

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorský

Studijní obor: Experimentální chirurgie



MUDr. et MUDr. Karel Klíma

Novotvorba a regenerace kostní tkáně s použitím kmenových buněk

New bone production and regeneration using stem cells

Typ závěrečné práce

Dizertační

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

Konzultant: MUDr. et MDDr. Jiří Šedý PhD.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze své práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, dne 20. května 2015

MUDr. et MUDr. Karel Klíma

Identifikační záznam:

KLÍMA, Karel. *Novotvorba a regenerace kostní tkáně s použitím kmenových buněk*. [New bone production and regeneration using stem cells]. Praha, 2015. Počet stran 125, počet příloh 0. Dizertační práce (PhD.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika ústní, čelistní a obličejové chirurgie VFN a 1. LF UK 2015. Školitel. Foltán, René

Abstrakt

Úvod: Dostatek kostní hmoty je limitujícím faktorem ošetření pacientů v ortopedii, traumatologii a maxilofaciální chirurgii. Cílem postgraduálního studia bylo ověřit hypotézu, zda anorganická či organická nebuněčná kostní matrix může sloužit jako nosič pro autologní kmenové buňky, které se mohou diferencovat v osteoblasty. Dalším cílem bylo ověřit, zda použitím vhodného média dosáhneme zrychlení regenerace augmentátu, jeho vhojení a současně i vyšší kvality kosti.

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 signifikantně 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 signifikantně 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.

Klíčová slova: kmenové buňky, mezenchymální kmenové buňky (MSCs), růstové faktory, biomateriály tkáňového inženýrství, kostní tkáňové inženýrství, potkan, kost

Abstract:

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.

Key words: stem cells, mesenchymal stem cells (MSCs), growth factors, biomaterial in tissue engineering, bone tissue engineering, rat, bone

Obsah:

Seznam použitých zkratek	7
1 Úvod	10
2 Cíl práce	11
3 Popis současného stavu řešeného tématu včetně literární rešerše	12
3.1 Kmenové buňky	12
3.2 Materiály kostních náhrad	14
3.2.1 Přírodní materiály	16
3.2.2 Syntetické biomateriály	19
3.3 Růstové faktory	25
4 Popis řešení a výsledky výzkumu	59
4.1 Materiál a metody	60
4.2 Výsledky	67
5 Diskuse	82
6 Závěr	93
7 Literatura	94

Seznam používaných symbolů a zkratk:

AATB	Americká asociace tkáňových bank (angl. American Association of Tissue Banks)
ALP	Alkalická fosfatáza
ANOVA	Statistická analýza rozptylu (angl. Analysis of variance)
APC	Synonymum pro PRP (angl. Autologous platelet concentrate)
ATMSCs	Mezenchymální kmenové buňky z tukové tkáně (angl. Adipose tissue mesenchymal stem cells)
bFGF	Fibroblastový růstový faktor beta
BMP	Kostní morfogenní protein
BMSCs	Mezenchymální kmenové buňky z kostní dřeně (angl. Bone marrow mesenchymal stem cells)
CAM	Buněčné adhezní molekuly (angl. Adhesion molecules)
CATP III	Connective Tissue-Activating Peptide III
CCN	Akronym z prvních písmen zástupců skupiny CCN
CD	Cluster of differentiation
CDC	Americké centrum pro nemoci a jejich prevenci
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CM	Kolagenní membrána
CSF	Kolonie stimulující faktory
CTGF	Růstový faktor vazivové tkáně (angl. Connective tissue growth factor)
Cyr61	Cysteine-rich angiogenic protein
DEF	Diethylfumarát
DFDBA	Lyofilizovaná a demineralizovaná alogenní kost (angl. Demineralized freeze-dried bone allograft)
EDGF	Endoteliální růstový faktor
EGF	Epidermální růstový faktor (angl. Epidermal Growth Factor)
ELISA	Serologická metoda detekce protilátek (angl. Enzyme linked immuno sorbent assay)
EMG	Enamel matrix derivative
EPCs	Endoteliální progenitorové buňky (angl. Endothelial progenitor cells)
ESCs	Embryonální kmenové buňky (angl. Embryonic Stem Cells)
FDA	Americká agentura kontroly potravin a léků (angl. U.S. Food and Drug Administration)
FDDBA	Lyofilizovaná alogenní kost (angl. Freeze-dried bone allograft)
FDM	Fused Deposition Modeling 3D tisk s tavením polymerujícího materiálu
FFB	Čerstvá zmrazená kost (angl. Fresh frozen bone)
FGF	Fibroblastový růstový faktor
FGFR	Receptor pro FGF
FGFs	Fibroblastové růstové faktory
FHF	Fibroblast homologous factors
G-CSF	Granulocyty kolonie stimulující faktor (angl. Granulocyte-CSF)
GDF	Růstový diferenciační faktor (angl. Growth differentiation factor)
GDF	Růstový a diferenciační faktor
GDNF	Gliální neurotrofický faktor (angl. Glial cell-derived neurotrophic factor)
GM-CSF	Granulocyty a makrofágy kolonie stimulující faktor (angl. Granulocyte-Macrophage-CSF)

HA	Kyselina hyaluronová
HAP	Hydroxyapatit
hBMSCs	Mezenchymální kmenové buňky z kostní dřeně (angl. Human bone marrow mesenchymal stem cells)
HBsAg	Povrchový antigen viru hepatitis B, australský antigen
hDPSCs	Lidské kmenové buňky zubní dřeně (angl. Human dental pulp stem cells)
hMSCs	Humánní mezenchymální kmenové buňky (angl. Human mesenchymal stem cells)
hPLCs	Lidské kmenové buňky z periodontia (Human periodontal ligament cells)
HSCs	Hematopoetické kmenové buňky (angl. Hematopoetic stem cells)
hUCMSCs	Lidské pupečnickové mezenchymální kmenové buňky (angl. Human umbilical cord mesenchymal stem cells)
IGF	Inzulínu podobný růstový faktor (angl. Insulin-like growth factor)
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein
IgG	Imunoglobulin
IKVAV	Buněčný ligand ve složení: Isoleucin-lysin-valin-alanin-valin
IL	Interleukin
KB	Kmenové buňky
KGF	Keratinocytární růstový faktor (angl. Keratinocyte growth factor)
KQAGDV	Buněčný ligand ve složení: lysin-glutamin-alanin-glycin-kyselina asparagová-valin
KRSR	Buněčný ligand ve složení: lysin-arginin-serin-arginin
LAP	Latency Associated Peptide
LLC	Large Latent Complex
LOM	Laminated Object Manufacturing metoda 3D tisku s použitím fólie
LTBP	Latent TGF- β -Binding Protein
M-CSF	Faktor stimulující makrofágy (angl. Macrophage-CSF)
MIH	Müllerian inhibiting hormone
MikroCT	Počítačová tomografie s vysokým rozlišením
MJM	Multi Jet Modeling, 3D tisk fotopolymerací.
MSTN	Myostatin
NOV	Nephroblastoma overexpressed
NSC	Neuronální kmenové buňky (angl. Neural stem cells)
P4HB	Poly 4-hydroxybutyrát
PAEK	Polyéteréterketony
PBS	Fosfátový pufr (angl. Phosphate buffered saline)
PCL	Polykapronolakton
PDECGF	Platelet-derived endothelial cell growth factor
PDGF	Destičkový růstový faktor
PDGF	Transformující růstový faktor- β , růstový faktor destiček (PDGF),
PDGF	Destičkový růstový faktor
PDLA	Kyselina poly-D-mléčná (angl. poly-D-lactide acid)
PDLLA	Kopolymer kyseliny poly-L-mléčné a poly-D-mléčné
PEG	Polyethylénglykol
PEKEKK	Poly(aryl,éter,keton,éter,keton,keton)
PEO	Polyethylénoxid
PGA	Kyselina polyglykolová
PGF	Placental growth factor
PHA	Polyhydroxyalkanoáty

PHB	Poly 3-hydroxybutyrát
PHBHHx	Kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyhexanoátu
PHBV	Kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu
pHEMA	Polyhydroxyethylmetakrylát
PHO	Poly 3-hydroxyoctanoát
PLA	Kyselina polymléčná (angl. polylactic acid- PLA)
PLGA	Kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové (angl. polylactic-co-glycolic acid).
PLLA	Kyselina poly-L-mléčná (angl. poly-L-lactide acid)
pMMA	Polymethylmetakrylát
PPF	Polypropylén fumarát
PPP	Plasma chudá na destičky
PRF	Fibrin bohatý na destičky
PRGF	Synonymum pro PRP (angl. Platelet-rich growth factor)
PRGFR	Receptor pro PDGF
PRP	Plazma bohatá na destičky
PTH	Parathormon
RADA16-I	Synonymum RADA. Buněčný ligand ve složení: arginin-alanin-kyselina asparagová-alanin
RADA16-II	Synonymum RARADADA Buněčný ligand ve složení: arginin-alanin-arginin-alanin-kyselina asparagová-alanin- kyselina asparagová-alanin
rASCs	Potkaní mezenchymální kmenové buňky z tukové tkáně (angl. Rat adipose derived stromal cells)
rBMSC	Potkaní mezenchymální kmenové bunky z kostní dřevě
REDV	Buněčný ligand ve složení: kyselina glutamová-kyselina asparagová-valin
RGD	Buněčný ligand složený z argininu, glycinu a kyseliny asparagové
rh	Rekombinantní humánní
rhBMP-2	Rekombinantní humánní kostní morfogenní protein 2
rhPDGF	Rekombinantní humánní destičkový růstový faktor
rhTGF- β	Rekombinantní humánní transformující růstový faktor beta
RTG	Rentgen
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
SLC	Small Latent Complex
SLS	Selektivní laserové spékání (angl. Selective Laser Sintering)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TGF- β	Transformující růstový faktor beta
TRH-DE	Thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme
TSP1	Trombospondin typ 1 repeat
UCBMCs	Pupečnickové mezenchymální kmenové buňky (angl. Umbilical cord mesenchymal stem cells)
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor
VP	2-vinylpyrrolidon
VWC	Von Willebrandův faktor typ C repeat
WJMSCs	Mezenchymální kmenové buňky z Whartonova pupečnickového rosolu (angl. Wharton's jelly mesenchymal stem cells),
β -TCP	Beta-trikalciium fosfát
μ CT	Počítačová tomografie s vysokým rozlišením

1 Úvod

Dostatek kostní tkáně je základním předpokladem úspěšné léčby pacientů po ztrátových poraněních, po resekčních výkonech u nádorových onemocnění, v traumatologii, spondylochirurgii, u plastických operací vrozených vad obličeje a u rozštěpů. V současné době se v klinické praxi používají různé augmentační materiály od autologní kosti až po různé směsi syntetických materiálů. Současně se studuje vliv dalších faktorů jako např. fibroblastového růstového faktoru (FGF), transformujícího růstového faktoru beta (TGF- β), kostního morfogenního proteinu (BMP) či endoteliálního růstového faktoru (EDGF).

Kostní tkáňové inženýrství se zabývá regenerací kosti. Regenerace na obecné úrovni znamená obnovení formy a funkce daného orgánu. Na kost se na rozdíl od parenchymatozních orgánů klade i požadavek na mechanickou pevnost a odolnost. K regeneraci kosti můžeme přistupovat dvěma způsoby: klasický přístup se zabývá přenosem kompletní kostní tkáně a pracuje s autografty, allografty a xenografty. Tento přístup je historicky starší. Novějším přístupem je metoda kostního tkáňového inženýrství. Tento přístup analyzuje nejjednodušší stavební jednotky kosti a dělí je na kostní buňky, růstové faktory a extracelulární matrix s její složkou organickou a anorganickou. Snaží se zjistit jak jednotlivé složky fungují, jak se ovlivňují. Toto poznání aplikuje na experiment, snaží se vybudovat kost s použitím těchto základních stavebních kamenů. Tato práce se zabývá tímto novějším přístupem.

2 Cíl práce

- Experimentálně ověřit efektivitu novotvorby kosti s použitím kmenových buněk 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 Popis současného stavu řešeného tématu včetně literární rešerše

V chirurgických oborech medicíny se lékaři potýkají s nedostatkem zdravé tkáně, která by byla pacientovi vlastní a mohla nahradit úrazem, tumorem a stárnutím poškozené orgány. Současné techniky se snaží tento hendikep nahradit transplantací orgánů od různých dárců. Ideálem regenerativní medicíny je vypěstovat rozličnými metodami tkáň, která by byla na buněčné a imunologické úrovni pacientovi vlastní. Tkáňové inženýrství se zabývá vývojem náhrad orgánů nebo jejich částí. Využívá matrix jako základní kostry tkáně, buněk, růstových faktorů, signálních a adhezivních molekul, které se snaží kultivovat v čase a získat vitální tkáň schopnou samostatné existence a klinické aplikace. Počátkem tkáňového inženýrství, kdy se poprvé použilo biomateriálů, bylo období 2. světové války. Tehdy vznikl velký tlak na rozvoj epitetiky a protetiky. Bylo pozorováno, že piloti zranění plastovými úlomky plexisklového krytu kabiny z polymethylmetakrylátu nemají odmítavou reakci proti tomuto cizorodému materiálu. Proto se následně začaly využívat polymethylmetakrylátové polymery jako náhrady kostí. V současné době je tkáňové inženýrství rychle se rozvíjejícím multidisciplinárním oborem medicíny, chemie, biologie a technologického inženýrství. V průběhu zlepšujících se technik kostního tkáňového inženýrství se vyvinul tzv. **triangular concept**. Stal se standardem a zahrnuje spolupůsobení tří faktorů, které fungují provázaně: **růstových faktorů**, **matrix** (scaffolds) a **osteogenních buněk** (kmenových buněk). Tento koncept doplnili Giannoudis et al., (2007) o pojem „mechanical environment“. Autoři měli na mysli potřebu mechanické stability jako základního faktoru hojení kosti. Nový koncept nazvali **diamantovým konceptem** (diamond concept): spolupůsobení 4 veličin: **osteogenních buněk**, **růstových faktorů**, **osteogení matrix** a **mechanické stability** [Giannoudis et al., 2007]. Následující text se zabývá nepostradatelnými výše zmíněnými prvky ke zhotovení kosti v rámci tkáňového inženýrství.

3.1 Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou nediferencované živočišné buňky. Jejich základní vlastností je diferenciace ve specializované buňky a schopnost sebeobnovy. Sebeobnova znamená, že dceřinná nebo dceřinné buňky mají opět vlastnosti buněk kmenových. Možnosti dělení kmenových buněk lze shrnout pod pojmem symetrické a asymetrické dělení. V ranném vývoji zárodku na úrovni zygoty se kmenové buňky dělí symetricky a vznikají dvě kmenové buňky totipotentní. V pozdní embryogenezi mluvíme o asymetrickém dělení. Při něm vzniká z kmenové buňky dceřinná kmenová buňka a buňka diferencující se ve funkční buňku. Příkladem je hematopoetická kmenová buňka a dceřinné buňky hematopoetické a progenitorové. Dalším příkladem asymetrického dělení je mitóza na úrovni hematologické progenitorové buňky, která se dělí na diferencované buňky, např. erytrocyt a granulocyt. Schopnost diferenciace uvádí následující tabulka 1.

Tabulka 1 - Schopnost diferenciacie

Schopnost Diferenciace	Funkce	Buňka	Etymologie
Totipotentní	Jakýkoliv typ buňky embryonálních a extraembryonálních tkání amnia, choria, placenty a včetně totipotentní buňky	Zygota	totus = všechen
↓↓↓			
Pluripotentní	Jakýkoliv typ buňky mimo buňky totipotentní a mimo buňky trofoblastu	Embryonální kmenová buňka – ESCs	plures = více
↓↓↓			
Multipotentní	Může se diferencovat do všech buněk jednoho zárodečného listu	Kmenové buňky zárodečných listů: entodermu, ektodermu a mezodermu.	multus = mnohý
↓↓↓			
Oligopotentní*	Synonymum progenitorové buňky*. Tkáňově více diferencované buňky	Kmenové buňky orgánů. Např. hematopoetická kmenová buňka	ὀλίγο- = málo
↓↓↓			
Tri- / bi- [*] potentní	Synonymum progenitorové buňky* Tkáňově více diferencované buňky	Kmenové buňky orgánů. Např. myeloidní nebo lymfoidní progenitorová buňka	tri- = troj- / bi- = dvoj-
↓↓↓			
Nulipotentní	Diferencovaná buňka neschopná dělení	Erytrocyt, Neutrofil, T-lymfocyt.	nullus = žádný

Podle: National Institutes of Health (NIH): <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/pages/chapter5.aspx>

* Oligopotentní a tri – bi potentní jsou u některých autorů synonyma

Totipotentní kmenové buňky se mohou diferencovat na jakýkoliv jiný typ buněk, včetně totipotentní buňky, bez omezení. Vzniknou splynutím vajíčka a spermie. Buňky vzniklé prvním dělením oplozeného vajíčka jsou také totipotentní. Pluripotentní kmenové buňky jsou potomky totipotentních buněk a mohou produkovat jakékoli jiné buňky kromě buňky totipotentní.

Multipotentní kmenové buňky mohou produkovat pouze buňky příbuzné danému typu buňky. Kmenové buňky dělíme na embryonální a adultní (syn: orgánově specifické KB, tkáňově specifické KB) [Leung et Verfaillie 2005]. Embryonální kmenové buňky (angl. Embryonic Stem Cells, ESCs) jsou derivátem blastocysty, jsou totipotentní, jsou schopny se diferencovat do jakékoli buněčné linie entodermu, mezodermu a ektodermu [Smith 2006]. Tuto schopnost si zachovávají buňky blastocysty pouze do 2. generace dělení oplozeného oocyty. Tyto buňky jsou schopny vysokého počtu dělení, tolerují dlouhé doby kultivace a mohou se diferencovat do embryonálních i extraembryonálních tkání např. placenty, pupečníku apod. Adultní kmenové buňky jsou pouze multipotentní a jsou

schopné se diferencovat do různých buněčných linií, ale jen příbuzného typu. V současné době dělíme adultní kmenové buňky na kmenové buňky kostní dřeně (angl. bone marrow stem cells - BMSCs) a mezenchymální kmenové buňky (angl. mesenchymal stem cells - MSCs). Kmenové buňky kostní dřeně jsou schopné se diferencovat do všech buněčných linií hematopoetického systému. Četnost těchto buněk je v kostní dřeni přibližně 1 na 10 000 – 15 000 diferencovaných buněk kostní dřeně (Weissman 2000).

Mezenchymální kmenové buňky jsou derivátem mezodermy, nacházejí se v kostní dřeni, ale i v dalších tkáních. V kostní dřeni jsou zastoupeny málo, přibližně 1 na $10^4 - 10^6$ buněk kostní dřeně. Mezenchymální kmenové buňky představují heterogenní skupinu buněk, které jsou schopné se diferencovat do buněk kostí, chrupavky, tukové tkáně, šlach a svalů (Jones et al., 2002). V druhé polovině 20. století se předpokládalo, že adultní kmenové buňky mají jen omezenou schopnost další diferenciaci a že buňka určité tkáně je již odsouzena diferencovat se pouze do buněk dané tkáně. Například jaterní kmenová buňka má schopnost se diferencovat pouze do hepatocytu apod. V posledních 10 letech došlo k publikaci velkého množství prací, které tuto doktrínu vyvrátily. Přibývá prací, které ukazují, že kmenové buňky kostní dřeně (HSC) jsou schopny se diferencovat na hepatocyty [Petersen et al., 1999], myocyty [Ferrari et al., 1998], kardiomyocyty [Tomita et al., 1999], neuronální buňky [Eglitis et Mezey 1997], endoteliální buňky [Tomita et al., 1999], epitelové buňky [Krause et al., 2001] a buňky pankreatických ostrůvků [Janus et al., 2005].

3.2 Materiály kostních náhrad

V tkáňovém inženýrství se uplatňují moderní metody výroby trojrozměrné matrix. Výroba se opírá zejména o rapid prototyping, což je metoda konstrukce trojrozměrných předmětů, někdy se označující jako 3D tisk. Rapid prototyping zahrnuje různé metody trojrozměrného tisku z různých materiálů. Podle toho jej dělíme:

a) Stereolitografie (ve tkáňovém inženýrství se užívá mikrostereolitografie) je metoda užívající tekuté pryskyřice, která polymeruje v UV světle. Princip je možné si zjednodušeně představit jako vanu naplněnou touto pryskyřicí. Na dně nádoby je plošina, která je těsně pod hladinou. Digitálně řízený laser „tiskne“ první vrstvu podle instrukcí z počítače. Po jejím dokončení se plošina mírně ponoří a laser tiskne další vrstvu. Tak vzniká trojrozměrný předmět [Gebhardt 2003], [Pandey, nedatováno]

b) Selective Laser Sintering (SLS) - selektivní laserové tavení. V celé komoře se udržuje teplota těsně pod bodem tavení substrátu. Metoda využívá látky ve formě prášku, který nanáší na válec v tenké vrstvě. Laser řízený počítačem vrstvu osvítí a tím ji fúzuje dohromady. Válec opět nanese vrstvu substrátu a proces pokračuje, dokud není výrobek hotov. Na obecné úrovni je tato metoda vhodná mimo jiné k 3D tisku kovů. Takto se mohou v tkáňovém inženýrství vyrábět např. hydroxyapatitové trojrozměrné konstrukce [Rýglová 2006], [Pandey, nedatováno]

c) Laminated Object Manufacturing (LOM) je metoda, která využívá fólie. Ta se odvíjí z válce. Z fólie laser vyřeže 2D objekt. Horký válec přejede přes takto nařezanou fólii a spojí ji s podkladem tepelnou aktivací pryskyřice. Z válce se odvine nový kus pryskyřice, laser opět vyřeže 2D objekt, válec za horka speče další vrstvu a tak dále, dokud objekt není hotov [Pandey, nedatováno]

d) Fused Deposition Modeling (FDM) využívá tavnou hlavu, která ohřívá polymerující materiál těsně nad teplotu tání. Hlava nanáší polymer na předchozí vrstvu a látka ihned po kontaktu s předchozí vrstvou tuhne. Některé systémy mají dvě hlavy, jednu pro vlastní 3D

tisk a druhou pro tisk výztuhy, která nese výrobek a na konci procesu je odstraněna [Pandey, nedatováno]

e) Multi Jet Modeling (MJM - vlastní 3D tisk) – nanáší se malá vrstva fotopolymeru. Výhodou metody je přesnost, hlava tiskne větší plochu výrobku najednou. Jako výztuha se používá vosk, který má nižší teplotu tání než vlastní fotopolymer výrobku a je na konci procesu vyplaven za vyšší teploty.

Materiály kostních náhrad jsou velmi heterogenní skupinou. Zahrnují na jedné straně vlastní kost pacienta a na straně druhé syntetické polymery k náhradě kosti. Lze je různě dělit, jako praktické se jeví rozdělení na přírodní a syntetické s mnoha podskupinami viz tabulka 2

Tabulka 2 - Materiály kostního tkáňového inženýrství:

Přírodní materiály

Autologní kost (autografts)

Alogenní kost (allografts)

Čerstvá zmrazená kost (Fresh frozen bone - FFB)

Lyofilizovaná a demineralizovaná alogenní kost (Demineralized freeze-dried bone allograft – DFDBA)

Lyofilizovaná alogenní kost (Freeze-dried bone allograft – FDBA)

Xenogenní kost (xenografts)

Enamel matrix derivative (Emdogain®)

Proteinové biomateriály

Kolagen

Želatina

Fibrin

Fibroin z hedvábí

Polysacharidové biomateriály

Agar

Alginát

Kyselina hyaluronová

Chitosan

Syntetické biomateriály

Deriváty kyseliny metakrylové

pHEMA

Biopiant HTR polymer

Polyéteréterketony (PAEK)

Nasycené alifatické polyestery

PLA

PGA

PLGA

Polykapronolakton- PCL

Nenasycené alifatické polyestery

Polypropylen fumarát - PPF

Polyhydroxyalkanoáty - PHA

Polyetylén glykol - PEG

Syntetické peptidy

Biokeramika

Beta-trikalcium fosfát - β -TCP

Hydroxyapatit - HAP

Coralline

Materiály v kostním tkáňovém inženýrství podporují novotvorbu kosti různými mechanismy a jsou na ně kladeny určité požadavky. Nejlépe tato kritéria splňuje vlastní transplantovaná kost.

Termínem **osteogeneze** rozumíme vznik, vývoj a vyžívání kosti.

Jako **osteoindukci** označujeme stimulaci osteogeneze osteoinduktivními peptidy, které pomáhají diferenciaci osteoprogenitorových buněk na osteoblasty a stimulují tak novotvorbu a vyžívání kosti.

Osteokondukce zajišťuje podporu osteoblastům příjemce jako trojrozměrná kostra, kterou remodelují ve vyžralou kost. Nejlepší osteokonduktivní vlastnosti má spongiózní kost.

3.2.1 Přírodní materiály

Autologní kost je často používána při augmentačních výkonech a představuje zlatý standard chirurgických postupů. Autologní kost nejlépe splňuje všechna kritéria osteogeneze, osteoindukce a osteokondukce. Dalšími výhodami je nulový alergenní potenciál, nulová možnost rejekce, vysoká biokompatibilita. Z chirurgického hlediska je nevýhodou nutnost dalšího odběrného místa, nejčastěji lopaty kosti kyčelní, fibuly, brady, *ramus mandibulae*, kalvy a s tím související vyšší morbidita. Kostní štěpy obecně podléhají resorpci.

Alogenní kost je kostní matrix získaná z lidských dárců. Zpracovává se různými postupy: např. zmrazením, suchým zmrazením ve vakuu, gama zářením, ozářením svazkem elektronů a sterilizací etylenoxidem. Rozlišujeme (i) čerstvou **zmrazenou kost** (fresh-frozen bone **FFB**), (ii) **lyofilizovanou a demineralizovanou alogenní kost** (demineralized freeze-dried bone allograft - **DFDBA**) a (iii) **lyofilizovanou alogenní kost** (freeze-dried bone allograft - **FDBA**). Podle Geralda et al., (2005) nejsou výraznější odchylky v tvorbě zralé kosti u pacientů mezi DFDBA a FDBA [Gerald et al., 2005]. Uvedené lyofilizační a sterilizační metody mají snížit alergenní potenciál štěpu a přenos infekčních agens. Z těchto důvodů byly zavedeny standardy Americké asociace tkáňových bank (American Association of Tissue Banks - AATB), které doporučují vyloučení kostních štěpů za určitých okolností (viz tabulka 3). Dle těchto standardů je používání štěpů DFDBA a FDBA bezpečné, štěpy FFB mají vyšší riziko přenosu infekce. Z chirurgického hlediska je práce s alogenní kostí obdobná jako s autologní, odpadá morbidita vyplývající z dalšího místa odběru štěpu, nutného v případě autologní kosti.

Tabulka 3 - Standardy Americké asociace tkáňových bank pro práci s kostními allografty

Dárci se zvýšeným rizikem
Dárci HIV pozitivní metodou ELISA
Dárci s jasnými známkami choroby
Kostní štěp bakteriálně kontaminovaný
Dárce HbsAg a HCV pozitivní
Dárce pozitivní na syfilis

Zdroj: American Association of Tissue Banks

Xenogenní kost je získávána z jiných živočišných druhů než je člověk. Nejčastěji se používá bovinní kost. Tyto xenomateriály se upravují, deproteinizují, čímž se z kosti odstraňuje organická složka a výsledný materiál je pouze trojrozměrnou anorganickou kostrou s osteokonduktivními vlastnostmi. Materiál je remodelován osteoblasty a osteoklasty příjemce. Používá se u řízené tkáňové regenerace, řízené kostní regenerace i s použitím membrán. Zástupcem těchto preparátů je např. Bio-oss®.

Enamel matrix derivative

Enamel matrix derivative (Emdogain® - EMG) je získáván ze zubních zárodků 6 měsíčních selat. Výrobcem toho derivátu byla firma Biora (Malmö, Švédsko), kterou v roce 2004 převzal Straumann Biologics Division (Švýcarsko), a nyní je pod názvem Emdogain® vyráběn touto firmou. Existuje pouze tento výrobce, a proto se pro tuto skupinu látek používá komerční název Emdogain®. Přípravek obsahuje nízkomolekulární hydrofobní proteiny skloviny a je z 90% tvořen amelogeniny [Qu et al., 2011]. Přípravek není tělu vlastní, ale amelogeniny se u savců příliš neliší [Brookes et al., 1995]. V praxi se díky tomu ukázalo, že EMG má malý alergenní potenciál. Původně bylo nutné EMG před použitím smíchat s propylenglykolalginátem. Firma vyvinula gel, který má stejný účinek jako původní EMG [Bratthall et al., 2001]. Komplexně se účinky EMG zabývalo Cochrane Collaboration® v metaanalýze osmi studií. Testovaly hypotézu, zda je EMG lepší než placebo u nitrokostních cirkumdentálních defektů,⁷ a dále zda je EMG lepší než řízená tkáňová regenerace (ŘTR/GTR). Z této metaanalýzy vyplynulo, že po jednom roce je EMG statisticky významně lepší než placebo a má přibližně stejné výsledky jako ŘTR/GTR. Autoři metaanalýzy konstatují vysokou heterogenitu dat. Podle této metaanalýzy lze konstatovat, že EMG má své místo v léčbě furkačních defektů zubů, zubů s chronickou *parodontitis*, zubů s recesy a v kombinaci s ŘTR/GTR [Bratthall et al., 2001]. Ve všeobecné chirurgii, spondylochirurgii a traumatologii se podle literatury tento materiál nepoužívá.

Proteinové biomateriály

Kolagen je extracelulární, ve vodě nerozpustný skleroprotein. Tvoří základní stavební hmotu pojivových tkání. Kolagenová vlákna mají vysokou odolnost v tahu, jsou nepružná, ohebná a měkká. V současné době patří mezi nejčastěji se vyskytující proteiny v lidském organismu a zároveň mezi nejlépe zdokumentované [Pospíšil 2012]. Kolagen se ve tkáňovém inženýrství používá často v různých aplikacích. Michelini et al (2006) použili

kolagen a embryonální kmenové buňky k diferenciaci neurogenních buněk [Michelini et al., 2006], Baharvand et al., (2006) úspěšně testovali embryonální kmenové buňky v kolagenové 3D matici k diferenciaci hepatocytů [Baharvand et al., 2006] aj. Chan et al., (2007) úspěšně použili mezenchymálních kmenových buněk s kolagenovými mikrosférami k osteogenezi [Chan et al., 2007].

