

UNIVERZITA KARLOVA

2. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Moderní terapie chondrálních defektů kloubů

Modern therapy of chondral defects

Pavel Neckář

Praha, 2023

Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu experimentální chirurgie na *Ortopedickém oddělení, Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem, Krajská zdravotní a.s.*

Školitel: Prof. MUDr. Vojtěch Havlas, Ph.D.

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady experimentální chirurgie dne v od

hod. Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu:

Prof. MUDr. Zdeněk Krška, DrSc.

Děkan fakulty: Prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc.

Tato práce vznikla za podpory grantu Krajské zdravotní a.s. IGA-KZ-2018-1-5, pro období 2018-2020. Název: Využití multipotentních kmenových buněk kostní dřeně v moderní léčbě poranění chrupavky

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 (tel. 224 435 836).

Abstrakt

Práce se zabývá aplikací kultivovaných kmenových buněk kostní dřene v terapii fokálního chondrálního defektu kolenního kloubu. V experimentální části práce bylo cílem kvantitativní a kvalitativní porovnání dvou odběrových míst monocytárních aspirátů kostní dřene, z ilické kosti a proximální tibie, za účelem určení vhodného buněčného zdroje pro moderní buněčnou terapii. V klinické práci uvádím popis chirurgického postupu a výsledky ročního sledování pacientů po implantaci kultivovaných kmenových buněk z kostní dřene, pod označením BiCure[®] orthoMSCp (Bioinova, Praha, Česká republika), fixovaných na komerčně dostupném 3D nosiči Chondrotissue[®] (BioTissue AG, Ženeva, Švýcarsko) pomocí koagulované autologní obohacené plazmy. Primární cíl klinické studie zahrnoval vyhodnocení krátkodobé a dlouhodobé bezpečnosti aplikovaného medicínského produktu. Sekundární cíl práce zahrnoval posouzení účinnosti terapie pomocí dotazníkového šetření a posouzení strukturální změny ošetřeného defektu pomocí magnetické rezonance 1 rok od operace. Práce prokazuje bezpečnost a velmi dobrý klinický výsledek léčby fokálního chrupavčitého defektu kolenního kloubu pomocí kultivovaných kmenových buněk z kostní dřene.

Klíčová slova

buněčná terapie, defekt chrupavky, kolenní kloub, kmenové buňky, kostní dřeň

Abstract

The thesis describes the application of cultured bone marrow stem cells in the therapy of focal chondral defect of the knee joint. In the experimental part of the work, the goal was to quantitatively and qualitatively compare two sampling sites of bone marrow monocytic aspirates, the iliac crest bone and the proximal tibia, in order to determine a suitable cell source for advanced cell therapy. The sample analysis showed that the amount of monocytic cells and the yield of stem cells from the aspirate obtained were significantly higher in the bone marrow from the iliac crest. We did not find significant qualitative differences between the two sources of stem cells. In the clinical part of the work, I present a description of the surgical procedure and the results of a 1-year follow-up of patients after the implantation of cultured stem cells from the bone marrow, under the name BiCure[®] orthoMSCp (Bioinova, Prague, Czech Republic), fixed on a commercially available 3D scaffold Chondrotissue[®] (BioTissue AG, Geneva, Switzerland) using coagulated autologous platelet-rich plasma. The primary objective of the clinical study included the evaluation of the short-term and long-term safety of the applied medical product. The secondary objective of the work included the assessment of the effectiveness of the therapy using a questionnaire survey and the assessment of structural changes in the treated defect using magnetic resonance 1 year after the operation. The work demonstrates the safety and very good clinical result of the treatment of a focal cartilaginous defect of the knee joint using cultured stem cells from the bone marrow.

Key words

bone marrow, cartilage defect, cell therapy, mesenchymal stem cells, knee joint

Obsah

1	ÚVOD DO PROBLEMATIKY	8
2	HYPOTÉZY A CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	10
3	MATERIÁL A METODIKA	11
3.1	METODIKA EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE.....	11
3.2	METODIKA KLINICKÉHO EXPERIMENTU	12
4	VÝSLEDKY	15
4.1	VÝSLEDKY EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI PRÁCE	15
4.2	VÝSLEDKY KLINICKÉ PRÁCE	18
5	DISKUZE	21
5.1	DISKUZE K EXPERIMENTU.....	21
5.2	DISKUZE KE KLINICKÉ PRÁCI	23
6	ZÁVĚR.....	27
7	SOUHRN	28
	SUMMARY	29
8	LITERATURA	30
	PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA.....	35

1 Úvod do problematiky

Hojení ohraničeného defektu kloubní chrupavky je stále nevyřešeným problémem ortopedie. Inspirací k vytvoření této práce mi byla společenská aktuálnost tématu využití kmenových buněk v medicíně. Nové moderní technologie nám dávají možnosti využití současných poznatků z oblasti experimentální medicíny a tkáňového inženýrství a tyto aplikovat do klinické praxe léčby defektu chrupavky. Standartně používané terapeutické postupy nevedou k úplné a dlouhodobé spokojenosti pacientů a restauraci kloubního povrchu, ve smyslu histologické kvality a biomechanických vlastností regenerované chrupavky (Horas et al. 2003; Knutsen et al. 2007). Výsledkem je vznik méně kvalitní vazivové nebo hyaline-like chrupavky. Méně kvalitní chrupavčitý povrch není schopen odolávat působícím biomechanickým vlivům na povrchu kolenního kloubu. Inkongruence kloubního povrchu vede k rozvoji sekundární artrózy se všemi klinickými projevy v běžném životě pacienta.

V posledních letech došlo k rozvoji techniky a znalostí v oboru tkáňového inženýrství, tento fakt vedl k využití léčebné metody založené na implantaci kultivovaných autologních buněk do ohraničeného defektu kloubního povrchu. Mezenchymální kmenové nebo stromální buňky (MSCs) byly dlouho navrhovány jako potenciální buněčný zdroj pro muskuloskeletální regeneraci. V oblasti léčby poranění chrupavky bylo vynaloženo několik snah vyvinout nové terapeutické strategie, které by využívaly MSCs (Migliorini et al. 2022; Schmitt et al. 2012a; Caplan and Correa 2011). Obecně lze MSCs terapie rozdělit do dvou kategorií; ty, které používají čerstvě izolované buňky, a ty, které používají jednovrstvé expandované buňky. Toto rozlišení přináší významné důsledky jak z hlediska regulačních požadavků, tak z hlediska mechanismu působení. Z vědeckého hlediska existují dva hlavní problémy, které zpozdily využití MSCs v klinické praxi. Nedostatečné nástroje pro adekvátní charakterizaci získaných buněčných populací a

nedostatečný výzkum v metodice implantace a účinku implantovaných buněk (Dominici et al. 2006b).

2 Hypotézy a cíle disertační práce

V experimentální části disertační práce jsem se zaměřil na analýzu monocytárního aspirátu kostní dřeně (MNCs) ze dvou různých anatomických zdrojů, pánevní kosti a proximální tibie, s cílem posouzení kvantitativních a kvalitativních parametrů získaných buněk s ohledem na jejich využití pro kultivaci MSCs z daného aspirátu. Kultivované MSCs z aspirátů z různých zdrojů byly následně kvalitativně a kvantitativně zhodnoceny a porovnány vzhledem k jejich možnému využití v terapii fokálního chrupavčitého defektu kolenního kloubu.

Hlavním cílem klinické části disertační práce je zhodnotit bezpečnost a proveditelnost chirurgické implantace kultivovaných kmenových buněk z kostní dřeně na 3D komerčně dostupném nosiči v léčbě fokálního chrupavčitého defektu kolenního kloubu. Dílčí cíle klinické práce lze shrnout následovně:

1. Zjistit, zda je aplikace kultivovaných MSCs z kostní dřeně na nosiči Chondrotissue® klinicky bezpečná.
2. Zjistit, zda stanovený chirurgický postup je reprodukovatelný a opakovatelný.
3. Zjistit, zda zvolená fixace buněčného implantátu pomocí fibrinového lepidla je primárně (v době implantace) dostatečně pevná a zda vede k sekundární integraci s okolní tkání.
4. Zhodnotit klinický efekt léčby pomocí dotazníkových šetření a klinického sledování pacientů po dobu 1 roku od operace.

3 Materiál a metodika

3.1 Metodika experimentální práce

Celkem 10 náhodně vybraných pacientů Ortopedického oddělení Masarykovy nemocnice o.z., Krajské zdravotní a.s. podstoupilo, po vyslovení informovaného souhlasu s účastí ve studii, odběr kostní dřeně z lopaty kyčelní a proximální metafýzy tibie v rámci prováděné plánované totální náhrady kolenního kloubu. Vstupními kritérii byl věk nad 40 let a osteoartróza kolenního kloubu indikovaná k totální endoprotéze kolenního kloubu. Vstupní laboratorní hematologické testy krevního obrazu a koagulace byly provedeny maximálně 3 týdny před zákrokem a jejich výsledky musely spadat do populačních norem referenční laboratoře. Vybraní pacienti museli být bez anamnézy příjmu nebo odběru krevních derivátů v posledních 3 měsících před plánovanou trepanobiopsií. Studie byla schválena etickou komisí Krajské zdravotní a.s.

