

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



**Nosiče kostní tkáně s mezenchymálními kmenovými buňkami  
Hojení kostních defektů**

**Tomáš Kučera**

**Autoreferát dizertační práce  
Doktorský studijní program chirurgie**

**Hradec Králové**

**2011**

Dizertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu chirurgie na Katedře chirurgie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: MUDr. Tomáš Kučera, Ortopedická klinika Fakultní nemocnice a Univerzity Karlovy Hradec Králové

Školitel: doc. MUDr. Karel Urban, CSc., Ortopedická klinika Fakultní nemocnice a Univerzity Karlovy Hradec Králové

Oponenti: doc. MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.  
Ortopedická klinika LF UP a FN v Olomouci

doc. MUDr. Martin Repko, Ph.D.  
Ortopedická klinika LF MU a FN Brno

Obhajoba dizertační práce 16. února 2012 od 12:00 hodin, Bedrnův pavilon, budova č. 21, 1. patro, konferenční místnost č. 1, areál Fakultní nemocnice Hradec Králové.

S dizertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

doc. MUDr. RNDr. Milan Kaška, Ph.D.

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací  
v doktorském studijním programu chirurgie

# OBSAH

|    |   |    |
|----|---|----|
| 1. | Souhrn.....                             | 3  |
| 2. | Summary.....                            | 4  |
| 3. | Úvod do problematiky.....               | 5  |
| 4. | Cíle dizertační práce.....              | 6  |
| 5. | Experimentální studie.....              | 7  |
|    | a. Materiál a metodika.....             | 7  |
|    | b. Výsledky.....                        | 8  |
|    | c. Diskuze.....                         | 8  |
|    | d. Závěry.....                          | 10 |
| 6. | Klinická studie.....                    | 12 |
|    | a. Materiál a metodika.....             | 12 |
|    | b. Výsledky.....                        | 13 |
|    | c. Diskuze.....                         | 14 |
|    | d. Závěry.....                          | 17 |
| 7. | Použitá literatura.....                 | 19 |
| 8. | Přehled publikační činnosti autora..... | 26 |

# 1. SOUHRN

Dizertační práce se zabývá některými otázkami souvisejícími s problematikou kostní regenerace. Je rozdělena na část experimentální a klinickou. V experimentální studii je stanovován počet, viabilita a proliferační schopnost mezenchymálních kmenových buněk získaných z kostní dřene proximálního femuru od 24 pacientek s koxartrózou, kterým byla implantována totální endoprotéza kyčelního kloubu. Zároveň je zjišťován výskyt osteopenie/osteoporózy v koincidenci s koxartrózou a jejich vliv na vlastnosti mezenchymálních kmenových buněk. Výsledkem je nález významné prevalence nižší kostní denzity a její koincidence s koxartrózou, dále při shodné viabilitě mezenchymálních kmenových buněk je u kosti s nižší denzitou menší počet a nižší proliferační schopnost těchto buněk. V druhé fázi byla sledována aktivita mezenchymálních kmenových buněk na vybraných nosičích. Tyto buňky byly obsaženy buď v aspirátu kompletní kostní dřene nebo v monocytárním koncentrátu. Z nosičů jsme testovali spongiózní aloštep, demineralizovanou kostní matrix, porézní  $\beta$ -trikalciumfosfát, lisovaný hydroxyapatit a kalciumsulfát. Hodnotili jsme tvorbu kolagenních vláken a mineralizované extracelulární matrix. Použili jsme expanzní médium a osteogenní diferenciační médium. Zároveň jsme srovnávali aktivitu mezenchymálních kmenových buněk při aplikaci kompletní kostní dřene a monocytárního koncentrátu. Nejvýraznější tvorba kolagenu a extracelulární mineralizované matrix byla již v expanzním médiu na aloštetu, méně na demineralizované kostní matrix. U umělých náhrad v expanzním médiu nebyla tato tvorba patrná, museli jsme použít osteogenní diferenciační médium a nejlepší výsledky byly zaznamenány u porézního  $\beta$ -trikalciumfosfátu. Dále bylo lepších výsledků dosaženo při aplikaci kompletní kostní dřene než u monocytárního koncentrátu.

