeniny zejména u oslabené kortiky brání jejímu vzniku.

Z grafů popisujících trabekulaci vyplývá, že přítomnost osteosyntézy tento proces zpomaluje (průměrná trabekulace po 12 měsících dle typu výplně 45 % – 71 %, u osteosyntézy 35 %). Při jejím odstranění opět došlo k dalšímu mírnému vzestupu trabekulace. Osteosyntetický materiál, v našem případě dlahy, mění přenos zátěže na kost. Význam zátěže na kostním hojení je demonstrován i vzrůstající úrovní trabekulace při zvyšování povoleného zatěžování končetiny. Fyziologická zátěž kosti je tak významným faktorem hojení (Buckwalter et Grodzinsky,1999).

Histologická vyšetření tkáně z místa původního defektu prokázala novotvorbu plnohodnotné lamelární kosti po výplni Poresorbem-TCP®. Tkáň byla odebírána z povrchu defektu, nelze tedy hodnotit postup kostní novotvorby směrem do jeho původního centra. Nevýhodou je i malé množství vzorků od 5 pacientů. Nicméně důležitým nálezem je absence zánětlivého infiltrátu v okolí původní výplně, což svědčí o její dobré osteointegraci.

6.5. Závěr

Velikost objemů většiny kostních defektů u afekcí nádorům podobných a benigních tumorů v naší klinické studii byla do 20 cm³. Tyto objemy jsou větší, než lze modelovat v experimentu na běžných laboratorních zvířatech a je tak nesnadné porovnání výsledků experimentálních prací s výsledky klinickými.

Při výplni kostních defektů autologními kostními štěpy jsme nezaznamenali závažné komplikace po odběru štěpů, jejich resorpce v defektu byla omezena na prvních 6 pooperačních týdnech. Trabekulace defektu měla rychlejší fázi do 12 měsíců od operace, po které následovala pomalejší fáze.

Výplň Poresorbem-TCP® vykazovala obdobnou dynamiku, nicméně resorpce materiálu a trabekulace defektu byla relativně pomalá, avšak jejich průměrné hodnoty byly doprovázeny významnými směrodatnými odchylkami. Výsledky některých takto vyplněných defektů odpovídaly výplni autologními kostními štěpy. β -TCP ve formě Poresorb-TCP® byl velmi dobře tolerován. Nebyla zjištěna žádná nežádoucí reakce na implantovaný materiál, novotvořené kostní trabekuly na něj přímo navazovaly bez přítomného vazivového interpozita, netvořily se radiolucenční zóny v okolí materiálu. V případě lokalizace β -TCP v měkkých tkáních byl bez komplikací plně resorbován.

Větší defekty byly vyplňovány autologními kostními štěpy v kombinaci s Poresorbem-TCP® v poměru 1:2. Převaha β -TCP a vyplňování větších defektů se odrazilo na výsledcích relativně pomalé resorpce materiálu a trabekulaci defektu. Směs byla dobře tolerována, nezjistili jsme žádné nežádoucí reakce. Křivky průběhu resorpce materiálu a trabekulace defektu byly obdobné jako při výplni samotným Poresorbem-TCP®. Rychlejší průběh jsme zaznamenali v prvních 6 měsících, které vysvětlujeme přítomností autologních kostních štěpů. Vzhledem k těmto nálezům lze dle našeho názoru použít Poresorb-TCP® i jako doplnění autologních kostních štěpů tam, kde jejich množství je vzhledem k velikosti defektu nedostatečné.

Při porovnání jednotlivých skupin výplně nejlepší výsledky vykazovala výplň autologními kostními štěpy. Mezi výplněmi β -TCP a směsí obou nebyl nalezen statistický rozdíl. I přes dobrou osteointegraci a nadějně výsledky nedosahují zatím umělé kostní náhrady kvality kostní tkáně, což jsme též prokázali v naší experimentální práci.

Resorpce materiálu a trabekulace defektu probíhala od periferie do centra defektu. Čím větší defekt, tím větší byla resorpce a trabekulace vyjádřené v cm^3 . Z hlediska kompletnosti zhojení defektu (vyjádřeno v procentech trabekulace celého defektu) není prokázán vztah, že čím menší defekt, tím kompletnější zhojení. Při stanoveném kritériu 80 % trabekulace defektu 12 měsíců od operace jako úspěchu hojení byl nalezen hraniční objem 4 cm^3 , který svou velikostí odpovídá možnostem difuze nutrientů do centra defektu. Tuto hodnotu lze považovat za hranici indikace pro Poresorb-TCP®, protože u větších defektů stanovenou mez úspěchu hojení dosáhlo 35 % vyplněných autologními kostními štěpy, ale žádný s výplní β -TCP.

Nebyla zjištěna statisticky významná závislost hojení defektů na věku. Poresorb-TCP® byl rovněž velmi dobře tolerován v dětském věku, plně kompenzoval nemožnost odběru nebo nedostatečné množství autologních kostních štěpů.