K odebraným aspirátům byl přidán Gelofusin (B. Braun) pro vytvoření frakce MNCs. Koncentrace MNCs před i po sedimentaci v Gelofusinu byla stanovena pomocí hematologického analyzátoru ABX Micros 60 (HORIBA Medical). Získaná frakce MNCs byla nasazena na kultivační láhev o koncentraci $1,2-1,6 \times 10^5$ MNCs/cm² a kultivována v médiu Alpha MEM (Lonza) s 5% suplementem Stemulate (Cook General BioTechnology) a 1% antibiotiky/antimykotiky (Penicilin, Streptomycin, Amfotericin B; Thermo Fisher Scientific) při teplotě 37°C a v atmosféře obsahující 5% CO₂. Po 24-48 h byly suspenzní buňky odstraněny oplachem PBS (Phosphate Buffered Saline (Lonza)) a k adhezivním buňkám bylo přidáno čerstvé kultivační médium. Kultivované MSCs byly pasážovány při dosažení 80-90% konfluence v rámci buněčných kolonií za použití enzymů TrypLE (Life Technologies) a opět vysety. Počet buněk v 1. i 2. pasáži byl stanoven pomocí přístroje Luna-II Cell Counter (Logos Biosystems).

Kultivované MSCs izolované z lopaty kosti kyčelní a kolenního kloubu byly na úrovni 2. pasáže analyzovány na znaky MSCs dle dříve publikovaných parametrů a na viabilitu (13-20 dní kultivace, 80-90% konfluence). Buněčná suspenze byla inkubována s konjugovanými monoklonálními lidskými protilátkami a následně byla provedena analýza průtokovým cytometrem BD FACS Canto II (BD Biosciences).

3.1.1 Metodika hodnocení experimentální části

Kvalitativní analýza zaměřující se na imunofenotypizaci, viabilitu, PDt (Population doubling time) MSCs populace, případně morfologii od všech 10 dárců byla hodnocena jednotlivě a na závěr sloučena a vyhodnocena pomocí programů FlowJo (Tree Star) a FSC Express (De Novo Software). Získaná statistická data byla vyhodnocena pomocí programu SigmaPlot (Systat Software). Jako statistický test byl použitý jednostranný t-test. Za statisticky významnou byla považována hodnota hladiny významnosti $p < 0,05$. Vyšší hodnoty nebyly hodnoceny jako statisticky významné (ns, non-significant).

3.2 Metodika klinického experimentu

Izolace a expanze BM-MSCs z kostní dřeně pánevní kosti byly provedeny v čistých prostorách třídy A/B v zařízení Bioinova s.r.o., Česká republika. Buňky byly sklizeny při třetí pasáži. Vysušená buněčná peleta byla resuspendována v autologní PrP (platelet-rich- plasma), aby se dosáhlo konečné koncentrace $3.5-6.5 \times 10^6$ buněk/mL. Kritéria pro uvolnění šarže zahrnovala přítomnost alespoň 90% buněk se znaky : CD105+/CD90+/CD73+/CD45-/CD34-/CD19-/CD14-/HLA-DR- cells (Dominici et al. 2006a) a více než 85% životaschopných buněk v produktu. Sterilita produktu byla sledována stran kontaminace bakteriemi, plísněmi a mykoplazmaty během celého výrobního procesu.

Pacienti přijati do klinické studie museli splňovat následující vstupní kritéria: Symptomatický chondrální defekt kolenního kloubu, III.-IV. stupně dle Outerbridge. Velikost chondrálního defektu do 6 cm². Věk 18-60 let. Osteoartróza do III. stupně dle Kellgrena a Lawrence na rtg snímku ne starším 3 měsíců. Body mass index < 30 kg/m². A nesměli splňovat vylučovací kritéria: Předchozí operační léčba totožného chondrálního defektu. Osová deformita kolenního kloubu nad 5st. Vazivová nestabilita kolenního kloubu. Hematopoetické onemocnění, nebo příjem krevních derivátů v posledních 3 měsících. Nádorové onemocnění. Těhotenství

Operační zákrok byl proveden na pracovišti autora. Operace byla provedena přibližně čtyři týdny po odběru kostní dřeně, načasování bylo dáno přípravou IMP. Nejprve byla artroskopicky stanovena lokalizace, velikost a Outerbridgova klasifikace (Outerbridge and R. E. 1961) defektu chrupavky. Byly vyloučeny kontraindikované stavy a případně ošetřeny přidružená poranění menisku. Následně byla provedena cílená miniartrotomie, kyretáž poškozené chrupavky a upraveny okraje léze. Dno defektu bylo ošetřeno Pridieho vrtáním pomocí Kirschnerova drátu o průměru 1,2 mm. Pro vyvolání gelovatění PrP v produktu bylo smícháno 1,1 mL IMP s 36 uL Calcium chloratum Bioitika (BB Pharma, Prague, Česká republika) obsahujícího 2,42 mg CaCl₂. Okamžitě byl celý objem rovnoměrně aplikován na 6 cm² proužku Chondrotissue® (BioTissue AG, Geneva, Switzerland) a tento byl umístěn na Petriho misku, což vedlo ke koncentraci buněk 0,98 (± 0,19) x 10⁶ buněk na cm² povrchu nosiče (Obr. 1A) a bylo inkubováno po dobu 15 minut k dokončení procesu gelovatění. Následně byla vyříznuta vhodná velikost a tvar štěpu s nasazenými buňkami (Obr. 1B). Štěp byl umístěn do léze chrupavky a přilepen pomocí fibrinového lepidla Tisseel fibrin sealant (Baxter, Deerfield, IL, USA) (Obr. 1C). Primární stabilita implantátu *in situ* byla testována několika flexními/extenzními pohyby kloubu a operační rána byla sešita po vrstvách, kloub drénován bez použití aktivního sání na 24 hod od operace. Koleno bylo po operaci fixováno

ve 20° flexi po dobu dvou týdnů a po šesti týdnech bylo povoleno plné zatížení došlapem na operovanou končetinu a plný rozsah pohybu.



Obr. 1A-C. A. Aplikace buněčné suspenze - BiCure™-Ortho-MSCp, na 3D nosič (Chondrotissue®) na operačním sále před finální úpravou nosiče. B. Úprava nosiče na požadovanou velikost a tvar. C. Implantát in situ na kondylu femuru

3.2.1 Metodika hodnocení klinického experimentu

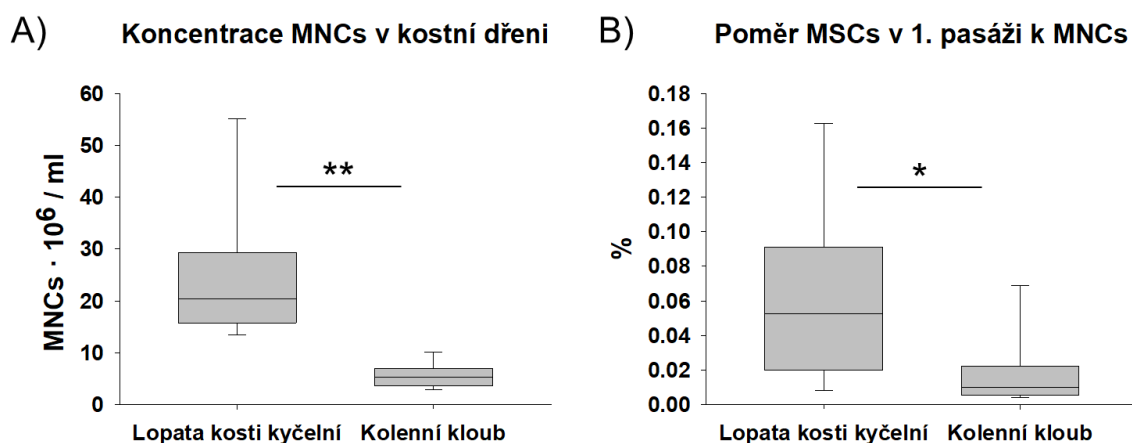
Bezpečnostní analýzy byly založeny na popisné statistice nežádoucích účinků se změnami oproti výchozí hodnotě, pokud to bylo možné.

Hodnoty získané pomocí Lysholmova skóre, KOOS (Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score) a VAS (Visual Analogue Scale) byla porovnána s hodnotami před léčbou pomocí oboustranného Wilcoxon Signed-Rank testu s použitím softwaru Statistics Kingdom software (Melbourne, Austrálie). Rozdíl mezi hodnotami srovnáními byl považován za statisticky významný, pokud $p < 0.05$.