Želatina, anglicky gelatin (z latinského *gelatus, a, um* – zamrzlý). Etymologie naznačuje, že jde o průsvitnou, bezbarvou, pevnou látku. Želatina je směsí mnoha proteinů. Získává se vařením – denaturací kolagenu z kostí, svalů a šlach. Takto hydrolyzovaný kolagen se přeměňuje na glutin, nejvýznamnější složku želatiny. Používá se v potravinářství a dříve i ve fotografickém průmyslu. Ve farmaceutickém průmyslu a bioinženýrství se používá k výrobě lékových kapslí, cévních protéz, obvazů ran a jako matrice v tkáňovém inženýrství. Hlavní výhodou želatiny je její biodegradabilita. Nevýhodou je malá pevnost a mechanická odolnost [Bigi et al., 2002]. Tuto nevýhodu se snaží některé modely odstranit použitím želatiny ve směsi např. s polykaprolaktonem (PCL) [Ghasemi-Mobarakeh et al., 2008] nebo zesíťováním její struktury [Bigi et al., 2002].

Fibrin je vláknitý nerozpustný biopolymer, který vzniká v závěrečné fázi srážení krve. Fibrinové pěny a gely jsou používány jako adheziva v plastické a rekonstrukční chirurgii. Fibrin přirozeně váže růstové faktory jako např. fibroblastový růstový faktor (bFGF), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), transformující růstový faktor- β , růstový faktor destiček (PDGF), IGF-1, interleukin-1 aj. Fibrin zlepšuje migraci buněk a jejich proliferaci při hojení ran a je trojrozměrnou kostrou při syntéze extracelulární matrix. Wong et al., (2003), Kawamura et al., (1988), Breen et al., (2009) dokázali, že fibrin může být i vehikulem exogenních růstových faktorů.

Fibroin z hedvábí. Hedvábí je přírodní produkt vytvářený zejména housenkou bource morušového (*Bombyx mori*). Kukla se skládá z fibroinu a sericinu. Fibroin, který obsahuje zejména aminokyseliny Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser, představuje vlastní vlákno. Toto vlákno je spojené sericinem, který se skládá převážně z aminokyseliny serinu. Sericin je zodpovědný za imunitní reakce hostitelského organismu a je ve vodě rozpustný. Výhodou fibroinu je pomalá biodegradabilita v porovnání s jinými přírodními materiály, např. s kolagenem. Další předností je pevnost a stabilita. Fibroinových biomateriálů se používá jako prekurzorů pro vývoj kostí, chrupavek a ligament. Riosová et al., (2009) prokázala dobré využití fibroinového modelu u ovce. Během 84 dní došlo k větší osteogenezi v materiálu složeném z fibroinu a chitosanu než v porovnání s autologní kostí [Rios et al., 2009]. Fibroin vytvořený genovým inženýrstvím vykazoval vyšší adhezi lidských fibroblastů než Pronectin FTM, který je komerčně vyráběnou obdobou fibroinu z hedvábí [Yang et al., 2007].

Polysacharidové biomateriály

Agar je přírodní polysacharid - lineární polymer galaktosy, který se vyrábí z červených mořských řas rodu *Floridiae*. Agar s kmenovými buňkami je často používán k diferenciaci chrupavky, kardiomyocytů, neuronů apod. V kostním tkáňovém inženýrství se uplatňuje velmi málo.

Alginát je přírodní polysacharid získávaný z buněčných stěn hnědých řas. Tkáňové inženýrství užívá alginátu k diferenciaci kardiomyocytů, neuronů a chondrocytů. Adheze a migrace buněk do alginátu se může zlepšit obohacením alginátu o arginin-glycin-kyselinu asparagovou (RGD), přidávanou jako integrinový ligand. Zhao et al., (2010) vytvořili injekční kalcium-fosfátový cement s alginátem, který testovali s použitím pupečnickových kmenových buněk (angl. human umbilical cord mesenchymal stem cells –hUCMSCs). Tento gel vykazoval vysokou pevnost a snadnou aplikovatelnost. Cement s alginátem měl mechanickou pevnost jako kortikální kost. Autoři testovali schopnost osteogenní diferenciaci kmenových buněk produkcí osteogenní markerů jako jsou alkalická fosfatáza, kolagen typu I a osteokalcin a porovnávali tuto produkci v 1., 7., a 14. dnu po implantaci. Ve skupině s kmenovými buňkami zjistili vyšší novotvorbu kosti výše popsány metodami. [Zhao et al., 2010]. Suárez-González et al., (2010) úspěšně použili alginát obohacený hydroxyapatitem s mezenchymálními kmenovými buňkami [Suárez-González et al., 2010].

Kyselina hyaluronová (HA) je glykosaminoglykan, neboli lineární polysacharid. Je složena z opakujících se disacharidových jednotek (kyselina D-glukuronová a N-acetylglukosamin). I přesto, že má poměrně jednoduchou strukturu, vykazuje HA velmi rozdílné biologické účinky v závislosti na velikosti molekuly a jejím prostorovém uspořádání [Pospíšil 2012]. Kyselina hyaluronová je hlavním komponentem extracelulární matrix. Svého využití našla s objevem potenciálu embryonálních kmenových buněk diferencovat se v cévy, chrupavku, neurony a jiné buněčné typy.

Chitosan je dalším polysacharidem používaným v tkáňovém inženýrství. Je získáván deacetylací chitinu a skládá se z glukosaminových jednotek [Willerth et Sakiyama-Elbert 2008]. Je netoxický, podléhá biodegradaci a je biokompatibilní. Chitosanu se často používá jako vehikula účinných látek. Adsorbci PDGF na chitosan dochází k iniciálnímu rychlému uvolnění tohoto růstového faktoru a následně je PDGF pomalu uvolňován a stupňuje tak kostní regeneraci defektů kalvy u potkanů [Lee et al., 2000] Lihai et al., (2010) zkoumali efekt chitosanu s kolagenem, s hydroxyapatitem a s kombinací kolagenu s hydroxyapatitem. Materiály byly zkoumány také pomocí elektronové mikroskopie. Chitosan modifikoval 3D strukturu směsi a zlepšoval i fyzikální vlastnosti směsi. Směs s chitosanem je hodnocena jako lepší pro adhezi osteoblastů a proliferaci *in vivo* [Lihai et al., 2010].

3.2.2 Syntetické biomateriály

Syntetické biomateriály nabízejí více výhod než materiály přírodní. Syntetizují se s pevně danými vlastnostmi, jsou uniformní, jejich chování je predikovatelné, jsou méně imunogenní. Můžeme využívat kombinací různých látek a vytvářet kompozity a sčítat jejich výhodné vlastnosti nebo potlačovat méně výhodné. Patří mezi ně polyhydroxyethylmetakrylát (pHEMA), polymethylmetakrylát (pMMA).

Polyhydroxyethylmetakrylát (pHEMA) je hydrofilní gel. Před druhou světovou válkou byl syntetizován pro vojenské účely termoplastický polymer **polymethylmetakrylát (pMMA)** [Stránský 2008], známý jako „plexisklo“. Jak popsáno výše, piloti zranění za druhé světové války plastovými úlomky plexisklového krytu kabiny z polymethylmetakrylátu neměli odmítavou reakci proti tomuto cizorodému materiálu. Proto se následně začalo využívat polymethylmetakrylátových polymerů jako kostních náhrad. V

padesátých letech Lím a Wichterle syntetizovali chemicky zesíťovaný hydrogel - polyhydroxyethylmetakrylát (pHEMA) [Wichterle et Lím, 1960]. Tento hydrogel má široké uplatnění při výrobě kontaktních čoček, ve farmaceutickém průmyslu a v tkáňovém inženýrství. Polyhydroxyethylmetakrylát je hydrofilní a má dobrou biokompatibilitu, ale je neresorbovatelný. Může kopolymerovat s dalšími monomery a měnit tak své biologické vlastnosti [Ratner et al., 2004]. Materiál pHEMA je odbouratelný makrofágy, ale intenzita biodegradace je velmi nízká [Mabilleau et al., 2004].

Bioplant™ HTR (Bioplant™ Hard Tissue Replacement) je neresorbovatelným kompozitním materiálem, jež je kombinací polymethylmetakrylátové (pMMA) a polyhydroxyethylmetakrylátové (pHEMA) pryskyřice s hydroxidem a uhličitánem vápenatým. Dále obsahuje síran barnatý, aby byl radiokontrastní. Polymethylmetakrylát (pMMA) je mechanicky odolný a pHEMA je hydrofilní. Castellon et al. (2004): je toho názoru, že „imediátní implantace dentálních intraoseálních implantátů s augmentací kosti Bioplant™ HTR polymerem má velmi dobré výsledky a je adekvátním augmentačním materiálem“, [Castellon et al., 2004].

Polyetheretherketony (PAEK)

Polyetheretherketony jsou skupinou termoplastických polymerů. Skládají se z aromatických jader navzájem spojených etherovou a ketonovou skupinou: poly(aryl,ether,ether,keton) (PEEK) a poly(aryl, ether, keton, ether, keton, keton) (PEKEKK) [May 1988], [Kurtz et Devine 2007]. PEKEKK nebyl v osmdesátých a devadesátých letech blíže zkoumán [Kurtz et Devine 2007]. Polyetheretherketon (polyetheretherketone - PEEK) je semikrystalický polyaromatický lineární termoplast, kterého se používá již 30 let. Má široké využití v průmyslu. Williams et al. (1987) ukázali, že PEEK by mohl být nadějným biomateriálem [Williams et al., 1987]. PEEK má vynikající mechanické vlastnosti, zejména nízkou abrazivitu [Harsha et Tewari 2003], je přirozeně rentgenkontrastní, MRI kompatibilní, není toxický [Wenz et al., 1990], [Katzner et al., 2002], [Sagomyants et al., 2008], je chemicky stabilní a odolný vůči sterilizaci [Sagomyants et al., 2008], [Godara et al., 2007]. V čelistní chirurgii se využívá také jeho přirozeně béžové barvy a malé tepelné vodivosti [Sagomyants et al., 2008]. U titanových dlah si někdy pacienti v obličejové chirurgii stěžují na pocit namrzání, zvláště u dlah, které jsou umístěné těsně pod tenkou vrstvou měkkých tkání obočí apod. U polyetheretherketonu tato nevýhoda odpadá. PEEK kombinuje pevnost s poměrně nízkým modulem pružnosti a je tedy mechanicky podobnější lidské kosti než titanový materiál [Sagomyants et al., 2008].

Nasycené alifatické polyestery

Nasycené alifatické polyestery jsou polymery kyseliny mléčné (polylactic acid-PLA) nebo kyseliny glykolové (polyglycolic acid - PGA). Jsou biologicky odbouratelné běžnými metabolickými drahami, tj. většinou hydrolyzou event. enzymaticky. Používají se také kopolymery PLA + PGA. Dále mohou být obohaceny o β -TCP nebo hydroxyapatit, které jim zvyšují mechanickou pevnost a osteokonduktivní vlastnosti. Jsou jednou z nejdéle a nejčastěji používanou skupinou látek, v tkáňovém inženýrství. Patří mezi ně: kyselina polylactická (polylactic acid- PLA), kyselina polyglykolová (PGA), kopolymer kyseliny polylactické a polyglykolové (PLGA - polylactic-co-glycolic acid), polykapronolakton (Poly- ϵ -kaprolakton - PCL). Metabolizují se různou rychlostí. Jejich

degradace je nejrychlejší u PGA a nejpomalejší u PCL, u kterého může trvat roky. Rychlost degradace lze vyjádřit: $PGA > PDLLA > PLLA > PCL$ [Rezwan et al., 2006].

Kyselina polymléčná (angl. polylactic acid - PLA) je alifatický polyester připravovaný polykondenzací přirozeně získané kyseliny mléčné. Vzhledem k chirálnímu charakteru kyseliny mléčné rozeznáváme 2 enantiomery této sloučeniny: PLLA (poly-L-lactide) je produktem polymerace kyseliny poly-L-mléčné a obráceně PDLA (poly-D-lactide) je produktem polymerace kyseliny poly-D-mléčné. Oba enantiomery se také používají jako kopolymery - PDLLA - v různých poměrech. PDLA podléhá rychlejší biodegradaci než PLLA. Materiál se v obou případech rozpadá na kyselinu mléčnou, která je dále běžně metabolizována na H_2O a CO_2 .

Kyselina polyglykolová (angl. polyglycolic acid - PGA) vzniká otevřením cyklického diesteru kyseliny glykolové a lineární polymerizací. Používá se nejčastěji jako kopolymer. PGA se v organismu rozkládá na kyselinu glykolovou, která se následně metabolizuje v citrátovém cyklu na CO_2 a H_2O . Materiál se nejčastěji používá jako základ šicích vstřebatelných materiálů a vstřebatelných pinů, šroubů a dlah. Lze ho použít i v tkáňovém inženýrství, i jako vehikula pro „controlled drug delivery“.

Kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové (PLGA - polylactic-co-glycolic acid). Degradace materiálu probíhá, jak bylo popsáno výše. Materiál je základem vstřebatelných šroubů a dlah a používá se často v maxilofaciální chirurgii, zejména u dětí. Jedním z nejstarších zástupců je Lactosorb®, což je materiál s 82% PLLA a 18% PGA [Fassmann et al., 2006]. K jeho resorpci dochází podle výrobce do 12 měsíců. Dále se PLGA používá jako trojrozměrná strukturální podpora v tkáňovém inženýrství.

Polykapronolakton (Poly- ϵ -kaprolakton - PCL) je syntetický biodegradabilní alifatický polymer. Jeho polymerace je založená na otevření kruhu ϵ -kaprolaktonu s použitím katalyzátoru. Tento materiál je degradován hydrolýzou a má podobné mechanické vlastnosti jako lidská trabekulární kost [Eshraghia et Das 2010]. Je možné jej vyrobit jako solidní PCL nebo jako porózní PCL. Materiál může být obráběn selektivním laserovým sintrováním (selective laser sintering - SLS) a mohou z něho být vyrobeny lineární, ploché i trojrozměrné objekty o definované porositě [Eshraghia et Das 2010]. Tento materiál nemá osteokonduktivní ani osteoindukční vlastnosti, což snižuje možnosti jeho použití v tkáňovém inženýrství. Navázání růstových faktorů, např. BMP, do kostry tohoto materiálu tyto vlastnosti zlepšuje [Zhang et al., 2010]. Zhang et al (2010) sledovali efekt PCL s adsorbovaným rhBMP-2 a PCL přímo konjugovaného s rhBMP-2. Autoři prokázali, že PCL v konjugované variantě výrazně zvyšoval genovou expresi pro markery osteogeneze (ALP, osteokalcin, kolagen I. typu) u potkaních mezenchymálních kmenových buněk z kostní dřene –rBMSCs [Zhang et al., 2010].

Nenasycené polyestery

Polypropylen fumarát (Polypropylene fumarate - PPF) je syntetický nenasycený lineární polyester. Každá jednotka PPF obsahuje nenasycenou vazbu, kterou můžeme využít k zesíťování. K tomuto procesu lze využít různých chemických sloučenin, a tím ovlivnit výslednou mechanickou a biologickou povahu vzniklého PPF. Propylen fumarátu je používáno v tkáňovém inženýrství k náhradě mechanicky namáhaných kostí. Má osteokonduktivní vlastnosti. Degradace PPF probíhá hydrolýzou na fumarát a

propylenglykol. Tyto produkty jsou v těle metabolizovány [Sabir et al., 2009]. Degradace PPF závisí na mnoha faktorech jako jsou molární hmotnost, činidlo použité při zesíťování, denzita zesíťování, velikost pórů, velikost implantované matrix, pH okolí a také další kopolymery [Sabir et al., 2009], [Hedberg et al., 2005].

Lee et al. (2011) použili fotokopolymeru PPF a diethylfumarátu (DEF) k vytvoření 3D přesně definované matrix. Použili metody mikrostereolihografie (MSTL), která byla popsána výše. Takto vytvořenou matrix nasýtili kuličkami z PLGA s adsorbovaným rekombinantním lidským kostním morfogenním proteinem (rhBMP-2). Takto vzniklou matrix testovali *in vitro* na kultuře preosteoblastů a pozorovali osteogenní diferenciaci. Dále materiál testovali *in vivo* na potkaním modelu v defektu kalvy. Materiál PPF+DEF+PLGA+rhBMP-2 měl signifikantně vyšší osteogenní potenciál než tradiční PLGA sycené rhBMP-2 [Kang et al., 2011].

Lee et al (2008) použili *in vitro* čtyř různých koncentrací hydroxyapatitu v kopolymeru s PPF. Testovali jejich vlastnosti. Zjistili, že v žádné skupině se nezlepšily mechanické vlastnosti PPF s přidaným hydroxyapatitem. PPF má dobré mechanické vlastnosti již sám o sobě. Přidaný hydroxyapatit zlepšil hydrofilní vlastnosti a měl vyšší absorpci sérových proteinů kultury, což vedlo k lepší vazbě, proliferaci a rozšíření preosteoblastů v materiálu [Lee et al., 2008].

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou alifatické polyestery, které jsou produkovány některými mikroorganismy jako forma zásobního uhlíku a energie. Patří mezi látky, které někdy označujeme jako odbouratelné plasty. V minulosti se uvažovalo o jejich tovární výrobě jako náhradě za plasty vyráběné z ropy. Jejich výroba je dražší než výroba plastů z ropy. Polyhydroxybutyrát má podobné vlastnosti jako polyethylen. Pro náhradu polyethylenu se vzhledem k ceně užívá sporadicky. Na rozdíl od něj je polyhydroxybutyrát rozložitelný v řádu měsíců [Obruča 2007]. Podle Obruči (2009) byly provedeny pokusy, jak extrahovat tyto látky z bakterií v průmyslovém měřítku, a tak je cenově přiblížit polyetylenu z ropy. V minulosti se tento postup prováděl kultivací bakterií v nádržích, což bylo ekonomicky náročné. V poslední době se zkouší produkce pomocí transgenních rostlin. Pro tkáňové inženýrství jsou využitelné zejména poly 3-hydroxybutyrát (PHB), kopolymery 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerát (PHBV), poly 4-hydroxybutyrát (P4HB), kopolymery 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyhexanoátu (PHBHHx) a poly 3-hydroxyoctanoát (PHO). Mají dobrou biodegradabilitu a biokompatibilitu [Qiang Chen et Wu 2005]. V medicíně a tkáňovém inženýrství se používají např. na šicí materiál, hřeby, chirurgické sítky, záplaty pro kardiovaskulární chirurgii, ortopedické piny, stenty, při řízené tkáňové regeneraci (ŘTR/GTR) a další [Qiang Chen et Wu 2005]. Vlastnosti polyhydroxyalkanoátů určuje mísení jednoho PHA s jiným a jejich vzájemný poměr, modifikace povrchu, smísení s jinými polymery nebo anorganickými sloučeninami [Qiang Chen et Wu 2005].

Doyle et al. (1991) ukázali, že materiály na základě polyhydroxybutyrátu (PHB) jsou vhodné pro kostní tkáňové inženýrství a nevykazují zánětlivou reakci v 12ti měsíčním sledování [Qiang Chen et Wu 2005], [Doyle et al., 1991].

Polyethylenglykol

Polyethylenglykol (PEG), syntetický polyethylenoxid – PEO, polyoxyetylen - POE), je nejvýznamnějším polyetherem. PEG je široce používaný jako biomateriál pro svoji rezistenci k biodegradaci. Polyethylenglykolové materiály mohou být ve tkáňovém inženýrství chemicky modifikovány bioaktivními molekulami, peptidy, heparinem. V

kombinaci s kmenovými buňkami mohou sloužit jako náhrady kosti, chrupavky, nervové tkáně, jater a cév [Willerth et Sakiyama-Elbert 2008].

Syntetické peptidy

Syntetické peptidy mohou tvořit dvojrozměrné, ale i trojrozměrné struktury. Tkáňová diferenciací závisí výrazným způsobem na interakci buněk navzájem a buněk s prostředím, tj. s extracelulární matrix. Materiály používané v tkáňovém inženýrství musejí splňovat více podmínek, než jen požadavek na pouhou toleranci, tj. absenci toxicity, teratogenity, kancerogenity. Materiál nazýváme bioaktivním, když aktivně podporuje vazbu buněk a vlastního bioaktivního materiálu a podílí se na jejich diferenciaci a růstu. Z bioaktivního přístupu ke konstrukci tkáňových náhrad vychází i příprava peptidových sítí jako 2D a 3D extracelulární podpůrné matrix. Tato struktura váže buňky specificky. Buňky, které se mají diferencovat nebo kolonizovat takový materiál, s ním interagují ve velké šíři. O povaze těchto interakcí s umělým materiálem rozhodují jeho povrchové fyzikální a chemické vlastnosti, jako je polarita, smáčivost, přítomnost určitých chemických funkčních skupin na povrchu materiálu (význam mají např. skupiny s obsahem kyslíku, aminoskupiny), dále elektrický náboj, elasticita či hrubost povrchu, solubilita, pH, a rovněž jeho topografie [Bačáková et al., 2004], [Vagaská et al., 2010]. Buňky interagují s extracelulární komponentou pomocí buněčných adhezivních molekul (CAM – cell adhesion molecules). Jsou to proteiny umístěné na povrchu buněk, zajišťující vazby mezi buňkami navzájem a mezi buňkami a extracelulární matrix. Jsou nepostradatelné ve fázi embryonálního vývoje v soudržnosti buněk a tkání [Ganong et al., 1995]. Jednou ze skupin adhezivních molekul jsou integriny, které hrají roli v adhezi, buněčné signalizaci, tvaru buněk, mobilitě a v regulaci buněčného cyklu. Ubikvitérním receptorem buněčných integrinů je oligopeptid ve složení arginin-glycin-kyselina asparagová (RGD). Podobně existují další sekvence aminokyselin, které zprostředkovávají vazbu na adhezivní molekuly specifických buněk. Jsou to např. lysin-arginin-serin-arginin (KRSR) s vazbou na osteoblasty [Nelson et al., 2006], arginin-kyselina glutamová-kyselina asparagová-valin (REDV) s vazbou na endotelové buňky, KQAGDV s vazbou na buňky hladké svaloviny cév, IKVAV na neurony, aj. Navázání těchto oligopeptidů na extracelulární syntetickou matrix umožňuje specificky vázat konkrétní buňky obvykle přes receptory – tkáňové integriny [Bačáková et al., 2004]. Tyto peptidy obsahují jak vazebné skupiny pro specifické buněčné linie, tak se spojují spontánně do polymerních struktur. V anglosaské literatuře se označují jako self-assembling scaffolds. Jsou založeny na stále se opakujícím monotonním úseku aminokyselin.

Biokeramika

Keramických materiálů se používá často. Z aloplastických materiálů představují přibližně 60 % všech náhrad kostní tkáně [Laurencin et Khan 2009].

Beta-trikalcium fosfát (β -TCP) je stechiometricky podobný amorfnímu biologickému prekurzoru kosti, je osteokonduktivní a na rozdíl od hydroxyapatitu je TCP více degradován. V organismu je částečně metabolizován na hydroxyapatit a je snadněji resorbován než hydroxyapatit [Fassmann et al., 2006b]. Přesto přetrvávají po pěti letech ostrůvky TCP v tkáních [Lane 1995]. Lze jej použít v kombinaci s dalšími materiály. Zhang et al., (2008) testovali osteogenní aktivitu β -TCP s použitím rat bone marrow stromal cells (rBMSCs). Po 4 a 8 týdnech byly vzorky vyšetřeny histologicky. Ve skupině

β -TCP došlo k nárůstu novotvořené kosti o 1,3 % resp. 4,7 %. Ve skupině β -TCP+rBMSCs (potkaní mezenchymální kmenové buňky z kostní dřevě) byl nárůst mnohem vyšší, o 6,3 % resp. 21,5 % [Zhang et al., 2008]. Tento experiment ukazuje osteokonduktivní schopnosti β -TCP, které se zvyšují při použití kmenových buněk.

Hydroxyapatit (HAP) je podobnější lidské kosti a je původní anorganickou složkou kosti [Lane 1995]. Jde o přirozenou formu vápníku a fosforu resp. apatitu se vzorcem $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Jedná se o keramický materiál. Je schopen vytvářet přímé vazby s kostí. Bohužel má poměrně slabé mechanické vlastnosti, proto se jeho aplikace omezují na použití do nepříliš namáhaných míst. Používá se ve více formách [Rýglová 2006]:

a) Čistý hydroxyapatit má malou pevnost v ohybu a není mechanicky odolný. Přípravuje se dvěma hlavními způsoby: mokrou cestou (srážením, hydrotermální technikou, hydrolyzou kalcium fosfátu) a reakcemi v pevném stavu – sintrováním [Rýglová 2006]. Vyznačuje se dobrou biokompatibilitou. Porozita, krystalická struktura a velikost povrchu mají vliv na vlastnosti hydroxyapatitu, zejména na resorpci a klinické vlastnosti. Konkrétní vlastnosti čistého hydroxyapatitu vyplývají z charakteru komerčně vyráběných materiálů. Hydroxyapatit je osteokonduktivní, je dobře snášen a často se používá v kombinaci s TCP.

b) Hydroxyapatitové keramické kompozity mohou tvořit několik druhů výztuží [Rýglová 2006] – částice, destičky, vlákna apod. Výztuž v hydroxyapatitových kompozitech sice zvyšuje pevnost a houževnatost, ale může dojít k poklesu biokompatibility. Příměsi mohou také podporovat rozklad HAP na β -TCP vedoucí ke zvýšení biodegradability. Hlavní výhodou keramických kompozitních materiálů jsou lepší mechanické vlastnosti než u čistého hydroxyapatitu a minimální tkáňové reakce. Příkladem hydroxyapatitových keramických kompozitů jsou HAP/ β -TCP [Rýglová 2006].

c) Hydroxyapatitové kompozitní materiály s bioaktivním sklem představují heterogenní skupinu komerčně dostupných bioaktivních skleněných keramik. Tato velká skupina materiálů má nejrozumnější biologickou vazbu ke tkáním. Některé se vážou k měkkým tkáním i ke kosti (Bioglass®), další mají afinitu jen ke kosti (Ceravital). Některá tato skla se ke kosti ani k měkkým tkáním neváží a jsou odbourána během několika týdnů. Obecně platí, že bioaktivní skleněná keramika s adsorbovanou tenkou vrstvou hydroxyapatitu usnadňuje kostní vazbu k těmto materiálům. Kombinace hydroxyapatitu s bioaktivním sklem vede ke zlepšení mechanických vlastností bez změny degradability a bez snížení bioaktivity. Nejčastěji se používají pro méně mechanicky namáhané aplikace. Nejvýznamnějším zástupcem je bioaktivní sklo 45S5, komerčním názvem Bioglass®. Tato bioaktivní keramika byla objevena profesorem Larry Henchem na Floridské univerzitě ke konci 60. let jako reakce na potřebu bioaktivního materiálu k náhradě kostních defektů u veteránů války ve Vietnamu. Hlavní výhodou je dobrá biokompatibilita a velmi nízká tendence k formování fibrózní tkáň. Nevýhodou je nízká pevnost. Prvním užitím tohoto materiálu byla náhrada kůstek středního ucha u pacientů s převodní nedoslýchavostí. Materiál může být používán i v rekonstrukční chirurgii. Ve srovnání s autologní kostí má bioaktivní keramika menší uplatnění a vykazuje menší formaci kostní hmoty v pokusu na králících [Trindade-Suedam et al., 2010].

d) Hydroxyapatitové polymerní kompozity vykazují horší mechanické vlastnosti než lidská kost, proto se jich neuzívá v místech s vyšší zátěží [Rýglová 2006]. Jsou známy

např. hydroxyapatit s polyethylenem. S rostoucím obsahem hydroxyapatitu stoupá pružnost a bioaktivita, naopak klesá houževnatost. Nejsou však biodegradabilní, přítomnost bioinertního polyethylenu snižuje schopnost vazby s kostí. Hydroxyapatit s kolagenem má podobné složení jako kost, ale už ne tak komplexní mikrostrukturu. Stále vykazuje slabé mechanické vlastnosti, ale vyšší osteokonduktivitu než samotný HA nebo kolagen. Proto jsou považovány za efektivní výplně do větších defektů.

Coralline je materiál složený zejména z CaCO_3 , izolovaného ze skeletu mořských korálů. Struktura tohoto materiálu je podobná struktuře lidské kosti, ale je křehčí. Tento materiál se používá již od roku 1980. Umožňuje vrůstání nově tvořených cév a je osteokonduktivní i osteoindukční. Materiál se liší velikostí své porozity. Mygind et al., (2007) zkoumali velikost těchto pórů na rychlost osteogenní diferenciaci lidských mezenchymálních kmenových buněk a zjistili, že póry menší než 200 mikronů lépe stimulují osteogenezi [Mygind et al., 2006]. Geiger et al., (2007) použili coralline jako matrix a testovali hojení defektu vřetenní kosti u králíka s použitím kmenových buněk. Testovali králíčí mezenchymální kmenové buňky z kostní dřevě (BMSCs) samotné, BMSCs infikované pomocí plasmidu genem pro VEGF-A a samotný plasmid-VEGF-A. Zjistili, že nejvyšší procento angiogeneze měly skupiny se samotným plasmidem-VEGF a BMSCs infikované plasmidem-VEGF-A. Nejvyšší procento novotvorené kosti ale měla skupina neinfikovaných BMSCs. Tato práce ukazuje, že coralline je vhodným materiálem, je dobře odbouráván a nevykazuje nežádoucí tkáňové reakce [Geiger et al., 2007].

