

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**Novotvorba a regenerace kostní tkáně s použitím  
kmenových buněk**

**MUDr. et MUDr. Karel Klíma**

**Praha, 2015**

**Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

**Obor:** Experimentální chirurgie

**Předseda oborové rady:** prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

**Školící pracoviště:** Stomatologická klinika VFN a 1. LF UK

**Školitel:** doc. MUDr. et MUDr. René Foltán, PhD.

**Konzultant:** MUDr. et MDDr. Jiří Šedý PhD.

## Obsah:

Abstrakt .....	4
Abstrakt (AJ) .....	5
1. Úvod .....	6
2. Hypotézy a cíle .....	7
3. Materiál a metodika .....	7
4. Výsledky .....	11
5. Diskuse .....	14
6. Závěry .....	16
7. Použitá literatura .....	17
Seznam publikací doktoranda .....	19

## **Abstrakt: Novotvorba a regenerace kostní tkáně s použitím kmenových buněk.**

Úvod: Dostatek kostní hmoty je limitujícím faktorem ošetření pacientů v ortopedii, traumatologii a maxilofaciální chirurgii. Cílem postgraduálního studia bylo experimentálně ověřit efektivitu novotvorby kosti s použitím kmenových buněk a anorganického prekursoru kosti, ověřit funkčnost potkaního modelu kostního defektu a navrhnout jednoduchý, časově nenáročný a levný model hojení zlomeniny u potkana.

Materiály a metodika: Zkoumali jsme regeneraci kosti s použitím kmenových buněk z kostní dřevě s hydroxyapatitem a trikalcium fosfátem na potkaním modelu kostního defektu a modelu obratlové fúze. Zavedli jsme jednoduchý model obratlové fúze u potkana, který je snadno reprodukovatelný s minimální mortalitou a morbiditou. Experiment probíhal 8 týdnů. Poté byla zvířata humánně utracena. Získané vzorky jsme analyzovali imunohistochemicky, pomocí mikroCT a histomorfometrie.

Výsledky: Na modelu defektu obratlového těla u potkana jsme experimentálně ověřili, že kmenové buňky spolu s hydroxyapatitem a trikalcium fosfátem vedou k významně vyšší novotvorbě kosti. Prokázali jsme, že nárůst kostní hmoty byl významnější při použití vyšší koncentrace kmenových buněk. Na modelu spinální fúze jsme zjistili, že kmenové buňky snižují zánět a zlepšují kvalitu kosti, aniž bychom dosáhli s jejich využitím významně vyšší novotvorby kosti.

Závěry: Z naší práce vyplývá, že kmenové buňky mají osteogenní potenciál, zlepšují osteogenezi v závislosti na hustotě a zřejmě mají protizánětlivé vlastnosti.

**Abstract: New bone production and regeneration using stem cells.**

*Introduction:* A lack of bone mass poses limits on treatment in maxillofacial surgery, orthopaedics and traumatology. This post-gradual research aimed to confirm the hypothesis that inorganic or organic non-cellular bone matrix could act as a carrier for autologous stem cells able to differentiate into osteoblasts as well as to verify whether we could accelerate regeneration of the augmentation and the healing process, resulting in improving the bone quality.

*Materials and methods:* Regenerative properties of the bone were explored using bone marrow stem cells with hydroxyapatite and tricalcium phosphate in a rat bone defect and spinal fusion model. A simple spinal fusion model was induced in a rat capable of easy reproduction, with the least possible mortality and morbidity. After the 8-week experiment, the rodents were euthanized. All samples were analyzed using micro-CT and histomorphometry.

*Results:* The research on a rat bone defect showed that stem cells with hydroxyapatite and tricalcium phosphate led to a significantly higher bone regeneration. It was proved that a higher concentration of stem cells caused a bigger body mass increase. The research on a spinal fusion model demonstrated that stem cells reduced inflammation and improved bone quality but did not significantly accelerate bone regeneration.

*Conclusion:* The experiment proved that stem cells have osteogenic potential, improve osteogenesis depending on their density, and may have anti-inflammatory qualities.