4 Výsledky

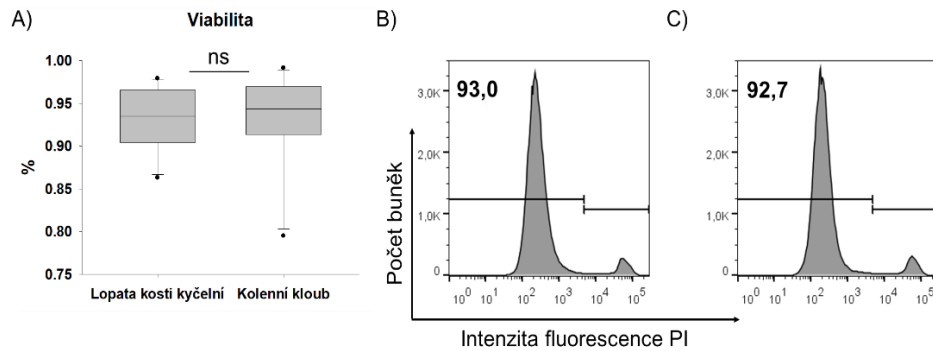
4.1 Výsledky experimentální části práce

Kvantitativní analýza získaných aspirátů kostní dřeně prokazuje signifikantně vyšší buněčnost MNCs u aspirátu kostní dřeně odebraného z lopaty kosti kyčelní. Medián získaných MNCs z tibie po sedimentaci byl $5,4 \times 10^6$ MNCs/ml, zatímco u odběru z lopaty kosti kyčelní $20,5 \times 10^6$ MNCs/ml (Obr. 2A). Výtěžnost kultivovaných MSCs byla stanovena jako poměr počtu MSCs v 1. pasáži a počtu MNCs, které byly použity pro kultivaci. Měření ukázalo statistickou významnost a větší podíl MSCs k počtu MNCs pocházejících z lopaty kosti kyčelní (5,2 %), zatímco u kolenního kloubu byl podíl pouze 1,0 % (Obr. 2B).

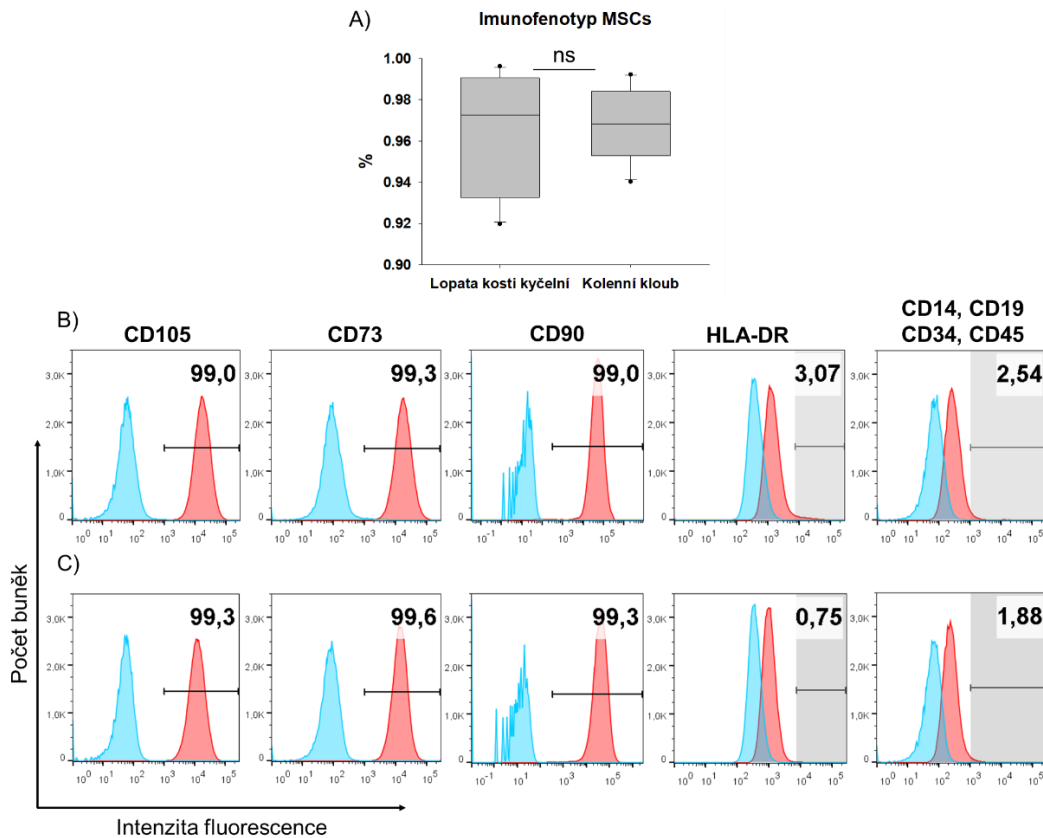


Obr. 2: Výtěžnost buněk. Krabicové grafy zobrazují koncentraci MNCs v aspirátu kostní dřeně z obou odběrových míst (A) a poměr získaných MSCs v 1. pasáži k počtu odebraných MNCs u obou odběrových míst (B). Data jsou zobrazená včetně mediánu (n=10; p=0,001-0,01 **; 0,01-0,05 *; chybové úsečky představují kvartily -5-25% a 75-95%).

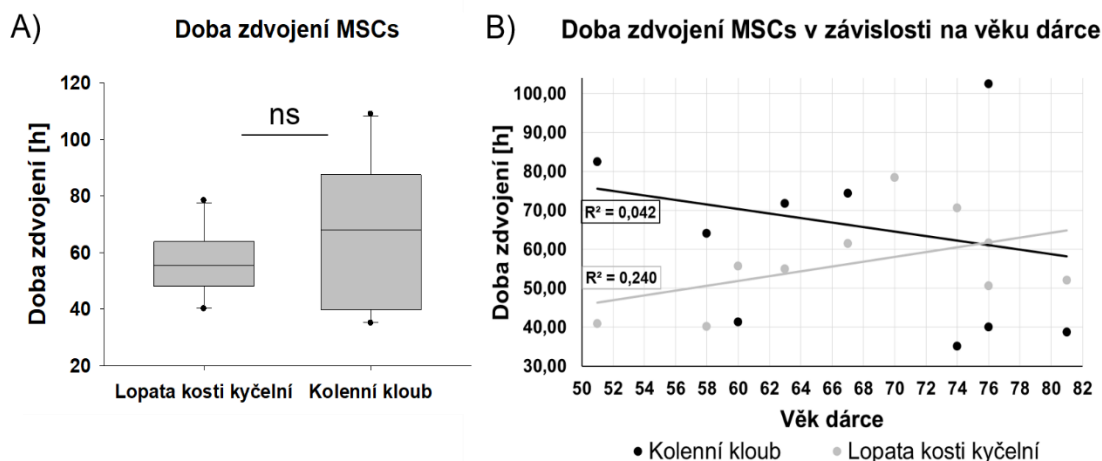
Kvalitativní analýza zaměřující se na imunofenotypizaci, viabilitu, PDt MSCs populace, případně morfologii, vycházela srovnatelně u MSCs z obou odběrových míst (Obr. 3, 4, 5).



Obr. 3: Viabilita MSCs. (A) Krabicový graf poukazuje na statisticky nevýznamný rozdíl mezi viabilitou buněk izolovaných z lopaty kosti kyčelní a z kolenního kloubu u všech dárců včetně odlehlých hodnot a mediánu (n=10; ns, nesignifikantní; chybové úsečky představují kvartily – 5-25% a 75-95%). Histogramy ukazují oddělené populace buněk pozitivních a negativních na značení PI v případě buněk z lopaty kosti kyčelní (B) a kolenního kloubu (C). Číselné údaje uvádění procentuální zastoupení.



Obr. 4: Imunofenotypizace MSCs. (A) Krabicový graf ukazuje srovnatelný fenotyp u obou odběrových míst včetně odlehlých hodnot a mediánu (n=10; ns, nesignifikantní; chybové úsečky představují kvartily – 5-25% a 75-95%). (B) a (C) zobrazují porovnání imunofenotypu buněk izolovaných z lopaty kosti kyčelní (B) a kolenního kloubu (C) vzhledem k negativní kontrole. Histogram na levé straně (modře) reprezentuje neznačenou (negativní) kontrolu, histogram na pravé straně (červeně) ukazuje značenou (pozitivní) populaci buněk. Hodnota nad úsečkou udává procentuální podíl populace pozitivní na daný znak.