3.3 Růstové faktory

Růstové faktory jsou velkou skupinou látek obvykle proteinové a steroidní povahy, které se účastní interakce s buněčnými receptory. Na obecné úrovni zajišťují [Varkey et al., 2004], [Chen et al., 2010] : chemotaxi, morfogenezi, apoptózu, mají mitogenní efekt, metabolický efekt či kombinaci výše popsaných efektů. Růstové faktory řídí proliferaci, diferenciaci, růst, dělení a apoptózu buněk [Varkey et al., 2004], [Chen et al., 2010]. Jde o širokou rodinu chemických substancí, které nejčastěji působí autokrinním, juxtakrinním, parakrinním a endokrinním způsobem. V kostním tkáňovém inženýrství se používá těchto látek často. Využívají se třemi způsoby: a) používá se jich přímo s kostní matrix; b) genem pro růstový faktor infikujeme vnímavou populaci buněk, jež bude tento faktor zvýšeně produkovat; c) kmenové buňky dostatečně namnožené v odpovídajícím mediu a odpovídající matrix budou růstové faktory spontánně produkovat. Nejčastěji se používá kostních morfogenních proteinů (BMP), vaskulárních endoteliálních růstových faktorů (VEGF), transformujících růstových faktorů beta TGF- β , destičkových růstových faktorů PDGF a růstových diferenciacních faktorů GDF. Do této kategorie se řadí také krevní plazma bohatá na trombocyty (PRP) a na trombocyty bohatý fibrin (PRF). Nejedná se o jasně biochemicky definovanou látku. Jde o koncentrát destiček, který prostřednictvím alfa-granul trombocytů přináší unikátní směs růstových faktorů. V devadesátých letech 20. století se růstové faktory testovaly v monoterapii. Postupně se objevovaly studie s kombinacemi těchto látek. Po roce 2000 jsou poměrně časté práce s transfekcí genů pro růstové faktory do vnímavých buněk, obvykle pomocí adenovirů.

Skupina transformujícího růstového faktoru beta

Transformující růstový faktor beta (Transforming Growth Factor β - TGF- β) je skupinou mnoha cytokinů, a proto je v anglické literatuře označována jako superfamily – superrodina. Tyto cytokiny sestávají ze strukturálně podobných regulačních proteinů. Jméno získaly podle prvního objeveného zástupce této skupiny TGF- β 1, popsaného v roce 1983 [Assoian et al., 1983]. Celá rozsáhlá skupina se skládá s homo- nebo heterodimerů spojených disulfidovým můstkem. Tyto cytokiny zahrnují skupinu **TGF- β** s izoformami TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, kostní morfogenetický protein – (angl. bone morphogenetic protein – **BMP**) s přibližně 20 zástupci, skupinu růstových a diferenciačních faktorů (growth and differentiation factor - **GDF**), skupinu **aktivinů/inhibinů** (aktivin A, AB, B, inhibin A, B), dále skupinu gliálního neurotrofického faktoru (angl. glial cell-derived neurotrophic factor - **GDNF**) a několik dalších členů jako např. MIH (angl. Müllerian inhibiting substance). Viz tabulka 4. [Knight et Glister 2006].

Tabulka 4 - Skupina transformujícího růstového faktoru beta TGF- β :

Podskupiny TGF- β	Anglický název	Zkratka
Kostní morfogenní proteiny	Bone Morphogenetic Proteins	BMP
Růstové a diferenciační faktory	Growth Differentiation Factors	GDF
Gliální neurotrofický faktor	Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor	GDNF
Transformující růstový faktor beta	Transforming Growth Factor Beta	TGF-beta
Aktivin/Inhibin	Activins/Inhibins	---
Další TGF-beta Ligandy	---	Zástupci: Lefty, MIH

Zdroj: Knight et Glister (2006)

Na obecné úrovni podskupina TGF kontroluje proliferaci, diferenciaci, buněčné rozpoznávání, apoptózu a embryogenezi od hmyzích druhů až po savce [Shi et Massagué 2003].

TGF- β ligand se váže na serin/threonin kinasový receptor na porchu buňky. Kaskádovou fosforylací dochází k aktivaci SMAD proteinů a tím k přímé regulaci transkripce cílových genů v jádře [Shi et Massagué 2003]. Všechny tři TGF- β se syntetizují v různých buňkách včetně makrofágů. Homodimer TGF- β po syntéze interaguje s Latency Associated Peptide (LAP). Vzniklý protein se nazývá Small Latent Complex (SLC). Tento se spojuje s dalším proteinem Latent TGF- β -Binding Protein (LTBP) za vytvoření ještě rozsáhlejšího proteinového konstruktů: Large Latent Complex (LLC). V této formě se TGF- β vylučuje do extracelulárního prostoru [Rifkin 2005]. Existují čtyři izoformy LTBP (LTBP-1, LTBP-2, LTBP-3, LTBP-4). Mutace alterující LAP nebo LTBP mohou vést k poruše signalizace TGF- β . Myši s mutací v genu pro LTBP-3 nebo LTBP-4 mají stejný fenotyp jako myši s alterovaným genem přímo pro TGF- β [Annes et al., 2003]. Volný a účinný TGF- β může být uvolněn celou řadou různých látek, např. v plazmě plasminem, v cílových tkáních makrofágy, trombospondinem I (glykoprotein zprostředkovávající interakci mezi buňkami a extracelulární matrix). Jméno transformujícího růstového faktoru vychází z pozorování, že TGF byl původně nalezen v extraktech z maligních tumorů a byl vysloven předpoklad, že vede k maligní transformaci [Centrella et Canalis 1985], [Schliephake 2002]. Později bylo zjištěno, že tento růstový faktor inhibuje proliferaci epitelových buněk a je zvýšeně exprimován v epitelálních malignitách. V karcinomu prostaty ztrácejí maligní buňky svůj receptor pro TGF a jsou rezistentní na jeho antiproliferativní působení. Vysoká exprese TGF v těchto tumorech simulovala příčinu nádorového růstu [Schliephake 2002],

[Wilkstrom et al., 2001]7,8. V hepatocelulárním karcinomu byla zvýšená exprese TGF pozorována a je spojena se ztrátou schopnosti apoptózy [Schliephake 2002], [Rossmannith et Schulte-Hermann 2001]. Při embryogenezi hraje TGF- β důležitou roli. Ztráta aktivity nebo defekt receptorů vede ke zvýšení perinatální mortality [Schliephake, 2002], [Duneas et al., 1998]. TGF- β hraje zřejmě roli při srůstu švů lebky v průběhu růstu lebečních kostí [Schliephake 2002]. V kostní tkáni byly nalezeny všechny tři izoformy TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3). Dominantní úlohu v kostní regeneraci hraje ve srovnání s ostatními izoformami TGF- β 1 [Virolainen et al., 1998]. TGF- β stimuluje časnou proliferaci osteoblastů a limituje diferenciaci pozdních stádií osteoblastů. Použití TGF- β v kostním tkáňovém inženýrství v monoterapii přineslo nejednoznačné výsledky.

Nikolidakis et al. (2009) studovali titanové zubní implantáty, které zavedli do stehenní kosti ovce. Zjistili, že čisté titanové implantáty měly největší procento osseointegrace. Signifikantně nižší úroveň osseointegrace měly implantáty spolu s 1,0 μ g TGF- β 1. Negativní efekt na osseointegraci měla dávka 0,5 μ g TGF- β 1 [Nikolidakis et al., 2009]. Tielinen et al., (2002) použili 50 μ g TGF- β 1 do defektu stehenní kosti u potkana spolu s celulosou a PLLA. Po 3 týdnech nebyl mezi skupinami léčenými TGF- β 1 a neléčenými žádný rozdíl v přírůstku kosti.[Tielinen et al., 2002] Hong et al., (2000) testovali TGF- β 1 spolu s želatinou na defektu kalvy u králíka. Prokázali signifikantně vyšší nárůst kostní hmoty ve skupině s TGF- β 1 [Hong et al., 2000]. Méně obvyklým testem se zabývali Sumner et al., (2006). Testovali mechanickou pevnost zavedeného titanového implantátu do pažní kosti psa. Zjistili aditivní efekt rhTGF-beta2 and rhBMP-2. Skupina s těmito růstovými faktory měla nejvyšší pevnost implantátu 28 dní od zavedení [Sumner et al., 2006]. Ehrhart et al., (2004) potvrdili signifikantně vyšší novotvorbu kosti s použitím rhTGF-beta1 v želatinovém nosiči v defektu loketní kosti u králíka [Ehrhart et al., 2004]. Simmons et al., (2004) využili potkaních kmenových buněk z kostní dřevě (rat bone marrow stem cells - rBMSCs) spolu s alginátem. Testovali efekt kombinace TGF- β 3 a BMP-2 na eventuální řízené uvolňování růstových faktorů z alginátu. Alginát kovalentně upravili navázáním peptidových ligandů RGD. Použili ektopický model myši. Zjistili, že společné použití TGF- β 3 a BMP-2 ukázalo nejvyšší novotvorbu kosti [Simmons et al., 2003]. Li et al., (2014) provedli méně obvyklý postup. Použili chitosanovou membránu s TGF- β 1, kterou překryli obnaženou zubní dřevě na psím modelu a testovali novotvorbu dentinu. Popsali, že chitosanová membrána obsahující TGF- β 1 zajistila 3–6 \times vyšší novotvorbu reparativního dentinu [Li et al., 2014]. Ferreira et al., (2013) provedli obsáhlé testování TGF- β 1 a BMP-4, jednotlivě spolu s PBS, jednotlivě spolu s liposomy a dohromady. Zjistili, že signifikantně nejvyšší nárůst nové kosti měly skupiny s liposomy s TGF- β 1, s BMP-4 a TGF- β 1+ BMP-4. Mezi těmito skupinami již rozdíly nebyly [Ferreira et al., 2013]. Porovnání úspěšnosti TGF- β 1 viz tabulka 5.

Tabulka 5 - Porovnání úspěšnosti TGF- β 1

Růstové faktory/ kmenové buňky	Matrix	Model	Metoda analýzy	Výsledek	Ref.
TGF- β 1	Titanový implantát	Titanové implantáty implantované do kondylu femuru ovce	Histomorfometrie	Použití TGF- β1 mělo signifikantně negativní vliv na osseointegraci. Čistý titan vykazoval nejlepší kontakt s kostí.	Nikolidakis et al. al., (2009)
TGF- β 1 50 μ g	Poly-lD-lactic acid (PLLA)	Defekt femuru u potkana	RTG, histologie	Histologicky bez rozdílů mezi skupinami.	Tielinen et al., (2002)
TGF- β 1 0.5 μ g	Želatina	Defekt lebky u králíka	RTG, histologie	Želatina s TGF- β1 měla nejvyšší nárůst novotvořené kosti. Samotná želatina a samotné TGF- β 1 singifikantně nižší novotvorbu kosti	Hong et al., (2000)
12 μ g rhTGF- beta2/ 25 μ g rhBMP-2	Titanový implantát	Humerus u psa	Mechanické testování	Aditivní efekt v mechanické stabilitě titanového implantátu při Použití rhTGF- beta2 ad rhBMP-2 dohromady	Sumner et al., (2006)
rhTGF- β 1	Želatina	Defekt ulny u králíka	Histomorfometrie RTG	Signifikantně vyšší novotvorba kosti ve skupině s TGF- β1 než ve skupině se samotným nosičem	Ehrhart et al., (2004)
20 ng TGF- β 3 200 ng BMP-2 rBMSCs	Alginát ozářený gama zářením upravený RGD*	Ektopický model u myši	Histomorfometrie	Neozářený alginát: bez efektu. Ozářený alginát: skupina TGF- β3 s BMP-2 se signifikantně vyšší novotvorbou kosti.	Simmons et al., (2004)
2 μ g rhTGF- β 1	chitosanová membrána	Uzávěr obnažené zubní pulpy testovaným materiálem u psa	Histologie	Chitosanová membrána obsahující TGF- β1 zajistila 3–6x vyšší novotvorbu reparativního dentínu.	Li et al., (2014)
20 ng TGF- β 1 20 ng BMP-4	Lipozomy	Hojení rány po extrakci stoličky u potkana	Histomorfmetrie imunohistochemie fibronektin (FN) a kolagen typ III	Signifikantně vyšší novotvorba kosti ve skupinách TGF- β1, BMP-4 a TGF- β1+ +BMP-4 oproti kontrole. Tyto skupiny se navzájem signifikantně nelišily.	Ferreira et al., (2013)

* RGD - oligopeptid ve složení arginin-glycin-kyselina asparagová

Z výše popsaného vyplývá, že nejlepším kandidátem v rámci skupiny TGF je izoforma TGF- β 1 [Nikolidakis et al., 2009], [Honk et al., 2000], [Ehrhart et al., 2004], [Li et al., 2014], [Ferreira et al., 2013].

Část výsledků zůstává kontroverzní [Sumner et al., 2006]. Jak bylo popsáno výše, dominantní úlohu v této skupině má izoforma TGF- β 1 ale i ostatní izoformy mají

pozitivní efekt na novotvorbu kosti [Sumner et al., 2006], [Simmons et al., 2004]. Skupina TGF patří spolu s BMP ke zlatému standardu kostního tkáňového inženýrství.

Kostní morfogenní protein – BMP

Poprvé osteoinduktivní aktivitu BMP pozoroval M. R. Urist v 60. letech 20. století. Předpokládal, že demineralizovaná a lyofilizovaná kost obsahuje látku s osteoindukční aktivitou [Urist 1965]. Vlastní název "Bone Morphogenetic Protein" navrhl Urist v roce 1971 [Urist et al., 1971]. Dlouho nebylo jasné, jaké látky se za touto schopností skrývají. V 80. letech byl purifikován BMP-3 (osteogenin) a izolován lidský BMP-2 a BMP-4 [Wozney et al., 1988].

Studie na transgenních myších ukázaly, že BMP hraje důležitou roli ve vývoji srdce, chrupavky a nervového systému. BMP má také důležitou roli při formování kosti [Chen et al., 2004]. Dnes BMP představují celou skupinu více než 20 proteinů. Sedm z nich má osteoinduktivní vlastnosti [Riley et al., 1996]. Přehled jednotlivých BMP s jejich funkcí viz následující tabulka 6.

Tabulka 6 - Přehled jednotlivých BMP s jejich funkcí

Typ BMP	Synonymum	Funkce
BMP-1	---	Formování chrupavky <i>in vivo</i> , je metaloproteinasou, není součástí skupiny TGF- β
BMP-2	BMP-2a	Embryonální vývoj chrupavky a kosti
BMP-3	Osteogenin	Indukuje osteogenezi
BMP-4	BMP-2b	Enchondrální osifikace. Snížená exprese byla popsána u fibrodysplázie
BMP-5		Vývoj chrupavky, podílí se na vývoji trabekulární kosti. Potenciální role v etiopatogenezi glaukomu
BMP-6	VGR	Exprimuje se v časně embryogenezi. Má vztah k BMP-5 a BMP-7, spekuluje se o jeho osteoindukční funkci. Kontroluje metabolismus železa cestou hepcidinu.
BMP-7	OP-1	Indukce osteogeneze podporou diferenciací osteoblastů
BMP-8a	---	Není zjištěno
BMP-8b	OP2, BMP8	Spekuluje se o osteogenním potenciálu
BMP-10	---	U myši se podílí na vývoji srdce
BMP-11	GDF-11	Řazeno mezi GDF
BMP-12	GDF-7	Řazeno mezi GDF
BMP-13	GDF-6	Řazeno mezi GDF
BMP-14	GDF-5	Řazeno mezi GDF
BMP-15	GDF9B	Maturace oocyty, vývoj ovariálního folikulu. Defekt v genu pro BMP-15 vede k ovariální dysgenezi

Zdroj: Genová banka americké Národní lékařské knihovny, www.ncbi.nlm.nih.gov/gene

Transdukce signálu BMP probíhá přes serin/threonin - kinasovou kaskádu. Tato kaskáda je stejná pro celou TGF-beta skupinu, a proto se BMP do této skupiny řadí. Přes kaskádu fosforylací je uvolněn transkripční faktor, který v jádře přímo reguluje transkripci DNA. Na základě sekvence aminokyselin můžeme osteoinduktivní BMP rozdělit do několika skupin: BMP-2/-4 a skupinu osteogenetického proteinu-1 neboli skupinu OP-1, kam patří BMP-5 až BMP-8. BMP se skládá ze 2 polypeptidových podjednotek spojených disulfidovými můstky. Podle toho můžeme BMP rozdělit na homodimery a heterodimery. *In vivo* nebyly heterodimery nalezeny [Diederik et al., 2010].

Zheng et al., (2010) porovnávali účinek heterodimerů rekombinantního humánního BMP2/7 (rhBMP2/7). Pozorovali, že tento heterodimer indukuje osteogenezi a migraci buněk v signifikantně nižší koncentraci než homodimery rhBMP-2 a rhBMP-7. V této studii autoři pozorovali, že stejné koncentrace heterodimerů rhBMP2/7 vedou k několikanásobně vyššímu depozitu vápníku než stejné koncentrace rhBMP-2, respektive rhBMP-7. Stejného efektu je pak možné dosáhnout s nižšími koncentracemi rhBMP2/7 [Zheng et al., 2010].

Smith et al., (2008) testovali použití kolagenové trojrozměrné matrice spolu s rhBMP-2 na králících. Ve skupině s rhBMP zaznamenali signifikantně vyšší zhojení defektů v kalvě jak s použitím 2D a 3D CT, tak i histologicky [Smith et al., 2008].

Hong et al., (1998) použili rhBMP-2 v hydrogelové matrici. Po 21 dnech pozorovali signifikantně vyšší denzitu kosti s použitím rhBMP-2 [Hong et al., 1998].

Zajímavou studii předložili Zheng et al., (2006). Testovali standardní a zvýšenou rychlost distrakce mandibuly u králíka. Zrychlená distrakce dosáhla trojnásobků obvyklých hodnot. U králíka byl podáván rhBMP na jednu stranu distrahovaného úseku. Podle mikroCT a histologické morfometrie není statisticky signifikantní odchylka mezi pomalou a rychlou distrakcí. Jinak řečeno, rhBMP zajistí stejně dobrou osteogenezi i u rychle distrahovaných částí dolní čelisti u králíka [Zheng et al., 2006].

Alonso et al., (2010) provedli klinické testování na 16 pacientech s rozštěpem rtu a patra. Pacienti byli randomizováni do 2 skupin. Chybějící kost v horní čelisti byla u pacientů 1. skupiny nahrazena autologní kostí z lopaty kosti kyčelní. U 2. skupiny byla použita resorbovatelná kolagenní matrix s rhBMP-2. Po 12 měsících od výkonu byl defekt v horní čelisti u 1. skupiny zaplněn z 65 % a ve druhé skupině z 83,8 %. Autoři hodnotí výsledek jako velmi dobrý, zvláště s přihlédnutím ke snížení morbidit eliminací dalšího operačního výkonu v místě odběru kosti (angl. donor site morbidity) [Alonso et al., 2010].

Bessa et al., (2010) použili partikulí fibroinu z hedvábí, do kterých uzavřeli rhBMP-2. Experiment prováděli *in vitro* i *in vivo*. *In vitro* byla po dvou týdnech aktivita ALP a mineralizace vyšší ve skupině enkapsulovaného rhBMP-2 než ve skupině rhBMP-2 přidaného jako roztok do testovaného media. *In vivo* použili enkapsulovaného rhBMP-2 do mikropatikulí fibroinu na potkaním ektopickém modelu osteogeneze. Histologicky a pomocí mikroCT pozorovali po dvou a čtyřech týdnech od implantace zvýšenou ektopickou novotvorbu kosti při použití 5 nebo 12,5 µg rhBMP-2. Nebyla pozorována žádná cytotoxicita. Autoři se domnívají, že se jedná o možný model ke klinickému testování [Bessa et al., 2010].

Ling-ling et al., (2010) studovali interakce mezi stromálními buňkami z tukové tkáně potkana – potkaní kmenové buňky z tukové tkáně (rat adipose derived stromal cells - rASCs), rhBMP-2 a beta-TCP. Po 12 týdnech nepozorovali signifikantní rozdíl v novotvorbě kosti mezi skupinami beta-TCP/rhBMP-2 a beta-TCP. Signifikantně vyšší nárůst kosti byl u skupiny rASCs/b-TCP oproti skupině beta-TCP. Ale nejvyšší nárůst novotvorby kosti byl u skupiny s kmenovými buňkami s beta-TCP i rhBMP-2 [Ling-Ling et al., 2010].

Velká část studií se věnuje testování optimální koncentrace příslušného růstového faktoru. Jiang et al., (2009) testovali optimální dávku rhBMP-7. Na modelu mezenchymálních kmenových buněk z kostní dřeně (angl. human bone marrow mesenchymal stem cells; hBMSCs) *in vitro* testovali vzestupné dávkování rhBMP-7 [Jiang et al., 2009].

Hsu et al., (2007) použili lentivirus jako vektor pro gen pro BMP-2, kterým infikovali potkaní MSC (rBMSCs). Pozorovali, že takto infikované buňky byly schopné dlouhodobé produkce BMP-2 *in vivo* a *in vitro* byly schopné novotvorby kosti [Hsu et al., 2007].

Z výše uvedeného je patrné, že BMP má významné osteoinduktivní účinky. Účinnějším je heterodimer rhBMP2/7 [Zheng et al., 2010]. Použití kmenových buněk různých linií s rhBMP vede k většímu nárůstu kosti [Ling-Ling et al., 2010], [Jiang et al., 2009]. Porovnání efektu proteinů ze skupiny BMP spolu s jinými růstovými faktory a s kmenovými buňkami viz tabulka 7.

Tabulka 7 - Porovnání úspěšnosti různých podtypů BMP na různých modelech

Růstové faktory/ kmenové buňky	Matrix	Model	Výsledek	Ref.
BMP-4/ autologní kost	Kolagen I	Nezhojené fraktury tibie u člověka	BMP na kolagenním nosiči mělo stejné výsledky jako použití autologní kosti bez morbidit v místě odběru	Friedlaender et al., (2001)
BMP-7/VEGF/ MSC	HA/TCP	Ektopická intramuskulární implantace u myši	Bez efektu*	Roldán et al., (2010)
VEGF/BMP-2/ hBMSCs	Alginát PDLLA	Defekt femuru u myši	Synergický efekt s použitím VEGF+BMP-2+hBMSCs	Kanczleret al., (2010)
BMP-7/MSCs	Kollagen	Defekt metatarzálních kostí u ovce	Synergický efekt ve skupině MSCs+BMP-7	Di Bella et al., (2010)
PLGA/BMP-2	PLGA+ Želatina	Defekt kondylu femuru u králíka	Bez efektu	Ueki et al., (2003)
ASCs/BMP-2	Kolagen	Defekt kalvy u králíka	Synergický efekt ve skupině BMP-2+MSCs	Smith et al., (2008)
hASC+BMP-2** hASC+vitamin D ₃ hASC+D ₃ +BMP-2	---	<i>in vitro</i>	Synergický efekt hASC+D ₃ +BMP-2**	Song et al., (2011)
VEGF/BMP-2	Polypropylén	Subkutánní implantace/ defekt femuru u potkana	Synergický efekt obou růstových faktorů Žádný rozdíl mezi skupinami VEGF+BMP-2 a samotným BMP-2	Kempen et al., (2009)
BMP-2	PPF+DEF/ PLGA***	Defekt kalvy u potkana	Synergický efekt****	Lee et al., (2011)
Transfekce genem pro BMP-7 a IGF-I genem	---	Fetální buňky z kalvy potkana (fetal rat calvaria -FRC) , <i>in vitro</i>	Synergický efekt@	Yeh et al., (2006)

- * VEGF výrazně zvýšilo angiogenezi, bez zvýšení osteogeneze
- ** Na dávce a času závislý osteogenní efekt vitamínu D₃ a BMP-2 s ASCs
- *** Trojrozměrná matrix vyrobena pomocí mikrostereolithografie (MSTL) s použitím Poly(propylen fumarátu) (PPF)/diethyl fumarátu (DEF) fotopolymeru
- **** Na dávce a času závislý osteogenní efekt vitamínu D₃ a BMP-2 s ASCs
- @ Synergický efekt ve skupině na 3D modelu PPF+ DEF+ PLGA+ BMP-2 v porovnání se skupinou PLGA+ BMP-2

Skupina BMP je nejvíce celosvětově studovanou skupinou růstových faktorů v kostním tkáňovém inženýrství. BMP se testuje *in vitro*, *in vivo*, ale i v preklinických a klinických studiích [Nauth et al., 2011]. V klinickém výzkumu byl BMP testován

zejména v hojení zlomenin [Friedlaender et al., 2001], [Zimmermann et al., 2009], v hojení kostních defektů [Ekrol et al., 2008], [Jones et al., 2006] a ve spinální fúzi [Dimar et al., 2006], [Vaccaro et al., 2004]. Bylo publikováno velké množství prací s BMP. Přesto nelze BMP a ani jiný růstový faktor v současné době považovat za ideální. Dokonce nejsou známy ani kombinace růstových faktorů, které bychom mohli prohlásit za zlatý standard. Tabulka 7 shrnuje rozsah použití BMP samostatně nebo v kombinaci s jinými růstovými faktory, eventuelně kmenovými buňkami.

Vaskulární endotelový růstový faktor - VEGF

Vaskulární endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor - VEGF) byl poprvé popsán Sengerem jako VPF (tumour Vascular Permeability Factor) v roce 1983 [Senger et al., 1983]. Ale až v roce 1989 jej charakterizovali Ferrara et al [Keramarisa et al., 2008], [Ferrara et al., 1989]. Po objevení prvního VEGF označeného jako VEGF-A byly objeveny i další podtypy: VEGF-B, VEGF-C (také nazývaný VEGF-2), VEGF-D, a placentární růstový faktor (placental growth factor - PLGF). Dále byly objeveny i virové endotelové faktory – VEGF-E a endotelové faktory hadího jedu VEGF-F [Ylä-Herttuala et al., 2007], [Ogawa et al., 1998], [Yamazaki et al., 2003]. Každý z výše popsáných VEGF má různé izoformy, které vznikají alternativním sestřihem pre-mRNA do mRNA. Sestřih (angl. splicing) představuje odstranění částí vzniklých prepisem intronů, které nekódují žádnou genetickou informaci. Vzniklé úseky mRNA mohou být různě spojeny a tím vznikají různé izoformy VEGF. V kostním tkáňovém inženýrství má největší význam VEGF-A. Nejdůležitějšími izomery VEGF-A jsou VEGF-A121, VEGF-A165, VEGF-A189, VEGF-A206. Účinek VEGF-A závisí na koncentraci v cílové tkáni. Nízké hladiny VEGF-A zajišťují homeostázu, přežití endotelových buněk, produkci oxidu dusnatého a prostacyklinu. Jinak řečeno v nízkých koncentracích zajišťuje vazodilataci, inhibici růstu buněk hladké svaloviny, mají antitrombotický efekt a celkově vaskuloprotektivní působení [Ylä-Herttuala et al., 2007], [Ylä-Herttuala et al., 2004]. Při vyšších hladinách má vaskulogenní efekt, vede k migraci endotelových buněk, jejich mitóze a vytváření nových cév [Ylä-Herttuala et al., 2007]. Porovnání efektu VEGF spolu s jinými růstovými faktory a s kmenovými buňkami viz tabulka 8.

Tabulka 8 - Porovnání efektu VEGF s jinými růstovými faktory a kmenovými buňkami

Růstové faktory/ kmenové buňky	Matrix	Model	Metoda	Výsledek	Ref.
Tranfekce VEGF-plasmidem/ rBMMSCs	Coralline	Defekt radia u králíka	RTG, μ CT, Histologie imunohistochemie histomorfometrie	Bez efektu na osteogenezi*. Synergický efekt na resorpci matrix.	Geiger et al., (2007)
VEGF	PLGA/ biokeramika/ alginát	Defekt kalvy u potkana	mikroCT, imunohistochemie	Vyšší vaskularizace, bez efektu na osteogenezi.	Leach et al. (2006)
BMP-7, VEGF, MSCs	HA/TCP 60:/40.**	Oboustr. podkožní implantace u myši	ESEM***, Histologie	Bez efektu v jakékoliv skupině	Roldán et al., (2010)

RhVEGF	Kolagen I	Defekt mandibuly u králíka	Histologie, histomorfometrie, imunohistochemie	Bez efektu na osteogenezi, vyšší vaskularizace	Kleinheinz et al., (2005)
*	VEGF- samotné and VEGF-v infikovaných buňkách vedlo k významně vyšší vaskularizaci a resorpci matrix. Nejvyšší stupeň novotvorby kosti byl ve skupině matrix + rBMSCs.				
**	HA – hydroxyapatit, TCP – beta-trikalcium fosfát				
***	Environmental scanning electron microscopy (ESEM)				
@	Skupina I : BMP-7 vs. BMP-7/VEGF; Skupina II: BMP-7 vs. BMP-7/MSCs, Skupina III: BMP-7 vs. kontrola. Plocha novotvořené kosti se významně nelišila				

Geiger et al., (2007) použili coralline jako matrix a testovali hojení defektu radia u králíka s použitím kmenových buněk. Testovali králičí mezenchymální kmenové buňky z kostní dřevě (BMSCs) samotné, BMSCs infikované pomocí plazmidu genem pro VEGF-A a samotný plazmid-VEGF-A. Zjistili, že nejvyšší procento angiogeneze měly skupiny se samotným plazmidem-VEGF a BMSCs infikované plazmidem-VEGF-A. Nevyšší procento novotvořené kosti však měla skupina neinfikovaných BMSCs [Geiger et al., 2007]. Tato práce také ukazuje, že VEGF nezajišťuje osteogenezi, ale působí na ni sekundárně novotvorbou cév. Podobné výsledky představili Leach et al. (2006). Vytvořili polymerní matrix složenou z bioaktivní keramiky (Bioglass 45S®) s kopolymerem kyseliny polymléčné a polyglykolové (PLGA - polylactic-co-glycolic acid) s alginátem a VEGF. Testovali, zda takto vytvořený kompozitní materiál vede k postupnému uvolňování VEGF. Zjistili významně vyšší neovaskularizaci v prvních 2 týdnech. Vliv VEGF na osteogenezi neprokázali [Leach et al., 2006].

Sojo et al. (2005) prováděli distrakci na stehenní kosti potkanů. Ověřili hypotézu, že aktivita VEGF, respektive angiogeneze, časově předchází osteogenezi [Sojo et al., 2005].

Roldán et al., (2010) použili hydroxyapatitový keramický kompozitní materiál s poměry hydroxyapatitu/ β -TCP 60:40 s mezenchymálními kmenovými buňkami (MSCs) a testovali účinnost BMP-7, VEGF, samostatně i dohromady a v kombinacích s MSCs. Na ektopickém modelu myši v žádné skupině nepozorovali vyšší osteogenezi ani v elektronovém mikroskopu, ani histologicky [Roldán et al., 2010]. Na tento výsledek zřejmě měla vliv ektopická implantace subkutánně [Roldán et al., 2010].