V klinické části jsme hodnotili hojení 87 kostních defektů u nádorům podobných afekcí a benigních tumorů s průměrným objemem  $15 \text{ cm}^3$ . 28 defektů bylo vyplněno autologními kostními štěpy, 44 porézním  $\beta$ -trikalciumfosfátem (Poresorb-TCP®) a 15 kombinací obou materiálů v poměru 1:2 ve prospěch  $\beta$ -trikalciumfosfátu. V průběhu pooperačních kontrol jsme na rentgenových snímcích hodnotili resorpci výplně a trabekulaci defektu. U všech třech výplní jsme zaznamenali rychlejší fázi resorpce, resp. trabekulace do 12. měsíce od operace, následovanou pomalejší fází. U autologních kostních štěpů byla resorpce jen nepatrná a trabekulace přesahovala 70 % v 12 měsících od operace, navíc jsme zjistili jen minimální komplikace při odběru štěpů z lopaty kosti kyčelní. Poresorb-TCP® byl velmi dobře tolerován bez nežádoucích reakcí, také v případě úniku do měkkých tkání byl bez komplikací plně resorbován. Nicméně resorpce výplně a trabekulace materiálu byla relativně pomalá. Srovnatelné výsledky byly zaznamenány i u kombinace obou materiálů, pouze v prvních šesti měsících byla oproti samotnému Poresorb-TCP® rychlejší jak resorpce, tak trabekulace. Umělé náhrady kostních štěpů tak zatím nedosahují kvalit autologní kostní tkáně. Při stanovení kritéria úspěšného hojení - 80% trabekulace defektu 12 měsíců od operace byl nalezen hraniční objem defektu  $4 \text{ cm}^3$ , do kterého byl výsledek trabekulace obdobný jak při výplni autologními kostními štěpy, tak Poresorbem-TCP®. Nebyla zjištěna statisticky významná závislost hojení defektů na věku, ani na poloze defektu v kosti s převahou spongiózní, kortikospongiózní nebo kortikální. Avšak v klinickém sledování hojení defektů v diafýzách trvalo déle. Bylo zjištěno zpomalení trabekulace defektu při současně provedené osteosyntéze a zrychlení při progredující povolované zátěži končetiny.

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  $4 \text{ cm}^3$  objemu.

## 2. BONE CARRIERS WITH MESENCHYMAL STEM CELLS SUMMARY

This thesis deals with certain issues relating to bone regeneration. It is divided into experimental and clinical parts. In the experimental part, the number, viability, and proliferative ability of mesenchymal stem cells obtained from the bone marrow of proximal femur of 24 female patients with hip osteoarthritis, who had already undergone a total hip arthroplasty implantation, are determined. At the same time, the incidence of osteopenia / osteoporosis in coincidence with hip osteoarthritis and their influence on the properties of mesenchymal stem cells are ascertained. The final outcome is a significant prevalence of low bone density and its coincidence with hip osteoarthritis, and moreover, when identical viability of mesenchymal stem cells, in bones with lower density, there is a smaller number and reduced proliferative capacity of such cells. In the second phase, the activity of mesenchymal stem cells in selected carriers was monitored. These cells were found either in the aspirate of complete bone marrow or in monocyte concentrate. From the carriers, we tested cancellous bone allograft, demineralized bone matrix, porous  $\beta$ -tricalcium phosphate, molded hydroxyapatite, and calcium sulfate. We evaluated the formation of collagen fibers and the mineralized extracellular matrix. We used expansion medium and osteogenic differentiation medium. At the same time, we compared the activity of mesenchymal stem cells during complete bone marrow application and during monocyte concentrate application. The most significant production of collagen and extracellular mineralized matrix was in the expansion medium for allograft, and less in the demineralized bone matrix. When bone graft substitutes with mesenchymal stem cells were present in the expansion medium, such a formation was not evident, thus we had to use the osteogenic differentiation medium, with the best results noted when  $\beta$ -tricalcium phosphate had been used. Furthermore, better results were achieved when applying complete bone marrow, rather than monocyte concentrate.

In the clinical part, we evaluated the healing of 87 bone defects in tumor-like lesions and benign tumors with an average volume of 15 cm<sup>3</sup>. 28 defects were filled with autologous bone grafts, 44 porous  $\beta$ -tricalcium phosphate (Poresorb-TCP®) and 15 combinations of both materials in a 1:2 ratio in favor of  $\beta$ -tricalcium phosphate. During the course of postoperative control, using radiographs, we evaluated the filling resorption and the defect trabeculation. Comparing all three fillings, we recorded a faster resorption phase, respectively, trabeculation up to 12th month after the operation, followed by a slower phase. In autologous bone graft resorption, there was only slight trabeculation, which exceeded 70% in the 1st year post-operatively. In addition, we noted minimal complications harvesting grafts from the iliac crest. Poresorb-TCP® was well tolerated without any undesirable reactions, also in case of leakage into the soft tissues, which was fully absorbed with no complications. However, filling resorption, and material trabeculation were relatively slow. Comparable results were seen even in combinations of both materials, with evidently faster resorption as well as trabeculation only during the first six months, compared to Poresorb itself. Bone graft substitutes are so far inferior to autologous bone. In establishing criteria for successful healing - 80% trabeculation of the defect during the 1st year after the operation has been calculated as the borderline defect volume of 4 cm<sup>3</sup>, up to which trabeculation of the defect was similar, either filled with autologous bone grafts, or Poresorb-TCP®. There was no statistically significant dependence of the defect healing on age, or the location of the defect in the bone, with a predominance of cancellous, cortical, or cortical-cancellous bone. However, in clinical monitoring, healing of defects in the diaphysis lasted longer. It was found that deceleration of the defect trabeculation in cases of a simultaneously performed osteosynthesis and acceleration when progressively weight-bearing the concerned extremities.

Standard for filling bone defects remain autologous bone grafts. Poresorb-TCP® however, is a reliable substitute of bone grafts applicable in both children and adults. It can be used alone or together with bone grafts. The best results were obtained when filling defects with a volume up to 4 cm<sup>3</sup>.