Statisticky nebyl zjištěn rozdíl v hojení defektů v závislosti na poloze v kosti s převahou spongiózní, kortikospongiózní nebo kortikální. V klinickém sledování však hojení defektů v diafýze trvalo déle.

Bylo zjištěno zpomalení trabekulace defektu při současně provedené osteosyntéze a zrychlení při progredující povolované zátěži končetiny. Histologická vyšetření tkáně z místa původního defektu a následně výplně prokázala novotvorbu lamelární kosti. Nebyla zaznamenána žádná zánětlivá reakce na výplň.

Máme za to, že β -TCP jako náhrada spongiózní kosti je především indikován do defektů ve spongiózní a kortikospongiózní kosti. Na druhé straně také v defektech s převahou kortikální kosti byl Poresorb-TCP® velmi dobře integrován i přes pomalejší resorpci. Je ho zde možné rovněž použít, ale je nutné zvážit i další faktory (šířka kosti, tloušťka kortiky, malá mechanická pevnost β -TCP), případně uvažovat o přídatné osteosyntéze tak, aby nebylo zvýšené riziko zlomeniny.

Standardem pro výplň kostních defektů zůstávají autologní kostní štěpy.

Poresorb-TCP® je však spolehlivá náhrada kostních štěpů použitelná u dětí i dospělých. Lze ho použít samostatně nebo jako doplnění kostních štěpů. Nejlepší výsledky byly dosaženy při výplni defektů do 4 cm^3 objemu.

7. Použitá literatura

1. ALBEE, FH. Transplantation of a portion of the tibia into the spine for Pott's disease. A preliminary report. *N. Y. State J. Med.*, 1911, vol. 93, p.1013-1016.
2. ALTANKOV, G., THOM, V., GROTH, T. et al. Modulating the biocompatibility of polymer surfaces with poly(ethylene glycol):effect of fibronectin. *J. Biomed Mater Res*, 2000, vol. 52, p. 219-230.
3. ANKER, CJ., HOLDRIDGE, SP., BAIRD, B. et al. Ultraporous β -tricalcium phosphate is well incorporated in small cavitory defects. *Clin. Orthop.*, 2005, vol. 434, no. 5, p. 251-257.
4. ARPORNMAEKLONG, P., KOCHER, M., DEPPRICH, R. et al. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 2004, vol. 33, no. 1, p. 60-70.
5. ARTS, JJC., GARDENIERS, JWM., WELTEN, MLM. et al. No negative effects of bone impaction grafting with bone and ceramic mixtures. *Clin. Orthop.*, 2005, vol. 438, no. 9, p. 239-247.
6. ARTZI, Z., WEINREB, M., GIVOL, N. et al. Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 2004, vol. 19, no. 3, p. 357-368.
7. ASPENBERG, P., JEPSSON, C., WANG, JS. et al. Transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein 2 for bone ingrowth: a comparison using bone chambers in rats. *Bone*, 1996, vol. 19, no. 5, p. 499-503.
8. ATTAWIA, MA., HERBERT, KM., UHRICH, KE. et al. Proliferation, morphology, and protein expression by osteoblasts cultured on poly (anhydride-co-imides). *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999, vol. 48, no. 3, p. 322-337.
9. BALTZER, AW., LATTERMANN, C., WHALEN, JD. et al. Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. *Gene Ther.*, 2000, vol. 7, no. 9, p. 734-739.
10. BANWART, JC., ASHER, MA., HASSANEIN, RS. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine*, 1995, vol. 20, no. 9, p. 1055-60.

11. BARTONÍČEK, J., DOSKOČIL, M., HEŘT, J. et al. *Chirurgická anatomie velkých končetinových kloubů*. 1. vyd., Praha: Avicenum, 1991, ISBN 80-201-0151-9.
12. BETZ, OB., BETZ, VM., NAZARIAN, A. et al. Delayed administration of adenoviral BMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects. *Gene Ther.*, 2007, vol. 14, no. 13, p. 1039-1044.
13. BISHOP, AT. Vascularized bone grafting. In *Green's operative hand surgery*. GREEN, DP. (Ed.), 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1999. p.1221-1250.
14. BROULÍK, P.: *Osteoporóza a její léčba*. 1. vyd., Praha: Maxdorf, 2007, ISBN 978-80-7345-134-9.
15. BRUDER, SP., HOROWITZ, MC., MOSCA, JD. et al. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone*, 1997, vol. 21, no. 3, p. 225-35.
16. BRUDER, SP., JAISWAL, N., HAYNESWORTH, SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell Biochem.*, 1997, vol. 64, no. 2, p. 278-94.
17. BUCKWALTER, JA., GRODZINSKY, AJ. Loading of healing bone, fibrous tissue, and muscle: implications for orthopaedic practice. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, 1999, vol. 7, no. 5, p. 291-299.
18. BUMA, P., SCHREURS, W., VERDONSCHOT, N. Skeletal tissue engineering: From in vitro studies to large animal models. *Biomaterials*, 2004, vol. 25, no. 9, p. 1487-1495.
19. CARPENTER, JE., HIPPI, JA., GERHART, TN. et al. Failure of growth hormone to alter the biomechanics of fracture-healing in a rabbit model. *J. Bone Joint Surg.*, 1992, vol. 74-A, no. 3, p. 359-367.
20. CASTRO, FP. Role of activated growth factors in lumbar spinal fusions. *J. Spinal Disord. Tech.*, 2004, vol. 17, no. 5, p. 380-384.
21. CENNI, E., CIAPETTI, G., PAGANI, S. et al. Effects of activated platelet concentrates on human primary cultures of fibroblasts and osteoblasts. *J. Periodontol.*, 2005, vol. 76, no. 3, p. 323-328.
22. CEONZO, K, GAYNOR, A., SHAFFER, L. et al. Polyglycolic acid – induced inflammation. Role of hydrolysis and resulting complement activation. *Tissue Eng.*, 2006, vol. 12, no. 2, p. 301-308.