Kanczler et al., (2010) testovali VEGF na alginátovém nosiči a BMP-2 na nosiči z obou D, L enantiomérů kyseliny polymléčné – PDLLA s lidskými kmenovými buňkami z kostní dřevě – hBMSCs. V prvních 7 dnech *in vitro* pozorovali zvýšené uvolňování VEGF ve tkáňové kultuře. BMP-2 se uvolňovalo později, ale dosahovalo vyšších hodnot než VEGF do 28. dne. *In vivo* pozorovali osteogenní potenciál u skupiny VEGF/BMP-2/hBMSCs. Autoři považují zvolenou matrix a růstové faktory jako velmi výhodné pro kostní tkáňové inženýrství [Kanczler et al., 2010].

Kleinheinz et al., (2005) vytvořili defekt v mandibule u králíků. Použili Colagen I jako matrix s VEGF. Ve skupině s VEGF nepozorovali ve srovnání s kontrolní skupinou vyšší novotvorbu kosti, ale vyšší denzitu [Kleinheinz et al., 2005]. Ukazuje se, že VEGF je důležitým růstovým faktorem, který nestimuluje novotvorbu kosti přímo, ale podílí se na ní zlepšením angiogeneze.

Destičkový růstový faktor - PDGF

Destičkový růstový faktor (angl. platelet-derived growth factor - PDGF) je dimerický glykoprotein složený ze dvou podjednotek spojených disulfidovou vazbou. PDGF je kódován 4 geny (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C a PDGF-D), které tvoří homodimery (PDGF-AA, -BB, -CC, -DD) a heterodimery PDGF-AB. Obě podjednotky se

mohou kombinovat jako homodimery AA nebo BB nebo jako heterodimery AB. Receptor pro PDGF (PRGFR) patří do skupiny tyrozin-kinásových receptorů a má 2 podtypy PDGFR- α a PDGFR- β . Chung et al., (2009) zkoumali roli PDGF-BB jako potencionálního růstového faktoru pro mezenchymální kmenové buňky po poranění růstových plotének kostí. Autoři experimentálně způsobili poranění růstové ploténky tibie u potkanů. Experimentálním zvířatům injikovali imatinib, inhibitor tyrozin-kinasy. Tento lék se používá v humánní medicíně zejména u myeloidní leukémie. Imatinib blokuje přenos informace o navázání PDGF do buňky a tím eliminuje jeho efekt. Autoři zjistili, že zvířata léčená Imatinibem, inhibitorem PDGFR, vedla k menšímu nárůstu chrupavky a kosti v místě poranění. Prokázali také, že PDGF-BB zvyšuje migraci mezenchymálních kmenových buněk z kostní dřevě do místa poranění [Chung et al., 2009]. To ukazuje na roli PDGF jako chemotaktického faktoru pro vlastní kmenové buňky, PDGF je mitogenem pro mezenchymální buňky [Diederik et al., 2010]. Tento růstový faktor hraje úlohu ve vývoji tkání a orgánů, zejména CNS, cév a glomerulů [Schliephake 2002]. Je důležitý v embryogenezi, zejména gastrulaci, vývoji neurální lišty, vývoji gliových buněk, skeletu, hematopoéze a angiogenezi. Na obecné úrovni má efekt mitogenní, podporuje angiogenezi, buněčnou migraci a proliferaci. Studie na knockout myších ukázaly velkou důležitost tohoto cytokinu. Tak velkou, že knockout myši měly velkou prenatální i perinatální mortalitu, což omezuje možnosti experimentálního studia tohoto faktoru. PDGF je důležitý při patogenezi nádorových a vaskulárních onemocnění. Strukturálně a funkčně je blízký vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru – VEGF3. Po poranění, v rané fázi, destičky agregují a uvolňují PDGF. Tento cytokin působí chemotakticky na neutrofilů, makrofágy a mezenchymální buňky, které poté slouží jako další zdroj PDGF během hojení [Diederik et al., 2010]. K porovnání účinku PDGF spolu s jinými růstovými faktory a s kmenovými buňkami viz tabulka 9.

Tabulka 9 - Porovnání účinku PDGF spolu s jinými růstovými faktory a s kmenovými buňkami

Růstové faktory/ Kmenové buňky	Matrix	Model	Metoda analýzy	Výsledek	Ref
Transfekce genem pro PDGF-b a BMP-7	Biosklofibroin	Defekt femuru potkana	MikroCT, histologie, imunohistochemie (kolagen I typu, osteopontin, BSP)	Synergický efekt PDGF a BMP-7 Signifikantně vyšší novorvorba kosti ve skupině s PDGF-b a BMP-7 ve srovnání s matrix samotnou anebo se samotným BMP-7	Zhang et al., (2012)
PDGF-BB	Vinyl--styrenové partikule	Defekt kalvy u potkana	Histomorfometrie	Vinylstyrenové partikule měly pozitivní vliv na novotvorbu kosti. PRGF-BB mělo negativní vliv na novotvorbu kosti.	Marzouk et al., (2007)
DNA plasmid kódující PDGF-B// <u>BMSCs</u>	Kolagen	Defekt kalvy u potkana	MikroCT, histologie, imunohistochemie	Signifikantně vyšší novotvorba kosti u skupiny infikované plasmidem s genem pro PDGF-B v porovnání s prázdným defektem nebo čistou matrix.	Ross et al., (2014)
PDGF	PDLLA+PLGA mikro-partikule*	Periodon-- tální defekt maxily u	MikroCT, histologie	Signifikantně vyšší objem kosti ve skupině PDLLA-PLGA+Simvastatin +PDGF	Chang et al., (2008)

		potkana		v porovnání s ostatními skupinami.	
rhPDGF versus rhGDF-5	beta-TCP	Periodontální defekt u psa	Histomorfometrie	Signifikantně vyšší novotvorba cementu u rhGDF-5/beta-TCP oproti rhPDGF/ beta-TCP	Kwon et al., (2010)
PDGF versus GDF-5	Kolage-nová mem-brána	<i>In vitro</i> : myši pre-osteoblasty	Hladiny ALP, Runx2, Osteokalcinu	CM/GDF-5 Signifikantně vyšší nárůst ALP, proliferace buněk v porovnání s CM/PDGF nebo CM samotné	Yamano et al. (2014)
DNA plasmid kódující PDGF-B gen// hPLCs**	Chitosan	Subkutánní implantace myši s agenezí thymu	Histologie, imunohistochemie RT-PCR***	HPLCs vykazovaly lepší proliferační aktivitu v matrix s genem pro PDGF-B, tato skupina vykazovala vyšší expresi PDGF-B a kolagenu typu I než skupina s čistým chitosanem.	Zhang et al., (2007)
rhPDGF-BB	Bio-oss©	Čelist u psa	Histologie, imunohistochemie	Signifikantně vyšší novotvorba kosti ve skupině s rhPDGF-BB	Schwarz et al., (2010)

* Partikule z kyseliny polymléčné a polyglykolové: poly-(D-L-lactide) a poly-(D-L-lactide-co-glycolide) (PDLLA-PLGA)

** hPLCs - human periodontal ligament cells

*** RT-PCR - reverse transcription-polymerase chain reaction

Zhang et al., (2012) použili adenoviru jako vektoru k transfekci geny pro PDGF a BMP-7 u ovariektomovaných potkanů s osteoporózou. Zjistili, že v kombinaci mají PDGF a BMP-7 synergický efekt. Signifikantně vyšší novotvorbu kosti pozorovali ve skupině s PDGF-b a BMP-7 ve srovnání s matrix samotnou nebo se samotnou transfekcí genu pro BMP-7 [Zhang et al., 2012]. Marzouk et al., (2007) testovali vinylstyrenové partikule společně s PDGF-BB v defektu kalvy u potkana. Ve skupině s PDGF-BB zjistili negativní efekt růstového faktoru na novotvorbu kosti [Marzouk et al., 2007]. Zhang et al., (2007) použili lidských periodontálních buněk (angl. human periodontal ligament cells – HPLCs) spolu s plazmidem kódujícím gen pro PDGF-B. Zjistili lepší proliferační aktivitu hPLCs v matrix s genem pro PDGF-B. Tato skupina vykazovala vyšší expresi PDGF-B a kolagenu typu I než skupina s čistým chitosanem jako matrix [Zhang et al., 2007]. Elangovan et al., (2014) použili DNA plazmy k transfekci lidských kmenových buněk z kostní dřeně (angl. human bone marrow stromal cells -BMSCs) genem pro PDGF-B. Použili kolagenní matrix v defektu kalvy u potkana. Popsali signifikantně vyšší novotvorbu kosti u skupiny infikované plazmidem s genem pro PDGF-B v porovnání s prázdným defektem nebo čistou matrix [Elangovan et al., 2014]. Chang et al., (2013) použili kopolymeru kyseliny polymléčné a polyglykolové (PDLLA-PLGA) se simvastatinem a PDGF do parodontálních defektů v horní čelisti u potkana. Zjistili signifikantně vyšší objem kosti ve skupině PDLLA-PLGA+Simvastatin +PDGF v porovnání s ostatními skupinami. V této skupině měla parodontální vlákna anatomicky správný tvar a byla inzerována do povrchu kořene se známkami cementogeneze [Chang et al., 2013]. Schwarz et al., (2010) testovali izoformu rhPDGF-BB na defektech mandibuly u psa s použitím deproteinizované bovinní kosti. Potvrdili pozitivní efekt rhPDGF-BB 10, kterého se používalo v devadesátých letech spíše v monoterapii. Po roce 2000 se zkoumaly kombinace růstových faktorů [Kwon et al., 2010], [Yamano et al., 2014] a v posledních letech přibývá prací s úspěšnou transfekcí kmenových buněk genem pro PDGF [Zhang et al., 2012], [Mello et al.,

2014], [Zhang et al., 2007]. Použití vinylstyrenových partikulí jako matrix v kostním tkáňovém inženýrství je neobvyklé a je možné, že tento fakt vedl k negativnímu výsledku při použití PDGF [Marzouk et al., 2007]. Na základě výše uvedeného můžeme konstatovat, že PDGF je dobrým a ověřeným růstovým faktorem v kostním tkáňovém inženýrství.

Růstový a diferenciační faktor – GDF

Růstové a diferenciační faktory (GDF) jsou podskupinou transformujícího růstového faktoru beta (TGF-beta). GDF představují skupinu proteinů, které se exprimují v různých tkáních, regulují embryogenezi, apoptózu, zánětlivou reakci a další procesy. Tato skupina má 15 zástupců: GDF1 – GDF15 viz tabulka 10.

Tabulka 10 - Přehled jednotlivých GDF s jejich funkcí

Zástupce	Synonymum	Popis
GDF1		V časně embryogenezi zodpovědný za pravolevou asymetrii a vývoj nervového systému v pozdní embryogenezi.
	BMP9	Důležitý pro vývoj cholinergní části CNS. Podílí se na řízení produkce hepcidinu, jaterního peptidu pro metabolismus železa.
GDF3	Vg-related gene 2" (Vgr-2)	Osifikace kostí v embryonálním vývoji
GDF5	BMP14.	Používá se v tkáňovém inženýrství k regeneraci kostí a chrupavky. Mutace v tomto genu způsobují některé typy brachydaktylie a chondrodysplasie. Toto naznačuje, že má velký vliv ve vývoji kostry. Vývoj CNC s mediátorem dopaminem.
GDF6	BMP13	Zodpovědný za tvorbu kostí, kloubů, končetin, lebky a axiální kostry. Mutace v genu pro GDF6 vede ke kolobomům, Klippel-Feilovu syndromu
GDF8	myostatin- MSTN	Negativní regulátor vývoje kosterních svalů.
GDF9		Reguluje folikulogenezi v ováriích
GDF10		Svým účinkem blízký BMP3. Synonymum BMP-b. Morfogeneze skeletu.
GDF11	BMP11	Vývoj mezodermy, vývoj čichového epitelu a části sítnice.
GDF15	TGF-PL, PTGFb	Regulace zánětu, apoptózy

Zdroj: Genová banka americké Národní lékařské knihovny, www.ncbi.nlm.nih.gov/gene

Jak vyplývá z tabulky 10 skupina GDF je skupinou částečně heterogenní. Mnoho GDF má různá synonyma a část zástupců této skupiny je řazeno mezi BMP. V kostním tkáňovém inženýrství je nejvíce zkoumáno GDF5. GDF5 se považuje za klíčový faktor při vývoji chrupavky při embryogenezi [Kleinschmidt et al., 2013], [Francis-West et al., 1999]. Bylo pozorováno, že ztráta funkce GDF5 vede ke zpomalenému hojení zlomenin [Kleinschmidt et al., 2013], [Chhabra et al., 2005], místní aplikace GDF5 vedla ke zvýšení kostní regenerace [Kleinschmidt et al., 2013], [Magit et al., 2006]. Přesto se

GDF5 považuje za méně efektivní v kostním tkáňovém inženýrství než BMP2. [Kleinschmidt et al., 2013], [Depprich et al., 2005]. Z těchto důvodů se Kleinschmidt et al., (2013) pokusili zkombinovat účinek BMP2 a GDF5. Syntetizovali novou variantu proteinu, ve které zkombinovali část aminokyselin GDF a BMP2. Testovali, zda takto vzniklý konstrukt bude účinnější než čisté GDF5 a BMP2 *in vivo* a *in vitro* na MSCs. Zjistili pozitivní efekt tohoto nového mutantu na novotvorbu kosti [Kleinschmidt et al., 2013]. Min et al., (2011) testovali injektovatelný gel z kopolymeru kyseliny polymlečné a polyglykolové (PLGA) spolu s rhGDF-5 v jednotěnném defektu periodontia u psů. Testovali GDF proti prázdnému defektu a dále rhGDF-5 s různou koncentrací (188 µg/defect, 37 µg/defect, 1.8 µg/defect). Zjistili signifikantně vyšší nárůst novotvořené kosti u rhGDF v závislosti na dávce [Min et al., 2011]. Kwon et al., (2010) také testovali jednotěnný periodontální defekt u psa. Testovali rhGDF-5 s beta-TCP oproti rhPDGF s beta-TCP. Zjistili, že GDF-5 přináší signifikantně vyšší novotvorbu cementu než rhPDGF [Kwon et al., 2010]. Lee et al., (2010) použili stejného periodontálního modelu a testovali rhPDGF s beta-TCP oproti beta-TCP a prázdnému periodontálnímu defektu. Zjistili nejvyšší nárůst kosti a cementu ve skupině s rhGDF-5/betaTCP [Lee et al., 2010]. Yamano et al., (2014) testovali myši preosteoblasty *in vitro* a porovnávali GDF-5 a PDGF na kolagenní membráně. Pozorovali signifikantně vyšší nárůst ALP a proliferaci buněk v porovnání s PDGF nebo kolagenní membránou (CM) samotnou. Dále testovali oba tyto růstové faktory na modelu defektu mandibuly u potkana. Popsali signifikantně vyšší novotvorbu kosti, kterou můžeme matematicky znázornit takto: CM/GDF-5 > CM/PDGF > CM samotná nebo v porovnání s kontrolou [Yamano et al., 2014]. Arnold et al (2007) použili miniprasátka jako model pro oboustranný sinus lift. Jako matrix použili beta-TCP. Zjistili nejvyšší nárůst kosti ve skupině s malou dávkou rh-GDF-5 (400 µg) oproti skupině s vysokou dávkou rh-GDF-5 (800 µg). Po 12 týdnech byl nárůst kosti stejný [Arnold et al., 2007]. K porovnání účinku GDF spolu s jinými růstovými faktory a s kmenovými buňkami viz tabulka 11.

Tabulka 11 - Porovnání účinku GDF spolu s jinými růstovými faktory a s kmenovými buňkami

Růstové faktory	Kmenové buňky	Matrix /scaffold	Model	Metod analýzy	Výsledek	Ref.
konstrukt GDF5+ +BMP2	MSC hUVEC*	in vitro - MSC in vivo: hUVEC+ kolagen	defekt radia u králíka	in vitro: hladina VEGF, ALP in vivo: mikroCT, histologie, denzitometrie	Vyšší novotvorba kostí u konstruktu GDF5+BMP2 než u čistého GDF5 a čistého BMP2	Kleinschmidt et al., (2013)
GDF5	---	kolagen I, hydroxyapatit	posterolaterální fúze u králíka	palapce, CT, RTG, histologie	Pozitivní efekt GDF5 oproti autograftu	Magit et al., (2006)
rhGDF-5	---	PLGA**	jednotěnný periodontální defekt u psa	Histomorfometrie	Pozitivní efekt rhGDF-5 závislý na dávce	Min et al., (2011)
rhGDF-5 versus rhPDGF	---	beta-TCP	jednotěnný periodontální defekt u psa	Histomorfometrie	Signifikantně vyšší novotvorba cementu u rhGDF-5/beta-TCP oproti	Kwon et al., (2010)

					rhPDGF/ beta-TCP	
rhGDF-5	---	beta-TCP	jednotěnný periodontální defekt u psa	Histomorfometrie	Skupina s hGDF-5/beta-TCP měla signifikantně vyšší novotvorbu cementu a kosti než skupina s beta-TCP a než skupina s prázdňným defektem	Lee et al., (2010)
PDGF versus GDF-5	---	kolagenová membrána (CM)	defekt mandibuly u potkana	μCT, histologie	Signifikantní novotvorba kosti CM/GDF-5> CM/PDGF> CM samotná nebo v porovnání s kontrolou. Novotvorba kosti p úměrná dávce GDF	Yamano et al., (2014)
PDGF versus GDF-5	---	kolagenová membrána (CM)	in vitro: mouse preosteoblasts	Hladiny ALP, Runx2, Osteokalcinu	CM/GDF-5 signifikantně vyšší nárůst ALP, proliferace buněk v porovnání s CM/PDGF nebo CM samotné	Yamano et al., (2014)
rh-GDF-5: 400 μg a 800 μg /g beta-TCP	---	Beta-TCP	sinus lift i miniprasat	CT denzitometrie a volumetrie	Po 4 týdnech skupina s nízkou koncentrací měla nejvyšší denzitu novotvořené kosti. Po 12 týdnech bez rozdílu.	Arnold et al., (2007)

* hUVEC - human umbilical vein endothelial cells

** Poly-lactide-co-glycolide-acid

V rámci GDF se v kostním tkáňovém inženýrství používá prakticky pouze GDF-5. Ukazuje se, že GDF-5 má pozitivní efekt na novotvorbu cementu a kosti [Lee et al., 2010]. Jedná se o efektivní růstový faktor pro novotvorbu kosti [Min et al., 2011], [Kwon et al., 2010], [Lee et al., 2010]. GDF má vyšší účinnost než PDGF [Kwon et al., 2010], [Yamano et al., 2014]. Ukazuje se, že dávka rhGDF má vliv na rychlost regenerace kosti, ale po delší době se kvalita regenerátu mezi dávkami GDF-5 vyrovnává [Arnold et al., 2007]. Více prací s použitím GDF s kmenovými buňkami v kostním tkáňovém inženýrství se nepodařilo dohledat. Zde je otevřená možnost dalších experimentů.

Inzulínu podobné růstové faktory - IGF

Inzulínu podobné růstové faktory (angl. insulin-like growth factors - IGFs) jsou malé polypeptidy, které hrají důležitou roli v kostním metabolismu, růstu a udržení kostní hmoty [Diederik et al., 2010]. Známe dvě izoformy IGF-I (70 aminokyselin) a IGF-II (67 aminokyselin). Obě izoformy jsou z 40-50 % shodné navzájem mezi sebou a s inzulínem. Přes částečnou homologii interagují IGFs a inzulín se svými specifickými receptory [Schliephake et al., 2002], [O'Connor 1998]. Působí na dva receptory označované jako IGF1R a IGF2R a v plasmě se váží na šest vazebných proteinů IGF-binding proteins (IGFBP-1 až IGFBP6) [Diederik et al., 2010]. Vazebné proteiny jsou zodpovědné za transport a regulaci jejich funkce [O'Connor 1998]. Receptor pro IGF-I, tj. IGF1R, má nejvyšší afinitu k IGF-I, 2–50× nižší afinitu k IGF-II a 100–500× nižší afinitu k inzulínu. Naproti tomu IGF2R váže jen IGF-II [Schliephake et al., 2002], [Morgan et al., 1987]. Fungování a účinky inzulínu podobných růstových faktorů lze dobře ukázat na transgenních myších. Myši diplosuficientní pro gen pro IGF-I trpěly výraznou embryonální retardací růstu, prodlouženou mineralizací skeletu a vysokou postnatální mortalitou [Liu et al., 1993], [Baker et al., 1993], [Jiang et al., 2006].

Myši haplosuficientní v genu pro IGF-I, které měly jen jednu alelu genu pro IGF-I funkční, dobře prospívaly postnatálně a pouze měly mírně nižší váhu a nižší hladinu IGF-I v séru [Powell-Braxton et al., 1993], [Bikle et al., 2001], [He et al., 2006].

Myši s chyběním receptoru pro IGF-I na zralých osteoblastech měly menší objem trabekulární kosti a porušenou mineralizaci kostní matrix, což naznačuje klíčovou úlohu IGF-I při mineralizaci [Zhang et al., 2002], [Jiang et al., 2006]. Receptor pro IGF-II se exprimuje již ve stádiu dvou buněk při vývoji myši. IGF-II hraje větší roli při prenatálním vývoji, IGF-I je důležitý prenatálně i postnatálně [Schliephake et al., 2002]. Toto zjištění je v souladu se zvyšujícím se poměrem IGF-I/IGF-II se stoupajícím věkem [Bikle et al., 1994]. V souladu s tímto zjištěním jsou nálezy hladin IGF-I, které byly popsány nejvyšší v séru mladých žen a nejnižší u postmenopauzálních žen s projevenou osteoporózou. Hladina IGF-I byla přímo úměrná objemu kostní hmoty [Schliephake et al., 2002], [Ravn et al., 1995]. Z výše uvedeného vyplývá, že inzulínu podobné růstové faktory (IGFs) jsou důležité pro prenatální a postnatální vývoj. Cirkulující IGF-I je primárně z velké části produkován játry. Přesto IGF-I a IGF-II byly nalezeny v dalších tkáních jako např. v kosterních svalech, chrupkách a kostech [Brennan-Speranza et al., 2011], [Slater et al., 1994], [Wong et al., 1990]. Selektivní potlačení jaterní produkce IGF-I u myši snížilo hladinu sérového IGF-I o 80 %, ale vede ke snížení tělesné hmotnosti jen o 10 %. Naproti tomu knockout myši s celkovým potlačením produkce IGF-I mají o 50 % sníženou tělesnou hmotnost při narození. Z toho vyplývá, že tkáňové IGF-I je velmi významné [Brennan-Speranza et al., 2011], [Clemmons 2007], [Vardatsikos et al., 2009], [Liu et al., 1993]. Přehled působení jednotlivých zástupců viz tabulka č. 12.

Tabulka 12 - Porovnání účinku IGF-1 spolu s jinými růstovými faktory a s kmenovými buňkami

Růstové faktory/ kmenové buňky	Matrix	Model	Metody analýzy	Výsledek	Ref.
IGF-1*	-----	Transgen. myši (TM) versus normální myši	μCT, Histomorfometrie, Mechanické testy, nanoindentace	Signifikantně vyšší novotvorba kosti ve skupině transgen. myši s genem pro IGF-1	Brennan-Speranza et al., (2011)
rhIGF-1 + rhTGF-β1	Titan. implantát PDLLA	Defekt tibie u potkana	RTG, mechanické testy, histomorfometrie	Titanový implantát s PDLLA+IGF-1 + TGF-β1, nejvyšší novotvorba kosti**	Schmidmaier et al., (2001)
rhIGF-1+ rhTGF-β1/ rhBMP-2***	PDLLA	Ektopická formace kosti ve svalu u ovce	RTG, histomorfometrie	Žádná novotvorba kosti u žádné skupiny	Kandziora et al., (2004)
Systémové podání rhIGF-1+ BMSCs	-----	Fraktura tibie u myši	Histologie, in-situ hybridizace, mechanické testy	Signifikantně největší novotvorba kosti ve skupině: BMSCs + systémové podání rhIGF-1	Myers et al. (2012)
rhIGF-1 + rhTGF-β1	Bovinní želatina	Defekt mandibuly u potkana	3D CT, histomorfometrie	Signifikantně vyšší novotvorba kosti ve skupině rhIGF-1 + rhTGF-β1 oproti samotným růstovým faktorům	Srouji et al., (2005)

* IGF-1 Transgenní myši: selektivně zvýšená exprese IGF-1 v osteoblastech

** Skupina I: Ti. implantát nepovlakovaný; Skupina II: Ti. implantát povlakovaný s PDLLA; Skupina III: Ti. implantát povlakovaný PDLLA+IGF-1+TGF-β1, Novotvorba kosti: Skupina I < Skupina II < Skupina III

*** Skupina I: Titanový disk nepovlakovaný, Skupina II: T. disk s PDLLA, Skupina III Ti. disk s PDLLA + IGF-1+ TGF-β1. Skupina IV: Ti. disk s PDLLA + BMP-2

Brennan-Speranza et al., (2011) použili transgenní myši se zvýšenou tvorbou IGF-I osteoblasty. Testovali, zda IGF-I produkovaný osteoblasty je schopný kompenzovat nízkokalorickou dietu. Testované myši byly vyšetřovány pomocí mikroCT, histomorfometrie a také mechanickými testy. Ve všech skupinách zvířata zhubla a vykazovala nižší plasmatické hladiny IGF-1. Ve skupině transgenních myši, ale zvýšená exprese IGF-I osteoblasty vedla k nárůstu kortikální tloušťky, větší denzity a mechanické odolnosti tibie a páteře [Brennan-Speranza et al., 2011].

Schmidmaier et al., (2001) použili titanových Kirschnerových drátů potažených PDLLA (kyseliny poly(D,L-mléčné) k fixaci zlomenin tibie u krys. PDLLA byla nasycena IGF-1 a TGF-β1. Skupina s PDLLA měla lepší výsledky hojení než kontrolní skupina, skupina PDLLA nasycena IGF-1 a TGF-β1 vykazovala nejlepší výsledky hojení [Schmidmaier et al., 2001].

Wildemann et al., (2004) použili titanových disků potažených PDLLA, které implantovali do svalu ovce. Testovali ektopickou novotvorbu kosti. Kontrolní skupina měla disky s čistým titanem, další skupiny disky s PDLLA, PDLLA s IGF-1 a TGF-β1, PDLLA s BMP-2. V žádné skupině nepozorovali žádnou novotvorbu kosti [Wildemann et al., 2004].

Myers et al., (2012) zkoumali mezenchymální kmenové buňky z kostní dřene (angl. bone marrow-derived mesenchymal stem cells - BMSCs) a systémové subkutánní podávání IGF-1 na hojení zlomenin tibie u myši. Nejlepší výsledky histologické a získané mechanickým testováním zjistili u skupiny BMSCs s podáváním IGF-1 [Myers et al., 2012].

Srouji et al., (2005) vytvořili defekt v mandibule potkana. Sledovali míru novotvorby kosti a zjistili, že ve skupinách s rhIGF-1 a rhTGF-β1 je vyšší produkce kosti než u kontrolní skupiny a dále že použití rhIGF-1 + rhTGF-β1 dohromady má synergický efekt a lepší výsledky než použití těchto růstových faktorů samostatně. Autoři se domnívají, že tato kombinace může mít potenciál v použití v klinické praxi [Srouji et al., 2005]. Stejná skupina prokázala obdobné výsledky hojení defektu tibie u potkana [Srouji et al., 2004].

Fibroblastové růstové faktory – FGFs

Název fibroblastové růstové faktory (FGF) je do jisté míry zavádějící. Dnes je tvořen širokou skupinou růstových cytokinů, jejichž funkcí není jen podpora fibrogenese. Jsou považovány za regulátory buněčného růstu a hojení. Armelin et al., v roce 1973 pozorovali, že extrakt z hypofýzy obsahuje látku, která stimuluje fibroblasty k růstu [Armelin et al., 1973]. Odtud pramení název celé této skupiny. Pomocí kyselého a zásaditého pH byl izolován kyselý „acidic fibroblast growth factor“ (FGF-1) a zásaditý, resp. "basic fibroblast growth factor" (FGF2) [Arese et al., 1999]. Proto se můžeme u FGF-2 setkat s označením bFGF-2. Dnes známe 18 savčích FGF (FGF1–FGF10 a FGF16–FGF23), které se dělí do 6 podskupin na základě jejich struktury a funkce [Beenken et al., 2009]. Mnoho FGF bylo řazeno do skupiny fibroblastových růstových faktorů (dříve označovány jako FGF11-FGF14). Tyto FGF mají podobnou sekvenci aminokyselin, ale nejsou schopné aktivovat FGF receptor (FGFR), a proto nejsou považovány za FGF 11. Tuto skupinu (FGF11–FGF14) označujeme jako fibroblast homologous factors (FHF). Tyto cytokiny ovlivňují intracelulární domény sodíkových kanálů a jejich mutace způsobují na myších modelech širokou škálu neurologických abnormalit. U člověka jejich mutace způsobí cerebelární ataxii [Beenken et al., 2009], [Goldfarb 2005]. Přehled zástupců FGF včetně FHF viz tabulka 13.

Tabulka 13 - Typy FGF včetně FHF

Zástupce	Synonymum	Popis
FGF-1	acidic FGF, FGFA	Normální kostní hojení [Arese et al., 1999] Migrace a proliferace endoteliálních buněk. Podílí se na organogenezi, mitogen pro buňky mezodermu a neuroektodermu. Silnější angiogenetický faktor než VEGF
FGF-2	basic FGF, FGFB	Vývoj končetin a nervového systému, hojení ran a růst tumorů. Silnější angiogenetický faktor než VEGF
FGF-3	HBGF-3	Transformace neoplazmat, růst tumorů. U kuřat má roli v morfogenezi vnitřního ucha. Předpokládá se stejné působení u lidí.
FGF-4	---	Rozvoj trofoblastu, ve vývoji srdečních chlopní a končetin [Beenken et Mohammadi 2009]. Prognostický marker v onkologii. FGFR-4 je špatným prognostickým markrem pro spinocelulární karcinom hlavy a krku [Streit et al., 2004]. Transformace neoplazmat, zvýšeně exprimován u tumorů ledvin
FGF-5	---	Onkogenní působení
FGF-6	HST2	Diferenciace a regenerace svalů. Má onkogenní aktivitu.