## 1. Úvod

Zlatým standardem rekonstrukcí defektů kosti v traumatologii, spondylochirurgii, ortopedii a maxilofaciální chirurgii stále zůstává kost autologní. Největším problémem je morbidita vyplývající z nutnosti dvou operačních přístupů, označovaná jako morbidita v místě odběru (angl. donor site morbidity). Dalším negativem je resorpce části transplantované kosti a limitovaný objem štěpu. Nalezením alternativy se zabývá kostní tkáňové inženýrství. Cílem je nalézt mechanicky stabilní biokompatibilní matrix s osteokonduktivními, osteoindukčními a osteogenetickými vlastnostmi, které se blíží vlastní kosti. Vysoký potenciál v kostním tkáňovém inženýrství se přisuzuje autologním mezenchymálním kmenovým buňkám (MSCs) [Zhang et al., 2010]. Tyto kmenové buňky mají několik výhod: mají osteogenní potenciál, snadno se získávají, kultivují a mají nízký imunogenní potenciál [Kim et al., 2008]. V kombinaci s hydroxyapatitovou matrix stupňují osteogenezi a kostní hojení fraktur dlouhých kostí v ortopedii [Choi et al., 2011], spinální fúzi ve spondylochirurgii [Huang et al., 2011] a léčbu kraniofaciálních defektů v maxilofaciální chirurgii [Miura et al., 2006]. Účelem práce bylo ověřit novotvorbu kosti s použitím definovaných lidských kmenových buněk z kostní dřevě – hBMSCs a hydroxyapatitové matrix na potkaním modelu. Ve druhé fázi jsme vytvořili levný a bezpečný model obratlové fúze u imunosuprimovaného potkana s použitím stejných buněk a matrix.

## 2. Hypotézy a cíle práce

- Experimentálně ověřit efektivitu novotvorby kosti s použitím kmenových buněk a anorganického prekursoru kosti.
- Ověřit funkčnost potkaního modelu kostního defektu.
- Navrhnout jednoduchý, časově nenáročný a levný model hojení zlomeniny u potkana
- Design experimentu přizpůsobit eventuálnímu klinickému použití.

## 3. Materiál a metodika

### Zvířecí model

V naší studii jsme pracovali s defektem obratlového těla na potkaním modelu kmene Wistar (Velaz, Praha, ČR) s hmotností mezi 300–350g. V dorzolaterální fúzi jsme experimentovali s kmenem Wistar (Anlab, Charles River Laboratories, Kolín n/Rýnem, Německo) s váhou mezi 300–350 g.

Experimentální skupiny:

a) experiment s defektem obratlového těla, 30 zvířat :

Skupina 1: prázdný defekt ventrální plochy obratlového těla L2 (n = 8);

Skupina 2: defekt ventrální plochy obratlového těla L2 vyplněný hydroxyapatitem (n = 7);

Skupina 3: defekt ventrální plochy obratlového těla L2 vyplněný hydroxyapatitem s  $0,5 \times 10^6$  hBMSCs (n = 7);

Skupina 4: defekt ventrální plochy obratlového těla L2 vyplněný hydroxyapatitem s  $5 \times 10^6$  hBMSCs (n = 8);

b) experiment s dorzolaterální fúzí L páteře, 10 zvířat:

Skupina 5: fúze spinózních výběžků sousedních obratlů lumbální páteře se stabilizací titanovým mikroplate s titanovými šrouby a s hydroxyapatitem krytým kolagenní membránou (n = 5);

Skupina 6: fúze spinózních výběžků sousedních obratlů lumbální páteře se stabilizací titanovým mikroplate s titanovými šrouby a s hydroxyapatitem v kombinaci s  $5 \times 10^6$  lidskými mezenchymálními kmenovými buňkami z kostní dřeně (hBMSCs), augmentační materiál byl krytý kolagenní membránou (n = 5);

#### Izolace a kultivace buněk

Lidské MSCs byly izolovány z kostní dřeně (hBMSCs) od čtyř různých dárců ve věku od 28 do 66 let. Veškerá příprava kmenových buněk proběhla v rámci „Správné výrobní praxe ve společnosti Bionova s.r.o. (Praha, ČR)“ a byla odsouhlasena Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL, ČR).

#### Příprava kostní matrix před implantací

Suspenze buněk s koncentrací od 0,5 do  $5,0 \times 10^6$  buněk/ml jsme umístili do vialek. Navlhčený hydroxyapatitový



granulát CEM-OSTETIC® (Berkeley Advanced Biomaterials, Inc., Berkeley, USA) (0.02 g) jsme impregnovali suspenzí buněk.