### 3. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

S problematikou hojení kostních defektů se setkáváme v každodenní ortopedické a traumatologické praxi. 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. Ústřední roli hrají mezenchymální kmenové buňky, jejich diferenciaci v osteogenní buňky, dále růstové faktory, proces neoangiogeneze. Při hojení kostních defektů je proces migrace, proliferace a diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk ovlivněn vlastnostmi nosičů, respektive výplní těchto defektů. Vyplnit kostní defekt lze autologními kostními štěpy, alogenními kostními štěpy nebo různými druhy umělých kostních náhrad (kalciumfosfátová keramika, bioinertní keramika, kalciumsulfát, polymery, kovy, různé kompozitní materiály). I přes řadu publikovaných prací z oblasti kostního hojení, mezenchymálních kmenových buněk, růstových faktorů, umělých kostních náhrad je třeba dle našeho názoru pokračovat ve výzkumu zejména 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.

Na některá témata se zaměřuje naše dizertační práce, která je členěna na experimentální a klinickou studii.

## 4. CÍLE DIZERTAČNÍ 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  $\beta$ -TCP a jejich kombinace.**
- **Zhodnocení vlivu současné osteosyntézy a zátěže končetiny na hojení defektů.**
- **Zjištění indikací pro použití  $\beta$ -TCP jako náhrady kostních štěpů.**

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ STUDIE

### A/ MATERIÁL A METODIKA

V experimentální studii byla k testům mezenchymálních kmenových buněk (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 (60 až 81 let, medián 69 let). Z hlediska vlivu osteopenie/osteoporózy bylo provedeno předoperační denzitometrické vyšetření v den nástupu na hospitalizaci, zároveň byl stanoven body-mass index.

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.

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. 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.

Implantace totální endoprotézy kyčelního kloubu probíhala standardním postupem. Před provedením osteotomie krčku stehenní kosti byla standardním způsobem pomocí Jamshidiho jehly aspirována z trochanterické oblasti femuru kostní dřev v množství 2 x 10 ml do předem heparinizovaných stříkaček. Buněčná suspenze byla přidána k vychlazenému (4°C) PBS pufru. Poměr kostní dřevě a PBS pufru byl 1:1 Takto připravená kostní dřev 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 min při 2800 ot/min na základě Ficoll-Paque vztakového 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 při 37°C za aerobních podmínek v expanzním médiu obsahujícím 2 % fetálního telecího séra. Toto expanzní médium se skládalo z Eaglova minimálního esenciálního média v alfa modifikaci - alpha-MEM, fetálního telecího séra, 2-fosfátu kyseliny askorbové, dexametazonu, L-glutaminu, penicilinu a streptomycinu. Po dosažení 70% splývavosti byly buňky uvolněny 0,25% trypsinem-EDTA. Buňky byly počítány pomocí přístroje Z2 Counter. Viabilita byla analyzována přístrojem Vi-Cell XR. 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 a čas potřebný na zdvojnásobení populace. Izolované MKB byly vizualizovány mikroskopií s fázovým kontrastem.

V další fázi bylo testováno chování MKB od vybraných dárců s normální kostní denzitou 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, pozorovány a fotografovány v rastrovacím elektronovém mikroskopu Tesla BS 301 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 přísadkou kyseliny L-askorbové 0,5 mM/l, beta-glycerofosfátu 10 mM/l a dexametazonu.

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  $\beta$ -trikalciium fosfát (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).

## **B/ VÝSLEDKY**

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 menopauzy – 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, u pacientek s nižší denzitou 24. Zjištěný Singhův index se shodoval s výsledky denzitometrie pouze u 7 z 24 žen.

Na vztlakovém gradientu Ficoll-Paque bylo izolováno v průměru při přímém měření  $23 \times 10^6$  ( $11,6 \times 10^6 - 125 \times 10^6$ ) 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  $1235 \pm 550$ , u pacientek s nižší denzitou  $239 \pm 150$ ). 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.

Při nanesení kompletní kostní dřevě i monocytárního koncentrátu na aloštěp byla patrná výrazná tvorba mineralizované extracelulární matrix a kolagenu již v expanzním médiu. 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 zřejmá až při větším zvětšení. Pro umělé náhrady kostních štěpů bylo společné, že novotvorba kolagenu po nanesení kostní dřevě i monocytárního koncentrátu nebyla prakticky patrná v expanzním médiu, proto bylo použito diferenciační médium. Nejvýraznější tvorba kolagenních vláken a extracelulární mineralizované matrix byla na porézním  $\beta$ -trikalciiumfosfátu. Na lisovaném hydroxyapatitu 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. Na kalciumsulfátu, který nemá porézní strukturu, byla ojedinělá tvorba kolagenních vláken na povrchu a v okolí otvorů.

Při srovnání kompletní kostní dřevě a monocytárního koncentrátu byla obecně výraznější tvorba kolagenu a extracelulární matrix při nanesení kompletní kostní dřevě.

## **C/ DISKUZE**

Kvalita kostní reparace je ovlivněna celou řadou faktorů. Jednou z podmínek je dostatečný počet a kvalita MKB v místě předpokládaného hojení. Muschler se spolupracovníky odebíral kostní dřev z lopaty kosti kyčelní od pacientů různého věku. Zjistili 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 v souvislosti s postmenopauzální osteoporózou (Muschler et al.,2001). Faktor osteopenie/osteoporózy je tak z hlediska kostní reparační velmi významný.