FGF-7	KGF	Růstový faktor pro epitelie. Morfogeneze kůže, vývoj vlasů a časný vývoj plic. Epitelizace rány. Jako rekombinantní rhFGF-7 je na trhu v EU k dispozici pod názvem Palifermin k léčbě mucositid u onkologických pacientů [Beenken et Mohammadi 2009]. Poznámka: Synonymum - keratinocyte growth factor (KGF)
FGF-8		Fyziologicky exprimován v ováriích a testes. Podporuje růst na androgenech závislých tumorů. Epiteliální faktor v embryogenezi. Gastrulace embrya, embryogeneze středního mozku, končetin
FGF-9	---	Podporuje proliferaci glie. Produkován neurony a zřejmě je důležitý pro vývoj gliálních buněk. Podílí se na testikulární embryogenezi.
FGF-10	---	Podobná funkce jako FGF-7. Podporuje proliferaci keratinocytů. V embryogenezi vývoj kůže, plic a iniciace vývoje končetin.
FGF-11@	FHF3	Funkce není zcela jasná. Zřejmě se podílí na vývoji nervového systému.
FGF-12@	FHF1	Funkce není jasná
FGF-13@	FGF2	Funkce není zcela jasná. Gen pro FGF-13 leží blízko oblasti na chromozomu X, která je asociovaná s Borjeson-Forsman-Lehmann syndromem. Je možné, že mutace v genu pro FGF-13 je zodpovědná za familiární výskyt této choroby s mentální retardací.
FGF-14@	FHF4	Mutace v genu pro FGF-14 je asociováno s cerebrální ataxií.
FGF-15	---	Existuje jen u myši domácí
FGF-16	FGF-16	Exprimován v embryonální hnědé tukové tkáni.
FGF-17	FGF-13	Exprimován v mozečku a mozkové kůře. Podílí s na vývoji mozku, cév a kostí.
FGF-18	FGF-18	Pleiotropní růstový faktor v mnoha tkáních. U knockout myši vede absence FGF-18 ke snížení exprese osteogenních markerů a prodloužení kostní osifikace [Beenken et Mohammadi 2009], [Liu et al., 2002], [Ohbayashi et al. 2002]. FGF-18 má chondrogení potenciál a vede ke zhojení kloubní chrupavky po traumatu [Moore et al., 2005].
FGF-19	---	Exprimován ve fetální mozku, podílí se na vývoji vnitřního ucha.
FGF-20	---	Exprimován fyziologicky v mozečku. Zřejmě reguluje funkci a vývoj CNS. Genetické varianty genu pro FGF-20 jsou spojeny s Parkinsonovou chorobou.
FGF-21	---	Funkce není jasná
FGF-22	---	Vývoj vlasového folikulu
FGF-23	ADHR	Klíčový regulátor homeostázy fosforu 1 a mutace genu pro FGF-23 byla pozorována u pacientů s hypofosfatemickou rachitis [Beenken et Mohammadi 2009], [White et al. 2000]. Řídí metabolismus vitamínu D a fosforu v ledvinách. V příštích těliscích inhibuje sekreci parathormonu [Ben-Dov et al., 2007]. U chronických renálních onemocnění je klíčovým faktorem postižení minerálního a kostního metabolismu [Armelin et al., 1973].

Zdroj: Genová banka americké Národní lékařské knihovny, www.ncbi.nlm.nih.gov/gene

@ FGF11-FGF14 mají podobnou sekvenci aminokyselin, ale nejsou schopné aktivovat FGF receptor (FGFR) a proto nejsou považovány za FGF 11. Označujeme je jako fibroblast homologous factors (FHF). Ovlivňují intracelulární domény sodíkových kanálů

V kosti je produkovány různé buňky, zejména osteoblasty, makrofágy a endoteliální buňky [Diederik et al., 2010]. V kostním tkáňovém inženýrství je nejlépe prostudován FGF-2 [Diederik et al., 2010]. Podílí se na regulaci normálního kostního hojení [Arese et al., 1999]. Přímá aplikace FGF-2 *in vivo* vede k rychlé denaturaci a degradaci cytokinu [Kawaguchi et al., 2001], [Abbaspour et al., 2008]. Tuto nevýhodu řešili Jiang et al., (2009) použitím adenoviru. Použili jej jako vektor k přenosu genu pro FGF-2 do mezenchymálních kmenových buněk kostní dřeně (angl. bone marrow mesenchymal stem

cells - BMSCs). U distrakce mandibuly králíků pozorovali nejvyšší nárůst kostní hmoty u této skupiny [Jiang et al., 2009]. Nakamura et al., (2005) testovali novotvorbu kosti na ektopickém modelu myši. Zjistili, že nízké koncentrace FGF-2 zvyšují expresi receptoru pro BMP-2 (BMPR) a tím zvyšují novotvorbu kosti. Naproti tomu vyšší koncentrace FGF-2 měly inhibiční účinek [Nakamura et al., 2005].

Nakamae et al., (2004) pozorovali výrazně vyšší stupeň neovaskularizace na rozhraní nekrotické kosti ve skupině s aplikací FGF-2 [Nakamae et al., 2004]. Mabileau et al., (2008) použili kopolymeru pHEMA s 2-vinylpyrrolidonem- p(HEMA-co-VP) jako vehikula FGF-2 na králičím modelu. Výsledky nebyly přesvědčivé. Ve skupině p(HEMA-co-VP) + FGF-2 byl po 2 měsících nárůst kosti signifikantně vyšší než v kontrolní skupině, ale po 3 měsících se množství novotvořené kosti vyrovnalo [Mabileau et al., 2008].

Role FGF-4 v kostním tkáňovém inženýrství je diskutabilní. Receptor pro FGF-4 (FGFR4) má potenciální roli jako prognostický marker v onkologii. Arg1388 v molekule FGFR-4 je špatným prognostickým markrem pro spinocelulární karcinom hlavy a krku [Streit et al., 2004]. Vlastní FGF-4 má celou řadu fyziologických funkcí: je důležitý pro rozvoj trofoblastu, ve vývoji srdečních chlopní a končetin [Beenken et al., 2009]. U knockout myši je chybění FGF-4 letální ve stádiu trofoblastu [Feldman et al., 1995].

Kubota et al., (2002) implantovali nosič s rhBMP-2 do oblasti hrudníku potkanů. Zjišťovali pomocí exprese mRNA, histomorfometrie a RTG denzitometrie novotvorbu kosti a cytokinů. Zjistili, že prvních 7 dní stoupá exprese FGF-4, poté klesá, ale stále se drží vysoká exprese FGFR indukované rhBMP-2. Dále testovali efekt podání rhFGF-4 a zjistili synergický efekt na novotvorbě kosti spolu s rhBMP-2 [Kubota et al., 2002]. Seo et al., (2009) testovali FGF-4 na hydroxyapatitové matrix spolu s bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). Ve skupině s FGF-4 pozorovali spíše novotvorbu vaziva [Seo et al., 2009]. Jak je patrné z výše uvedeného, výsledky použití FGF-4 v kostním tkáňovém inženýrství jsou kontroverzní a v posledních letech se FGF-4 při regeneraci kosti nepoužívá.

FGF-7 se v kostním tkáňovém inženýrství nepoužívá. Někdy je označován jako růstový faktor keratinocytů (angl. keratinocyte growth factor, KGF). Jako rekombinantní rhFGF-7 je na trhu v EU k dispozici pod názvem Palifermin k léčbě mukosid u onkologických pacientů [Beenken et al., 2009].

Nedostatek FGF-18 u knockout myši vede ke snížení exprese osteogenních markerů a prodloužení kostní osifikace [Beenken et al., 2009], [Liu et al., 2002], [Ohbayashi et al., 2002]. FGF-18 má chondrogenní potenciál a vede ke zhojení kloubní chrupavky po traumatu [Moore et al., 2005]. Podle www.ClinicalTrialsFeeds.org probíhají čtyři klinické studie v USA zaměřené na regeneraci chrupavky kolen.

Behr et al., (2011) zkoumali haplosuficientní myši FGF4^{+/-} genu pro FGF-18. Pozorovali zhoršené hojení unikortikálního defektu tibie. V další části experimentu aplikovali rhFGF-18 a došlo k normalizaci hojení kostního defektu. Autoři dále zjistili, že haplosuficientní myši neměly zhoršenou časnou fázi hojení včetně angiogeneze. FGF-18 má význam v pozdních stádiích kostního hojení [Behr et al., 2011]. Liu et al., (2002) pozorovali ve studii na diplosuficientních myších – knockout myších FGF4^{-/-}, že tyto myši měly menší porodní váhu. Většina měla rozštěp patra a skeletální defekty dlouhých kostí [Liu et al., 2002]. Jeon et al., (2012) použili krysích kmenových buněk z kostní dřeně (rat bone marrow mesenchymal stem cells – rBMSCs) spolu s FGF-18. V pokusu *in vitro* dokázali osteogenní diferenciaci ve skupině s FGF-18. Tato zjištění podporují úlohu FGF-18 v osteogenezi [Jeon et al., 2012].

FGF-23 se ze skupiny FGF vymyká. Svoji povahou je spíše hormonem. Je klíčovým regulátorem homeostázy fosforu [Beenken et al., 2009] a mutace genu pro FGF-23 byla pozorována u pacientů s hypofosfatemickou rachitis [Beenken et al., 2009], [White et al. 2000]. FGF-23 se exprimuje v kostech [Riminucci et al., (2003)], [Liu et al., (2003)], v preosteoblastech a osteocytech [Riminucci et al., (2003)]. Je vyplavován do krve a řídí metabolismus vitamínu D a fosforu v ledvinách [Beenken et al., 2009], [White et al., 2000]. FGF23 zvyšuje vylučování fosforu ledvinami snížením jeho reabsorpce. Také snižuje aktivitu enzymu, který přeměňuje vitamín D na aktivní vitamín D [Beenken et al., 2009]. V příštítých těliscích inhibuje sekreci parathormonu [Ben-Dov et al., 2007]. U chronických renálních onemocnění (angl. chronic kidney disease - CKD) je klíčovým faktorem postižení minerálového a kostního metabolismu [Wesseling-Perry 2010]. V relevantní literatuře nebylo užití FGF-23 ani anti-FGF23 nalezeno. Porovnání účinku FGF s kmenovými buňkami viz tabulka 14.

Tabulka 14 - Porovnání účinku FGF s kmenovými buňkami

Růstové faktory/ kmenové buňky	Matrix	Model	Metoda analýzy	Výsledek	Ref.
Transfekce genem pro FGF-2// BMSCs	---	Distrakce mandibuly u králíka	mikroCT, histologie, mechanické testování	Signifikantně vyšší novotvorba kosti ve skupině BMSCs infikované genem pro TGF-2	Jiang et al., (2010)
FGF-4// BMSCs	Hydroxyapatit (HAP)	Spinální fúze u potkana	RTG, μ CT, palpáce	Signifikantně vyšší novotvorba kosti ve skupině BMSCs + HAP. FGF-4 indukoval vznik vaziva	[Seo et al., 2009]
FGF-2/BMP-2	Kolagen	Kolagenní disky s BMP-2 a FGF-2 implantovány do svalu myši	RTG, Histomorfometrie, Northern blot, Western blot	Synergický efekt. Nízké dávky FGF-2 spolu s BMP-2 zvyšovaly ektopickou novotvorbu kosti.*	[Nakamura et al., 2005]
FGF-2	p(HEMA-co-VP)**	Defekt femuru u králíka	mikroCT, Histomorfometrie	Bez efektu	[Mabilleau et al., 2008]
rhFGF-18// rBMSCs	<i>in vitro</i>	Efekt rhFGF-18 na rBMSCs	real-time PCR, histologie	Signifikantní nárůst novotvorby kosti, rhFGF-18 zvyšovalo proliferační aktivitu rBMSCs	[Jeon et al., 2012]

- Nízké dávky FGF-2 dle autorů zvyšovaly novotvorbu kosti zřejmě mechanismem zvýšení exprese BMPR na povrchu osteoprogenitorových buněk
- ** Poly(2-hydroxyethyl methakrylát) pHEMA kopolymerovaný s 2-vinylpyrrolidonem - VP, poměr 80:20%

Plazma bohatá na destičky - PRP

Plazma bohatá na destičky (angl. Platelet-Rich Plasma, PRP), v literatuře méně často nazývaná autologous platelet concentrate (APC) nebo platelet-rich growth factor (PRGF).

Hojení tkáně na obecné úrovni probíhá ve třech fázích: a) stádium reparativního zánětu, který zahrnuje agregaci destiček a jejich aktivaci, migraci granulocytů a markofágů, b) proliferace mezenchymálních buněk a jejich diferenciaci, c) regenerace tkáně specifickými buňkami [Intini 2012], [Kumar et al., 2003].

Destičky jsou bezjaderné drobné buňky vznikající z megakaryocytů. Mají hlavní roli ve vzniku primárního uzávěru rány krevní sraženinou. Jsou důležité v modulaci zánětu, usnadňují buněčnou chemotaxi a proliferaci, usnadňují hojení, angiogenezi a formování kosti [Orlando et al., 2013]. PRP představuje koncentrát destiček v malém objemu plasmy. Destičky uvolňují ze svých granulí velké množství různých cytokinů a růstových faktorů [Intini 2012]. Studie ukazují, že destičky obsahují více než 800 proteinů s různými posttranslačními modifikacemi, jako je např. fosforylace, která vede k vytvoření více než 1500 bioaktivních látek [Zhu et al., 2013]. Z nejvýznamnějších a nejvíce popsaných jmenujme např. Connective Tissue-Activating Peptide III (CATP III), epidermální růstový faktor (epidermal Growth Factor, EGF), faktor V, XI, XIII, fibrinogen, fibroblastový růstový faktor 2 Fibroblast Growth Factor (Fibroblast Growth Factor - FGF2), fibronektin, inzulinu podobný růstový faktor I (Insulin-like Growth Factor-I - IGF-I), osteokalcin, platelet-derived endothelial cell growth factor - PDECGF, destičkový růstový faktor (Platelet-derived Growth Factor - PDGF), serotonin, transformující růstový faktor beta-1 (Transforming Growth Factor-b1 - TGF-b1), vaskulární endoteliální růstový faktor (Vascular Endothelial Growth Factor -VEGF), Von Willebrandův faktor [Intini 2012], [Kumar et al., 2003], [Frechette et al., 2005], [Lacoste et al., 2003], [Hoffman et al., 2000], [Thiede et al., 1994]. Z výše uvedeného vyplývá důležitost destiček v reparaci a regeneraci tkání. Část růstových faktorů destiček je zřejmě ještě neobjevena. Použití destiček ve formě PRP v tkáňovém inženýrství místo čistých růstových faktorů má mnoho výhod: a) menší riziko alergických reakcí, b) menší riziko přenosu infekčních chorob, c) všestranné ovlivňování regenerace tkáně nejen konkrétní směsí růstových faktorů, ale i přímou interakcí mezi intermembránovými glykoproteiny a receptory destiček, d) je levný, e) dobře dostupný. Příprava PRP je možná dvěma technikami pomocí: a) víceúčelových buněčných separátorů (centrifug), b) destičkových separátorů [Raja et Naidu 2008]. Jedná se o metody jednostupňové a dvoustupňové centrifugace [Zhu et al., 2013]. U víceúčelových separátorů se užívá většího množství krve (cca 450 ml) s citrátovým antikoagulantem, která se centrifuguje přibližně při 5600 otáčkách za minutu. Poté se otáčky sníží na cca 2400 otáček/min. a výsledkem je cca 30 ml PRP. Oddělená část vzorku cca 420 ml se může vrátit pacientovi nebo je zničena [Raja et Naidu 2008]. U jednoúčelových separátorů se používá malé množství krve, což tyto přístroje předurčuje k použití v klinické praxi, např. v zubním lékařství a maxilofaciální chirurgii. Jsou k dispozici různé centrifugy, které používají různé antikoagulanty. Princip přípravy PRP je popsán v tabulce 15.

Tabulka 15 - Příprava PRP

Pořadí	Popis
1.	Odběr venózní krve do zkumavky s antikoagulantem
2.	První centrifugace o nízkých otáčkách, která separuje krev na nejnižší položenou vrstvu červených krvinek (55 % objemu), nejvýše je acelulární plasma nazývaná také PPP (platelet poor plasma- 40 % objemu), a mezi těmito vrstvami je PRP vrstva (5 % objemu), která se v transfúzním lékařství nazývá také „buffy coat“ [Raja et Naidu 2008]
3.	Sterilní stříkačkou se odebere PPP, PRP a drobné množství červených krvinek do další zkumavky bez antikoagulantu
4.	Druhá centrifugace o vysokých otáčkách, kdy separujeme PRP na dno zkumavky a PPP (80 % objemu) je nad vrstvou PRP
5.	PRP se odsaje a roztřepe
6.	PRP se smíchá s bovinním trombinem a chloridem vápenatým, který zruší efekt citrátového antikoagulantu. Bovinní trombin aktivuje fibrinogen na fibrin [Raja et Naidu 2008], [Sonnleitner et al., 2000]

Zdroj: [Zhu et al., 2013]

Výše popsaného mechanismu se používá v tkáňovém inženýrství, kde potřebujeme získat matrix pro kmenové buňky. V klinických aplikacích se PRP připravuje s vynecháním bodu 6., což má za důsledek vznik injektabilní formy PRP. Koncentraci destiček ovlivňuje pohlaví (u žen vyšší koncentrace) a fyzická kondice subjektu, ale není ovlivněna věkem. Obsah růstových faktorů nezávisí ani na pohlaví, ani na věku a jiných faktorech [Zhu et al., 2013].

V maxilofaciální chirurgii první klinické testování PRP provedli Marx et al., v roce 1998. Autoři prokázali, že PRP obsahuje růstové faktory a v koncentrované formě je dodává regenerující tkáň. Dále uvádějí, že použití PRP statisticky signifikantně vedlo k lepšímu hojení kostní rány [Marx et al., 1998]. Od té doby se PRP začalo zkoumat a užívat i v klinické praxi. Použití PRP v klinické praxi eliminuje riziko přenosu infekčních onemocnění, protože se jedná o autologní aplikaci, dále je levné a rychlé pro klinické použití. Mezi výhody PRP patří i absence nežádoucích imunitních reakcí, jaké jsou známy u přenosu allogeních a xenogeních materiálů. Někteří autoři uvádějí riziko imunitních reakcí při použití bovinního trombinu. Toto tvrzení podporuje práce Raja et Naidu z roku (2007) a rovněž Lansbergové et al., (1998), [Raja et Naidu 2008], [Landesberg et al., 1998]. Autoři diskutují o rizicích spojených s používáním PRP ve formě gelu, který se získává smícháním PRP s bovinním trombinem.

Landbergová varuje před použitím bovinního trombinu, který může vést k rozvoji závažných život ohrožujících koagulopatií [Raja et Naidu 2008], [Landesberg et al., 1998]. Toto riziko, jak zmíněno výše, se nevyskytuje u PRP používané v klinických studiích bez bovinního trombinu. V souvislosti s PRP se diskutuje o optimální koncentraci destiček.

Choi et al., (2005) studovali závislost koncentrace PRP *in vitro* na kostních buňkách získaných z alveolárních výběžků čelistí. Zjistili, že vysoké koncentrace PRP mají supresorový efekt na viabilitu a proliferaci kostních buněk. Naopak nízké koncentrace PRP okolo 1–5% zlepšovaly signifikantně viabilitu a proliferaci kostních buněk. Jejich zjištění zřejmě vysvětluje heterogenitu dat, respektive úspěšnost používání PRP v různých studiích [Choi et al., 2005].

Marx publikoval v roce 2004 článek, ve kterém se věnuje kontroverzi v hodnocení PRP. Uvádí, že řada studií proběhla na zvířecích modelech jejichž velikost znemožňovala získání většího množství krve. V těchto studiích se používalo krve od jiného jedince. Proto

nemají dle Marxe výpovědní hodnotu, neboť se jednalo pouze o homologní, ale ne autologní krev. PRP je vždy autologním materiálem [Marx 2004].

V tkáňovém inženýrství se PRP široce používá. Zhang et al., (2011) studovali efekt PRP *in vitro*, kdy testovali obsah alkalické fosfatázy (ALP), a *in vivo* na myších s použitím korálu jako matrix spolu s mezenchymálními kmenovými buňkami z kostní dřevě (BMSCs). Nejvyšší novotvorbu kosti pozorovali ve skupině s PRP s BMSCs, a to jak histomorfometricky, tak i v hladině ALP [Zhang et al., 2011].

Kasten et al., (2008) testovali efekt PRP na modelu defektu diafýzy radia u králíka s použitím hydroxyapatitové matrix a mezenchymálních kmenových buněk z kostní dřevě (BMSCs). Novotvořenou kost vyšetřovali pomocí mikroCT a histomorfometrie. Zjistili vyšší novotvorbu kosti u skupiny s PRP. Překvapivě ve skupině PRP s BMSCs nebyl další nárůst novotvorby oproti skupině pouze s PRP. Při mechanickém testování nepozorovali žádný rozdíl mezi skupinami [Kasten et al., 2008]. Další efekt PRP na novotvorbu kosti stále zůstává kontroverzní.

Sarkara et al., (2006) nepotvrdili pozitivní efekt PRP v novotvorbě kosti na kolagenním nosiči.

Khojasteh et al., (2008) testovali mezenchymální kmenové buňky z kostní dřevě (BMSCs) a porovnávali jejich efekt spolu s efektem PRP. Zjistili horší výsledky novotvorby kosti ve skupině s PRP oproti skupině s BMSCs [Khojasteh et al., 2008].

V kostním tkáňovém inženýrství zůstává role PRP kontroverzní – viz tabulka 15. Obecně lze konstatovat, že PRP zlepšuje proliferaci buněk, snižuje obsah alkalické fosfatasy jako markeru osteogeneze [Arpornmaeklong et al., 2004].

Kruger et al., (2012) pozorovali, že PRP podporuje proliferaci buněk a podporuje chondrogenézi [Kruger et al., 2012]. Mishra et al., (2009) pozorovali stejný efekt PRP [Mishra et al., 2009]. Ukazuje se, že role PRP bude spíše v chondrogení diferenciaci kmenových buněk a tím klinicky použitelné spíše v léčbě osteoartrózy.

Tento názor podporuje Kütük et al., (2014). Autoři pozorovali zlepšení osteoartrózy temporomandibulárního kloubu po aplikaci PRP.

Pozitivní efekt PRP potvrdili ve své práci Machoň et al., (2013), kdy v klinické studii na 30 pacientech porovnávali efekt intraartikulární aplikace kyseliny hyaluronové, efekt PRP a pouze režimových opatření. Ve skupině s PRP pacienti udávali v 70% zlepšení bolesti [Machoň et al., 2013].

V kostním tkáňovém inženýrství se o roli PRP široce diskutuje. V rámci konstruktivistického přístupu ke kostnímu tkáňovému inženýrství se uvažuje o PRP jako o médiu k dodání široké palety růstových faktorů v ideálních koncentracích. Již nyní se v ortopedii a čelistní chirurgii uplatňuje v léčbě osteoartrózy pro svůj větší chondrogení potenciál. Porovnání účinku PRP s kmenovými buňkami viz tabulka 16.

Tabulka 16 - Porovnání účinku PRP s kmenovými buňkami

Růstové faktory/ kmenové buňky	Matrix	Model	Metoda analýzy	Výsledek	Ref.
PRP// 5x10 ⁶ rBMSCs*	Coralline	<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i> : myš	Hladina ALP histomorfometrie	Signifikantně vyšší nárůst kostí ve skupině PRP+MSCs+coralline.	Zhang et al., (2011)
PRP// BMSCs*	Hydroxyapatit (HA)	defekt diafýzy radia u králíka	μCT, histomorfometrie, mechanické testování	Podle mikroCT a histomorfometrie: vyšší novotvorba kostí u skupiny PRP+HA. Ve skupině PRP+HA+BMSCs nebyl další nárůst novotvorby oproti PRP+HA. Mechanické testování: žádný rozdíl mezi skupinami	Vogela et al., (2008)
PRP	Kolagen	defekt tibie u ovce	RTG, μCT, histologie, mechanické testování	Bez efektu	Sarkara et al., (2006)
PRP// rMSCs	Bio-oss®/HA+β-TCP, Skupiny: Bio-oss®+PRP Bio-oss®+BMCS HA+β-TCP + PRP HA+β-TCP+BMSCs	defekt kalvy u krysy	Histomorfometrie	Nejvyšší nárůst kosti ve skupině: HA+β-TCP +BMSCs. PRP bez pozitivního efektu na novotvorbu kosti	Khojasteh et al., (2008)
PRP 2.5x10 ⁸ -1.6x10 ⁷ destiček /kulturu) rhBMP-2 (300 ng), PPP**// BMSCs * 4x10 ⁴ buněk	Kolagen	<i>in vitro</i>	měření ALP a obsahu vápníku v 3 denních intervalech	PRP na dávce závislá podpora proliferace buněk s poklesem aktivity ALP a obsahu vápníku. U skupin s rhBMP-2 inhibice proliferační aktivity, nárůst ALP a obsahu vápníku. PRP inhibuje osteogenní diferenciaci pre-osteoblastu z BMSCs. PRP nemůže nahradit rhBMP-2	Arpornmaeklong et al., (2008)
PRP// BMSCs, ASCs	Kolagen	Defekt tibie u ovce	RTG, histologie	Skupiny s kmenovými buňkami větší nárůst kosti než prázdný defekt. Nejvyšší nárůst kosti BMSCs>+ASCs+RPR>ASCs >prázdný defekt. Závěr: PRP kompenzuje novotvorbu kosti u ASC.	Niemeyer et al., (2010)

* BMSCs - Bone marrow derived mesenchymal stem cells; ASCs - adipose-tissue derived stem cells

** PPP - Plasma chudá na destičky

Fibrin bohatý na destičky - PRF

Fibrin bohatý na destičky (angl. Platelet-Rich Fibrin – PRF) je druhou generací destičkového koncentrátu po plasmě bohaté na destičky – PRP. PRF je fibrinové koagulum bohaté na destičky bez přidaného trombinu [Dohan et al., 2006]. Dohan and Choukroun et al., (2006) uvádějí, že by PRF měl mít jiné biologické chování než PRP. PRP podle těchto autorů uvolňuje růstové faktory a další působky nekontrolovaně a velmi rychle. PRF by naproti tomu měl tyto působky uvolňovat mnohem pomaleji vzhledem k jejich „uvěznění“ v zesíťované fibrinové matrix PRF [Dohan et al., 2006]. PRF obsahuje stejné působky, které byly popsány u PRP. Protokol na přípravu PRF je jednoduchý a obdobný jako výroba PRP. Po odběru vzorku venózní krve se vzorky umístí do centrifugy. Ve zkumavce není žádný antikoagulant. Centrifugace probíhá s 3000 otáčkami/min po dobu 10 min. Poté můžeme ve zkumavce pozorovat 3 vrstvy: horní vrstva je tvořena acelulární plazmou, dolní, červená, vrstva obsahuje erytrocyty a střední vrstva je fibrinovou sraženinou. Horní vrstva se odsaje, střední vrstva se 2 mm pod linií mezi střední a dolní vrstvou oddělí. Střední vrstva s malým lemlem dolní erytrocytární vrstvy představuje PRF. Střední vrstvu tvoří fibrinová síť se zachycenými destičkami. Úspěch metody je závislý na rychlosti mezi odebráním krve a centrifugací, protože krev se začíná srážet ihned po kontaktu se stěnou odběrové zkumavky [Naik et al., 2013]. Výhody PRF oproti PRP viz tabulka 17.

Tabulka 17 - Výhody použití PRF oproti PRP

Jednoduchá a levná procedura
Odpadá použití bovinního trombinu
Nepoužívají se antikoagulancia
Lepší hojení tkáně dané pomalým uvolňováním růstových faktorů
Lepší proliferace a migrace buněk
PRF má pozitivní efekt na imunitní systém
Uspadňuje hemostázu [Dohan et al., 2006], [Naik et al., 2013]

Zdroj: [Dohan et al., 2006], [Naik et al., 2013]

Dohan et al., (2004), Dohan et al., (2006) spolu s autorem konceptu PRF Choukrounem testovali kvantitativně obsah PDGF, TGF β -1 a IGF-I v horní vrstvě centrifugátu tj. PPP (angl. platelet poor plasma) a ve vlastním PRF. Autoři naznačují, že pomalá polymerace fibrinu vede k inkorporaci destiček, což by mohlo vést k dlouhodobějšímu uvolňování růstových faktorů destiček a tím by PRF bylo kvalitnějším vehikulem růstových faktorů [Dohan et al., 2004], [Dohan et al., 2006]. Stejní autoři demonstrují úspěšnost PRF na případu vyplnění kostní cystické dutiny po exstirpaci cysty z čelisti. Uvádějí, že cystická dutina se po exstirpaci zaplní koagulem, což má být jednodušší verze PRF. Spontánní zhojení cystické kostní dutiny trvá 6–12 měsíců, dle autorů k němu dojde pomocí PRF za 2 měsíce [Choukroun et al., 2004].

He et al., (2009) porovnávali klinický efekt PRP a PRF *in vitro* na potkaních osteoblastech. Autoři analyzovali získané PRP a PRF a kvantifikovali PDGF (angl. platelet-derived growth factor) a TGF- β 1 (angl. transforming growth factor β 1; TGF- β 1) vždy 1., 7., 14., 21. a 28. den. Dále působili pomocí PRP a PRF na potkaní osteoblasty. Zjistili, že PRP uvolňuje nevyšší koncentrace PDGF a TGF- β 1 první den a v dalších dnech uvolňování těchto růstových faktorů singifikantně klesá. PRF uvolňovalo TGF- β 1 nejvíce 14. a PDGF 7. den. Na buněčných kulturách byla produkce alkalické fosfatasy (ALP) vyšší ve skupině PRF [He et al., 2009]. Takto zajímavě potvrdili předpoklady Dohana a Choukrouna [Dohan et al., 2006a], [Dohan et al., 2006a], [Choukroun et al., 2004].

Kobayashi et al., (2012) zlepšili a standardizovali přípravu PRF. Pokusili se také kvantifikovat, jaký je obsah růstových faktorů v PRF v závislosti na přípravě [Kobayashi et al., 2012]. Jeong et al., (2014) augmentovali horní čelist u psů s použitím metody sinus liftu. Místo vzniklé po elevaci sliznice *sinus maxillaris* vyplnili PRF. Po 6 měsících nezjistili dostatečný nárůst kosti s použitím PRF [Jeong et al., 2014].

Pripatnanont et al., (2013) testovali PRF na králičím modelu. Autoři vytvořili bikortikální defekt v kalvě králíka oboustranně a tento vyplnili PRF samotným, PRF s autologní kostí a PRF s deproteinizovanou bovinní kostí. PRF mělo pozitivní efekt při použití jako samotné nebo v kombinaci s autologní kostí a negativní efekt při použití s deproteinizovanou bovinní kostí [Pripatnanont et al., 2013].