### Chirurgický výkon

V celkové inhalační anestézii v poloze na břicho jsme po odstranění srsti potkanů a dezinfekci v rámci běžné asepsy operačního pole, provedli kožní incizi v délce cca 3 cm na úrovni obratlů L1–L3. Celý operační postup jsme vykonali s pomocí operačního binokulárního mikroskopu (Carl Zeiss, Jena, Německo).

#### a) Experiment s defektem obratlového těla:

Extraperitoneálně jsme získali přístup k ventrolaterální ploše obratlového těla L2. Tuto část jsme deperiostovali a očistili od zbytků měkkých tkání. Sterilním tvrdokovovým kulovitým vrtáčkem jsme při rychlosti 1500 otáček/min s chlazením sterilním fyziologickým roztokem vytvořili defekt obratlového těla o velikosti  $2 \times 5 \times 1,5$  mm. Defekt jsme dle výše popsaných skupin nechali prázdný, event. jsme jej vyplnili hydroxyapatitem, hydroxyapatitem s kmenovými buňkami v koncentraci 0,5 nebo  $5,0 \times 10^6$ . Takto vyplněný defekt jsme pokryli vstřebatelnou kolagenní membránou HyproSorb® (Hypro, Otrokovice, ČR) v souladu s pravidly metody řízené kostní regenerace (angl. guided bone regeneration). Svaly jsme sešili neresorbovatelným materiálem jednotlivými stehy, kůži jsme sešili plastickým stehem k prevenci vykousávání šicího materiálu zvířaty. Zvířata jsme imunosuprimovali denně cyclosporinem dávkou 10 mg/kg i.m. (Sandimmun®, Novartis, Bazilej, Švýcarsko). K prevenci bakteriální infekce jsme subkutánně podávali gentamicin

10mg po 24 hod. po dobu prvních 5 pooperačních dní (Gentamicine Lek®, Lek Pharmaceuticals, Lublaňa, Slovinsko). Potkany jsme humánně usmrtili na konci 8. týdne od operace. Provedli jsem histologické, histomorfometrické vyšetření a mikroCT.

b) Experiment s dorzolaterální fúzí lumbální páteře:

Paravertebrální svaly jsme odpreparovali. Dorzální plochy *processus transversus et spinosus* stejně jako kost dorzální plochy *arcus vertebrae* jsme pečlivě očistili od zbytků měkkých tkání. Takto jsme očistili vždy dva obratle nad sebou bez průniku do míšního kanálu. Vrtáčkem z mikroinstrumentária (Jeil Medical Corporation, Soul, Jižní Korea) jsme vytvořili otvory v *processus spinosus* dvou sousedních obratlů a spojili je titanovými šrouby a mikrodlahami s tloušťkou 0,5 mm z medicínsky čistého titanu Grade IV (Jeil Medical Corporation, Soul, Jižní Korea). Na odvrácené straně od titanové dlahy mikroplate jsme vyplnili prostor mezi tranverzálními a spinózními výběžky pastou z augmentačního materiálu samotného (skupina 5) nebo pastou z augmentačního materiálu s  $5 \times 10^6$  hBMSCs (skupina 6). V obou skupinách jsme kolem augmentátu vytvořili komůrku z kolagenní membrány Hyprosorb® (Hypro, Otrokovice, ČR) k prevenci vrůstání buněk vaziva do augmentátu dle pravidel metody řízené tkáňové regenerace. Zádové svalstvo jsme sešili obdobně jako u skupin 1-4. Antibiotika a imunosupresi jsme podávali stejně jako u skupin 1-4. Potkany jsme humánně usmrtili na konci 8. týdne od operace. Provedli jsme radiografické, histologické, histomorfometrické vyšetření a mikroCT.

## 4. Výsledky

### Histologické vyšetření

#### a) Experiment s defektem obratlového těla:

Ve skupině s prázdným defektem obratlového těla (skupina 1) jsme histologicky zaznamenali známky kostního hojení s reaktivní osteoplázií a fokální kartilaginózní metaplázií. Ve skupině s defektem vyplněným pouze hydroxyapatitovou matrix (skupina 2) jsme zjistili depozita lámavého granulárního materiálu, místy s granulomatózní reakcí proti exogennímu materiálu. Kvalitativní rozdíl jsme zaznamenali ve skupině hydroxyapatitové matrix s 0,5 milionem hBMSCs (skupina 3). Histologicky měla tato skupina větší kostní trámce kolem augmentačního materiálu. Matrix byla částečně inkorporována do nově formované kosti. V poslední skupině hydroxyapatitové matrix s 5 miliony hBMSCs (skupina 4) lze popsat signifikantně vyšší novotvorbu kosti v defektu.