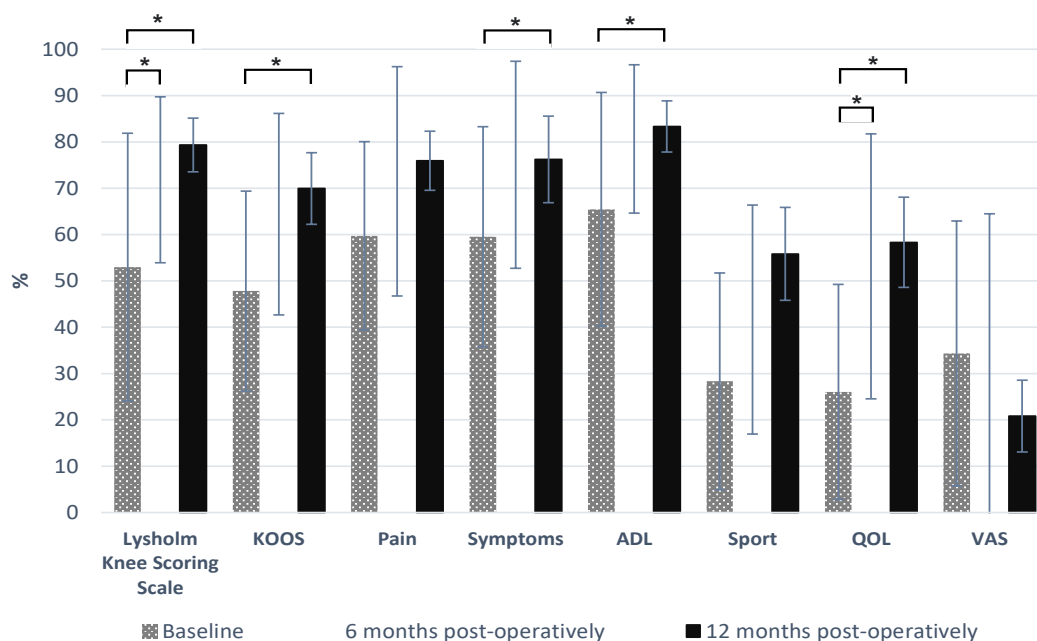
Obr. 5: Doba zdvojení MSCs. A) Krabicový graf ukazující dobu zdvojení (Pdt) MSCs izolovaných z lopaty kosti kyčelní a kolenního kloubu včetně odlehlých hodnot a mediánu (n=10; ns, nesignifikantní; chybové úsečky představují kvartily – 5-25% a 75-95%). B) Graf závislosti hodnoty Pdt na věku dárce pro MSCs odebrané z lopaty kosti kyčelní (šedě) a kolenního kloubu (černě) včetně hodnoty spolehlivosti R^2 . Korelační koeficient pro lopatu kosti kyčelní je roven hodnotě 0,49, pro kyčelní kloub -0,20.

4.2 Výsledky klinické práce

Vzhledem k hodnocení bezpečnosti implantovaného medicínského produktu. Ve sledované skupině se nevyskytly žádné vážné nežádoucí události. Laboratorní rozborů krevních vzorků ve sledovaném období u všech pacientů neprokázaly žádné vážné odchylky ze sledovaných parametrů.

Hodnocení dotazníků a klinického stavu prokázalo, že dvanáct měsíců po operaci bylo pozorováno klinicky a statisticky významné zlepšení funkce operovaného kolena (Graf 1). Lysholmovo skóre se zlepšilo z průměrné hodnoty $53,0 \pm 28,9$ na $79,3 \pm 14,2$ ($p = 0,03$), což odpovídá klinickému zlepšení ze „špatného“ na „dobrý“ (Tegner and Lysholm 1985). Průměrné hodnoty KOOS se zlepšily hodnot $47,8 \pm$

21,6 na $69,9 \pm 18,9$ ($p = 0,03$). Pokud jde o podskupiny škály KOOS, nejlepších výsledků bylo dosaženo v podskupině hodnotící „kvalitu života“ související s funkcí kolenního kloubu, která se zlepšila z $26,0 \pm 23,2$ na $58,3 \pm 23,8$ ($p = 0,04$). Významné zlepšení bylo také zaznamenáno v podskupině hodnotící „symptomy a aktivity každodenního života“ KOOS. Míra vnímání bolesti vykazovala tendenci ke snížení, přičemž průměrná hodnota VAS se zlepšila z $34,3 \pm 28,6$ na $20,8 \pm 19,0$. Tato změna byla statisticky nevýznamná ($p = 0,31$). Na druhé straně se hodnotící podskupina KOOS „bolesti“ zlepšila z $59,7 \pm 20,3$ na $75,9 \pm 15,6$ bodu. Rozdíl 16,2 bodu byl rovněž statisticky nevýznamný ($p = 0,62$), nicméně stále výrazně převyšoval minimální detekovatelnou změnu této podskupiny hodnoceného skóre (6–13,4 body) (Collins et al. 2011).



Graf 1. Hodnoty dotazníkových šetření před operací, v 6. měsíci a 12. měsíci od operace. Lysholm-Tegner skóre (0-100% bodu), KOOS skóre (Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score) (0-100% bodu), s výsledky pro jednotlivé oddíly dotazníkového šetření KOOS – Bolest (pain), Symptomy (Other symptoms), Denní aktivity (Function in daily living (ADL)), Sport (Function in sport and recreation),

Kvalita života (Knee related Quality (QOL)). VAS (Bez bolesti = 0 mm, Maximum bolesti = 100 mm).

Stran hodnocené kvality fixace implantátu. Provedená MRI vyšetření prokázala dobrou fixaci a integraci implantátů do přilehlé tkáně 12 měsíců po operaci. Průměrná hodnota skóre MOCART byla 48 ± 15 bodů

Tab. 4. Hodnoty proměnných MOCART skóre (Magnetic Resonance Observation of Cartilage Repair Tissue) u jednotlivých pacientů 1 rok od implantace.

Pacient (klinické označení)	Objem výplně defektu (0-20)	Integrace do okolní tkáně (0-15)	Povrch nové tkáně (0-10)	Struktura nové tkáně (0-10)	Intenzita Signálu nové tkáně (0-15)	Kostěný defekt nebo přerůst (0-10)	Subchondrální změny (0-20)	Celkové skóre (bodů) (0-100)
OR2	20	15	5	0	10	10	10	70
OR3	20	10	5	0	10	5	0	50
OR4	0	5	0	0	10	0	0	15
OR5	15	5	5	0	10	5	10	50
OR6	15	10	0	0	10	5	15	55
OR7	20	15	0	0	10	5	10	60

Diskuze

5.1 Diskuze k experimentu

Vzhledem k neuspokojivým výsledkům dřev stimulujících technik se do popředí zájmu dostala buněčná terapie, jejíž základní biologické aspekty byly předmětem experimentální práce. Nevyřešenou otázkou zůstává, zda je nízká dostupnost progenitorových buněk výsledkem nedostatečné distribuce do místa defektu chrupavky, anebo zda je tento stav dán věkem pacienta a celkově nízkou proliferační aktivitou progenitorových buněk.

Kostní dřev v oblasti pánve a metafýzy velkých kostí (distálního femuru, proximální tibie) obsahuje mononukleární buňky, jejichž subpopulace disponuje všemi charakteristickými znaky MSCs podle kritérií Mezinárodní společnosti pro buněčnou a genovou terapii (International Society for Cell & Gene Therapy, ISCT) včetně adherence k plastu, specifické imunofenotypizace a potenciálu k diferenciaci v alespoň tři typy buněk (chondro-, adipo- a osteocyty) (Dominici et al. 2006b). V naší studii jsme analyzovali MSCs na úrovni 2. pasáže, kdy je již doba v kultivaci dostatečná pro odstranění nežádoucích buněčných příměsí a zároveň jsou MSCs v nejlepší kondici z hlediska proliferace a morfologie. Pro buněčnou terapii se nejčastěji používají buňky ve 3. - 4. pasáži především z důvodu terapeuticky relevantního počtu. Vyšší pasáže již nejsou doporučované z důvodu nižší schopnosti proliferace buněk, vyšší hodnoty PDt, horší morfologie buněk (větší velikost a tím menší celkový počet buněk) a v kultuře se mohou začít vyskytovat senescentní buňky (Kundrotas et al. 2016).

Kultivované buňky z obou testovaných zdrojů kostní dřev našich pacientů (z pánevní kosti a proximální tibie) vykazovaly podobné imunofenotypy ve smyslu exprese povrchových znaků CD90, CD105, CD73. Spolu s absencí specifických hematopoetických znaků (CD34 a CD45) a leukocytárních markerů jsme byli schopni s velkou pravděpodobností identifikovat získané buňky jako

MSCs (Dominici et al. 2006b). Nalezené povrchové znaky jsou membránové markery, které nalézáme také u endoteliálních buněk a dávají nám možnost uvažovat o aktivitě MSCs v procesu angiogeneze a regenerace tkáně s poruchou krevního zásobení (např. hojení pakloubu, avaskulární nekrózy) (Hernigou et al. 2005; Schmitt et al. 2012b)

Domníváme se, že získané poznatky nás opravňují uvažovat o jedinečné možnosti využití MSCs v terapii chondrálních defektů. Výskyt MSCs v populaci jaderných buněk kostní dřeně je velice nízký, udává se četnost kolem 1:10 000 až 1:100 000 buněk. Kostní dřeň pánevní kosti je nejbohatším zdrojem MNCs a tím také zdrojem MSCs po celou dobu života (Beitzel et al. 2013; McIntyre et al. 2018). V literatuře není příliš prací, které by se zabývaly výskytem MSCs v kostní dřeni v jiných anatomických lokalitách u člověka. McLain et al. (McLain et al. 2009) porovnal aspiráty kostní dřeně obratlových těl a pánevní kosti. Závěr jeho studie ukázal vyšší koncentraci MNCs ze vzorku z obratlového těla ($19,8 \times 10^6/\text{ml}$) v porovnání s ilickou kostí ($16,9 \times 10^6/\text{ml}$). Námi zjištěné průměrné koncentrace MNCs ze získaného aspirátu z ilické kosti a proximální tibie byly $24,8 \times 10^6/\text{ml}$ respektive $5,5 \times 10^6/\text{ml}$. Hodnoty koncentrace v našem souboru byly obecně nižší, než je uváděno v literatuře a je to dáno zřejmě vyšším věkem pacientů našeho souboru.