23. CHAMBERLAIN, G., FOX, J., ASHTON, B. et al. Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells*, 2007, vol. 25, no. 11, p. 2739-2749.
24. CHOI, BH., IM, CJ., HUH, JY. et al. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 2004, vol. 33, no. 1, p. 56-59.
25. CHOW, DC., WENNING, LA., MILLER, WM. et al. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. *Biophys. J.*, 2001, vol. 81, no. 2, p. 675-696.
26. COELHO, MJ., FERNANDES, MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials*, 2000, vol. 21, no. 11, p. 1095-1102.
27. COLTER, DC., CLASS, R., DI GIROLAMO, CM. et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, vol. 97, no. 7, p. 3213-3218.
28. CONNOLLY, JF. Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. *Clin. Orthop.*, 1998, vol. 355, Suppl, p. 257-266.
29. CONNOLLY, JF., GUSE, R., LIPPIELLO, L. et al. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. *J. Bone Joint Surg.*, 1989, vol. 71-A, no. 5, p. 684-691.
30. CONNOLLY, JF., SHINDEL, R. Percutaneous marrow injection for an ununited tibia. *Nebr. Med. J.*, 1986, vol. 71, no. 4, p. 105-107.
31. CRITCHLOW, MA., BLAND, YS., ASHURST, DE. The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. *Bone*, 1995, vol. 16, no. 5, p. 521-7.
32. CUOMO, AV., VIRK, M., PETRIGLIANO, F. et al. Mesenchymal stem cell concentration and bone repair: potential pitfalls from bench to bedside. *J. Bone Joint Surg.*, 2009, vol. 91-A, no. 5, p. 1073-1083.
33. DACULSI, G., WEISS, P., BOULER, J.M. et al. Biphasic calcium phosphate/hydrosoluble polymer composites: a new concept for bone and dental substitution biomaterials. *Bone*, 1999, vol. 25, Suppl, p. 59-61.
34. DE LONG, WG., EINHORN, TA., KOVAL, K. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. *J. Bone Joint Surg.*, 2007, vol. 89-A, no. 3, p. 649-658.

35. DI BELLA, C., ALDINI, NN., LUCARELLI, E. et al. Osteogenic protein-1 associated with mesenchymal stem cells promote bone allograft integration. *Tissue Eng. Part A*, 2010, vol. 16, no. 9, p. 2967-2976.
36. DI GIROLAMO, CM., STOKES, D., COLTER, D. et al. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br. J. Haematol.*, 1999, vol. 107, no. 2, p. 275-281.
37. D'IPPOLITO, G., SCHILLER, PC., RICORDI, C. et al. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J. Bone Miner. Res.*, 1999, vol. 14, no. 4, p. 1115-1122.
38. DOCQUIER, PL., DELLOYE, C. Treatment of aneurysmal bone cysts by introduction of demineralized bone and autogenous bone marrow. *J. Bone Joint Surg.*, 2005, vol. 87-A, no. 10, p. 2253-2258.
39. DRESSMANN, H. Ueber Knochenplombierung bei Hohlenformigen Defekten des Knochens. *Beitr. Klin. Chir.*, 1892, vol. 9, p. 804-810.
40. EL-GHANNAM, A. Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. *Expert. Rev. Med. Devices*, 2005, vol. 2, no. 1, p. 87-101.
41. ERBE, EM., MARX, JG., CLINEFF, TD. et al. Potential of an ultraporous beta-tricalcium phosphate synthetic cancellous bone void filler and bone marrow aspirate composite graft. *Eur. Spine J.*, 2001, vol. 10, Suppl 2, p. 141-146.
42. FERRARO, JW. Experimental evaluation of ceramic calcium phosphate as a substitute for bone grafts. *Plast. Reconstr. Surg.*, 1979, vol. 63, no. 5, p. 634-640.
43. FIALA, O., HEROUT, V. Přestavba a funkční zapojení alogenních masívních kostních a kostně chrupavčitých transplantátů. *Acta Chir orthop Traum čech*, 1977, roč. 44, č. 4, s.173-181.
44. FIALA, O., HEROUT, V. *Rekonstrukce kloubů biologickým a cizím materiálem*. Výzkumný úkol 38-01-06, Ortopedická klinika Lékařské fakulty Univerzity Karlovy Hradec Králové, 1980.
45. FRANKENBURG, EP., GOLDSTEIN, SA., BAUER, TW. et al. Biomechanical and histological evaluation of calcium phosphate cement. *J Bone Joint Surg*, 1998, vol. 80-A, no. 8, p. 1112-24.