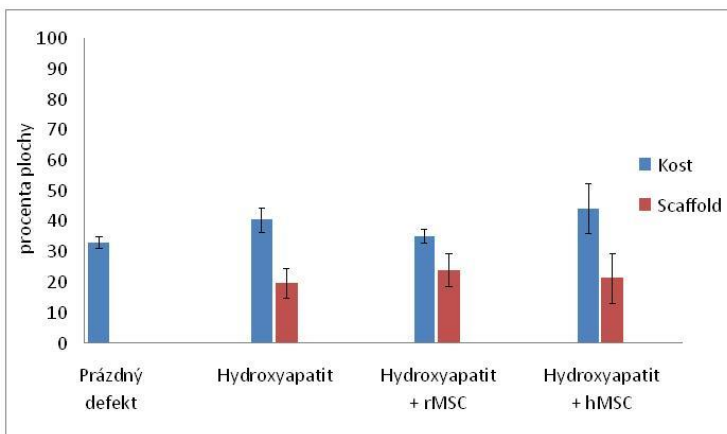
#### b) Experiment s dorzolaterální fúzí lumbální páteře:

Ve skupině s hBMSCs (skupina 6) byla novotvořená kost lépe integrovaná do okolní kosti a vykazovala dokonce i lamelární charakter. V této skupině jsme nezaznamenali zánětlivou reakci okolí. Naproti tomu ve skupině s čistým hydroxyapatitem (skupina 5) jsme v některých řezech pozorovali smíšenou zánětlivou reakci v okolí augmentačního materiálu s neutrofily a makrofágy, formujícími se do obrovských buněk z cizích těles. Barvení chloracetát esterázou ukázalo menší zánětlivou reakci ve skupině č. 6 (s hBMSCs) než ve skupině bez MSCs.

## Histomorfometrické vyšetření

### a) Experiment s defektem obratlového těla:

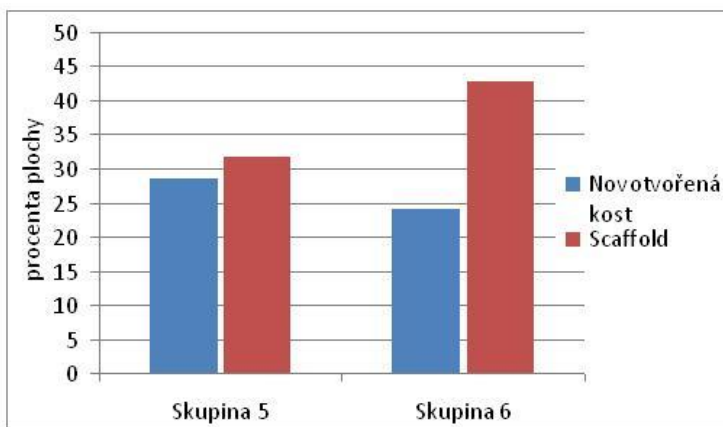
Kvantitativní analýza vzorků ukázala nesignifikantní rozdíl v procentu novotvořené kosti mezi skupinou s prázdným defektem (skupina 1) ( $33,84 \pm 1,84$  %) a skupinou léčenou samotným hydroxyapatitem ( $40,34 \pm 3,85$  %). Toto zjištění naznačuje malý osteoindukční charakter hydroxyapatitu. Signifikantně vyšší ( $p < 0,01$ ) novotvorbu kosti jsme zaznamenali ve skupině hydroxyapatitu s 5 miliony hBMSCs ( $65,60 \pm 4,89$  %) v porovnání se skupinou léčenou hydroxyapatitem s 0,5 milionem hBMSCs ( $38,91 \pm 5,76$  %), ve srovnání s matrix ( $p < 0,05$ ) a prázdným defektem ( $p < 0,01$ )- obrázek 1.



Obrázek 1 – Histomorfometrické vyšetření Scaffold - reziduální kostní matrix

## b) Experiment s dorzolaterální fúzí lumbální páteře:

Kvantitativní analýza vzorků neukázala singifikantní rozdíl mezi množstvím novotvořené kosti ( $p=0,56$ ) mezi skupinou č. 5 ( $28,54 \pm 6,22$  %) a skupinou č. 6 ( $24,01 \pm 4,36$  %). Množství reziduální matrix ( $p=0,17$ ) se mezi skupinou č. 5 ( $31,52 \pm 6,96$  %) a skupinou č. 6 ( $42,75 \pm 4,24$ ) signifikantně nelišilo – obrázek 2.