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.,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 je tato koincidence (50 % žen) adekvátní tomuto výsledku při menším počtu sledovaných pacientek, přičemž dominovala osteopenie. Stejnou zkušenost jsme získali i my při vyhodnocování Singhova indexu, který neodpovídal výsledkům denzitometrie. Výskyt osteopenie/osteoporózy u pacientek s nízkým BMI a delším odstupem od menopauzy v našem souboru odpovídá údajům publikovaným 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).

Dle Cuomo et al. existuje široká variabilita v koncentraci MKB v aspirátu kostní dřevě – 1010 ± 960 CFU-F/ml, v koncentrátu 6150 ± 6660 CFU-F/ml. Počet monocytárních buněk v aspirátu kostní dřevě je 21 000 ± 7 000/μl, v koncentrátu 91 000 ± 19 000/μl (Cuomo et al.,2009). 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. Z výše uvedených skutečností vyplývá, že nemusí být u určitého pacienta zaručen v místě hojení dostatek MKB jak do počtu, tak proliferační schopnosti. V klinické praxi by bylo s výhodou obohatit toto místo hojení MKB.

Z klinického hlediska je technicky nejjednodušší odběr kostní dřevě, prakticky jako aspirát z lopaty kosti kyčelní, který MKB obsahuje. Další možností, jak zvýšit koncentraci mezenchymálních kmenových buněk, je centrifugace získaného aspirátu kostní dřevě, kterou lze provést v uzavřeném systému v rámci jednoho operačního výkonu. Metoda aspirace kostní dřevě vylučuje nutnost dalšího operačního řezu a výrazně tak snižuje morbiditu. Connolly se spolupracovníky popsal použití aspirátu kostní dřevě jako alternativu k autolognímu kostnímu štěpu (Connolly et al.,1986 et 1998). Z hlediska koncentrace MKB v aspirátu kostní dřevě 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. stanovili minimální počet 30000 progenitorových buněk nutných v místě hojení, resp. koncentraci vyšší než 1500 CFU-F/ml (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.

Možným řešením by byl nejprve odběr kostní dřevě, 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 dřevové krve a získáním konečného produktu pro buněčnou terapii na přibližně 4-6 týdnů. V České republice toho času není možno připravovat MKB *in vitro* ke klinickým účelům, a to především z důvodů současné praxe přípravy mezenchymových buněk. Vzhledem k možnostem současné klinické praxe jsme tedy na připravené nosiče aplikovali kompletní aspirovanou kostní dřev nebo monocytární koncentrát. Tento koncentrát lze připravit v rámci operačního výkonu, avšak znamená to i přesto určitou manipulaci s rizikem kontaminace a jistě též představuje prodloužení doby operace. Zajímá nás tedy také rozdíl výsledků v nanesení

kompletní kostní dřeně 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 dřeně 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 dřeni. Monocytární koncentrát se tak nejevil jako výhodnější. 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 samotná kostní dřeň s demineralizovanou kostní matrix nezvyšuje osteogenezu a zároveň zjistili, že nanesení monocytárního koncentrátu na DBM nemá lepší výsledky než kompletní kostní dřeň (Cuomo et al., 2009). Výsledky naší práce se tak s tímto shodují.

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.  $\beta$ -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. Nejlepší výsledky vykazoval porézní  $\beta$ -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. Porézní  $\beta$ -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.

## **D/ ZÁVĚR**

Schopnost kostní regenerace a hojení je ovlivněna řadou faktorů. U seniorů, zejména postmenopauzálních žen je tato schopnost ovlivněna 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. 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 tento počet dosáhla jen část z těchto pacientů. Nelze tedy spolehlivě dopředu 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 klinice provést aspirátem kostní dřeně nebo

případně monocytárním koncentrátem. Úskalím obou metod je předem 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 větší koncentraci MKB a intenzivnější tvorbu extracelulární matrix včetně kolagenních vláken, ale výsledek byl opačný. Námí 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  $\beta$ -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.

## 6. KLINICKÁ STUDIE

### A/ MATERIÁL A METODIKA

V klinické studii byly hodnoceny výsledky léčby kostních defektů za období 2003 až 2009 u 87 pacientů (49 mužů, 38 žen) s průměrným věkem 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 odstup nejméně jeden rok od operace a plně zachovaná rentgenová dokumentace. Vyloučení byli pacienti s maligními tumory, imunosuprimovaní, užívající kortikosteroidy a cytostatika, kuřáci.

Před operací byl zaznamenán věk a pohlaví pacientů, předpokládaná diagnóza, která byla ověřena histologickým vyšetřením, postižená kost, dominantní typ kosti v okolí ložiska (spongiózní, kortikospongiózní nebo kortikální) a 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 kraniokaudální, transverzální a předozadní rozměr kostního defektu a jeho objem byl vypočítán jako objem kvádrů v  $\text{cm}^3$ . Operace probíhaly v celkové anestézii ze standardních operačních přístupů. V místě léze byly 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  $\beta$ -TCP (Poresorb-TCP®). Část defektů byla vyplněna směsí autologních kostních štěpů a  $\beta$ -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). Plné zatěžování končetin bylo povoleno mezi 6 týdny až 3 měsíci po operaci 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.

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  $\beta$ -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. Trabekulací 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  $\text{cm}^3$ , tak v procentuálním vyjádření ve vztahu k původní velikosti.