Bölükbaşı et al., (2013) testovali bifázický kalcium fosfát (BCP) spolu s PRF. Nepozorovali statisticky signifikantní nárůst kosti ve skupině s PRF u defektu tibie u ovce [Bölükbaşı et al., 2013].

Yoon et al., (2014) zkoumali nárůst kosti v defektu kalvy u králíka s použitím PRF a bovinní kosti – směsi hydroxyapatitu a beta-trikalcium fosfátu (HA+β-TCP). Ve skupině s PRF nezjistili statisticky významný nárůst kosti [Yoon et al., 2014].

Pokud mluvíme o PRP jako částečně kontroverzní metodě, která ještě čeká na experimentální a klinické ověření, platí totéž pro PRF ještě více. V dostupné literatuře není k dispozici prakticky žádná validní studie s použitím PRF a kmenových buněk. Porovnání účinku PRF v různých experimentech viz tabulka 18.

Tabulka 18 - Porovnání účinku PRF

Růstové faktory	Matrix	Model	Metoda analýzy	Výsledek	Ref.
PRF	----	Sinus lift u psa	RTG, histomorfometrie	Zhoršení nárůstu kosti u skupiny s PRF	Jeong et al., (2014)
PRF	Autologní kost, deproteinizovaná bovinní kost	Defekt kalvy u králíka	Radiografická denzitometrie, histomorfometrie	PRF s pozitivním efektem při použití samotné nebo v kombinaci s autologní kostí. Negativní efekt při použití s deproteinizovanou bovinní kostí	Pripatnanont et al., (2013)
PRF	Bifázický kalcium fosfát (BCP)	Defekt tibie u ovce	Histomorfometrie	Bez statisticky signifikantního efektu	Bölükbaşı et al., (2013)
PRF	Xenogenní bovinní kost- Bio-oss®=HA+β-TCP	Defekty kalvy u králíka	Imunohistochemie na VEGF, histologie	Bez statisticky signifikantního efektu	Yoon et al., (2014)

Růstový faktor vazivové tkáně – CTGF/CCN2

Růstový faktor vazivové tkáně (angl. connective Tissue Growth Factor, CTGF) byl objeven v roce 1991. Tento faktor byl nazván CTGF pro svoje mitogenní a chemotaktické vlastnosti na fibroblasty [Kanaan et al., 2006]. CTGF patří do skupiny označované jako CCN, což jsou proteiny asociované s extracelulární matrix, které mají širokou paletu působení na adhezi, mitogenezu, migraci, chemotaxi, přežití buňky, diferenciaci, angiogenezi, chondrogenezi, tumorogenezi a hojení tkání.

Název CCN zavedl Bork v roce 1993, který si všiml, že základní tři zástupci této šestičlenné skupiny, tj. CYR61 (CCN1), CTGF (CCN2) a NOV (CCN3), sdílí čtyři části své molekuly [Bork 1993], [Perbal et al., 2010]. Tyto domény jsou podobné i dalším růstovým faktorům. Jedná se o: i) insulin-like growth factor binding protein (IGFBP), ii) von Willebrandův faktor typ C repeat (VWC), iii) thrombospondin typ 1 (TSP1) a iv) cysteinovou doménu. Tyto jednotlivé podjednotky interagují s různými růstovými faktory, buněčnými receptory, a proto mají různé funkce v rozličných tkáních. CTGF (CCN2) produkují nejrůznější buňky jako např. fibroblasty, endoteliální buňky, buňky mesangia ledvin, osteoblasty a chondrocyty [Kanaan et al., 2006]. CTGF je zástupcem skupiny látek, které se označují jako CCN. Název, jak naznačeno výše, je akronymem prvních písmen zástupců této skupiny podle pořadí, v jakém byly objeveny: Cyr61 (cysteine-rich angiogenic protein), CTGF (connective tissue growth factor), NOV (nephroblastoma overexpressed) [Kikuchi et al., 2008]. Celkem je ve skupině CCN šest zástupců označovaných postupně jako CCN1–CCN6. Receptory pro CTGF byly nalezeny na osteoblastech, chondrocytech, endoteliálních buňkách, destičkách a fibroblastech a jedná se o receptory ze skupiny integrinů [Kanaan et al., 2006]. CCN2 má zřejmě velký vliv na rozvoj fibrózy tkání, zejména jater, ledvin, plic, srdce a kůže. V těchto lokalizacích je fibróza spojena s nadměrnou expresí CCN2 [Brigstock 1999]. Ono et al., (2007) pozorovali vyšší adhezi lidských kmenových buněk z kostní dřene (hBMSCs) na hydroxyapatit. Tuto vazbu rušila protilátka proti intergrinu $\alpha\beta 3$, což potvrzuje účast těchto receptorů. CTGF podporuje proliferaci a diferenciaci fibroblastů, chondrocytů, endoteliálních buněk a osteoblastů *in vitro* [Kikuchi et al., 2008], [Kikuchi et al., 1995], [Nakanishi et al., 2000], [Shimo et al., 1999], [Nishida et al., 2000]. Tento růstový faktor má také nezastupitelnou roli ve vývoji skeletu.

Yosimichi et al., (2001) pozorovali, že CTGF je 8–10× více exprimován u osteopetrozy, což naznačuje vyšší počet MSCs, diferencujících se osteogenně. CTGF také zvyšuje adhezi a migraci lidských mezenchymálních kmenových buněk z kostní dřene a usnadňuje jejich osteogenní diferenciaci [Kikuchi et al., 2008], [Ono et al., 2007], [Ono et al., 2008]. CTGF má zřejmě roli ve vývoji tkáňové fibrózy a je důležitý při navození experimentální fibrózy [Leask 2011], jak některé studie naznačují.

Kikuchi et al., (2008) testovali rekombinantní CTGF na osteoblastech *in vitro*. Pozorovali osteogenní diferenciaci buněk *in vitro*. Poté použili takto *in vitro* ověřené CTGF *in vivo*, na modelu kostního defektu femuru u potkana. Jako matrix použili želatiny s kolagenem k postupnému uvolňování CTGF. Kvantitativní analýza ukázala 70–80 % regenerované kosti ve skupině s CTGF v defektu ve srovnání s 50 % v kontrolní skupině [Kikuchi et al., 2008]. CTGF není typickým růstovým faktorem v kostním tkáňovém inženýrství. V maxilofaciální oblasti existuje jen několik prací o roli CTGF v kostním hojení a novotvorbě.

Kanyama et al., (2003) studovali expresi CTGF v alveolární kosti u potkana. Zjistili, že k expresi CTGF docházelo v časném stádiu hojení extrakční rány. Vysokou expresi CTGF zjistili v endoteliálních buňkách migrujících do granulační tkáně na dně extrakční rány 4. poextrakční den. Osteoblasty exprimovaly CTGF v malém množství kolem 7., 10. a 14. dne [Kanyama et al., 2003].

Role CTGF v kostním hojení se stále v literatuře studuje. Publikací na toto téma je poskrovnu, neboť role CTGF je v kostním tkáňovém inženýrství okrajová.

Další růstové faktory a látky ovlivňující novotvorbu kosti

Cytokiny jsou heterogenní skupinou látek, které se účastní buněčné signalizace. Patří mezi ně například interleukiny, interferony, tumor nekrotizující faktor a další. V kostním tkáňovém inženýrství se tyto látky příliš neuplatňují. Z celé skupiny interleukinů se v kostním vývoji a metabolismu uplatňují zejména IL-6 a IL-11. Receptorem pro buněčnou signalizaci je gp130 a je pravděpodobné, že další cytokiny, které přenáší signál přes tento receptor, ovlivňují osteogenezi [Bilezikian et al., 2008].

Interleukin 6 a interleukin 11 mají dle literatury i negativní vliv na osteogenezi v buněčných kulturách [Bilezikian et al., 2008], [Hughes et al., 1993]. Ve srovnání s BMP, PDGF, VEGF, TGF- β představují interleukiny spíše postranní proud v kostním tkáňovém inženýrství.

Interleukin 11 se účastní regulace a diferenciaci kostních buněk. Zvýšená exprese IL-11 u myši vede ke stimulaci novotvorby kosti. Zvyšuje tloušťku kortikalis dlouhých kostí, zvětšuje jejich pevnost a na myších snižuje věkem podmíněnou ztrátu kostní hmoty. V experimentu na myších vedl IL-11 ke zvýšení exprese genu pro BMP-2, k osteoblastogenezi a snížení adipogeneze v kostní dřeni [Takeuchi et al., 2002]. Interleukin 11 může hrát důležitou roli v humánní medicíně k ochraně před stařeckou osteoporozou. Leon et al., (2007) testovali *in vitro* lidské parodontální buňky (HPLCs - human periodontal ligament cells) spolu s IL-11 v přítomnosti kyseliny citronové. Potvrdili, že HPLCs se v přítomnosti IL-11 a kyseliny citronové diferencovaly v osteoblasty.

Suga et al., (2001) testovali interleukin 11 a BMP-2 na myších mezenchymálních kmenových buňkách. Zjistili synergický efekt IL-11 a BMP-2 na osteogenezi [Suga et al., 2001]. Této zkušenosti autoři využili k dalším experimentům a v roce 2004 publikovali zkušenosti s testováním IL-11 *in vivo*. Suga et al., (2004) pracovali s defektem ulny na králičím modelu. Použili PLGA adsorbované želatinové matrix spolu s rhBMP-2 a rhIL-2. Testovali oba růstové faktory dohromady a samostatně. Prokázali, že oba růstové faktory působily synergicky a ve skupině s rhBMP-2 a rhIL-2 byl největší nárůst kosti. Překvapivé bylo, že mechanická stabilita byla po 8 týdnech stejná ve všech skupinách. Růstové faktory vedly zřejmě ke zrychlení novotvorby kosti bez nárůstu její pevnosti [Suga et al., 2004].

Vitamin D obvlivňuje metabolismus kosti. V kostním tkáňovém inženýrství se používá méně ve srovnání s předchozími látkami. Tento vitamin steroidní povahy typicky ovlivňuje střevo, ledviny, kost, ale receptory pro jeho působení mají i kůže, lymfocyty, monocyty, kosterní a srdeční sval, mléčná žláza a adenohipofýza. Hlavní funkcí vitamínu D je aktivace transportu Ca^{2+} a PO_4^{3-} ze střeva a zvýšení plazmatické hladiny těchto iontů v plazmě. Jeho sekrece je fyziologicky kontrolována zpětnovazebně přes plazmatickou hladinu Ca^{2+} a PO_4^{3-} . Tvorba vitamínu D je stimulována parathormonem [Ganong et al., 1995]. De Kok et al., (2006) použili lidských mezenchymálních buněk (hMSCs) s vitamínem D spolu s hydroxyapatitem a trikalciem fosfátem. Tyto buňky implantovali subkutánně imunosuprimovaným myším a zjistili, že skupina s hMSCs měla větší nárůst kosti oproti kontrole, ale pozitivní efekt vitamínu D se nepodařilo prokázat. [De Kok et al., 2006].

Song et al., (2011) testovali MSCs z kostní dřeni od lidských dopělých dárců spolu s BMP-2 a kalcitriolem. Zjistili signifikantně synergický efekt obou růstových faktorů na hladinu alkalické fosfatasy a na mineralizaci. [Song et al., 2011]

Kabasawa et al., (2003) použili demineralizované potkaní kosti s rh-BMP-2, kterou implantovali subkutánně čtyřtýdenním a padesátitýdenním samicím potkana. Snažili se simulovat podmínky regenerace kosti u staršího pacienta. Zjistili signifikantně nižší

novotvorbu kosti u padesátitýdenních samic. Systémovým podáváním kalcitriolu, parathormonu a prostaglandinu E2 samostatně se snažili eliminovat tento věkový rozdíl v osteogenezi. Došlo k signifikantnímu nárůstu kosti u systémového podávání všech tří růstových faktorů bez rozdílu. Autoři se domnívají, že by tato zkušenost mohla pomoci při léčbě porotických pacientů vyššího věku [Kabasawa et al., 2003].

Vitaminu D se používá v kostním tkáňovém inženýrství méně, spíše jako aditiva. Porovnání účinku vitaminu D v různých experimentech viz tabulka 19.

Tabulka 19 - Porovnání účinku vitaminu D v různých studiích

Růstové faktory/ kmenové buňky	Matrix	Model	Metoda analýzy	Výsledek	Ref.
Vitamin D //hBMSCs	Hydroxyapatit/trikalci- um fosfát	Subkutánní implantace u imunosupri- mované myši	Histomofrometrie	Bez efektu. Nebyl signifikantní rozdíl mezi skupinou hBMSCs léčenou vitaminem D a neléčenou	De Kok et al., (2006)
BMP-2/ vitamin D ₃ //ASCs*	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> - osteogenní medium	Barvení:Alizarin červený, ALP	Synergický efekt vitaminu D a BMP- 2	Song et al., (2011)
Implantace rhBMP-2. Systémové podávání: Kalcitriolu/ Parathormonu Prostaglandinu E2	Deminera- lizo-vaná kost potkana	Subkutánní implantace u 4 a 50 týdenních samic potkana	RTG, histologie, aktivita ALP, obsah vápníku	50 týdenní samice potkana měly menší novotvorbu kosti ve srovnání s 4 týdenními. Systémové podávání Kalcitriolu/ Parathormonu/ Prostaglandinu E2 samostatně vedlo k signifikantnímu nárůstu kosti. Nárůst byl srovnatelný s nárůstem novotvorby u 4 týdenních samic. Rozdíly mezi růstovými faktory nebyly.	Kabasawa et al., (2003)

* Adipose stem cells

Parathormon PTH je produkován příštítnými tělísky štítné žlázy. Hormon působí v kostech, zvyšuje kostní resorpci a mobilizuje Ca²⁺. Kromě zvyšování plasmatické hladiny Ca²⁺ a snižování hladiny fosfátu v plazmě, PTH zvyšuje exkreci fosfátu močí. Parathormon také zvyšuje tvorbu 1,25-dihydroxycholecalciferolu. Syntetický polypeptid obsahující aminokyselinové zbytky 1-34 hovězího PTH má všechny známé biologické účinky celé molekuly [Ganong et al., 1995]. Pokud je parathormon podáván systémově intermitentně, zvyšuje novotvorbu kosti. Při kontinuálním podávání vedl k její resorpci [Hock et al., 2002].

Pettwayová et al., (2005) citují celou řadu autorů a dokládají, že intermitentní podávání PTH stimuluje novotvorbu kosti, zvyšuje množství kompakty a její tloušťku a zlepšuje mechanické vlastnosti kosti u hlodavců, králíků, primátů a člověka [Pettway et al., 2005]. Stejná autorka použila myších mezenchymálních kmenových buněk z kostní dřevě na želatinovém nosiči. Systémově podávali denně PTH po dobu 1, 3 a 7 týdnů a testovali efekt. Výsledky byly protikladné, autoři zjistili nejvyšší novotvorbu kosti při systémovém třítydenním podávání PTH, ale v třítydenním podávání nebyl rozdíl mezi PTH a podáváním prázdného vehikula [Pettway et al., 2005].

V kostním tkáňovém inženýrství se využívá aminoterminální části molekuly PTH(1-34) pro výše popsané účinky. Na potkaním modelu bylo potvrzeno, že PTH(1-34) zastavuje rozvoj osteoartrózy, pokud je podáván jednou za tři dny [Chang et al., 2009]. Eswaramoorthy et al., (2012) použili stejného molekulového zbytku PTH(1-34) a snažili se vylepšit podávání PTH. Porovnávali intraartikulární podávání PTH(1-34) v intervalu jednou za tři dny s PTH(1-34) enkapsulovaným na PLGA. Pozorovali, že v obou skupinách došlo k zastavení osteoartrózy, jinak řečeno, že PLGA s parathormonem je stejně účinný při patnáctidenním intervalu podávání. Autoři ověřili postupné uvolňování PTH(1-34) z PLGA [Eswaramoorthy et al., 2012].

Rozen et al., (2007) porovnávali synergický efekt PTH(28-48) interleukinu 6 a receptoru pro interleukin 6 (IL-6R). Zjistili výrazný nárůst pevnosti zhojené zlomeniny s použitím PTH(1-34) s IL-6+ IL-6R a PTH(28-48) s IL-6+ IL-6R [Rozen et al., 2007]. Guimarães et al., (2012) systémově podávali PTH(1-34). Studovali dentinogenezi a mineralizaci zárodků řezáků u myši. Potvrdili signifikantně vyšší apozici dentinu, vyšší obsah ALP a lepší výsledky v mechanickém testování při použití PTH(1-34) [Guimarães et al., 2012].

V kostním tkáňovém inženýrství hraje parathormon menší roli a stejně tak jako IL-6 a IL-11 má spíše doplňkovou úlohu. Práce s použitím PTH jsou alespoň o řád méně časté. K porovnání účinku vitamínu D v různých experimentech viz tabulka 20.

Tabulka 20 - Porovnání účinku PTH v různých experimentech

Růstové faktory/ kmenové buňky	Matrix	Model	Metoda analýzy	Výsledek	Ref.
PTH// mBMSCs*	Želatina	Subkutánní implantace u myši	RTG, μ CT, spektroskopie, histomorfometrie	Protikladné výsledky mezi spektroskopii a histomorfometrií.	Pettway et al., (2005)
PTH(1-34) enkapsulované do PLGA	PLGA	Léčba osteoartritis kolene na krysím modelu, intra-artikulární aplikace.	Histologie, imunohistochemie, histomorfometrie	Výborný efekt postupného uvolňování PTH(1-34) z PLGA. Stejný efekt aplikace PTH(1-34) v intervalu 3 denním ve srovnání s PTH(1-34) enkapsulovaném do PLGA v intervalu 15 denním.	Chang et al., 2009
PTH(28-48) PTH(1-34) IL-6+IL-6R**	---	Zlomenina tibie u potkana	Histomorfometrie mechanické testování	Signifikantní zlepšení (o 300%) mechanické pevnosti zlomeniny při použití IL-6+IL-6R + PTH(1-34) a zlepšení o 200% s použitím IL-6+IL-6R+ PTH(28-48)	Rozen et al., (2007)
Systemové podávání	---	Dentinogeneze a mineralizace	RTG, elektronová	Signifikantně vyšší apozice dentinu, vyšší obsah ALP,	Guimarãe

PTH(1-34)	zárodků řezáků u myši	mikroskopie, nanoindentace	lepší výsledky v mechanickém testování	s et al., (2012)
*	mBMSCs – myši mezenchymální kmenové buňky z kostní dřeni			
**	IL-6+IL-6R – Interleukin 6 a IL-6 solubilní receptor			

Kalcitonin

Kalcitonin je hormon, který produkují parafolikulární buňky štítné žlázy. Tento peptid funguje jako antagonist parathormonu a snižuje plazmatickou hladinu vápníku, zvyšuje ukládání Ca^{2+} v kostech, respektive inhibuje aktivitu osteoklastů, snižuje absorpci vápníku ve střevě a reabsorpci v ledvinách. Kalcitonin patří do větší skupiny peptidů, kterou můžeme označit jako skupinu kalcitoninu. Obsahuje další peptidové hormony, které jsou svojí strukturou blízké kalcitoninu a zahrnují calcitonin gene-related peptide (CGRP), amylin, adrenomedulin a adrenomedulin-2 [24]. Výše jmenované peptidy z rodiny kalcitoninu vznikají alternativním sestřihem (angl. splicing) primárního transkriptu RNA. Při výběru exonů 1, 2, 3 a 4 vzniká kalcitonin, pokud je exon 4 nahrazen exony 5, 6 vzniká CGRP [Naot et Cornish 2008], [Rosenfeld et al., 1983]. Alternativní sestřih je specifický pro různé tkáně. Pro nervovou tkáň je typický CGRP [Naot et Cornish 2008]. Kalcitoninu se používá v humánní medicíně při léčbě úbytku kostní hmoty jako např. u osteoporózy, Pagetovy choroby, u nádorových chorob a při imobilitě. Podobně jako kalcitonin vyvolá podání CGRP nebo amylinu pokles plazmatické hladiny vápníku, ale tyto látky mají výrazně menší působení než vlastní kalcitonin. V kostním tkáňovém inženýrství se kalcitoninu používá méně. O to překvapivější je práce Fanga et al., (2013). Tito autoři použili adenoviru jako vektoru genu pro CGRP na kmenové buňky z tukové tkáně (ASCs). Takto upravených kmenových buněk použili spolu s β -TCP matrix na defekt radia u potkana. Zjistili signifikantně vyšší novotvorbu kosti u skupiny transfekce CGRP na kmenové buňky oproti samotné matrix či kmenovým buňkám s matrix bez transfekce [Fang et al., 2013].

Almeida et al., (2007) testovali vliv systémového podávání kalcitoninu u defektu mandibuly u potkana. Zjistili negativní efekt tohoto hormonu na novotvorbu kosti oproti kontrole [Almeida et al., 2007].

Arisawa et al., (2008) vytvořili defekt mandibuly u ovariektomovaných samic potkana. Nejistili rozdíl v novotvorbě kosti oproti kontrole [Arisawa et al., 2008].

Washimi et al., (2007) zjišťovali rozdíly v novotvorbě kosti mezi použitím kalcitoninu a PTH(1-34) na modelu ovariektomovaných samic potkana. Zjistili synergický účinek PTH s kalcitoninem na udržení mikroarchitektury kosti u ovariektomovaných samic, tedy lepší výsledky než při použití těchto hormonů samostatně [Washimi et al., 2007].

Claro et al., (2005) použili potkanů s farmakologicky navozeným diabetem. Autoři nepozorovali žádný rozdíl v nárůstu kosti mezi skupinou s diabetem léčenou kalcitoninem a skupinou s diabetem bez léčby [Claro et al., 2005].

Kalcitonin má negativní výsledky v kostním tkáňovém inženýrství [Almeida et al., 2007] a často má jeho použití kontroverzní výsledky [Arisawa et al., 2008], [Claro et al., 2005]. Použití tohoto hormonu je méně časté. K porovnání účinku kalcitoninu v různých experimentech viz tabulka 21.

Tabulka 21 - Porovnání účinku kalcitoninu v různých experimentech

Růstové faktory/ kmenové buňky	Matrix	Model	Metoda analýzy	Výsledek	Ref.
Kalcitonin systémově	---	Defekt mandibuly u potkana	RTG, histologie, histomorfometrie	Negativní efekt. Menší nárůst kostní homoty ve skupině s kalcitoninem	Almeida et al., (2007)
Kalcitonin systémově	---	Defekt mandibuly u ovariectomovaných samic potkana	Denzitometrie, histologie, histomorfometrie	Bez efektu	Arisawa et al., (2008)
Kalcitonin/ PTH(1-34) systémově	---	Změna mikroarchitektury femoru u ovariectomovaných samic potkana	μCT, mechanické testy, histomorfometrie,	Synergický účinek na Udržení mikroarchitektury kostí mezi PTH a ECT u ovariectomovaných samic. Lepší výsledky než při použití těchto hormonů samostatně	Washimi et al., (2007)
Kalcitonin systémově	polyetylén	Defekt vyplněný matrix v parietální kosti u potkana s indukovaným diabetem	Histologie, histomorfometrie	Bez efektu na novotvorbu kosti mezi potkany s diabetem a skupinou s diabetem a kalcitoninem	Claro et al., (2005)
Transfekce genem pro CGRP* // rASCs**	β-TCP	Defekt radia u potkana	RTG, histomorfometrie	Signifikantně vyšší novotvorba kosti ve skupině CGRP-ASCs/β-TCP oproti skupině s β-TCP a skupině s ASCs/β-TCP	Fang et al., (2013)

* CGRP - Calcitonin gene-related peptide

** rASCs - potkaní kmenové buňky derivované z tukové tkáně

Kolonie stimulující faktory - CSF

Kolonie stimulující faktory (amgl. colony-stimulating factors) jsou glykoproteiny, které patří mezi cytokiny a působí na vyzrání bílých krvinek z hematopoetické kmenové buňky. Mezi CSF patří faktor stimulující granulocyty a makrofágy (angl.. Granulocyte-Macrophage CSF, GM-CSF), faktor stimulující granulocyty (angl.. Granulocyte CSF, G-CSF) a faktor stimulující makrofágy (angl.. Macrophage CSF, M-CSF)32.

Granulocyty kolonie stimulující faktor (G-CSF) reguluje granulocytopenzu, podílí se na proliferaci, aktivaci a maturaci neutrofilů [Demetri et al., 1991]. V klinické medicíně se ho používá jako rekombinantního G-CSF k terapii neutropenie, především v onkologii po chemoterapii a v hematonekologii po transplantaci kostní dřeně k rychlé mobilizaci granulocytů. G-CSF lze využít ke stimulaci granulopoezy v rámci přípravy na chemoterapii nebo transplantaci kostní dřeně. Může se ho také použít u pacientů s HIV infekcí k mobilizaci granulocytů z kostní dřeně [Demetri et al., 1991].

Ishida et al., (2010) použili želatiny jako nosiče a systému transportu léčiv ("drug delivery") pro G-CSF v defektu vřetenní kosti u králíka. Na základě CT volumetrie, histologie, imunohistochemie a PCR prokázali, že G-CSF vedlo k rychlejší osteogenezi a angiogenezi [Ishida et al., 2010].

Minagawa et al., (2014) vytvořili defekt kalvy u potkana, který vyplnili β-TCP s G-CSF, β-TCP s želatinovým nosičem s G-CSF. Signifikantně nejvyšší nárůst v

novotvorbě kosti byl ve skupině s želatinou jako nosičem G-CSF. Dále autoři zaznamenali nejvyšší nárůst produkce kosti ve skupině β -TCP+ želatina+ 1 a 5 μ g G-CSF, oproti skupině β -TCP+ želatina+ 20 μ g G-CSF. 28. Na této práci se ukazuje, že želatina zřejmě pomaleji uvolňuje G-CSF a optimum dávky je mezi 1 a 5 μ g G-CSF [Minagawa et al., 2014].

Endoteliální progenitorové buňky (angl. Endothelial progenitor cells - EPCs) se podílejí na embryonálním vývoji cévního systému a jako CD34+ byly nalezeny v periferní krvi dospělých lidí. Jsou rezervoárem pro neovaskularizaci. G-CSF tyto buňky ovlivňuje, buňky se označují jako mobilizované a mohou být použity nejen k revaskularizaci, ale i osteogenezi [Mifune et al., 2008].

Mifune et al., (2008) využili CD34+ buněk z periferní krve mobilizovaných G-CSF. U těchto buněk ověřili *in vitro* schopnost diferencovat se v osteoblasty. Dále vytvořili *in vivo* model nehojící se zlomeniny na potkaním modelu. Vytvořili zlomeninu femoru a kauterizovali přilehlý periost. Výše popsaných buněk použili v některých skupinách *in situ* s kolagenní matrix a v jiných je podali systémově. Zjistili lepší efekt u buněk implantovaných *in situ* než podaných celkově. Dále ověřili jejich osteogenní a vaskulogenní potenciál [Mifune et al., 2008].

Klinicky využili těchto poznatků Kuroda et al., (2011) v kazuistice pacienta s nezhojenou frakturou tibie 11 měsíců po osteosyntéze. Použili CD34+ buněk z periferní krve, které mobilizovali G-CSF. Takto mobilizovaných buněk použili spolu s autologní kostí. Po 3 měsících byla zlomenina zhojena [Kuroda et al., 2011]. Tato zkušenost zřejmě autorům dodala odvahu, protože v roce 2014 publikovali pilotní klinickou studii s použitím CD34+ buněk mobilizovaných opět G-CSF na kolagenním nosiči. Po 12 týdnech radiologicky verifikovali zhojení u 71% pacientů, respektive u 5 pacientů ze 7. Nezaznamenali žádné negativní efekty, které by měly vliv na morbiditu nebo mortalitu pacientů [Kuroda et al., 2014].

Jiný experiment provedli Murakami et al., (2013) s lidskými kmenovými buňkami zubní dřeně (human dental pulp stem cells - hDPSCs). Autoři se snažili nalézt techniku izolace kmenových buněk bez použití průtokové cytometrie. Tyto buňky mobilizovali použitím G-CSF. Efektivitu přeměny buněk verifikovali analýzou pomocí western blot expresí biomarkeru pulpální tkáň TRH-DE (thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme). Takto získaných mobilizovaných kmenových buněk použili v experimentu *in vivo* na imunosuprimovaných myších, kterým subkutánně implantovali kořeny lidských zubů s kolagenní matrix a modifikovanými hDPSCs (hMDPSCs). Pozorovali signifikantní nárůst novotvorby pulpy histologicky a také signifikantní nárůst neovaskularizace [Murakami et al., 2013].

Granulocyty kolonie stimulující faktor má vliv na mobilizaci kmenových buněk a vývoj neovaskularizace. V kostním tkáňovém inženýrství se ho používá méně často, stejně jako to platí o celé skupině. Následující tabulka 22 porovnává účinek G-CSF v různých experimentech.

Tabulka 22 - Porovnání účinku G-CSF v různých experimentech

Růstové faktory/ kmenové buňky	Matrix	Model	Metoda analýzy	Výsledek	Ref.
G-CSF	Želatina	Defekt ulny u králíka	Histologie, histomorfometrie, RTG, CT volumetrie, RT-PCR*, průtoková cytometrie, imunohistochemie	Signifikantně vyšší novotvorba kosti ve skupině s G-CSF. Vaskulogeneze a osteogeneze signifikantně zvýšeny ve skupině G-CSF	[Ishida et al., 2010]
G-CSF	□-TCP, želatina	Defekt kalvy u potkana	Histomorfometrie	Signifikantně vyšší novotvorba kosti u skupiny s 1 a 5 µg G-CSF v želatině s použitím β-TCP. Skupina β-TCP+želatina+ 20 µg G-CSF měla výrazně menší novotvorbu kosti. Skupiny s G-CSF jen s β-TCP neměly takový nárůst kosti.	Minagawa et al., 2014
G-CSF// hDPSCs**	Kolagen	Subkutánní implantace lidských kořenů zubů u imunosu-primované myši	Histologie, western blot: TRH-DE***	Histologicky signifikantní nárůst novotvořené zubní dřene při použití mobilizovaných hDPSCs resp. (MDPSCs), signifikantní nárůst vaskularizace pulpy s použitím mobilizovaných hDPSCs resp. (MDPSCs)	Murakami et al., (2013)

* RT-PCR Real time PCR

** hDPSCs - lidské kmenové buňky zubní dřene - human dental pulp stem cells

*** Western blot analýza exprese biomarkeru pulpální tkáně: thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme (TRH-DE)

4 Popis řešení a výsledky výzkumu

Nedostatek kosti je jedním s největších problémů traumatologie, ortopedie, spondylochirurgie a maxilofaciální chirurgie. Ve všech těchto oborech se lékaři setkávají s kostními defekty u pacientů po ztrátových poraněních, po resekčních výkonech u nádorových onemocnění, v dentální implantologii, u plastických operací vrozených vad obličeje (u rozštěpů, kraniofaciálních dysostóz a u estetických korekčních operací). Nedostatek kosti je často limitujícím faktorem funkční rehabilitace pacienta. Ve spondylochirurgii se kostní defekt nahrazuje autologní kostí nebo kostí z tkáňové banky. Nejčastější formou zlomenin páteře jsou tříštivé zlomeniny, kompresivní fraktury u osteoporózy, osteolytické kostní tumory včetně sekundárních. [Barsa et al., 2012]. Traumatologové a ortopedi se potýkají se stejným spektrem příčin, které způsobují nedostatek kostního materiálu.