Obrázek 2 – Histomorfometrické vyšetření experimentálních zvířat s dorzolaterální fúzí lumbální páteře. Scaffold - reziduální kostní matrix

## Radiografické vyšetření

Prosté RTG snímky jsme prováděli pouze u experimentu se spinální fúzí, jak bylo vysvětleno výše. Nepozorovali jsme zlomeninu titanové mikrodlahy, pouze jeden šroub se mírně uvolnil z očka dlahy aniž byl dislokován mimo oko mikrodlahy.

## MikroCT vyšetření

### a) Experiment s defektem obratlového těla:

Ve skupině č. 4 s hydroxyapatitem kombinovaným s 5,0 miliony hBMSCs jsme našli vyšší úroveň resorpce hydroxyapatitové matrix s novotvorbou kosti nad niveau původního defektu.

### b) Experiment s dorzolaterální fúzí lumbální páteře:

Místo spinální fúze bylo na axiální projekci dobře patrné. Ve skupině č. 6 (hydroxyapatit s 5 mil. hBMSCs) jsme zjistili vyšší novotvorbu kosti než ve skupině č. 5.

## 5. Diskuse

V našem experimentu jsme zaznamenali nulovou mortalitu ve všech skupinách. V první části naší práce jsme hodnotili vliv kmenových buněk při použití hydroxyapatitové matrix na kostní regeneraci defektu obratlového těla u potkana. Nejlepších výsledků v novotvorbě kosti jsme dosáhli při použití lidských kmenových buněk z kostní dřeně ve vyšší koncentraci. Ve srovnání s koncentrací hBMSCs 0,5 milionu měla skupina s koncentrací 5 milionů signifikantně vyšší nárůst kosti s lepší inkorporací reziduální matrix a menším množstvím zbytkového hydroxyapatitu. Naše výsledky potvrzují práce dalších autorů, kteří testovali vliv hustoty MSCs na kvantitu novotvořené kosti [Choi et al., 2011]. Fenotyp kmenových buněk a jejich charakteristika je výsledkem dodržení standardů Mezinárodní společnosti pro buněčnou terapii (International Society for Cellular Therapy - ISCT) [Dominici et al., 2006]. Někteří autoři ukázali, že transplantované MSCs přežívají pouze po krátkou dobu a

nepřímou podporují migraci vlastních buněk organismu, což vede k novotvorbě kosti [Boukhechba et al., 2010]. V našem experimentu obratlového defektu jsme ve skupině prázdného defektu (skupina 1) pozorovali reaktivní osteoplázií s okrsky kartilaginózní metaplazie. Ve skupině s hydroxyapatitem samotným (skupina 2) jsme viděli na povrchu augmentačního materiálu izolované ostrůvky novotvořené kosti a osteoidu. Tato novotvorba kosti může znamenat aktivaci tělu vlastních MSCs z kostní dřene na základě operačního traumatu. V našem experimentu novotvořená kost pravděpodobně pocházela z experimentálního zvířete. Domníváme se tak na základě nálezu jen velmi malého množství lidských buněk na konci experimentu v barvení na přítomnost lidských mitochondrií - MT-CO2. Můžeme jen spekulovat, zda po transplantaci lidských MSCs tyto produkovaly různé růstové faktory [Baraniak et al., 2010] a tím došlo k atrahování kmenových buněk hostitelského organismu a zlepšenému hojení. Ve skupině s MSCs jsme pozorovali výrazně redukovanou zánětlivě granulomatózní reakci. Toto zjištění vysvětluje imunomodulační efekt MSCs [Nauta et Fibbe 2007], který může signifikantně vést k zlepšení kostního hojení [Hoogduijn et al., 2010]. Nepozorovali jsme deformaci obratle nebo kompresi páteřního kanálu, což naznačuje, že defekt obratlového těla a jeho regenerace s použitím kmenových buněk jsou bezpečné.

Ve druhé části našeho experimentu jsme využili zjištěné ideální denzity kmenových buněk a navrhli jsme nový model spinální fúze u potkana. Modelů spinální fúze na malých zvířatech se stále více využívá pro jejich přednosti: jsou levné, rychle se hojí, což vede k četnějším experimentům a rychlejšímu výsledku [Reid et al., 2011].