Výsledky byly statisticky zpracovány. Při těchto výpočtech jsme pracovali s hladinou významnosti  $p = 5 \%$ . Byl vyhotoven histogram velikostí defektů. Resorpci výplně a trabekulaci defektu jsme sledovali zvláště 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 12 měsíců 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 12 měsíců od operace na věku pacienta.

Porovnávali jsme trabekulaci defektů v 6 týdnech, 3, 6 a 12 měsících od operace 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 přídavné 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 retikulín, byl hodnocen výskyt pletivové či trabekulární kosti. Prohlíženy byly při zvětšení 200x.

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

## **B/ VÝSLEDKY**

Průměrný objem kostního defektu byl 15 cm<sup>3</sup> (rozsah 0,4 – 144 cm<sup>3</sup>, medián 9 cm<sup>3</sup>). 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. Umístění defektu bylo v kortikospongiózní kosti (40 x), dále ve spongiózní (21 x), nejméně v kortikální kosti (16 x).

Průměrná doba sledování pacientů byla 4 roky (rozsah 1 až 6 let) od operace. 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. 12 měsíců od operace byla průměrná trabekulace kostního defektu 71 % (SD = 17 %). Při použití β-TCP (Poresorb-TCP®) jako náhrady kostní tkáně jsme nezaznamenali nežádoucí vedlejší reakce. Resorpce Poresorb-TCP® v defektu byla pomalá, zejména u větších defektů. 12 měsíců od operace bylo průměrné množství resorbovaného materiálu 59 % (SD = 30 %), což je široké rozmezí závislé zejména na množství implantovaného materiálu. Trabekulace v kostním defektu postupovala rovněž pomalu. 12 měsíců po operaci byla průměrně 49 % (SD = 30 %) a dále se tato hodnota v čase příliš nezvětšovala. Situace se lišila defekt od defektu a úspěšnost trabekulace byla rovněž závislá na velikosti kostního defektu. Poresorb-TCP® byl velmi dobře tolerován, na rentgenogramech v žádném případě nebyly nalezeny radiolucentní oblasti kolem materiálu. Zato jsme pozorovali přímou vazbu novotvořených trabekul na něj. 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 byl materiál kompletně vstřebaný. 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®.

Dále jsme porovnávali trabekulaci defektů při jednotlivých výplních. Analýzou rozptylu bylo zjištěno, že skupiny nejsou stejné a dvouvýběrovým t-testem byl zjištěn 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 zaznamenán.

$\beta$ -TCP se v kostních defektech resorbuje od periferie do centra a stejným směrem postupuje na stěnách defektu začínající novotvorba kostních trámečků. Relativně častým nálezem byl neresorbovaný  $\beta$ -TCP v centrální části. Proto bylo zmenšování defektu hodnoceno v absolutních číslech v  $\text{cm}^3$ , tato hodnota zohledňovala velikost defektu (čím větší defekt, tím více biomateriálu se na periférii resorbuje) a v relativních číslech v procentech, která vyjadřují, do jaké míry se původní defekt zhojil. 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 (úrovně trabekulace defektu v procentuálním vyjádření) na jeho původní velikosti

Regresní analýzou nebyla zjištěna praktická závislost zhojení defektu (úrovně trabekulace defektu vyjádřená v procentech) na věku pacienta.

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 1 roku od operace. Pro časová období od operace v 6 týdnech, 3, 6 a 12 měsících byla provedena analýza rozptylu, kde nebyla zjištěna normalita rozdělení. Proto byl použit neparametrický test a potvrzena hypotéza, že nebyl rozdíl v trabekulaci defektu dle jeho polohy v kosti Nicméně při hodnocení rentgenových snímků jsme pozorovali pomalejší resorpci výplně a trabekulaci defektu zasahujícího do kortikální kosti v oblasti diafýzy. Zaznamenali jsme dvě zlomeniny u kostních defektů vyplněných  $\beta$ -TCP v oblasti s převahou kortikální kosti, první rok po výplni, druhou dva roky po výplni a zároveň rok po odstranění dlahy. 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 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 metadiadiafýzách 3x femuru a 2x tibie. Byla prokázána novotvořená kostní tkáň v defektu jak vláknitá, tak lamelární, včetně přítomných osteocytů a povrchových osteoblastů. Vzhledem k nálezu úrovně trabekulace 12 měsíců po operaci u defektů vyplněných autologními kostními štěpy, která přesahovala 70 %, 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  $4 \text{ cm}^3$  měly obdobné výsledky trabekulace v 1 roce od operace při výplni autologními kostními štěpy nebo porézním  $\beta$ -TCP. U defektů nad  $4 \text{ cm}^3$  byly takto úspěšné pouze ty, které byly vyplněny autologními kostními štěpy

## C/ DISKUZE

Na začátku diskuse 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 vzaty všechny kostní defekty vyplněné porézním  $\beta$ -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  $144 \text{ cm}^3$ ), nicméně medián velikosti defektu byl  $9 \text{ cm}^3$  a 70 z 87 defektů měřilo do velikosti  $20 \text{ cm}^3$ .