46. FREDERICKS, DC., BOBST, JA., PETERSEN, EB. et al. Cellular interactions and bone healing responses to novel porous tricalcium phosphate bone graft material. *Orthopedics*, 2004, vol. 27, Suppl 1, p. 167-173.
47. FRIEDENSTEIN, AJ., GORSKAJA, JF., KULAGINA, NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.*, 1976, vol. 4, no. 5, p. 267-274.
48. GALOIS, L., MAINARD, D. Bone ingrowth into two porous ceramics with different pore sizes: an experimental study. *Acta Orthop. Belg.*, 2004, vol. 70, no. 6, p. 598-603.
49. GALOIS, L., MAINARD, D., COHEN, P. et al. Comblement des pertes de substance osseuse par le phosphate tricalcique beta en traumatologie. *Ann. Chir.*, 2000, vol. 125, p. 972-981.
50. GAO, TJ., TUOMINEN, TK., LINDHOLM, TS. et al. Morphological and biomechanical difference in healing in segmental tibial defects implanted with biocoral or tricalcium phosphate cylinders. *Biomaterials*, 1997, vol. 18, no. 3, p. 219-223.
51. GARG, NK., GAUR, S., SHARMA, S. Percutaneous autogenous bone marrow grafting in 20 cases of ununited fracture. *Acta Orthop. Scand.*, 1993, vol. 64, no. 6, p. 671-672.
52. GAZDAK, AR., LANE, JM., GLASER, D. et al. Alternatives to 14. autogenous bone graft: efficacy and indications. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, 1995, vol. 3, no. 1, p. 1-8.
53. GHASSEMI, A., GHASSEMI, M., RIEDIGER, D. et al. Comparison of donor-site engraftment after harvesting vascularized and nonvascularized iliac bone grafts. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 2009, vol. 67, no. 8, p. 1589-94.
54. GLOWACKI, J., HURWITZ, S., THORNHILL, TS. et al. Osteoporosis and vitamin – D deficiency among postmenopausal women with osteoarthritis undergoing total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg.*, 2003, vol. 85-A, no. 12, p. 2371-2377.
55. GOEL, A., SANGWAN, SS., SIWACH, RC. et al. Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union. *Injury*, 2005, vol. 36, no. 1, p. 203-206.
56. GOULET, JA., SENUNAS, LE., DE SILVA, GL. et al. Autogenous iliac crest bone graft: Complications and functional assessment. *Clin. Orthop.*, 1997, vol. 339, no. 6, p. 76-81.
57. GOVENDER, S., CSIMMA, C., GENANT, HK et al. BMP-2 evaluation in surgery for tibial trauma (BESTT) study group. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for

treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J. Bone Joint Surg*, 2002, vol. 84-A, no. 12, p. 2123-34.

58. GRONTHOS, S., SIMMONS, PJ. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood*, 1995, vol. 85, no. 4, p. 929-940.

59. GUO, X., ZHENG, Q., KULBATSKI, I. et al. 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, vol.1, no. 3, p. 93-99.

60. HABERLAND, M., SCHILLING, AF., RUEGER, JM. et al. Brain and Bone: Central Regulation of Bone Mass. *J. Bone Joint Surg.*, 2001, vol. 83-A, no. 12, p. 1871-1876.

61. HAN, B., WOODSELL-MAY, J., PONTICIELLO, M. et al. The effect of thrombin activation of platelet-rich plasma on demineralized bone matrix osteoinductivity. *J. Bone Joint Surg.*, 2009, vol. 91-A, no. 6, p. 1459-1470.

62. HEALEY, JH., VIGORITA, VJ., LANE, JM. The coexistence and characteristics of osteoarthritis and osteoporosis. *J. Bone Joint Surg.*, 1985, vol. 67-A, no. 4, p. 586-592.

63. HEIPLE, KG., CHASE, SW., HERNDON, CH. A comparative study of the healing process following different types of bone transplantation. *J. Bone Joint Surg.*, 1963, vol. 45-A, no. 12, p. 1593-1616.

64. HERNIGOU, P., POIGNARD, A., BEAUJEAN, F. et al. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J. Bone Joint Surg.*, 2005, vol. 87-A, no. 7, p. 1430-1437.