Zlatým standardem rekonstrukce stále zůstává autologní kost. Největším problémem je morbidita vyplývající z nutnosti dvou operačních přístupů, označovaná jako morbidita v místě odběru (angl. donor site morbidity). Dalším negativem u autologních štěpů je resorpce části transplantované kosti vyplývající z absence výživy v době po operaci. Z toho vyplývá riziko mikrobiální kontaminace kostního bloku, který v době po operaci není kontrolován imunitou pacienta, protože chybí cévní zásobení. Autologní kost je limitována také objemem, který lze odebrat. 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. Ideálem by byla arteficiální kostní matrix s výše uvedenými vlastnostmi opatřená kmenovými buňkami, která dá vzniknout vlastní kosti pacienta.

Vysoký potenciál v kostním tkáňovém inženýrství se přisuzuje autologním mezenchymálním kmenovým buňkám (MSCs) [Zhang et al., 2010], [Griffin et al., 2011]. Tyto kmenové buňky mají několik výhod oproti použití růstových faktorů: mají osteogenní potenciál, snadno se získávají, kultivují a mají nízký imunogenní potenciál. [Kim et al., 2008]. Podle různých autorů inhibují proliferaci buněk imunitního systému, jako jsou T- a B- lymfocyty, dendritické buňky a NK buňky, a modulují funkci makrofágů [Kim et Hematti 2009], [Ghannam et al., 2010]. 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].

Mechanická stabilita hraje velkou roli v kostním tkáňovém inženýrství. Zlomenina je vystavena značným dislokačním silám. V maxilofaciální chirurgii se jedná o velké žvýkací síly, v ortopedii zatížení osového skeletu a ve spondylochirurgii je páteř namáhána páčivými, trakčními a kompresivními silami. Experimentálního modelu fraktur kalvy se široce užívá, ale všechny tyto experimenty postrádají efekt mechanického zatížení. Obratlový defekt a posterolaterální fúzi jsme si vybrali jako experiment s mechanicky zatíženým augmentátem. Obvykle se spinální fúze provádí na větším zvířeti, nejčastěji ovčím nebo potkaním modelu [Liang et al., 2010], [Zhu et al., 2011]. V našem experimentu jsme se snažili přiblížit použití kmenových buněk a hydroxyapatitové matrix klinické praxi. Účelem práce bylo ověřit novotvorbu kosti s použitím definovaných lidských kmenových buněk z kostní dřevě – hBMSCs - a hydroxyapatitové matrix na imunosuprimovaném potkaním modelu. Ve druhé fázi jsme vytvořili levný a bezpečný model obratlové fúze u imunosuprimovaného potkana s použitím stejných buněk a matrix.

4.1 Materiál a metody

Zvířecí model

V naší studii jsme pracovali s defektem obratlového těla na potkaním modelu kmene Wistar (Velaz, Praha, ČR) s hmotností mezi 300–350 g. V dorzolaterální fúzi jsme experimentovali s kmenem Wistar (Anlab, Charles River Laboratories, Kolín n/Rýnem, Německo) s váhou mezi 300–350 g. Do naší studie jsme zahrnuli pouze samce tohoto kmene k minimalizaci vlivu hormonů na hojení a novotvorbu kosti [Šedý et al., 2008, Luize et al., 2008]. Studii jsme prováděli podle nařízení Evropské komise - European Communities Council Directive - z 24. listopadu 1986 (86/609/EEC) o použití zvířat ve výzkumu. Studie byla odsouhlasena Etickou komisí Ústavu experimentální medicíny Akademie věd ČR.

Experimentální skupiny

Potkany jsme náhodně rozdělili do následujících skupin:

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 5×10^6 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 5×10^6 lidskými mezenchymálními kmenovými buňkami z kostní dřevě (hBMSCs), augmentační materiál byl krytý kolagenní membránou (n = 5);

Izolace a kultivace buněk

Lidské MSCs byly izolovány z kostní dřevě (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). Mononukleární frakce obsahující hBMSCs byla separována stupňovitou centrifugací s použitím 25% Gelofusinu® (B. Braun, Melsungen, Německo) a buňky byly umístěny do plastových nádob v koncentraci 5–10 x 10⁶ buněk/75 cm². Buňky byly dále kultivovány v médiu s obsahem Alpha MEM Eagle bez deoxyribonukleotidů, ribonukleotidů a UltraGlutaminu (Lonza, Basilej, Švýcarsko) s přidávkem 5 % trombocytárního lyzátu (Bionova, Praha, ČR) s 10 µg/ml Gentamicinu (Lek Pharmaceuticals, Lublaňa, Slovinsko). Neadherující buňky jsme vypláchli stejným médiem. Po dosažení 80% pokrytí nádoby buňkami jsme odloučili buňky od stěny nádoby pomocí roztoku 1 ml/75 cm² TrypLE CTS Select™ (Gibco, CA, USA). Buňky jsme v

rámci druhé pasáže analyzovali a použili k experimentům. Expresí specifických markerů jsme ověřili průtokovou cytometrií (FACS Aria flow cytometer, BD Biosciences, San Diego, USA). Buňky exprimovaly markery CD105, CD73, CD90 a byly negativní na expresi markerů CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79alpha a HLA-DR. Růstový potenciál buněk jsme ověřili osteogenní, chondrogenní a adipogenní diferenciací s použitím standardních diferenciacních medií, která byla popsána v literatuře [Turnovcová et al., 2009]. Viabilita buněk byla více než 95 %. Tuto jsme ověřili barvením tryptanovou modří. Kultury jsme testovali na přítomnost bakteriální (včetně *Mycosplasma pneumoniae*) a fungální kontaminace. Přestože byly buňky získány od dárců různého věku, nepozorovali jsme signifikantní odlišnosti v proliferační aktivitě. Buňky byly zmrazeny ve fyziologickém roztoku s obsahem 7,5% dimethylsulfoxidu (DMSO) s 5% albuminem. Buňky jsme skladovali v tekutém dusíku při -160°C až do použití v experimentu.

Příprava kostní matrix před implantací

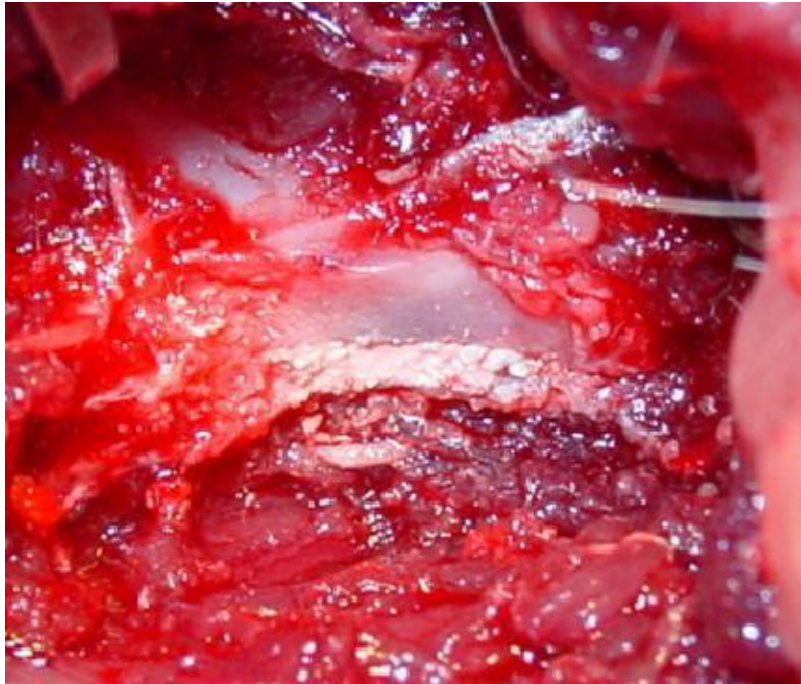
Kmenové buňky jsme rozmrazili, centrifugovali a třikrát promyli roztokem vlažného pufru PBS (angl. phosphate buffered saline) k odstranění zbytkového zmrazovacího roztoku. Suspenze buněk s koncentrací od 0,5 do $5,0 \times 10^6$ buněk/ml jsme umístili do vialek. Navlhčený hydroxyapatitový granulát CEM-OSTETIC® (Berkeley Advanced Biomaterials, Inc., Berkeley, USA) (0.02 g) jsme impregnovali suspenzí buněk. Suspenze obsahující matrix jsme centrifugovali při 1000 otáčkách/min. Po centrifugaci jsme zbytkový PBS odstranili. Obsah vialky jsme promíchali sterilním nástrojem, abychom získali homogenně granulovanou suspenzi matrix a buněk.

Chirurgický výkon

Zvířata jsme uvedli do celkové inhalační anestezie 5% isofluranem ve směsi se vzduchem při průtoku 300 ml/min. Vedení celkové anestézie bylo dále pomocí 2% isofluranu se stejnou nosnou směsí i průtokem pomocí obličejové masky. V naší laboratoři je tento anestetický protokol rutinně používán řadu let a ve výše uvedeném provedení a koncentraci anestetika byl prokázán jako bezpečný i pro déletrvající chirurgické výkony [Hejcl et al., 2008]. V poloze zvířete na břicho jsme po odstranění srsti 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:

Svaly kolem páteře jsme tupě odsunuli a bez perforace peritonea jsme vytvořili přístup k ventrolaterální ploše obratlového těla L2. Ventrální část obratlového těla 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. Rozměry jsme kontrolovali kalibrovanou parodontologickou WHO sondou. Defekt jsme dle výše popsaných skupin nechali prázdný, event. jsme jej vyplnili hydroxyapatitem, hydroxyapatitem s kmenovými buňkami v koncentraci 0,5 nebo $5,0 \times 10^6$ (viz obrázek č. 1).

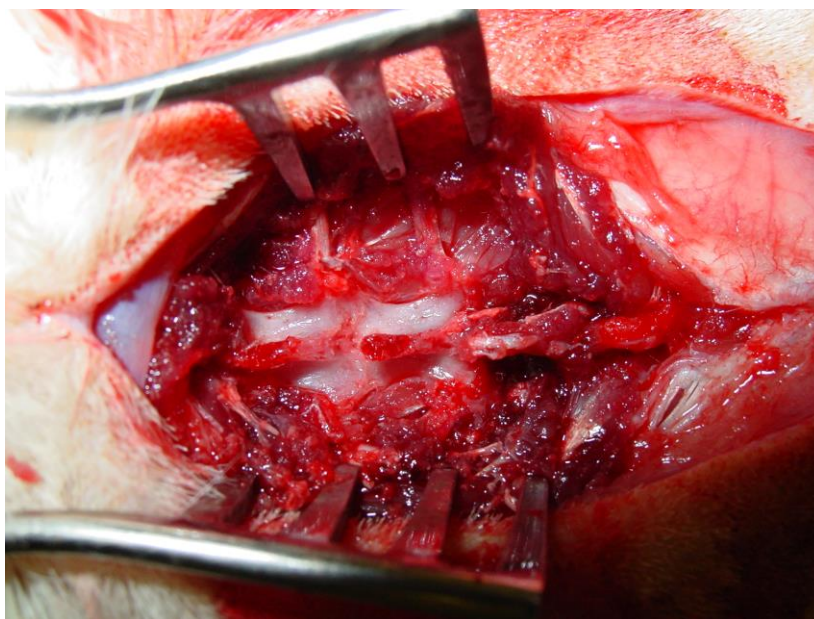


Obrázek 1 – Defekt ventrální části obratlového těla lumbální páteře s augmentačním materiálem – peroperační fotografie. Experiment defektu obratlového těla

Takto vyplněný defekt jsme pokryli vstřebatelnou kolagenní membránou HyproSorb® (Hypro, Otrokovice, ČR) v souladu s pravidly metody řízené kostní regenerace (angl. guided bone regeneration). Použití kolagenní membrány samo o sobě je zlatým standardem v řízené kostní regeneraci [Kazakos et al., 2011]. Svaly jsme sešili neresorbovatelným materiálem jednotlivými stehy, kůži jsme sešili plastickým stehem k prevenci vykousávání šicího materiálu zvířaty. Zvířata s augmentací, tj. s hydroxyapatitem nebo s hydroxyapatitem a kmenovými buňkami, jsme imunosuprimovali denně cyclosporinem dávkou 10 mg/kg i.m. (Sandimmun®, Novartis, Bazilej, Švýcarsko). K prevenci bakteriální infekce jsme subkutánně podávali gentamicin 10 mg 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.

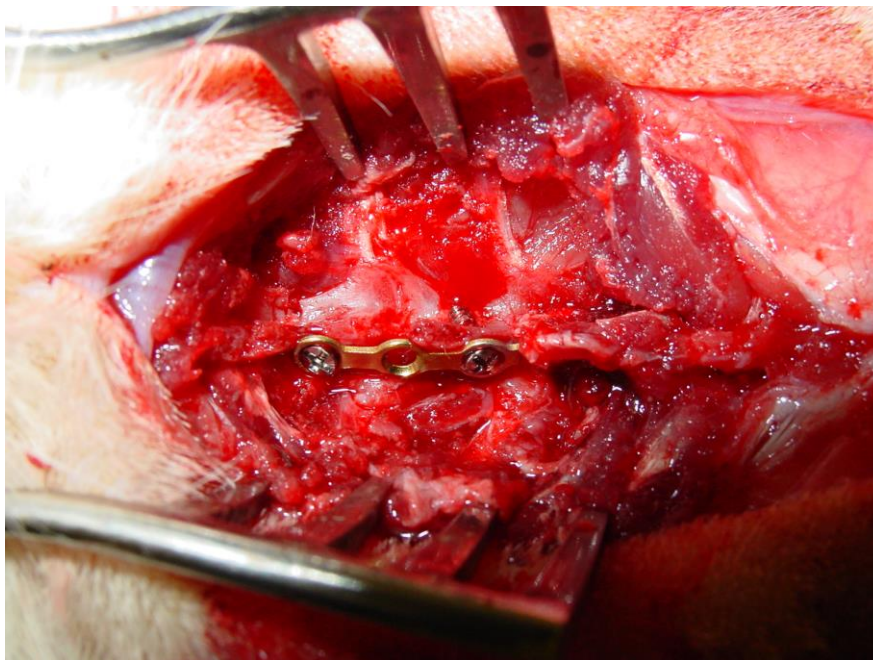
b) Experiment s dorzolaterální fúzí lumbální páteře:

Svaly kolem páteře jsme tupě odsunuli. Dorzální plochy *processus transversi et spinosi* stejně jako kost *arcus vertebrae* jsme pečlivě očistili od zbytků měkkých tkání. Takto jsme očistili vždy dva obratle nad sebou bez průniku do míšního kanálu (viz obrázek č. 2).



Obrázek 2 - Deperiostované obratlové oblouky a spinózní výběžky lumbální páteře - peroperační fotografie. Experiment spinální fúze, skupiny č. 5, 6

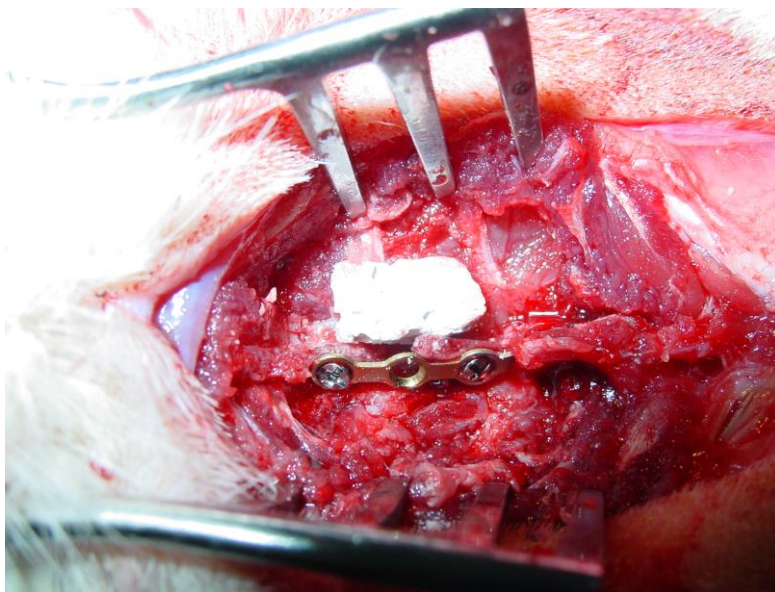
Vrtáčkem z instrumentária mikro (Jeil Medical Corporation, Soul, Jižní Korea) jsme vytvořili otvory v processus spinosi dvou sousedních obratlů a spojili je titanovými dlahami mikroplate a šrouby (viz obrázek č. 3).



Obrázek 3 – Osteosyntéza spinózních výběžků lumbálních obratlů pomocí titanových mikroplate a titanových šroubů – peroperační fotografie. Experiment spinální fúze, skupiny č. 5, 6

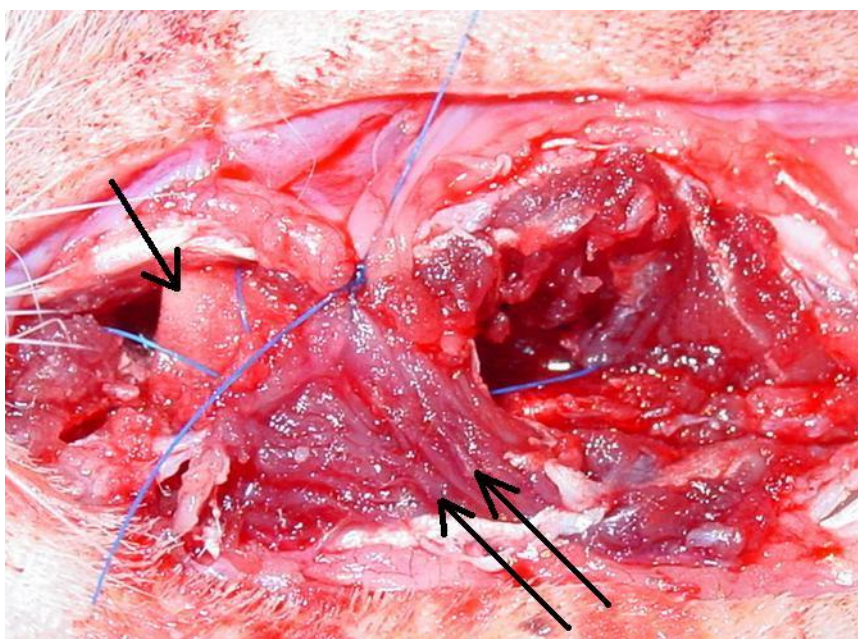
Vlastní preparaci spinózních výběžků jsme prováděli s chlazením sterilním fyziologickým roztokem jako prevencí tepelného traumatu kosti. Stabilitu fúze jsme kontrolovali šetrnou

manuální palpací. Použili jsme standardní titanové dlahy mikroplate s tloušťkou 0,5 mm z medicínsky čistého titanu Grade IV a titanových šroubů (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 5×10^6 hBMSCs (skupina 6). Zvažovali jsme použití hydroxyapatitu v bloku spolu s kmenovými buňkami, ale jak vyplývá z obrázku č. 4, materiál v jednom kuse v bloku by dostatečně nepřilnul ke kostnímu podkladu a pravděpodobně by mohlo docházet k podrůstání vaziva mezi obratel experimentálního zvířete a augmentační materiál.



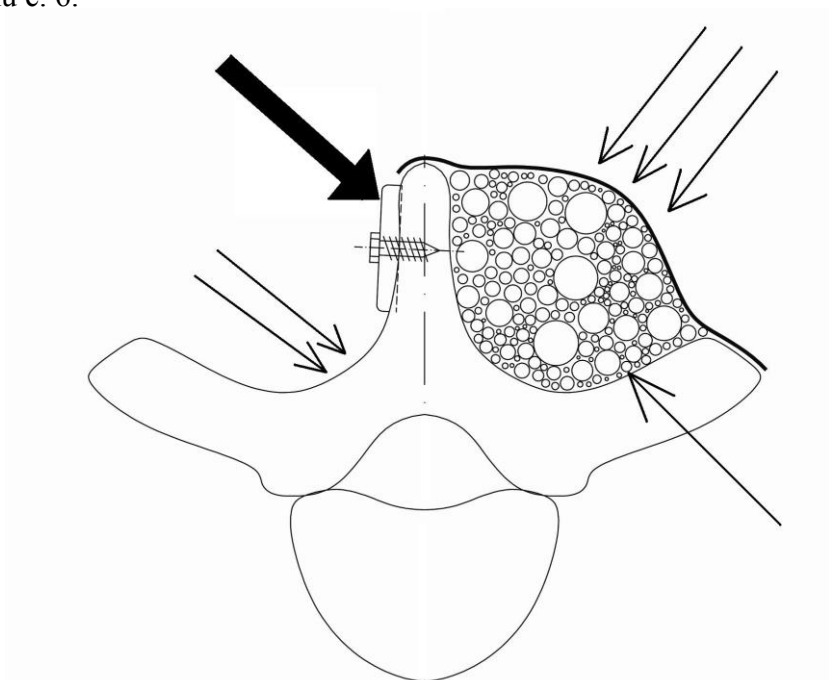
Obrázek 4 – Schématická ukázka umístění augmentátu do prostoru ohraničeném dorzální plochou obratlových oblouků a spinózními výběžky – peroperační fotografie. Solidní materiál v bloku by dostatečně nepřilnul ke kostnímu podkladu a pravděpodobně by mohlo docházet k podrůstání vaziva mezi obratel experimentálního zvířete a augmentační materiál, experiment spinální fúze, skupiny č. 5, 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 (viz obrázek č. 5).



Obrázek 5 – Sutura po vrstvách. Jednou šipkou je označena kolagenní membrána a dvěma šipkami paravertebrální svaly, které jsme přetáhli přes augmentovaný segment – peroperační fotografie. Experiment spinální fúze, skupiny č. 5, 6

Na tomto obrázku je jednou šipkou označena kolagenní membrána a dvěma šipkami paravertebrální svaly, které jsme přetáhli přes místo spinální fúze. Schéma celého postupu je na obrázku č. 6.



Obrázek 6 – Schéma spinální fúze, transverzální řez. Jedna šipka: augmentační materiál, dvě šipky: oblouk obratlového těla, tři šipky: kolagenní membrána, silná šipka: titanový mikroplate se šroubem na kontralaterální ploše *processus spinosus*. Experiment spinální fúze, skupiny č. 5, 6

Zádové svalstvo jsme sešili nevstřebatelnou suturou jednotlivými stehy (viz obrázek č. 5). Kůži jsme sešili stejnou suturou intradermálním stehem k prevenci vykousávání stehů zvířetem. Zvířata s augmentací, tj. s hydroxyapatitem nebo s hydroxyapatitem a kmenovými buňkami, jsme imunosuprimovali denně 10 mg/kg i.m. cyclosporinem (10mg/kg, 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.

Pooperační péče

Zvířata jsme umístili do standardizovaných boxů po párech, abychom redukovali stres z izolace. Měla trvalý přístup k vodě a stravě, cyklus světlo-tma jsme střídali po 12 hodinách. Denně byla zvířata kontrolována, včetně výměny steliva.

Ukončení experimentu

Na konci 8. týdne od operace jsme zvířata uvedli do hluboké celkové anestézie pentobarbitalem o dávce 150 mg/kg. Transkardiálně jsme je perfundovali 4% paraformaldehydem v 0,1 mol. roztoku PBS. Provedli jsme disekci celého segmentu páteře, abychom nepoškodili augmentovanou oblast. Kost jsme dodatečně fixovali imerzí v 10% paraformaldehydu.

Radiografické vyšetření

Radiografické vyšetření jsme neprováděli u první části experimentu tj. u defektu obratlového těla. Domníváme se, že by nám nebylo přineslo žádná další data v důsledku sumace defektu s okolní kostí.

V experimentu s dorzolaterální fúzí lumbální páteře jsme z každé skupiny provedli RTG vyšetření stejného vzorku, který byl později vyšetřován pomocí mikroCT. Použili jsme RTG dentálního přístroje (Prostyle Intra, Planmeca Oy, Helsinky, Finland) a provedli klasický RTG snímek ve dvou projekcích celého segmentu páteře po jeho vybavení z těla, aniž jsme odstraňovali osteosyntetický materiál.

Micro-CT

Z každé skupiny jsme jeden vzorek podrobili mikrotomografické analýze. Skenování bylo provedeno s použitím rentgenového tomografického zařízení, popsaného v naší publikaci [Vaněček et al., 2013]. Vzorky jsme ozařovali s použitím mikrofokuzního zdroje rentgenového záření L8601-01 (Hamamatsu Photonics K.K., Japonsko) s výstupní šířkou svazku 5 μm , wolframovou anodou a rozbíhavým kuželovým svazkem. Jako detektor jsme používali velkoplošný RTG detektor C7942CA-22 (Hamamatsu Photonics K.K., Japonsko) s rozlišením 2368 \times 2240 pixelů a fyzickou velikostí 120 \times 120 mm. Pro účely tomografické rekonstrukce bylo provedeno 360 projekcí s úhlovým krokem o velikosti 1°. Dosáhli jsme tak největšího možného zvětšení, které odpovídalo vzdálenosti zdroj-objekt 170 mm a vzdálenosti zdroj-detektor 500 mm. Protože rentgenka L8601-01 vyzářuje s kontinuálním energetickým spektrem, použili jsme na všechny radiogramy linearizaci útlumového spektra (korekci tvrdnutí svazku – beam hardening correction) pro zohlednění nestejných útlumových vlastností zobrazovaných

vzorků. Radiogramy byly rekonstruovány s použitím algoritmu zpětné projekce kuželového svazku, který byl prokázán jako vhodný k zobrazování trabekulární mikroarchitektury celých kostí s vysokou přesností [Kytýr et al., 2011], [Vavřík et al., 2011]. Výsledné rozlišení 3D rekonstrukce bylo přibližně $30 \mu\text{m}^3$.

Histologie

Kost fixovanou v 10% paraformaldehydu jsme dekalcifikovali pomocí kyseliny mravenčí. Z každého vzorku jsme vytнули tři transverzální bločky, které jsme zalili do parafinu. Na mikrotomu jsme získali $4 \mu\text{m}$ silné řezy, které jsme obarvili hematoxylin-eozinem nebo naftol-AS-D chloracetát-esterasou k verifikaci myeloidních buněk včetně polymorfonukleárů. Řezy jsme vyšetřili ve světelném mikroskopu. Histomorfometrické vyšetření jsme provedli s použitím analyzačního software NIS-Elements (Nikon Instruments, Inc., USA).

V experimentu s obratlovým defektem jsme použili imunofluorescence s barvením na lidské mitochondrie (anti-cytochrom c oxidasa, protilátka proti podjednotce II), MT-CO2 (ABcam, Cambridge, UK). Těchto protilátek se používá k detekci humánních buněk ve zvířecích modelech [Abdouh et al., 2009], [Amemori et al., 2013], [Cocks et al., 2013], [Růžička et al., 2013]. Komplex antigenu a protilátky jsme vyšetřovali s použitím kozích protilátek proti myším IgG konjugovaným s Alexa-Fluor 488 – druhotná protilátka proti kozí protilátce myších IgG. Vzorky kosti se spinální fúzí jsme navíc ještě barvili chloracetátesterasou, která má afinitu k buňkám granulocytární řady.

Vzorky jsme vyšetřili pomocí spektrálního konfokálního mikroskopu (Carl-Zeiss, Německo).

Statistická analýza

Výsledky uvádíme jako průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka (S.E.M.). Výsledky jsme hodnotili pomocí analýzy variance jednoduchého třídění (One-way ANOVA) s *post hoc* HSD (angl. honestly significant difference) testem. Statisticky významné rozdíly byly stanoveny na $p < 0,05$.

4.2 Výsledky

Experimentální model defektu obratlového těla:

V experimentálních skupinách s defektem obratlového těla (skupiny 1 až 4) jsme neměli žádné úmrtí experimentálního zvířete. Při preparaci defektu do obratlového těla jsme pod kontrolou mikroskopu dbali na hranici kostěné preparace, aby nedošlo k neurologickému poškození experimentálních zvířat při proniknutí do páteřního kanálu. Použitý model byl bezpečný, ale konstatujeme nutnost používání operačního mikroskopu. Při pokusech o vizuální preparaci bylo operační pole nepřehledné vzhledem k nutnosti chlazení a odsávání při preparaci kosti. Tento experimentální model považujeme za jednoduchý, bezpečný a levný.