Otázkou bylo, zda v malém počtu vyskytující se větší defekty v rámci větší homogenity souboru ze studie nevyložit. 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 cm<sup>3</sup>, medián 24 cm<sup>3</sup>, přičemž za velké defekty považoval ty, které měřily více než 43 cm<sup>3</sup> (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. Objem experimentálních defektů není v těchto studiích velmi často uváděn, když ano, pohybují se dle velikosti experimentálního zvířete od 0,1 do 3 cm<sup>3</sup> (Lane et al.,1999, Fredericks et al.,2004, Artzi et al.,2004, Gao et al.,1997, Arts et al.,2005).

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). Podobně jako Ghassemi se spolupracovníky jsme nenašli významnější komplikace po odběru autologních kostních štěpů (Ghassemi et al.,2009).

Při kontrole po 6 týdnech od operace jsme zjistili resorpci části autologních kostních 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. 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. 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 (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. 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). 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). 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  $\beta$ -TCP o určité množství růstových faktorů a osteoblastů. Arts se spolupracovníky vyplňoval defekty acetabula směsí autologních štěpů a  $\beta$ -TCP v poměru 1:1 s dobrým efektem (Arts et al.,2005). V našem případě převažoval podíl  $\beta$ -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  $\beta$ -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.

Z hodnocení hojení kostních defektů bylo zřejmé, že jednu z klíčových úloh hraje jejich velikost. Hlavním důvodem, proč v centru větších kostních defektů nevzniká kostní tkáň, je nedostatečný přísuv 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. 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. 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 typ výplně. Pokud bychom za hlavní příčinu tohoto jevu pokládali omezenou vzdálenost účinné difúze 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. Na základě výsledku trabekulace defektu po výplni autologními kostními štěpy a klinických zkušeností jsme stanovili jako hranici úspěchu hojení 80% trabekulaci defektu ve 12 měsících od operace. Zjištěný hraniční objem 4 cm<sup>3</sup> by odpovídal objemu krychle o hraně přibližně 1,6 cm. Při předpokladu difúze živin ze všech stran krychle odpovídá tento rozměr schopnosti nutrientů difundovat do centra defektu (Muschler et al.,2004). Objem 4 cm<sup>3</sup> může být tak považován za hraniční pro výplň Poresorbem-TCP®. Problémem, který vyžaduje optimální řešení, zůstává, jak zlepšit hojení kostních defektů, zejména těch s větším objemem. 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  $\beta$ -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).

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. Z našich pozorování vyvozujeme, že  $\beta$ -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 průběhu trabekulace vyplývá, že přítomnost osteosyntézy tento proces zpomaluje (průměrná trabekulace v 1 roce 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 odebrána 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.

## D/ ZÁVĚR

Velikost objemů většiny kostních defektů u afekcí nádorům podobných a benigních tumorů v naší klinické studii byla do 20 cm<sup>3</sup>. Tyto objemy jsou větší než lze modelovat v experimentu na běžných laboratorních zvířatech a je tak nsnadné 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 radiolucentní 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 odrazily 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 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 vyjádřená v cm<sup>3</sup>. 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 ve 12 měsících od operace jako úspěchu hojení byl nalezen hraniční objem 4 cm<sup>3</sup>, který svou velikostí

odpovídá možnostem difúze 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  $\beta$ -TCP.

Nebyla zjištěna statisticky významná závislost hojení defektů na věku. Nicméně Poresorb-TCP® byl 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  $\beta$ -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. Lze ho doporučit do oblasti spongiózní a kortikospongiózní kosti. U defektů v kortikální kosti je ho možné rovněž použít, ale je nutné zvážit i další faktory (šířka kosti, tloušťka kortiky, malá mechanická pevnost  $\beta$ -TCP), případně uvažovat o přidatné 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<sup>3</sup> 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  $\beta$ -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 pO<sub>2</sub> 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. CONNOLY, JF. Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. *Clin. Orthop.*, 1998, vol. 355, Suppl, p. 257-266.
29. CONNOLY, 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. CONNOLY, 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 masivních kostních a kostně chrupavčitých transplantátů. *Acta Chir orthop Traum česk*, 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. Recobinant 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  $\beta$ -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+cavitory+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 application. *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 cavitory 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., PALÍČKA, 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  $\beta$ -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. Tricalcium 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 tricalcium-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.

## 8. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA

### Monografie a kapitoly v monografiích

1. KRAJINA, A. et al. *Intervenční radiologie: miniinvazivní terapie*. 1. vyd., 2005. Hradec Králové: Olga Čermáková, 835 s. ISBN 978-808-670-308-4
2. KRAJINA, A., KUČERA, T. *Intervenční radiologie: miniinvazivní terapie*, 1. vyd. Hradec Králové: Olga Čermáková, 2005. 835 s. ISBN 978-808-670-308-4. Perkutánní léčba venózních a lymfatických malformací, s.785-789.
3. SPONER, P., URBAN, K., KUCERA, T. Comparison of apatite-wollastonite glass-ceramic and  $\beta$ -tricalcium phosphate used as bone graft substitutes after curettage of bone cysts. *Advances in Ceramics - Electric and Magnetic Ceramics, Bioceramics, Ceramics and Environment* [online]. Sep. 2011, Costas Sikalidis (Ed.), InTech Dostupné z <http://www.intechopen.com/articles/show/title/comparison-of-apatite-wollastonite-glass-ceramic-and-tricalcium-phosphate-used-as-bone-graft-substit> . ISBN: 978-953-307-350-7.