65. HIRATA, M., MURATA, H., TAKESHITA, H. et al. Use of purified beta-tricalcium phosphate for filling defects after curettage of benign bone tumours. *Int. Orthop.*, 2006, vol. 30, no. 6, p. 510-513.

66. HOLLINGER, JO., ONIKEPE, AO., MAC KRELL, J. et al. Accelerated fracture healing in the geriatric, osteoporotic rat with recombinant human platelet-derived growth factor-BB and an injectable beta-tricalcium phosphate/collagen matrix. *J. Orthop. Res.*, 2008, vol. 26, no. 1, p. 83-90.

67. ISHAG-RILEY, SL., CRANE, GM., GURLEK, A. et al. Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1997, vol. 36, no. 1, p. 1-8.

68. ITO, H., KOEFOED, M., TIYAPATANAPUTI, P. et al. Remodeling of cortical bone allografts mediated by adherent rAAV-RANKL and VEGF gene therapy. *Nat. Med.*, 2005, vol. 11, no. 3, p. 291-297.
69. ITOH, K., UDAGAWA, N., KATAGIRI, T. et al. Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *Endocrinology*, 2001, vol. 142, no. 8, p. 3656-3662.
70. JIANG, Y., JAHAGIRDAR, BN., REINHARDT, L. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, vol. 418, no. 6893, p. 41-49.
71. JONES, AL., BUCHOLZ, RW., BOSSE, M. et al. Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects. *J. Bone Joint Surg.*, 2006, vol. 88-A, no. 7, p. 1431-1441.
72. KARAGEORGIU, V., KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, no. 27, p. 5474-5491.
73. KASTEN, P., BEYEN, I., NIEMEYER, P. et al. Porosity and pore size of β -tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: An in vitro and in vivo study. *Acta Biomater.*, 2008, vol. 4, no. 6, p. 1904-1915.
74. KATO, T., KAWAGUCHI, H., HANADA, K. et al. Single local injection of recombinant fibroblast growth factor-2 stimulates healing of segmental bone defects in rabbits. *J. Orthop. Res.*, 1998, vol. 16, no. 6, p. 654-659.
75. KHAN, SN., CAMMISA, FP., SANDHU, HS. et al. The biology of bone grafting. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, 2005, vol. 13, no. 1, p. 77-86.
76. KIKUCHI, M., TANAKA, J., KOYAMA, Y. et al. Cell culture test of TCP/CPLA composite. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999, vol. 48, no. 2: 108-110.
77. KNAACK, D., GOAD, ME., AIOLOVA, M. et al. Resorbable calcium phosphate bone substitute. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998, vol. 43, no. 4, p. 399-409.
78. KOOT, VCM., KESSELAER, SMMJ., CLEVERS, GJ. et al. Evaluation of the Singh index for measuring osteoporosis. *J. Bone Joint Surg.*, 1996, vol. 78-B, no. 5, p. 831-834.
79. KUCERA, T., URBAN, K., RAGKOU, S. Healing of cavitory bone defects. *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* [online first], 2011, DOI 10.1007/s00590-011-0831-9, [cit. 2011-06-17],

dostupné z <http://www.springerlink.com/content/?k=Healing+of+cavitary+bone+defects>

80. KUHNE, JH., BARTL, R., FRISCH, B. et al. Bone formativ in coralline hydroxyapatite. Effects of pore size studied in rabbits. *Acta Orthop. Scand.*, 1994, vol. 65, no. 3, p. 246-252.
81. KUZNETSOV, SA., MANKANI, MH., ROBEY, PG. Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. *Transplantation*, 2000, vol. 70, no. 12, p. 1780-1787.
82. LAFFARGUE, P., HILDEBRAND, HF., RTAIMATE, M. et al. Evaluation of human recombinant bone morphogenetic protein-2-loaded tricalcium phosphate implants in rabbits' bone defects. *Bone*, 1999, vol. 25, Suppl 2, p. 55-58.
83. LANE, JM., YASKO, AW., TOMIN, E. et al. Bone marrow and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in osseous repair. *Clin. Orthop.*, 1999, vol. 361, no. 4, p. 216-227.
84. LARSSON, S., BAUER, TW. Use of injectable calcium phosphate cement for fracture fixation: a review. *Clin. Orthop.*, 2002, vol. 395, no. 2, p. 23-32.
85. LIEBERMAN, JR., DALUISKI, A., EINHORN, TA. The role of growth factors in the repair of bone biology and clinical aplication. *J. Bone Joint Surg.*, 2002, vol. 84-A, no. 6, p. 1032-1044.
86. LU, JX., FLAUTRE, B., ANSELME, K. et al. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 1999, vol. 10, no. 2, p. 111-120.
87. LUTOLF, MP., WEBER, FE., SCHMOEKEL, HG. et al. Repair of bone defects using synthatic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nat. Biotechnol.*, 2003, vol. 21, no. 5, p. 513-518.
88. MACKENSEN, A., DRAGER, R., SCHLEISER, M. et al. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer. Immunol. Immunother.*, 2000, vol. 49, no. 3, p. 152-156.
89. MC GOVERN, SC., FONG, W., WANG, JC. Can bone morphogenetic protein binding peptide increase efficiency of bone formation? *Spine*, 2010, vol. 35, no. 17, p. 1655-1659.