Náš nový experimentální model fixace *processus spinosus* ukazuje, že je bezpečný vzhledem k nulové morbiditě a mortalitě. Ve skupině s MSCs (skupina 6) jsme zaznamenali vyšší novotvorbu kosti, která se však významně nelišila od novotvorby kosti u skupiny bez MSCs (skupina 5). Domníváme se, že zhojení čtyřstěnného defektu je obtížnější a hůře se kontroluje vrůstání vaziva do augmentačního materiálu. Vlastnosti mikroprostředí se mohou výrazně lišit a ovlivňovat novotvorbu kosti mezi zhojením metafyzárního defektu a dorzolaterální fúzi (Boden et al., al., 1999).

## 6. Závěry

Experimentálně jsme ověřili, že použití mezenchymálních kmenových buněk vede u jednostěnného defektu obratlového těla potkana k významně vyšší novotvorbě kosti v porovnání s kontrolou nebo s použitím pouze matrix bez kmenových buněk. Nárůst novotvořené kosti byl závislý na hustotě použitých kmenových buněk přímo úměrně.

Během experimentu jsme navrhli levný a snadno reprodukovatelný model hojení zlomeniny u potkana metodou obratlové fúze s fixací titanovými dlahami a šrouby. Nárůst kostní hmoty u obratlové fúze nebyl významně vyšší ve srovnání s kontrolou. Testovali jsme jednoduchou přípravu matrix a kmenových buněk, vhodnou k použití v klinické medicíně. Oba popsané modely, tj. model defektu obratlového těla a spinální fúze, byly levné, bezpečné, snadno reprodukovatelné.



## 7. Použitá literatura

**Baraniak, PR.,** McDevitt, TC.: Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regen Med.* 5(1), 2010, s. 121-43.

**Boden, SD.,** Martin, GJ., Morone, M., Ugbo, JL., Titus, L., Hutton, WC.: The use of coralline hydroxyapatite with bone marrow, autogenous bone graft, or osteoinductive bone protein extract for posterolateral lumbar spine fusion. *Spine.* 24, 1999, s. 320-327.

**Boukhechba, F.,** Balaguer, T., Bouvet-Gerbetaz, S., Michiels, JF., Bouler, JM., Carle, GF., Scimeca, JC., Rochet, N.: Fate of bone marrow stromal cells in a syngenic model of bone formation. *Tissue Eng Part A.* 17(17-18), 2011, s. 2267-78.

**Dominici, M.,** Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E.: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 2006, s. 315–317.

**Hoogduijn, MJ.,** Popp, F., Verbeek, R., Masoodi, M., Nicolaou, A., Baan, C., Dahlke, MH.: The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *Int Immunopharmacol.* 10(12), 2010, s. 1496-500.

**Huang, JW.,** Lin, SS., Chen, LH., Liu, SJ., Niu, CC., Yuan, LJ., Wu, CC., Chen, WJ.: The use of fluorescence-labeled mesenchymal stem cells in poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite/collagen hybrid graft as a bone substitute for posterolateral spinal fusion. *J Trauma.* 70(6), 2011, s. 1495-502.

**Choi, HJ.,** Kim, JM., Kwon, E., Che, JH., Lee, JI., Cho, SR., Kang, SK., Ra, JC., Kang BC.: Establishment of efficacy and

safety assessment of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hATMSCs) in a nude rat femoral segmental defect model. *J Korean Med Sci.* 26(4), 2011, s. 482-91.

**Khana**, SN., Laneb, JM.: Spinal fusion surgery: animal models for tissue-engineered bone constructs. *Biomaterials.* 25, 2004, s.1475-1485.

**Kim**, HJ., Park, JB., Lee, JK., Park, EY., Park, EA., Riew, KD., Rhee, SK.: Transplanted xenogenic bone marrow stem cells survive and generate new bone formation in the posterolateral lumbar spine of non-immunosuppressed rabbits. *Eur Spine J.* 17, 2008, s. 1515–1521.

**Le Blanc**, K., Rasmusson, I., Götherström, C., Seidel, C., Sundberg, B., Sundin, M., Rosendahl, K., Tammik, C., Ringdén, O.: Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol.* 60(3),2004, s. 307-15.