Došli jsme k podobnému závěru jako práce Narbona-Carcelesa et al. (Narbona-Carceles et al. 2014), který porovnal množství MNCs z aspirátu z ilické kosti, distálního femuru a proximální tibie u pacientů indikovaných k totální endoprotéze. Prokázal, že nejbohatším zdrojem je pánevní kosti bez ohledu na věk pacienta. Snižování množství a schopnosti proliferace MNCs se zvyšujícím se věkem člověka bylo pozorováno v několika dalších studiích (Cavallo et al. 2022; Zaim et al. 2012).

Cílem naší studie bylo analyzovat výtěžnost a kvalitu MSCs kultivovaných z kostní dřeně obou zdrojů u vzorku populace ČR, dle našich znalostí, nebyla tato data nikdy analyzována a publikována.

Oproti jiným publikacím jsme v našem souboru nenašli signifikantní rozdíl mezi množstvím získaných MNCs a jejich viabilitou, jak se někteří autoři domnívají (Wagner et al. 2010).

Z naší studie tedy vyplývá, že lze uvažovat o metafýze proximální tibie jako o alternativním zdroji kultivovaných MSCs. Jeho výhodou je jednoduchá přístupnost, anatomická bezpečnost odběru a možnost odběru během artroskopického výkonu. Je nutné ale dodat, že tento zdroj dává nižší počet MNCs pro zvažované "one-step" operační terapie (bone marrow aspiration and implatantion), kdy by byly implantovány nekultivované MNCs. I přes značné množství publikací stále neexistuje shoda ohledně množství MSCs potřebných k léčbě fokální chondrální léze. V čem se s výsledky publikovaných prací shodujeme je fakt, že je nutné MSCs kultivovat, abychom dosáhli dostatečného množství progenitorových buněk a tyto buňky implantovat v rámci další operace.

Tato studie má jistě své limity, mezi které patří nízký počet probandů (celkem 10 zkoumaných odběrů ze dvou zdrojů) a dále vyšší věk pacientů (průměr 55 let), což ale bylo dáno designem studie. Zároveň jsme nebyli schopni posoudit bolestivost odběru z tibie, míru možných komplikací samotného odběru kostní dřevě z proximální tibie vůči odběru z pánevní kosti (hematom, otok, dysestezie, septické komplikace atd.), jelikož skupinu tvoří pacienti s implantovanou totální endoprotézou kolenního kloubu. Pooperační stav nám hodnocení bolesti a ostatních kvalit v lokalitě kolena neumožnil.

5.2 Diskuze ke klinické práci

Metaanalýzy prokazují, že chirurgická léčba poškozené chrupavky obecně poskytuje dobré a výborné výsledky terapie. Stále však není možné přesně definovat, který chirurgický postup je lepší a vhodnější pro určitý typ defektu (velikost, umístění, stupeň poškození) a typ pacientů, vzhledem k věku, pohlaví a aktivitám (Zamborsky and Danisovic 2020; Maheshwer et al. 2021). Limity výzkumu jsou dány

možnostmi ověření výsledné regenerace tkáně (Liu et al. 2023). Každý proband v „in vivo“ studii představuje stran biomechaniky pohybu a biochemického mikroprostředí kloubu unikátní jednotku.

Naše data získaná z klinické studie ukazují, že intraartikulární aplikace BiCure[®] orthoMSCp nasazená na 3D nosič (Chondrotissue[®]) byla dobře tolerována. Žádná z AEs přímo nesouvisela s IMP. Mírný výpotek kolena krátce po operaci byl nejčastější AE u 83% pacientů a připisujeme ho stavu po operaci, který je pozorovatelný i v případě jiných nitrokloubních operačních zákroků (Słynarski et al. 2020). Imunopriviligence kloubní chrupavky je dána alymfatickou a avaskulární charakteristikou kloubní chrupavky (Revell and Athanasiou 2009). Samotný chirurgický zákrok vede k otevření synoviální tkáně a kloubního pouzdra, které mohou vést k aktivaci imunitního systému. Toto může být sníženo miniinvazivním přístupem operačního zákroku (Hashimoto et al. 2019a).

Primární i sekundární stabilita implantátu navrženou technikou je funkční. Defekt byl účinně vyplněn u všech léčených pacientů, i když povrch novotvořené tkáně byl nižší než okolní zdravá chrupavka. To lze vysvětlit relativně krátkým časovým obdobím od implantace a zamyšlením nad možností modifikace implantace vrstvením matrix s aplikovanými buňkami v místě defektu. Při srovnání skóre MOCART na základě MRI s daty z jiných prospektivních studií s podobným typem chirurgické léčby a časovým intervalem po implantaci nosiče (Dhollander et al. 2012; Steinwachs et al. 2019), jsme pozorovali podobné hodnoty skóre, které prokazují dobrou fixaci a integraci do okolní tkáně. MRI provedená 12 měsíců po operaci odhalila přetrvávající subchondrální edém v místě návrtů, podobně ve shodě s předchozími studiiemi po dřev stimulujícím operačním zákroku (Dhollander et al. 2012).

Hodnocení účinnosti terapie v našem sledovaném souboru má své limitace zejména kvůli nízkému počtu pacientů zařazených do studie. Pozorovali jsme však statisticky

významné zlepšení Lysholmova skóre a KOOS. Přes jasnou tendenci ke zmírnění bolesti kolena nebyly výsledky v tomto hodnotícím parametru statisticky významné. Tyto výsledky jsou v souladu s nedávno publikovaným přehledem, metaanalýzou, hodnotící aplikaci MSCs v léčbě poškození chrupavky kolenního kloubu (Maheshwer et al. 2021).

Ve světě publikované studie jednoznačně prokázaly, že aplikace kmenových buněk v terapii fokálních chondrálních defektů je bezpečná a efektivní (S. Wakitani et al. 2002; Nejadnik et al. 2010; Gobbi et al. 2011; Hashimoto et al. 2019b). Dle recentních publikovaných dat má použití kultivovaných BM-MSCs ve srovnání s implantací autologními chondrocyty (ACI) podobné nebo i lepší výsledky (Migliorini et al. 2022). Jiná randomizovaná klinická studie s použitím matrix indukovaných BM-MSCs a ACI prokázala po 2letém sledování významně lepší funkční výsledky ve skupině BM-MSCs v hodnocení KOOS, VAS a Lysholmova skóre (Akgun et al. 2015). V literatuře jsou zatím ojedinělé publikace, které by hodnotily dlouhodobé výsledky léčby pomocí kultivovaných MSCs (Shigeyuki Wakitani et al. 2011; Teo et al. 2019). Teo et al. (Teo et al. 2019) popsal srovnání dvou kohort, každou z 36 pacienty léčených BM-MSCs (podanými v rámci periostálního krytí aplikovaných buněk) nebo p-ACI a jejich sledování po dobu 10 let. Oba přístupy se ukázaly být stejně účinné.

Bezpečnost implantovaných kultivovaných MSCs je stále skloňovaným problémem, zejména kvůli jejich předpokládanému tumorigennímu potenciálu po dlouhodobé kultivaci (Røslund et al. 2009). Avšak většina léčivých přípravků na bázi MSCs používá k terapii buňky po dvou až čtyřech pasážích. Tím tento argument ztrácí na podstatě. Několik studií s dlouhodobým sledováním prokázalo bezpečnost aplikace kultivovaných MSCs, včetně faktu, že dosud nebyl v žádném sledovaném souboru zaznamenán výskyt rakoviny související s tímto typem léčby (Teo et al. 2019; Shigeyuki Wakitani et al. 2011).