90. MC KEE, MD., SCHEMITSCH, EH., WADDELL, JP. et al. The effect of human recombinant bone morphogenetic protein (rhBMP-7) on the healing of open tibial shaft fractures: results of a multi-center, prospective, randomized clinical trial. In *Proceedings of the 18th Annual Meeting of the Orthopaedic Trauma Association Oct 11-13, 2002, Toronto, Canada*, p. 157-158.
91. MC LAIN, RF., FLEMING, JE., BOEHM, CA. et al. Aspiration of osteoprogenitor cells for augmenting spinal fusion: comparison of progenitor cell concentrations from the vertebral body and iliac crest. *J. Bone Joint Surg.*, 2005, vol. 87-A, no. 12, p. 2655-2661.
92. MINGUEL, JJ., ERICES, A., CONGET, P. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.*, 2001, vol. 226, no. 6, p. 507-520.
93. MOORE, DC., EHRLICH, MG., MC ALLISTER, SC. et al. Recombinant human Platelet-Derived Growth Factor-BB augmentation of new-bone formation in a rat model of distraction osteogenesis. *J. Bone Joint Surg.*, 2009, vol. 91-A, no. 8, p. 1973-1984.
94. MORO-BARRERO, L., ACEBAL-CORTINA, G., SUÁREZ-SUÁREZ, M. et al. Radiographic analysis of fusion mass using fresh autologous bone marrow with ceramic composites as an alternative to autologous bone graft. *J. Spinal Disord. Tech.*, 2007, vol. 20, no. 6, p. 409-415.
95. MUSCHLER, GF., BOEHM, C., EASLEY, K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J. Bone Joint Surg.*, 1997, vol. 79-A, no. 11, p. 1699-1709.
96. MUSCHLER, GF., NAKAMOTO, C., GRIFFITH, LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J. Bone Joint Surg.*, 2004, vol. 86-A, no. 7, p. 1541-1558.
97. MUSCHLER, GF., NITTO, H., BOEHM, CA. et al. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J. Orthop. Res.*, 2001, vol. 19, no. 1, p. 117-125.
98. NAIR, LS., LAURENCIN, CT. Nanofibers and nanoparticles for orthopaedic surgery applications. *J. Bone Joint Surg.*, 2008, vol. 90-A, Suppl 1, p. 128-131.
99. NAKAMURA, T., HARA, Y., TAGAWA, M. et al. Recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates fracture healing by enhancing callus remodeling in experimental dog tibial fracture. *J. Bone Miner. Res.*, 1998, vol. 13, no. 6, p. 942-949.

100. NATHER, A., DAVID, V., TENG, JWH. et al. Effect of autologous mesenchymal stem cells on biological healing of allografts in critical-sized tibial defects simulated in adult rabbits. *Ann. Acad. Med. Singapore*, 2010, vol. 39, no. 8, p. 599-606.
101. NICHOLAS, RW., LANGE, TA. Granular tricalcium phosphate grafting of cavitary lesions in human bone. *Clin. Orthop.*, 1994, vol. 306, no. 9, p. 197-203.
102. NOVICOFF, WM., MANASWI, A., HOGAN, MV. et al. Critical analysis of the evidence for current technologies in bone-healing and repair. *J. Bone Joint Surg.*, 2008, vol. 90-A, Suppl 1, p. 85-91.
103. PADHRAIG, F., O'LOUGHLIN, MD., MORR, S. et al. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J. Bone Joint Surg.*, 2008, vol. 90-A, Suppl 1, p. 79-84.
104. PARIKH, SN. Bone graft substitutes: past, present, future. *J. Postgrad. Med.*, 2002, vol. 48, no. 2, p. 142-148.
105. PARIKH, SN. Gene therapy: principles and clinical applications in ortopedics. *Ortopedics*, 2004, vol. 27, no. 3, p. 294-305.
106. PENG, H., USAS, A., OLSHANSKI, A. et al. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP-2 –induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J. Bone Miner. Res.*, 2005, vol. 20, no. 11, p. 2017-2027.
107. PHEMISTER, DB. Fate of transplanted bone and the regenerative power of various constituents. *Surg., Gynec., Obst.*, 1914, vol. 19, p. 303-333.
108. PIETRZAK, WS., EPPLEY, BL. Platelet rich plasma: Biology and new technology. *J. Craniofac. Surg.*, 2005, vol. 16, no. 6, p. 1043-1053.
109. PITTENGER, MF., MARIN, BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ. Res.*, 2004, vol. 95, no. 1, p. 9-20.
110. PRAT-POIRET, N., LANGLAIS, F., BONNAURE, M. et al. Phosphate tricalcique et gentamycine. Diffusion de l'antibiotique in vitro et in vivo, rehabilitation en site osseux chez le mouton. *Chirurgie*, 1996, vol. 121, no. 4, p. 298-308.
111. PROCKOP, DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 1997, vol. 276, no. 5309, p. 71-74.