### Původní články

1. KARPAŠ, K., KUČERA, T. Komplikace po endoprotézách kyčelního kloubu v úrazové indikaci. *Lékařské zprávy Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové*, 2005, roč. 50, č. 3-4, s. 73-81.
2. KUČERA, T., KRAJINA, A., ŠPONER, P., KOHOUT, A. Cévní malformace pohybového systému u dětí. *Acta Chir orthop Traum čech*, 2006, roč. 73, č. 2, s. 99-103.
3. KUČERA, T., URBAN, K., KARPAŠ, K., ŠPONER, P. Omezení hybnosti kolenního kloubu po implantaci totální endoprotézy. *Acta Chir orthop Traum čech*, 2007, roč. 74, č. 5, s. 326-331.
4. LUTONSKÝ, M., KUČERA, T., KARPAŠ, K. Komplikace po TEP kolenního kloubu u pacientů s revmatoidní artritidou. *Česká revmatologie*, 2007, roč. 14, č. 4, s. 149-153.
5. ŠPONER, P., PELLAR, D., KUČERA, T., KARPAŠ, K. Our Approach to the Treatment of Spastic hip Subluxation and Dislocation in Children with Cerebral Palsy. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2006, roč. 49, č. 4, s. 215-218.
6. ŠPONER, P., URBAN, K., PELLAR, D., KUČERA, T., KARPAŠ, K. Léčení patologických zlomenin u juvenilní kostní cystě u dětí. *Úrazová chirurgie*, 2007, roč. 15, č. 1, s. 11-16.
7. KUČERA, T., KARPAŠ, K. Zlomeniny krčku stehenní kosti u seniorů. *Česká geriatrická revue*, 2008, roč. 6, č. 2, s. 111-115.
8. KUČERA, T., MALÝ, R., URBAN, K., ŠPONER, P. Prevence tromboembolické nemoci po implantaci totální endoprotézy kyčelního kloubu. *Acta Chir orthop Traum cech* 2011, roč. 78, č. 2, s.101-105.
9. ŠPONER, P., URBAN, K., KUČERA, T., KOHOUT, A., BRŤKOVÁ, J., KNÍŽEK, J. The use of interconnected  $\beta$ -tricalcium phosphate as bone substitute after curettage of benign bone tumours. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 2011, vol.21, p. 235-241. IF 0,146 .
10. KUCERA, T., URBAN, K., RAGKOU, S. Healing of cavitary bone defects. *Eur J Orthop Surg Traumatol* [online], June 2011, DOI 10.1007/s00590-011-0831-9 (online first), dostupné z <http://www.springerlink.com/content/101157/?Content+Status=Accepted>, ISSN Online: 1432- 1068, IF 0,146.

## Statě ve sbornících

SOUKUP, T., KUČERA, T., PALIČKA, V., KARBANOVÁ, J., PYTLÍK, R., KUČEROVÁ, L., MOKRÝ, J., URBAN, K., SUCHOMEL, P. Mezenchymové kmenové buňky u nemocných s osteoporózou. In: *2. morfologický postgraduální kurz*, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2007, s. 20-24.

## Přehledové články

1. KUČERA, T., URBAN, K., SOUKUP, T. Hojení kostních defektů. *Ortopedie*, 2009, roč. 3, č. 5, s. 226-231.
2. MALÝ, R., KUČERA, T., PETROVÁ, L., VÍŠKOVÁ, H. Farmakoekonomika hluboké žilní trombózy – klíčová role prevence žilního tromboembolismu. *Postgraduální medicína*, 2010, roč. 12, č.1, s. 78-82.
3. KUCERA, T., URBAN, K., SPONER, P. Charcot arthropathy of the knee. A case-based review. *Clin Rheumatol*, 2011, vol. 30, no. 3, p. 425-428, IF 1,6.

## Jiné

SPONER, P., KUCERA, T. Remodelling of the femoral head after proximal femoral osteotomy for avascular necrosis associated with slipped capital femoral epiphysis. *Bratisl Lek Listy*, 2010; vol. 111, no. 7, p. 410-413, IF 0,345