**Miura**, M., Miura, Y., Sonoyama, W., Yamaza, T., Gronthos, S., Shi, S.: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for regenerative medicine in craniofacial region. *Oral Dis.* 12(6), 2006, s. 514-22.

**Muschler**, GF., Raut, VP., Patterson, TE., Wenke JC., Hollinger JO.: The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev.* 16, 2010, s. 123-145.

**Nakajima**, T., Iizuka, H., Tsutsumi, S., Kayakabe, M., Takagishi, K.: Evaluation of posterolateral spinal fusion using mesenchymal stem cells differences with or without osteogenic differentiation. *Spine.* 32, 2007, s. 2432-2436.

**Nauta, AJ., Fibbe, WE.:** Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 15;110(10), 2007, s. 3499-506.

**Reid, JJ., Johnson, JS., Wang, JC.:** Challenges to bone formation in spinal fusion. *J Biomech* 44, 2011, s. 213-220.

**Zhang, H., Migneco, F., Lin, CY., Hollister, SJ.:** Chemically-conjugated bone morphogenetic protein-2 on three-dimensional polycaprolactone scaffolds stimulates osteogenic activity in bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A*. Nov;16(11), 2010, s. 3441-8.

### Seznam publikací doktoranda:

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

a) s impact factorem (uvést hodnotu IF)

**Klíma, K., Vaněček, V., Kohout, A., Jiroušek, O., Foltán, R., Štulík, J., Machoň, V., Pavlíková, G., Jendelová, P., Syková, E., Šedý, J.:** Stem cells regenerative properties on new rat spinal fusion model. *Physiol Res*. 64(1), 2015, s. 119-28.

**IF=1,531**

Vaněček, V., **Klíma, K.**, Kohout, A., Foltán, R., Jiroušek, O., Šedý, J., Štulík, J.: The combination of mesenchymal stem cells and a bone scaffold in the treatment of vertebral body defects. *Eur Spine J*. 22(12), 2013, s. 2777-86. **IF=2,133**

b) bez IF: ---

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

a) s IF (uvést hodnotu IF)

Nieblerova, J., Foltan, R., Hanzelka, T., Pavlikova, G., Vlk, M., **Klíma, K.**, Samsonyan, L.: Stability of the miniplate osteosynthesis used for sagittal split osteotomy for closing an

anterior open bite: An experimental study in mini-pigs. Int J Oral Maxillofac Surg. 41(4), 2012, s. 482-8. **IF=1,506**

Machoň, V., Sedý, J., **Klíma, K.**, Hirjak, D., Foltán, R.: Arthroscopic lysis and lavage in patients with temporomandibular anterior disc displacement without reduction. Int J Oral Maxillofac Surg. 41(1), 2012, s. 109-13. **IF=1,506**

Foltán, R., Hoffmannová, J., Pavlíková, G., Hanzelka, T., **Klíma, K.**, Horká, E., Adámek, S., Sedý, J.: The influence of orthognathic surgery on ventilation during sleep. Int J Oral Maxillofac Surg. 40(2), 2011, s. 146-9. **IF=1,302**

Foltán, R., **Klíma, K.**, Spacková, J., Sedý, J.: Mechanism of traumatic neuroma development. Med Hypotheses. 71(4), 2008, s. 572-6. **IF=1,416**

Foltan, R., Donev, F., Hoffmannova, J., Vlk, M., **Klima, K.**: Influence of Le Fort I advancement and mandibular setback for class III malocclusion on ventilation during sleep. Int J Oral Maxillofac Surg. 36(11), 2007, s. 1021-1021. **IF=1,225**

b) bez IF

Machoň, V., **Klíma, K.**, et al. Atlas léčby onemocnění temporomandibulárního kloubu. Vyd. 1., Praha, Triton. ISBN: 978-80-7387-807-8. (autor jedné z kapitol)

Hoffmannová, J., Foltán, R., Vlk, M., **Klíma, K.**, Pavlíková, G., Bulik, O.: Factors affecting the stability of bilateral sagittal split osteotomy of a mandible. Prague Med Rep. 109(4), 2008, s. 286-97.

Černý, R., **Klíma, K.**, et al.: Analýza konfliktního jednání a prevence komunikačních dysfunkcí ve vztahu lékař pacient: hodnocení konfliktů v ambulancích lékařů první linie. Vyd. 1. - Praha : Radix, 2011. - 75 s. ISBN 978-80-86031-91-0.