Jednou z výhod BM-MSCs ve srovnání s ACI je také parakrinní aktivita buněk. Uvádí se, že sekretom MSCs přispívá k reparaci chrupavky a vytváří mikroprostředí kolem místa poškození, které podporuje nábor endogenních progenitorových buněk (Fahy, Alini, and Stoddart 2018). Dalším přínosem MSCs terapie oproti ACI je možnost účinné kultivace MSCs získaných i od starších pacientů nad 45-50 let věku (Martin and Buckwalter 2003). Tento aspekt je z mého pohledu rozhodující výhodou pro pacienty indikované k buněčné regenerační terapii. Izolace a kultivace MSCs z kostní dřeně je technicky jednodušší než zpracování autologních chondrocytů, které je také spojeno se zvýšenou morbiditou dárcovského místa a nižší proliferační aktivitou chondrocytů u pacientů ve vyšším věku (Dozin et al. 2005; Lohmander et al. 2007).

6 Závěr

Závěrem je třeba konstatovat, že se podařilo splnit všechny vytyčené cíle disertační práce. Experimentálně jsme porovnali dva anatomicky dobře dostupné zdroje aspirátu kostní dřeně s ohledem na jejich využití při terapii fokálního chrupavčitého defektu kolenního kloubu. Prokázali jsme, že odběrem aspirátu kostní dřeně z obou zdrojů lze získat dostatečné množství monocytárních buněk kostní dřeně ke kultivaci MSCs. Zkoumané buněčné zdroje (aspirát kostní dřeně z pánevní kosti a proximální tibie) se liší v kvantitativních parametrech získaných MNCs i MSCs. Neprokázali jsme statisticky významný rozdíl v kvalitativních parametrech kultivovaných MSCs z obou zdrojů.

Výsledky experimentu jsme použili jako podklad k vytvoření metodiky klinické práce, prospektivní monocentrické studie. Byla provedena aplikace produktu moderní buněčné terapie – kultivovaných kmenových buněk z kostní dřeně pánevní kosti, pod označením BiCure®orthoMSCp, u 6 pacientů s fokálním chrupavčítým defektem kolenního kloubu. Výsledky hodnocených dat u sledovaných pacientů jednoznačně ukazují, že implantace léčebného prostředku, BiCure®orthoMSCp, aplikovaného na komerčně dostupný nosič (Chondrotissue®) je bezpečná. Operační zákrok je proveditelný a opakovatelný, bez zaznamenaných komplikací. Kvalita primární i sekundární fixace buněčného implantátu (BiCure®orthoMSCp a Chondrotissue®) pomocí komerčně dostupného tkáňového lepidla je velmi dobrá s prokazatelnou integrací do okolní tkáně po 1 roce od operace pomocí MRI. Druhotným cílem bylo zhodnotit klinický výsledek terapie pomocí dotazníkového šetření. Práce prokázala zlepšení klinického stavu pacientů, zlepšení funkce operovaného kloubu se snížením bolesti 1 rok od operace.

7 Souhrn

Disertační práce ve své experimentální i klinické části prokazatelně potvrzuje bezpečnost odběru a manipulace získaných mesenchymálních buněk z aspirátu kostní dřeně s cílem přípravy a aplikace prostředku moderní buněčné terapie v léčbě fokálního chrupavčitého defektu kolenního kloubu.

Získané výsledky experimentální studie opravňují k tvrzení, že výhodnějším zdrojem MNCs respektive kultivovaných MSCs je aspirát kostní dřeně z pánevní kosti. V případě využití alternativních zdrojů je odběr a následná kultivace MSCs možná i z aspirátu kostní dřeně z proximální části tibie, bez signifikantní změny kvalitativních vlastností výsledného buněčného transplantátu.

Vzhledem k získaným závěrům a zkušenostem z experimentální části jsme sestavili klinickou monocentrickou studii, která primárně prokázala bezpečnost aplikovaného nového léčebného prostředku moderní buněčné terapie, pod označením BiCure[®]orthoMSCp, v kombinaci s jeho aplikací na komerčně dostupný 3D nosič Chondrotissue[®]. Sekundárně jsme prokázali velmi dobrý klinický efekt operace u 6 dobrovolných pacientů s fokálním chrupavčítým defektem kolenního kloubu, zhodnocený dotazníkovým šetřením 1 rok od operace. Klinická práce prokázala velmi dobrou primární i sekundární stabilitu implantátu, zhodnocenou 1 rok od operace pomocí MRI. Dále jsme prokázali reprodukovatelnost operačního výkonu, včetně bezpečné manipulace s léčivým přípravkem moderní buněčné terapie na operačním sále. Práce podporuje další výzkum v oblasti moderní buněčné terapie se zaměřením na implantaci kultivovaných kmenových buněk z kostní dřeně v léčbě ohraničeného chrupavčitého defektu kolenního kloubu.

Summary

The experimental and clinical part of the dissertation proves the safety of collection and manipulation of mesenchymal cells obtained from bone marrow aspirate (BM-MSCs) with the aim of preparing and applying an advanced cell therapy medicinal product in the treatment of focal cartilage defects of the knee joint.

The results of the experimental study justify the claim that bone marrow aspirate from the pelvic bone is a more convenient source for obtaining mononuclear cells (MNCs) or MSCs cultivation. In the case of using alternative sources, the collection and subsequent cultivation of MSCs is also possible from bone marrow aspirate from the proximal part of the tibia, without significantly changing the qualitative properties of the resulting cell transplant.

The clinical monocentric study was designed, which primarily evaluated the safety and secondary objective of the study was to evaluate the clinical effect of implantation of a novel advanced cell therapy medicinal product, BiCure[®] orthoMSCp, applied in combination with a commercially available Chondrotissue[®] scaffold.

The clinical study in 6 patients demonstrated the safety and very good primary and secondary implant stability. The clinical study further demonstrated the reproducibility of both the surgical procedure and the handling of the advanced cell therapy medicinal product in the operating room. The data demonstrated an improvement in the function of the knee joint 1 year after the operation and painreduction in all monitored patients.

This work supports further research in the field of advanced cell therapy with a focus on the implantation of cultured BM-MSCs in the treatment of focal cartilage defects of the knee joint.

8 Literatura

- Akgun, Isik, Mehmet C. Unlu, Ozan A. Erdal, Tahir Ogut, Murat Erturk, Ercument Ovali, Fatih Kantarci, Gurkan Caliskan, and Yamac Akgun. 2015. "Matrix-Induced Autologous Mesenchymal Stem Cell Implantation versus Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation in the Treatment of Chondral Defects of the Knee: A 2-Year Randomized Study." *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 135 (2): 251–63. <https://doi.org/10.1007/S00402-014-2136-Z>.
- Beitzel, Knut, Mary Beth R. McCarthy, Mark P. Cote, Thomas J.S. Durant, David M. Chowaniec, Olga Solovyova, Ryan P. Russell, Robert A. Arciero, and Augustus D. Mazzocca. 2013. "Comparison of Mesenchymal Stem Cells (Osteoprogenitors) Harvested from Proximal Humerus and Distal Femur during Arthroscopic Surgery." *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery: Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 29 (2): 301–8. <https://doi.org/10.1016/J.ARTHRO.2012.08.021>.
- Caplan, Arnold I., and Diego Correa. 2011. "The MSC: An Injury Drugstore." *Cell Stem Cell* 9 (1): 11–15. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2011.06.008>.
- Cavallo, Carola, Angelo Boffa, Laura de Girolamo, Giulia Merli, Elizaveta Kon, Luca Cattini, Emma Santo, Brunella Grigolo, and Giuseppe Filardo. 2022. "Bone Marrow Aspirate Concentrate Quality Is Affected by Age and Harvest Site." *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy: Official Journal of the ESSKA*, September. <https://doi.org/10.1007/s00167-022-07153-6>.
- Collins, Natalie J., Devyani Misra, David T. Felson, Kay M. Crossley, and Ewa M. Roos. 2011. "Measures of Knee Function: International Knee Documentation Committee (IKDC) Subjective Knee Evaluation Form, Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS), Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score Physical Function Short Form (KOOS-PS), Knee Ou." *Arthritis Care and Research* 63 (SUPPL. 11). <https://doi.org/10.1002/acr.20632>.
- Dhollander, Aad A.M., Peter C.M. Verdonk, Stijn Lambrecht, René Verdonk, Dirk Elewaut, Gust Verbruggen, and Karl Fredrik Almqvist. 2012. "Midterm Results of the Treatment of Cartilage Defects in the Knee Using Alginate Beads Containing Human Mature Allogenic Chondrocytes." *American Journal of Sports Medicine* 40 (1): 75–82. <https://doi.org/10.1177/0363546511423013>.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C C. Marini, D.S. S. Krause, R.J. J. Deans, A. Keating, D.J. J. Prockop, and E.M. M. Horwitz. 2006a. "Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement." *Cytotherapy* 8