112. PYTLÍK, R., STEHLÍK, D., SOUKUP, T. et al. The cultivation of human multipotent mesenchymal stromal cells in clinical grade medium for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2009, vol. 30, no. 20, p. 3415-3427.
113. RANLY, DM., MC MILLAN, J., KELLER, T. et al. Platelet-derived growth factor inhibits demineralized bone matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation. A study of immunocompromised mice. *J. Bone Joint Surg.*, 2005, vol. 87-A, no. 9, p. 2052-2064.
114. REYES, M., LUND, T., LENVIK, T. et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 2001, vol. 98, no. 9, p. 2615-2625.
115. RIEGGER, C., KROPIL, P., JUNGBLUTH, P. et al. Quantitative assessment of bone defect healing by multidetector CT in a pig model. *Skeletal Radiol.* [online first], 2011, DOI 10.1007/s00256-011-1203-6, [cit.2011-06-24],
dostupné z <http://www.springerlink.com/content/m176422470g16kk1/>.
116. ROBINSON, D., ALK, D., SANDBANK, J. et al. Inflammatory reactions associated with a calcium sulphate bone substitute. *Ann. Transplant.*, 1999, vol. 4, no. 3-4, p. 91-97.
117. SALAMAT, MR., ROSTAMPOUR, N., ZOFAGHARI, SJ. et al. Comparison of Singh index accuracy and dual energy X-ray absorptiometry bone mineral density measurement for evaluating osteoporosis. *Iran. J. Radiat. Res.*, 2010, vol. 8, no. 2, p. 123-128.
118. SARKAR, MR., AUGAT, P., SHEFELBINE, SJ. et al. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials*, 2006, vol. 27, no. 9, p. 1817-1823.
119. SATO, M., WEBSTER, TJ. Nanobiotechnology: implications for the future of nanotechnology in orthopedic applications. *Expert. Rev. Med. Devices*, 2004, vol. 1, no. 1, p. 105-114.
120. SCHECROUN, N., DELLOYE, CH. In vitro growth and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells supported by autologous plasma. *Bone*, 2004, vol. 35, no. 2, p. 517-524.
121. SEO, BM., MIURA, M., GRONTHOS, S. et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 2004, vol. 364, no. 9429, p. 149-155.
122. SHAPIRO, F. Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *J. Bone Joint Surg.*, 1988, vol. 70-A, no. 7, p. 1067-1081.

123. SHI, SR., KEY, ME., KALRA, KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.*, 1991, vol. 39, no. 6, p. 741-748.
124. SINGH, M., NAGRATH, AR., MAINI, PS. Changes in trabecular pattern of the upper end of the femur as an index of osteoporosis. *J. Bone Joint Surg.*, 1970, vol. 52-A, no. 3, p. 457-467.
125. SIRIS, ES., MILLER, PD., BARRET-CONNOR, E. et al. Identification and fracture outcomes of undiagnosed low bone mineral density in postmenopausal women. *JAMA*, 2001, vol. 286, no. 22, p. 2815-2822.
126. SLÍŽOVÁ, D., KRS, O., POSPÍŠILOVÁ, B. Alternative method of rapid drying vascular specimens for scanning electron microscopy. *J. Endovasc. Ther.*, 2003, vol. 10, no. 2, p. 285-287.
127. SOUKUP, T., KUČERA, T., PALIČKA, V. et al. Mezenchymové kmenové buňky u nemocných s osteoporózou. In 2. *Morfologický postgraduální kurz. Univerzita Karlova Praha, Farmaceutická fakulta Hradec Králové*, 14.12. 2006, s. 20-24.
128. SOUKUP, T., MOKRÝ, J., KARBANOVÁ, J. et al. Mesenchymal stem cells isolated from the human bone marrow: cultivation, phenotypic analysis and changes in proliferation kinetics. *Acta Medica*, 2006, vol. 49, no. 1, p. 27-33.
129. STEVENSON, S. Biology of bone grafts. *Orthop. Clin. North. Am.*, 1999, vol. 30, no. 4, p. 543-552.
130. STUTE, N., HOLTZ, K., BEBENHEIM, M. et al. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp. Hematol.*, 2004, vol. 32, no. 12, p. 1212-1225.
131. SUGUIRA, F., KITO, H., ISHIGURO, N. Osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, vol. 316, no. 1, p. 233-239.
132. SZPALSKI, C., BARR, J., WETTERAU, M. et al. Cranial bone defects: Current and future strategies: In vivo animal models of cranial defects. *Neurosurg. Focus*, 2010, vol. 29, no. 6, p. 8.