## Přednášky přednesené autorem

1. KUČERA, T. Operační přístupy na horní končetině. Seminář Ortopedické kliniky FN a LF UK Hradec Králové, 2004.
2. KUČERA, T. Současné postavení preferenčních COX-2 inhibitorů. XIV.Ortopedické sympozium s mezinárodní účastí Hradec Králové, 2005.
3. KUČERA, T., KRAJINA, A., ŠPONER, P. Muskuloskeletální cévní anomálie u dětí. XIV.Ortopedické sympozium s mezinárodní účastí Hradec Králové, 2005.
4. KUČERA, T., KRAJINA, A., ŠPONER, P. Cévní malformace v dětské ortopedii. XIII. Frejkovy dny Brno, 2005.
5. KUČERA, T., KARPAŠ, K. Zlomeniny krčku femuru u geriatrických pacientů. Kongres Trauma, VIII. Slovenský kongres úrazovej chirurgie s mezinárodní účastí a XII. Bratislavské traumatologické dni Miloša Brixa, 2005.
6. KUČERA, T., URBAN, K. Omezení hybnosti po TEP kolenního kloubu. XV. Ortopedické sympozium s mezinárodní účastí Hradec Králové, 2006.
7. KUČERA, T., KARPAŠ, K., URBAN, K., LUTONSKÝ, M., ŠPONER, P. Střednědobé výsledky TEP kolenního kloubu. XV. Ortopedické sympozium s mezinárodní účastí Hradec Králové, 2006.
8. KUČERA, T. Současné možnosti náhrady kostní tkáně. Bioaktivní cementy. Seminář Ortopedické kliniky FN a LF UK Hradec Králové, 2006.
9. KUČERA, T. Úhlové deformity dolních končetin řešené dočasnou hemiepihyzeodézou. XV. Frejkovy dny, Brno, 2007
10. KUČERA, T., URBAN, K., KOHOUT, A., STRNAD, Z. Osteogeneze v okolí Poresorbu u kostních defektů. 4. Ortopedické sympozium Litoměřice, 2008.
11. KUČERA, T., ŠROT, J., ŠPONER, P., KOHOUT, A. Subakutní a chronická osteomyelitida u dětí. XVII. Ortopedické sympozium s mezinárodní účastí. Hradec Králové, 2008.

12. KUČERA, T., URBAN, K., ŠPONER, P., KOHOUT, A., STRNAD, J. Osteointegrace trikalciumfosfátu v kostních defektech. XVII. Ortopedické symposium s mezinárodní účastí, poster. Hradec Králové, 2008.
13. KUČERA, T., URBAN, K. Léčba kostních defektů výplní  $\beta$  – trikalciumfosfátem. Přednáška v rámci předmětu Příprava odborné přednášky a odborné publikace postgraduálního studia. Lékařská fakulta UK Hradec Králové, 2008.
14. KUČERA, T., ŠPONER, P., KARPAŠ, K. Temporary hemiphyseal stapling for the treatment of genu valgum in children. EPOS 27th Annual Meeting, e-poster, Warsaw, 2008.
15. KUČERA, T., KARPAŠ, K. Revizní operace po aloplastikách kyčelního kloubu. II. Brandýské symposium, Brandýs nad Orlicí, 2008.
16. KUČERA, T. Náhrady kostní tkáně s mezenchymálními kmenovými buňkami. Prezentace postgraduálního studia, Lékařská fakulta UK Hradec Králové, 2009.
17. KUČERA, T., KARPAŠ, K., ŠROT, J., DEJMEK, M., ZÍTKO, D., ŠPONER, P., URBAN, K., RYŠKOVÁ, L. Infekční komplikace endoprotéz kyčelního kloubu. XVIII. Ortopedické sympozium s mezinárodní účastí, Hradec Králové, 2009.
18. KUČERA, T., KARPAŠ, K., ŠPONER, P., ZÍTKO, D., ŠROT, J., DEJMEK, M. Infekce v dětské ortopedii. XVIII. Ortopedické sympozium s mezinárodní účastí, Hradec Králové, 2009.
19. KUČERA, T., URBAN, K., ŠPONER, P., KOHOUT, A., STRNAD, J. Osteointegrace trikalciumfosfátu v kostních defektech. I. Celostátní konference Bioimplantologie, poster, Brno, 2009.
20. KUČERA, T. Mezenchymální kmenové buňky a růstové faktory v ortopedii. Přednáška pro studenty volitelného předmětu Ortopedie Lékařské fakulty UK Hradec Králové, 2009.
21. KUČERA, T., RYŠKOVÁ, L. Septická ortopedie. Přednáška semináře Ortopedické kliniky FN a LF UK Hradec Králové, 2009.
22. KUČERA, T., SOUKUP, T., KRS, O., URBAN, K. Behavior of mesenchymal stem cells in biomaterials used in clinical practice. 7<sup>th</sup> International Stem Cell School in Regenerative Medicine, poster, Prague, 2009.
23. KUČERA, T., MALÝ, R., URBAN, K. Prevence TEN po implantaci endoprotézy kyčelního kloubu. 31. Sympozium Ortopedické kliniky IPVZ a 1. LF UK FN Na Bulovce, Praha, 2009.
24. KUČERA, T. Současné směry v endoprotetice, Seminář Ortopedické kliniky FN a LF UK Hradec Králové, 2010.
25. KUČERA, T. Zlomeniny distálního předloktí. Mezioborový seminář Fakultní nemocnice Hradec Králové, 2010.
26. KUČERA, T., URBAN, K., ŠROT, J. Totální endoprotéza kolenního kloubu při Charcotově artropatii. Národní kongres ČSOT Praha, 2010.
27. KUČERA, T., RYŠKOVÁ, L., ZÍTKO, D. Infekční komplikace TEP kyčelního kloubu. Beskydské ortopedické dny. Frýdek Místek, 2010.
28. KUČERA, T., URBAN, K., ŠPONER, P. Hojení kostních defektů. 32. Sympozium Ortopedické kliniky IPVZ a 1. LF UK FN Na Bulovce. Praha, 2010.
29. KUČERA, T., RYŠKOVÁ, L., ŠROT, J., LUTONSKÝ, M. Infekce kloubních náhrad, změna spectra patogenů. Národní kongres ČSOT, Praha, 2011.