- (4): 315–17. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C Marini, D.S. Krause, R.J. Deans, A. Keating, D.J. Prockop, and E.M. Horwitz. 2006b. “Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement.” *Cytotherapy* 8 (4): 315–17. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
- Dozin, Beatrice, Mara Malpeli, Ranieri Cancedda, Paolo Bruzzi, Silvano Calcagno, Luigi Molfetta, Ferdinando Priano, Elisaveta Kon, and Maurilio Marcacci. 2005. “Comparative Evaluation of Autologous Chondrocyte Implantation and Mosaicplasty: A Multicentered Randomized Clinical Trial.” *Clinical Journal of Sport Medicine : Official Journal of the Canadian Academy of Sport Medicine* 15 (4): 220–26. <https://doi.org/10.1097/01.JSM.0000171882.66432.80>.
- Fahy, Niamh, Mauro Alini, and Martin J. Stoddart. 2018. “Mechanical Stimulation of Mesenchymal Stem Cells: Implications for Cartilage Tissue Engineering.” *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 36 (1): 52–63. <https://doi.org/10.1002/JOR.23670>.
- Gobbi, Alberto, Georgios Karnatzikos, Celeste Scotti, Vivek Mahajan, Laura Mazzucco, and Brunella Grigolo. 2011. “One-Step Cartilage Repair with Bone Marrow Aspirate Concentrated Cells and Collagen Matrix in Full-Thickness Knee Cartilage Lesions: Results at 2-Year Follow-Up.” *Cartilage* 2 (3): 286–99. <https://doi.org/10.1177/1947603510392023>.
- Hashimoto, Yusuke, Yohei Nishida, Shinji Takahashi, Hiroaki Nakamura, Hisashi Mera, Kaori Kashiwa, Shinichi Yoshiya, et al. 2019a. “Transplantation of Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells under Arthroscopic Surgery with Microfracture versus Microfracture Alone for Articular Cartilage Lesions in the Knee: A Multicenter Prospective Randomized Control Clinical Trial.” *Regenerative Therapy* 11 (December): 106–13. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.06.002>.
- . 2019b. “Transplantation of Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells under Arthroscopic Surgery with Microfracture versus Microfracture Alone for Articular Cartilage Lesions in the Knee: A Multicenter Prospective Randomized Control Clinical Trial.” *Regenerative Therapy* 11 (December): 106–13. <https://doi.org/10.1016/J.RETH.2019.06.002>.
- Hernigou, Philippe, A. Poignard, O. Manicom, G. Mathieu, and H. Rourd. 2005. “The Use of Percutaneous Autologous Bone Marrow Transplantation in Nonunion and Avascular Necrosis of Bone.” *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 87 (7): 896–902. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.87B7.16289>.
- Horas, U., D. Pelinkovic, G. Herr, T. Aigner, and R. Schnettler. 2003. “Autologous Chondrocyte Implantation and Osteochondral Cylinder Transplantation in Cartilage Repair of the Knee Joint. A Prospective, Comparative Trial.” *The*

- Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 85 (2): 185–92. <https://doi.org/10.2106/00004623-200302000-00001>.
- Knutsen, Gunnar, Jon Olav Drogset, Lars Engebretsen, Torbjørn Grøntvedt, Vidar Isaksen, Tom C. Ludvigsen, Sally Roberts, Eirik Solheim, Torbjørn Strand, and Oddmund Johansen. 2007. “A Randomized Trial Comparing Autologous Chondrocyte Implantation with Microfracture. Findings at Five Years.” *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 89 (10): 2105–12. <https://doi.org/10.2106/JBJS.G.00003>.
- Kundrotas, Gabrielis, Evelina Gasperskaja, Grazina Slapsyte, Zivile Gudleviciene, Jan Krasko, Ausra Stumbryte, and Regina Liudkeviciene. 2016. “Identity, Proliferation Capacity, Genomic Stability and Novel Senescence Markers of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Low Volume of Human Bone Marrow.” *Oncotarget* 7 (10): 10788–802. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.7456>.
- Liu, Yufeng, Ning Ma, Zhe Zhao, and Quanyi Guo. 2023. “Mid- to Long-Term Clinical Outcomes of Cartilage Restoration of Knee Joint with Allogenic Next-Generation Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation (MACI).” *Orthopaedic Surgery* 15 (2): 549–62. <https://doi.org/10.1111/OS.13662>.
- Lohmander, L. Stefan, P. Martin Englund, Ludvig L. Dahl, and Ewa M. Roos. 2007. “The Long-Term Consequence of Anterior Cruciate Ligament and Meniscus Injuries: Osteoarthritis.” *The American Journal of Sports Medicine* 35 (10): 1756–69. <https://doi.org/10.1177/0363546507307396>.
- Maheshwer, Bhargavi, Evan M. Polce, Katlynn Paul, Brady T. Williams, Theodore S. Wolfson, Adam Yanke, Nikhil N. Verma, Brian J. Cole, and Jorge Chahla. 2021. “Regenerative Potential of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Knee Osteoarthritis and Chondral Defects: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*. W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2020.05.037>.
- Martin, James A., and Joseph A. Buckwalter. 2003. “The Role of Chondrocyte Senescence in the Pathogenesis of Osteoarthritis and in Limiting Cartilage Repair.” *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 85-A Suppl 2 (SUPPL. 1): 106–10. <https://doi.org/10.2106/00004623-200300002-00014>.
- McIntyre, James A., Ian A. Jones, Bo Han, and C. Thomas Vangsness. 2018. “Intra-Articular Mesenchymal Stem Cell Therapy for the Human Joint: A Systematic Review.” *The American Journal of Sports Medicine* 46 (14): 3550–63. <https://doi.org/10.1177/0363546517735844>.
- McLain, Robert F., Cynthia A. Boehm, Candace Rufo-Smith, and George F. Muschler. 2009. “Transpedicular Aspiration of Osteoprogenitor Cells from the Vertebral Body: Progenitor Cell Concentrations Affected by Serial Aspiration.” *The Spine Journal : Official Journal of the North American Spine Society* 9 (12): 995–1002. <https://doi.org/10.1016/J.SPINEE.2009.08.455>.

- Migliorini, Filippo, Nicola Maffulli, Jörg Eschweiler, Christian Götze, Frank Hildebrand, and Marcel Betsch. 2022. “Prognostic Factors for the Management of Chondral Defects of the Knee and Ankle Joint: A Systematic Review.” *European Journal of Trauma and Emergency Surgery: Official Publication of the European Trauma Society*, November. <https://doi.org/10.1007/s00068-022-02155-y>.
- Narbona-Carceles, Javier, Javier Vaquero, Susana B.S. Suárez-Sancho, Francisco Forriol, and Maria Eugenia Fernández-Santos. 2014. “Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Aspirates from Alternative Sources: Is the Knee as Good as the Iliac Crest?” *Injury* 45 Suppl 4 (S4): S42–47. [https://doi.org/10.1016/S0020-1383\(14\)70009-9](https://doi.org/10.1016/S0020-1383(14)70009-9).
- Nejadnik, Hossein, James H. Hui, Erica Pei Feng Choong, Bee Choo Tai, and Eng Hin Lee. 2010. “Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells versus Autologous Chondrocyte Implantation: An Observational Cohort Study.” *The American Journal of Sports Medicine* 38 (6): 1110–16. <https://doi.org/10.1177/0363546509359067>.
- Outerbridge, and R. E. 1961. “The Etiology of Chondromalacia Patellae.” *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 43-B (November): 752–57. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.43b4.752>.
- Revell, Christopher M., and Kyriacos A. Athanasiou. 2009. “Success Rates and Immunologic Responses of Autogenic, Allogenic, and Xenogenic Treatments to Repair Articular Cartilage Defects.” *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 15 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEB.2008.0189>.
- Røslund, Gro Vatne, Agnete Svendsen, Anja Torsvik, Ewa Sobala, Emmet McCormack, Heike Immervoll, Josef Mysliwietz, et al. 2009. “Long-Term Cultures of Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Frequently Undergo Spontaneous Malignant Transformation.” *Cancer Research* 69 (13): 5331–39. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4630>.
- Schmitt, Andreas, Martijn Van Griensven, Andreas B. Imhoff, and Stefan Buchmann. 2012a. “Application of Stem Cells in Orthopedics.” *Stem Cells International* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/394962>.
- . 2012b. “Application of Stem Cells in Orthopedics.” *Stem Cells International* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/394962>.
- Stynarski, Konrad, Willem Cornelis de Jong, Martyn Snow, Jeanine Anna Alphonse Hendriks, Clayton Ellis Wilson, and Peter Verdonk. 2020. “Single-Stage Autologous Chondrocyte-Based Treatment for the Repair of Knee Cartilage Lesions: Two-Year Follow-up of a Prospective Single-Arm Multicenter Study.” *American Journal of Sports Medicine* 48 (6): 1327–37. <https://doi.org/10.1177/0363546520912444>.
- Steinwachs, Matthias R., Justus Gille, Martin Volz, Sven Anders, Roland Jakob, Laura De Giromlamo, Piero Volpi, et al. 2019. “Systematic Review and Meta-