133. SZPALSKI, M., GUNZBURG, R. Applications of calcium phosphate-based cancellous bone void fillers in trauma surgery. *Orthopedics*, 2002, vol. 25, Suppl 5, p. 601-609.
134. ŠPONER, P., URBAN, K., KUČERA, T. et al. The use of interconnected β -tricalcium phosphate as bone substitute after curettage of benign bone tumours. *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.*, 2011, vol. 21, no. 4, p. 235-241.
135. ŠPONER, P., URBAN, K., POVÝŠIL, C. Bioaktivní sklokeramický materiál BAS-O jako náhrada kostní tkáně (klinické zkušenosti v delším časovém intervalu od aplikace). *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 1998, roč. 65, č. 2, s. 145-152.
136. TERMAAT, MF., DEN BOER, FC., BAKKER, FC. et al. Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J. Bone Joint Surg.*, 2005, vol. 87-A, no. 6, p. 1367-1378.
137. TIEDMAN, JJ., GARVIN, KL., KILE, TA. et al. The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. *Orthopedics*, 1995, vol. 18, no. 12, p. 1153-1158.
138. TISDEL, CL., GOLDBERG, VM., PARR, JA. et al. The influence of a hydroxyapatite and tricalcium phosphatae coating on bone growth into titanium fiber-metal implants. *J. Bone Joint Surg.*, 1994, vol. 76-A, no. 2, p. 159-171.
139. TSUTSUMI, S., SHIMAZU, A., MIYAZAKI, K. et al. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, vol. 288, no. 2, p. 413-419.
140. UEDA, T., MIZUNO, I., YOTSUYANAGI, T. et al. Possibility of alpha-tricalcium phosphate (alpha-TCP) particles as a drug carrier for treatment of abdominal carcinomatosis. *Cancer et chemotherapy*, 1997, vol. 24, no. 12, p. 1789-1793.
141. ULUDAG, H., D'AUGUSTA, D., GOLDEN, J. et al. Implantation of recombinant human bone morphogenetic proteins with biomaterial carriers: a correlation between protein pharmacokinetics and osteoinduction in the rat ectopic model. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000, vol. 50, no. 2, p. 227-238.
142. URBAN, K., STEHLÍK, J. První klinické zkušenosti s bioaktivním sklokeramickým materiálem BAS-0. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 1993, roč. 60, č. 1, s. 40-46.
143. URBAN, K., STRNAD, Z., POVÝŠIL, C. et al. Trikalciem fosfát jako substituce kostní tkáně (testování biologických vlastností v experimentu na zvířatech). *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 1996, roč. 63, č. 1, s. 16-20.

144. URBAN, K., ŠPONER, P. Rekonstrukce rozsáhlých acetabulárních defektů bioaktivní sklokeramikou u revizních operací totálních endoprotéz. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 1998, roč. 65, č. 1, s. 17-23.
145. URBAN, K., URBANOVÁ, E. Sledování postupu vhojování bioaktivní sklokeramiky v okolí acetabula po revizní operaci endoprotézy kyčle pomocí scintigrafie. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 1998, roč. 65, č. 1, s. 11-16.
146. URIST, MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*, 1965, vol. 150, no. 698, p. 893-899.
147. VON DOERNBERG, MC., VON RECHENBERG, B., BOHNER, M. et al. In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials*, 2006, vol. 27, no. 30, p. 5186-5198.
148. WEINER, BK., WALKER, M. Efficacy of autologous growth factors in lumbar intertransverse fusions. *Spine*, 2003, vol. 28, no. 17, p. 1968-1971.
149. WIENTROUB, S., GOODWIN, D., KHERMOSH, O. et al. The clinical use of autologous marrow to improve osteogenic potential of bone grafts in pediatric orthopedics. *J. Pediatr. Orthop.*, 1989, vol. 9, no. 2, p. 186-190.
150. WILTFANG, J., MERTEN, HA., SCHLEGEL, KA. et al. Degradation characteristics of alpha and beta tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, vol. 63, no. 2, p. 115-121.
151. WINN, SR., SCHMITT, JM., BUCK, D. et al. Tissue-engineered bone biomimetic to regenerate calvarial critical-sized defects in athymic rats. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999, vol. 45, no. 4, p. 414-421.
152. WOLFF, J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. 1. Auflage, Berlin: Hirschwald, 1892, ISBN: 978-3-86805-648-8.
153. *World Health Organization study group on assessment of fracture risk and its application to screening and postmenopausal osteoporosis*. Report of a WHO Study Group. Technical Report Series no. 84, 1994.
154. ZHANG, R., MA, PX. Porous poly (L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999, vol. 45, no. 4, p. 285-293.
155. ZISCH, AH., SCHENK, U., SCHENSE, JC. et al. Covalently conjugated VEGF-fibrin matrices for endothelialization. *J. Control. Release*, 2001, vol. 72, no. 1-3, p. 101-113.

156. ZÍTKO, D., URBAN, K. Bioaktivní sklokeramický nosič antibiotik v léčení chronické osteomyelitidy. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 1998, roč. 65, č. 3, s. 231-223.