- Analysis of the Clinical Evidence on the Use of Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis in the Knee.” *Cartilage*.
<https://doi.org/10.1177/1947603519870846>.
- Tegner, Y, and J Lysholm. 1985. “Rating Systems in the Evaluation of Knee Ligament Injuries - PubMed.” *Clin Orthop Relat Res*. 1985.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4028566/>.
- Teo, Alex Quok An, Keng Lin Wong, Liang Shen, Jia Ying Lim, Wei Seong Toh, Eng Hin Lee, and James Hoi Po Hui. 2019. “Equivalent 10-Year Outcomes After Implantation of Autologous Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells Versus Autologous Chondrocyte Implantation for Chondral Defects of the Knee.” *American Journal of Sports Medicine* 47 (12): 2881–87.
<https://doi.org/10.1177/0363546519867933>.
- Wagner, Wolfgang, Simone Bork, Günther Lepperdinger, Sylvia Jousen, Nan Ma, Dirk Strunk, and Carmen Koch. 2010. “How to Track Cellular Aging of Mesenchymal Stromal Cells?” *Aging* 2 (4): 224–30.
<https://doi.org/10.18632/AGING.100136>.
- Wakitani, S., K. Imoto, T. Yamamoto, M. Saito, N. Murata, and M. Yoneda. 2002. “Human Autologous Culture Expanded Bone Marrow-Mesenchymal Cell Transplantation for Repair of Cartilage Defects in Osteoarthritic Knees.” *Osteoarthritis and Cartilage* 10 (3): 199–206.
<https://doi.org/10.1053/joca.2001.0504>.
- Wakitani, Shigeyuki, Takahiro Okabe, Shuji Horibe, Tomoki Mitsuoka, Masanobu Saito, Tsuyoshi Koyama, Masashi Nawata, et al. 2011. “Safety of Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation for Cartilage Repair in 41 Patients with 45 Joints Followed for up to 11 Years and 5 Months.” *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 5 (2): 146–50.
<https://doi.org/10.1002/TERM.299>.
- Zaim, Merve, Serap Karaman, Guven Cetin, and Sevim Isik. 2012. “Donor Age and Long-Term Culture Affect Differentiation and Proliferation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells.” *Annals of Hematology* 91 (8): 1175–86.
<https://doi.org/10.1007/S00277-012-1438-X>.
- Zamborsky, Radoslav, and Lubos Danisovic. 2020. “Surgical Techniques for Knee Cartilage Repair: An Updated Large-Scale Systematic Review and Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.” *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 36 (3): 845–58.
<https://doi.org/10.1016/j.arthro.2019.11.096>.

Přehled publikační činnosti autora

1) Původní vědecké práce in extenso, které jsou podkladem disertace

a) s impakt faktorem

Neckář P., Havlas V., Lylková D., Braniš J., Kvízová J., Bauer P. O.: Porovnání stromálních buněk kostní dřeně z různých anatomických lokací z hlediska jejich klinického využití, Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca. 87, 2020, No.3, p. 183-190. **(IF 0,531)**

Neckar P, Potockova H, Branis J, Havlas V, Novotny T, Lykova D, Gujski J, Drahoradova I, Ruzickova K, Kaclova J, Skala P, Bauer PO. Treatment of knee cartilage by cultured stem cells and three dimensional scaffold: a phase I/IIa clinical trial. International Orthopedics. 2022 Jul 19. doi: 10.1007/s00264-022-05505-y. Epub ahead of print. PMID: 35854056, **(IF 3,479)**

b) bez impakt faktoru

Neckář P., Syková E., Kmenové buňky v ortopedii, Čas. Lék. čes. 2015; 154: 107-109

2) Původní vědecké práce in extenso bez vztahu k tématu disertace

a) bez impakt faktoru

Neckář P., „The athletic foot“, Ploska nohy, vyšetření a terapie v praxi tělovýchovného lékaře, Med Sport Boh Slov, 2020, 29(1): 18-20

Neckář P, Kadřmasová Z, Klementová R, Short-Term Analgesic Effects of Focused Shockwave Therapy in Common Orthopedic Diagnoses, International journal of clinical studies and medical case reports, 2021; 11: 1-7, DOI: 10.46998/IJCMCR.2021.11.000271

3) Vybrané přednášky a plakátová sdělení na odborných setkáních

a) Přednášky, první autor a přednášející

- Konference České společnosti tělovýchovného lékařství, Valtice, 2015. Přednáška: Moderní operační metody při poranění chrupavky
- Krajský traumatologický seminář a odborná konference všeobecných sester, Ústí nad Labem, 2016. Přednáška: Implantace autologních chondrocytů
- XIX. Tradiční, každoroční, teplické, ortopedické symposium, Teplice, 2016, Přednáška: Operační terapie poraněné chrupavky v oblasti hlezna
- Kongres artroskopie v traumatologii, sportovní medicíně a ortopedii, Ústí nad Labem, 2018. Přednáška: Poranění chrupavky, možnosti terapie vs. skutečnost
- X. Národní kongres Společnosti pro sportovní Traumatologii a artroskopii ČLS JEP, Plzeň, 2018. Přednáška: Konzervativní nebo operační léčba chondrální léze u sportovce
- XIII Národní kongres ČSOT, Praha, 2019. Přednáška: Léčba chondrálního defektu kolenního kloubu: AMIC + MSCs z kostní dřeně: zahájení studie
- IV. Konference Centrálních operačních sálů a sterilizace, Ústí nad Labem, 2019. Přednáška: Buněčná terapie defektu chrupavky

- 15th World Congress of International cartilage regeneration and joint preservation society - ICRS, Vancouver, Canada, 2019. Přednáška: Evaluation of bone marrow MSCs from different sources for the treatment of chondral lesions of knee in over 40-years old patients
- XXIV. Národní kongres ČSOT, Brno, 2020. Přednáška: Aplikace kmenových buněk z kostní dřeně v léčbě fokálního defektu chrupavky kolenního kloubu – průběžné výsledky
- Konference tělovýchovného lékařství 2021, České Budějovice. Využití ultrasonografie v diagnostice „bone stress injuries“, ID: 103618, 17 kreditů
- 31.3.2022 XI. Spring Orthopaedic Symposium, Praha, 2021. Přednáška: Využití UZ v diagnostice a terapii JOCD, Přednáška: Aplikace kultivovaných MSCs z kostní dřeně na 3D nosič v terapii chondrálního defektu kolena
- VI. Děčínské chirurgické dny, Děčín, 2022. Přednáška: Luxace česky, léčba a operační postupy
- Konference centrálních operačních sálů, Krajské zdravotní a.s., Ústí nad Labem, 2022. Přednáška: Operační léčba osteoartrózy, jak zůstat aktivní po celý život
- II. Konference Centra plánované chirurgie ruky a nohy, Chomutov, 2023. Přednáška: Chondrální a osteochondrální defekt hlezenného kloubu – možnosti léčby

b) Plakátová sdělení

- The 15th World Congress of International cartilage regeneration and joint preservation society - ICRS, Vancouver, Canada, 2019. E-poster, **Neckář P.**, Havlas V., Bauer P.O. Evaluation of bone marrow MSCs from different sources for the treatment of chondral lesions of knee in over 40-years old patients
- The 36th SICOT Orthopedic world congress, Guangzhou, Čína, 2021. E-poster No. 39945, **Neckář P.**, Havlas V., Arthroscopic procedure by the elderly sportsmen- does it help?
- Vědecká konference 2. Lékařské fakulty UK, Praha, 2017. Poster: **Neckář P.**, Havlas V., Využití multipotentních buněk kostní dřeně v moderní léčbě poranění chrupavky,
- Vědecká konference 2. LF University Karlovy, Praha, 2020. Poster: **Neckář P.**, Havlas V., Buňky, které nestárnou, máme na dosah,

4) Odborné stáže a jiné vědecké aktivity

a) Granty

- Grant Krajské zdravotní a.s. IGA-KZ-2018-1-5, pro období 2018-2020. Název: Využití multipotentních kmenových buněk kostní dřeně v moderní léčbě poranění chrupavky

a) Klinické studie

- Klinická sledování v rámci specifického léčebného programu NTC chondrograft® - Implantace neregistrovaného léčivého přípravku pro moderní terapie - 2 leté sledování. Identifikace programu: MNUL-SpLP-2015-NTC chondrograft®.
- Klinická studie, hlavní zkoušející, Bioinova s.r.o.: EudraCT No.: 2018-004067-31, Autologous none marrow-derived mesenchymal stem cells seeded on 3D scaffold in treatment of knee cartilage defects. Prospective open-label study to assess safety and feasibility.
- Multicentrická klinická studie, hlavní zkoušející, Bioinova s.r.o., EUDRA CT No. 2017-004143-21, Účinnost autologních mezenchymálních kmenových buněk z kostní dřeně na 3D nosiči v léčbě poškození kolenní chrupavky. Randomizovaná, kontrolovaná, otevřená, multicentrická studie

a) Výuka – lektorská činnost

- Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta zdravotních studií, obor: Tělovýchovné lékařství, prezenční a kombinované studium
- Institut postgraduálního vzdělávání, IPVZ, Obor: Tělovýchovné lékařství, Základní kurz ve sportovní medicíně