Experimentální model páteřní fúze:

Ve skupinách spinální fúze (Skupiny 5 a 6) jsme nezaznamenali žádnou mortalitu ani poruchy motoriky zvířat či problémy vyplývající z chirurgického postupu. Pomocí běžných mikrodlah a šroubů jsme fixovali sousední obratle. Tyto dlahy mikroplate se běžně používají v čelistní chirurgii k fixaci zlomenin obličejového skeletu. Použití

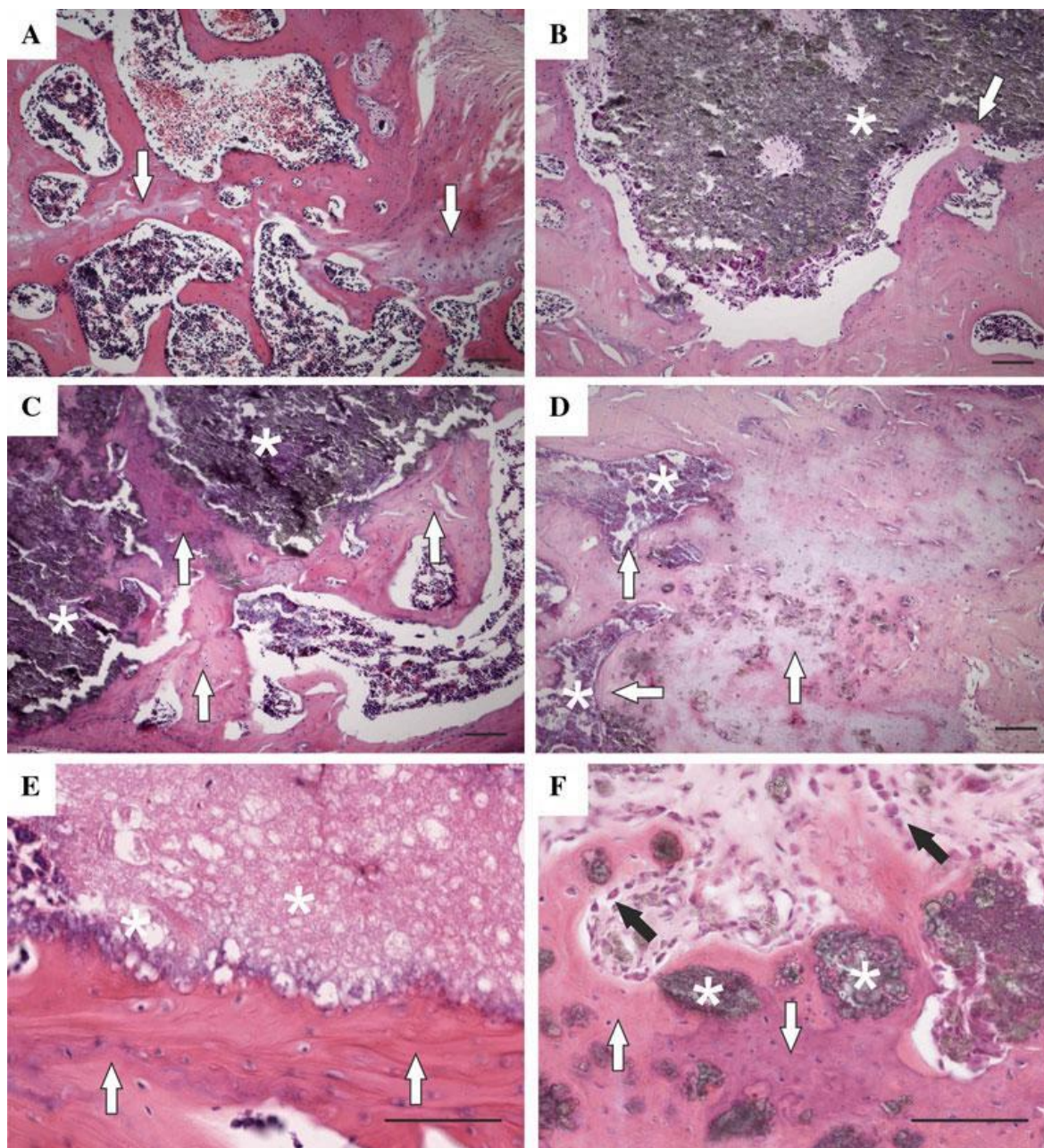
operačního binokulárního mikroskopu bylo fakultativní a zlepšovalo přehlednost operačního pole. Model páteřní fúze byl jednoduchý, bezpečný, levný a při použití na potkaním modelu i rychle reprodukovatelný.

Histologické vyšetření

a) Experiment s defektem obratlového těla:

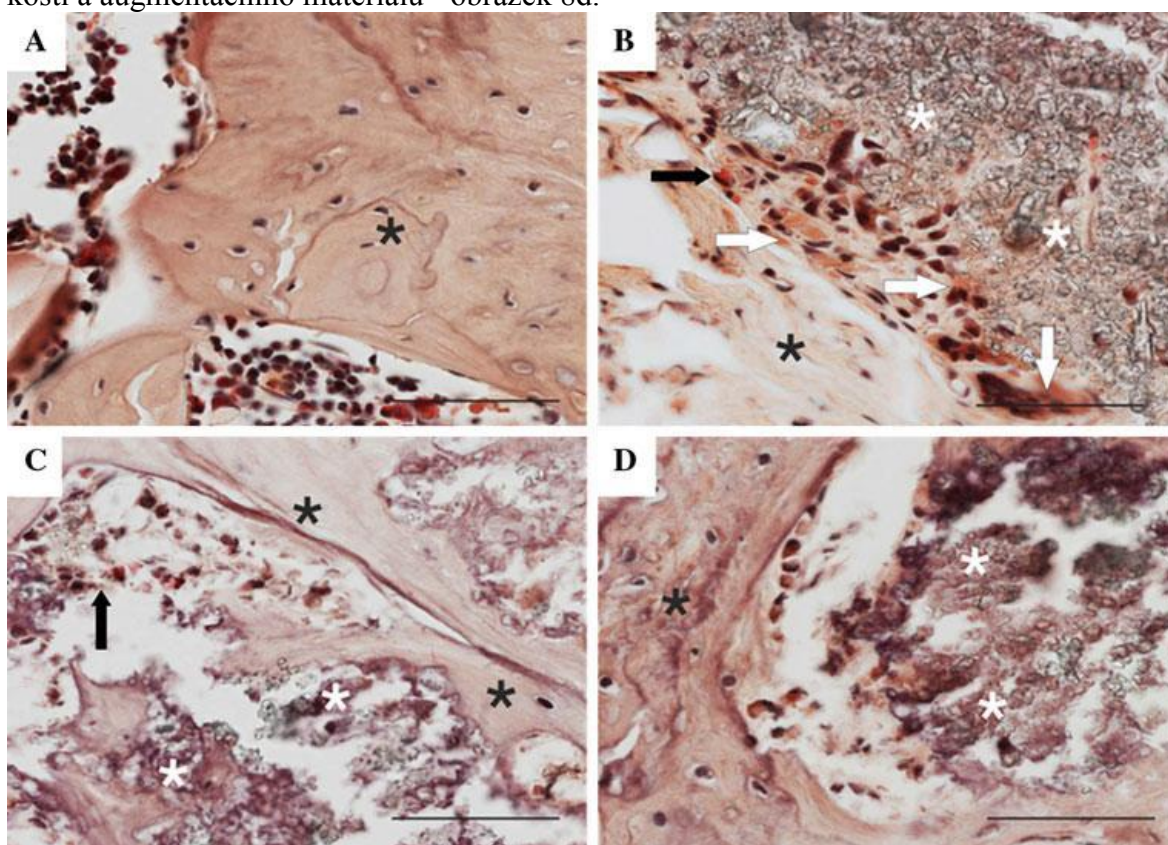
Ve skupině s prázdným defektem obratlového těla (Skupina 1) jsme histologicky zaznamenali známky kostního hojení s reaktivní osteoplázií a fokální kartilaginózní metaplázií - obrázek 7a. Ve skupině s defektem vyplněným pouze hydroxyapatitovou matrix jsme zjistili depozita lámavého granulárního materiálu, místy s granulomatózní reakcí proti exogennímu materiálu. Na povrchu augmentačního materiálu jsme pozorovali izolované ostrůvky novotvořené kosti a osteoidu - obrázek 7b.

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 - obrázek 7c. V poslední skupině hydroxyapatitové matrix s 5 miliony hBMSCs lze popsat signifikantně vyšší novotvorbu kosti v defektu - obrázek 7d-7f. Matrix byla více zavzata do kostní tkáň a částečně resorbována. V blízkém okolí augmentátu jsme pozorovali reaktivní osteopenii, která nebyla v místní souvislosti s augmentátem. V této skupině jsme v některých případech pozorovali jizevnatou tkáň, zřejmě jako následek chirurgického traumatu.



Obrázek 7 – Histologické vyšetření defektu obratlového těla 8 týdnů po implantaci. **A** Reaktivní osteoplázie s ložisky kartilaginózní metaplázie (bílé šipky) ve skupině s prázdným kostním defektem. **B** Ve skupině s defektem obratlového těla vyplněným čistým hydroxyapatitem nacházíme ostrůvky novotvořené kosti (bílé šipky) na povrchu augmentačního materiálu (hvězdička). **C** Ve skupině s 0,5 ml. kmenových buněk vidíme kostní trabekuly vláknité a lamelární kosti (bílé šipky) na povrchu augmentačního materiálu (hvězdička). **D** Ve skupině s 5 ml. MSCs je augmentát (hvězdička) inkorporovaný do rozsáhlejších ploch lamelární kosti (bílé šipky). **E** Ve skupině s 5 ml. MSCs pozorujeme široké kostní trámce (bílé šipky) na povrchu augmentačního materiálu. **F** Ve skupině s 5 ml. MSCs vidíme plochy novotvořené kosti (bílé šipky) s inkorporovanými partikulami augmentačního materiálu (hvězdičky), na povrchu kostních trabekul pozorujeme aktivní osteoblasty (černé šipky). Hematoxilin-eosin. Měřítko: 100 μ m

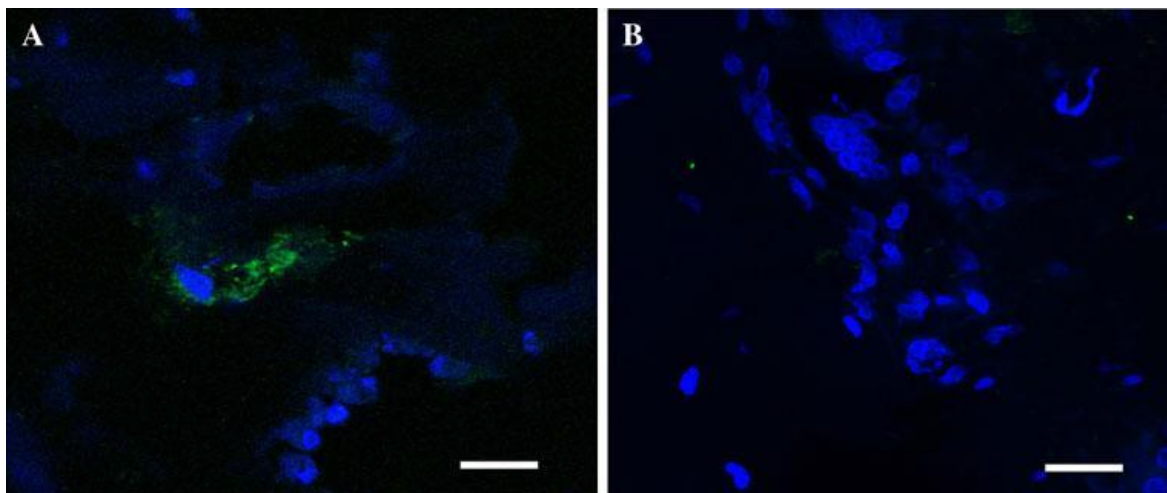
V žádné ze skupin s hBMSCs (Skupina 3 a 4) jsme nepozorovali granulomatozní reakci, zánětlivé nebo nádorové změny. Obrázek 8a-8d ukazuje reprezentativní vzorek barvený naftol AS-D chloroacetát-esterasou. V kostním defektu obsahovaly intratrabekulární prostory hematopoetické buňky kostní dřeně s mnohočetnými myeloidními buňkami barvenými pozitivně naftol AS-D chloroacetát-esterasou – světle červeně - obrázek 8a. Ve skupině léčené samotným augmentačním materiálem (Skupina 1) byl tento obklopen lemem makrofágů, buněk z cizích těles a polymorfonukleárů - obrázek 8b. Ve skupině léčené augmentačním materiálem s 0,5 milionem hBMSCs jsme našli izolované polymorfonukleáry pozitivní na naftol AS-D chloroacetát-esterasu - obrázek 8c. Ve skupině s 5 miliony hBMSCs jsme nepozorovali žádné polymorfonukleáry na rozhraní kosti a augmentačního materiálu - obrázek 8d.



Obrázek 8 - Histologické vyšetření defektu obratlového těla 8 týdnů po implantaci. Barvení naftol AS-D chloracetát-esterázou. **A** Prázdný defekt obratlového těla se širokými trabekulami převážně vláknité kosti s depozity cementu (černá hvězdička) jako výsledek procesu hojení. Intertrabekulární prostory obsahují hematopoetické buňky kostní dřeně s mnohočetnými myeloidními buňkami (světle červené) pozitivní na barvení naftol AS-D chloracetát-esterázou. **B** Ve skupině s čistým hydroxyapatitem je augmentační materiál (bílé hvězdičky) obklopen pruhem makrofágů a buněk z cizích těles (bílé šipky) a fibrózní tkání (černé hvězdičky). Ve vzorku vidíme jen ojedinělé polymorfonukleáry pozitivní na barvení naftol AS-D chloracetát-esterázou (černé šipky). **C** Ve skupině s 0,5 mil. kmenových buněk vidíme izolované polymorfonukleáry, pozitivní na barvení naftol AS-D chloracetát-esterázou (černá šipka), asociované s augmentačním materiálem (bílé hvězdička), novotvořené kostní trámce (černé šipky). **D** Ve skupině s 5 mil. MSCs pozorujeme kostní trámce s lemem aktivních osteoblastů (černá hvězdička) a augmentační

materiál (bílé hvězdičky). V této skupině nebyly přítomny polymorfonukleáry. Barvení naftol AS-D chloracetátsterázou. Měřítko: 100 μ m

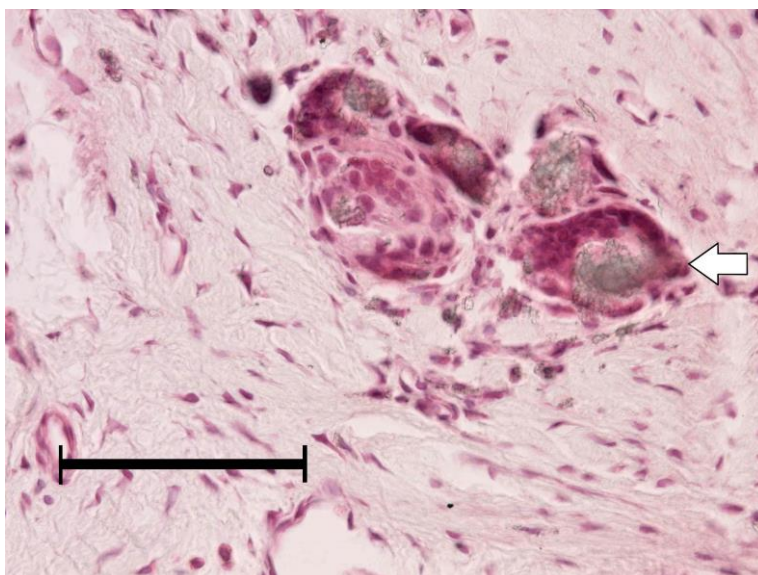
Po 8 týdnech od augmentace jsme pomocí lidského mitochondriálního markeru našli jen velmi málo MT-CO2 buněk - obrázek 9a. Toto zjištění naznačuje jen malé přežití transplantovaných buněk. Barvení na MT-CO2 bylo negativní ve skupině se samotným hydroxyapatitem (Skupina 1) – obrázek 9b.



Obrázek 9A - Barvení na marker humánních mitochondrií MTCO2. Ve skupině s 5 mil. MSCs se pozitivní lidské kmenové buňky zobrazují zeleně 8 týdnů po implantaci – skupina č. 4. Měřítko: 20 μ m **B** - Negativní barvení na marker humánních mitochondrií MTCO2 ve skupině s čistým augmentačním materiálem – skupina č. 2. Měřítko: 20 μ m

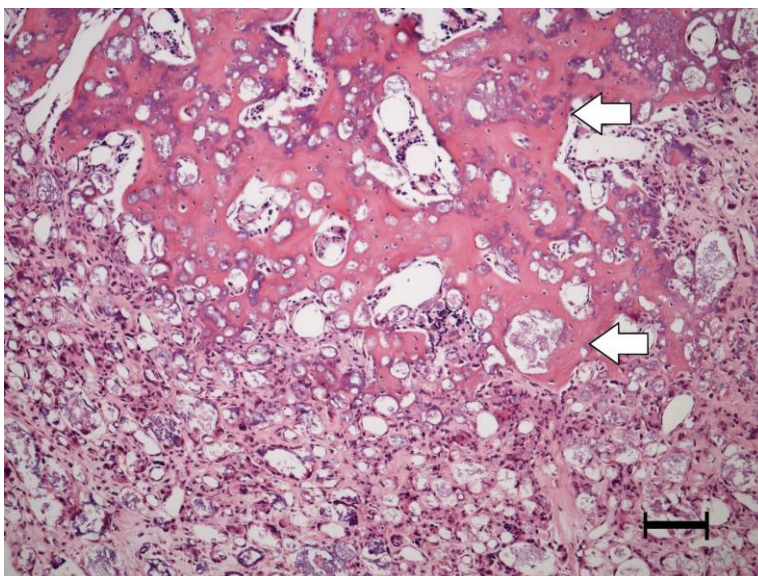
b) Experiment s dorzolaterální fúzí lumbální páteře:

V obou skupinách (skupiny 5 a 6) měl augmentační materiál charakter shluků dvojlomných granulí. Ve skupině s čistým hydroxyapatitem jsme častěji pozorovali obrovské buňky z cizích těles - obrázek 10. V okolí matrix byla denzní kolagenní tkáň podobná tkáni jizevnaté. Zřejmě jde o následek operačního traumatu. Na periferii a vzácně v centru augmentované oblasti byly ostrůvky novotvořené kosti.



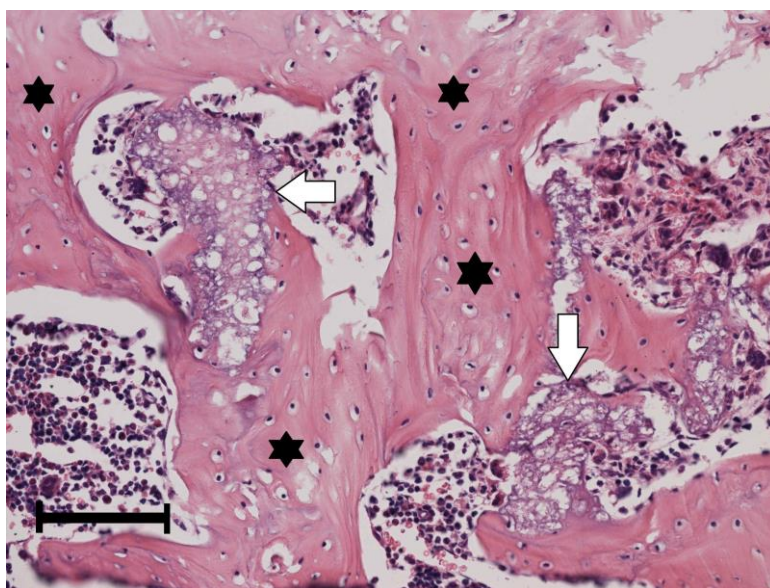
Obrázek 10 – Histologické vyšetření segmentu páteře se spinální fúzí: obrovské mnohoaderné buňky z cizích těles kolem augmentačního materiálu (bílá šipka). Experiment spinální fúze, skupina č. 5. Hematoxilin-eosin, měřítko: 100 μ m

Ve skupině s hBMSCs (Skupina 6) byla novotvořená kost lépe integrovaná do okolní kosti. Novotvořená kost byla vláknitého typu, ale kost lamelární jsme pozorovali též – obrázek 11.



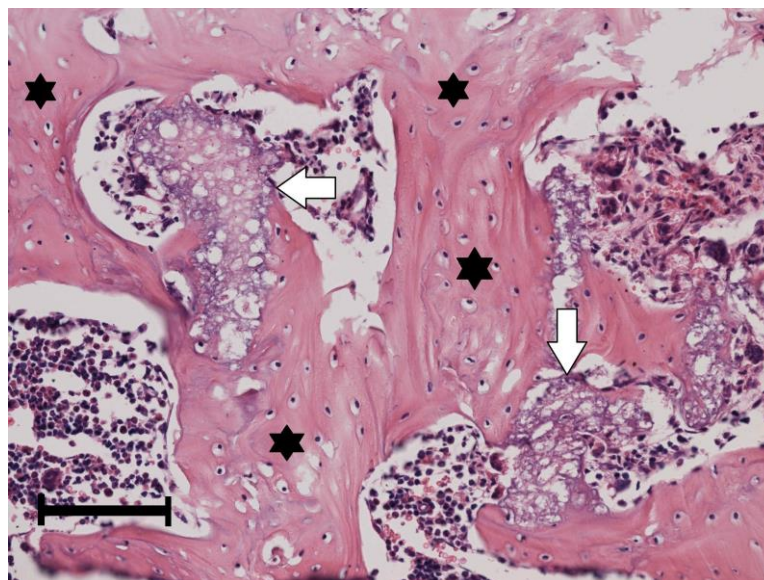
Obrázek 11 – Histologické vyšetření segmentu páteře se spinální fúzí: formace vláknité kosti kolem granulí augmentačního materiálu (bílá šipka). Experiment spinální fúze, skupina č. 5. Hematoxilin-eosin, měřítko: 100 μ m

Shluky augmentačního materiálu byly na některých místech novotvořenou kostí zcela obklopeny– obrázek 12.

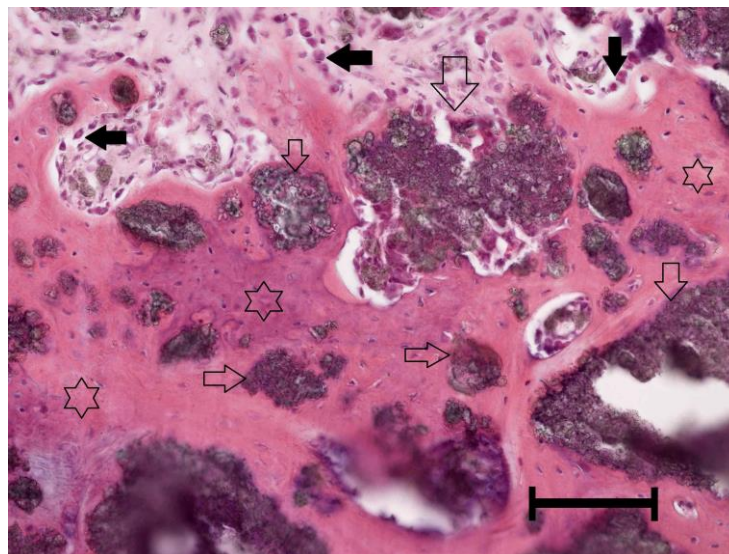


Obrázek 12 – Histologické vyšetření segmentu páteře se spinální fúzí: vláknitá a lamelární kost na povrchu augmentačního materiálu. Široké kostní trabekuly (hvězdička) s inkorporovaným augmentačním materiálem (prázdné šipky). Experiment spinální fúze, skupina č. 5. Hematoxilin-eosin, měřítko: 100 μ m

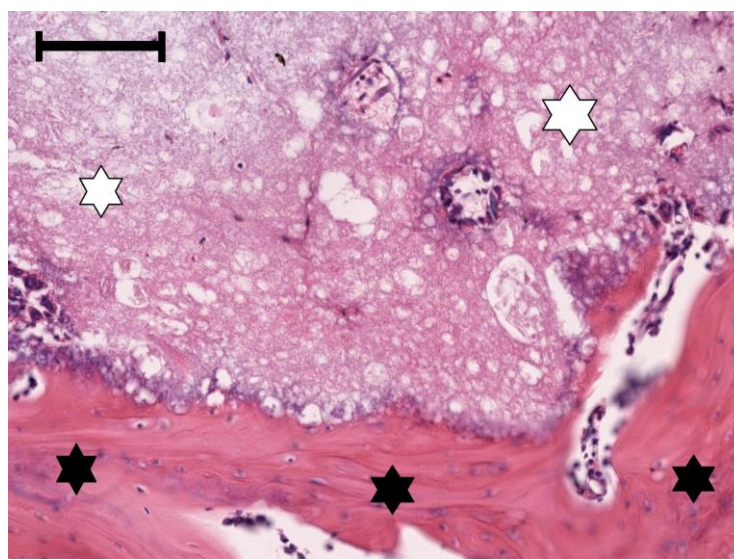
Trabekuly novotvořené kosti byly obklopeny aktivními osteoblasty a rozptýlenými osteoklasty jako následek aktivní remodelace kosti. Ve vazivové tkáni kolem granulí augmentačního materiálu jsme zjistili větší množství tenkostěnných kapilár. Ve skupině č. 6 byla novotvořená kost lépe integrovaná do okolní kostní tkáně – obrázek 13, 14, 15 - a vykazovala dokonce i lamelární charakter – obrázek 11.



Obrázek 13 – Histologické vyšetření segmentu páteře se spinální fúzí: široké kostní trabekuly lamelární kosti (černá hvězdička) na povrchu augmentačního materiálu (bílé hvězdičky). Experiment spinální fúze, skupina č. 6. Hematoxilin-eosin, měřítko: 100 μ m

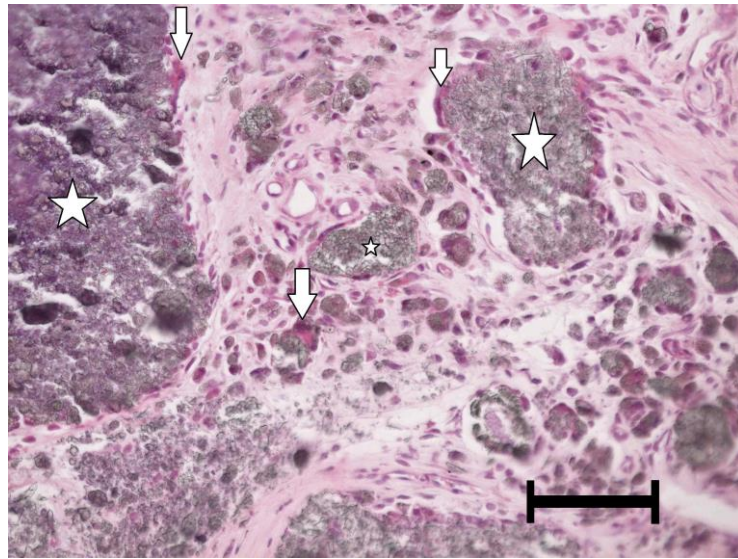


Obrázek 14 – Histologické vyšetření segmentu páteře se spinální fúzí: široké plochy převážně vláknité kosti (hvězdičky) s inkorporovanými granulemi augmentačního materiálu (bílé šipky). Za pozornost stojí lem aktivních osteoblastů na povrchu kostních trabekul (černé šipky). Experiment spinální fúze, skupina č. 6. Hematoxilin-eosin, měřítko: 100 μ m



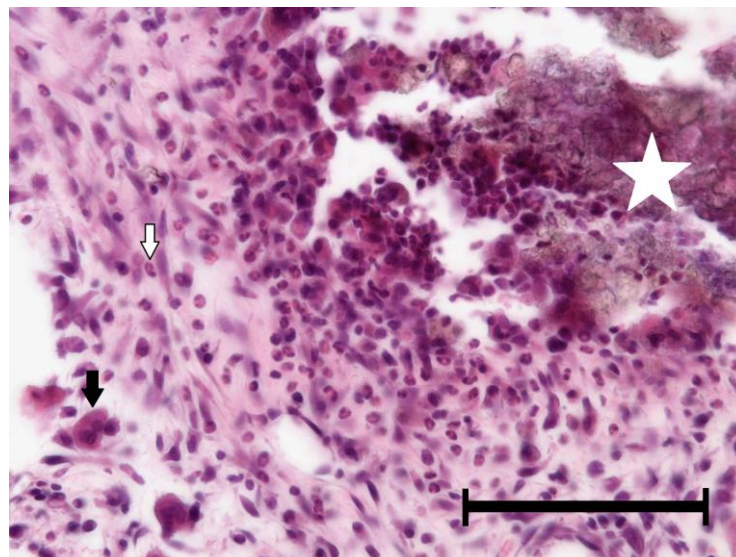
Obrázek 15 – Histologické vyšetření segmentu páteře se spinální fúzí: široké kostní trabekuly lamelární kosti (černé hvězdičky) na povrchu augmentačního materiálu (černé hvězdičky). Experiment spinální fúze, skupina č. 6. Hematoxilin-eosin, měřítko: 100 μ m

V této skupině jsme nezaznamenali zánětlivou reakci okolí – obrázek 16

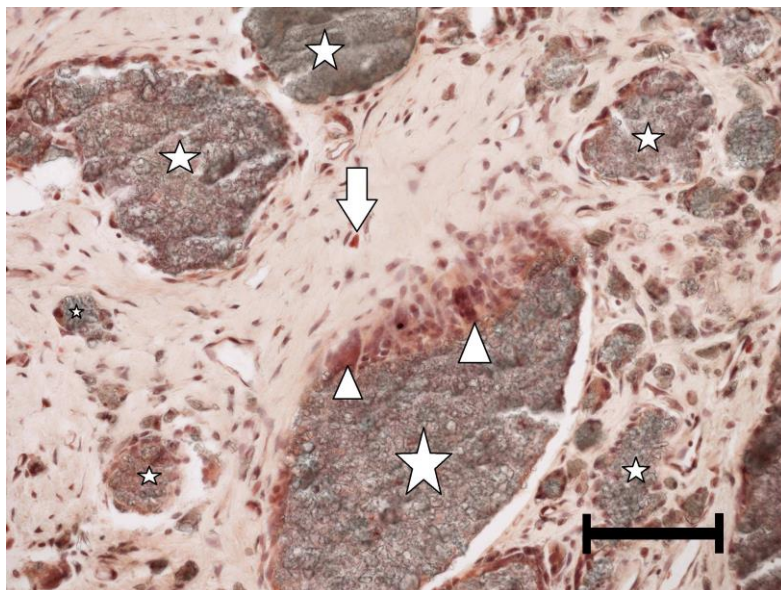


Obrázek 16 – Histologické vyšetření segmentu páteře se spinální fúzí: granula augmentačního materiálu (bílé hvězdičky) jsou obklopeny mnoha obrovskými mnohjadernými buňkami z cizích těles (bílé šipky). Za pozornost stojí absence zánětlivé reakce. Experiment spinální fúze, skupina č. 6. Hematoxilin-eosin, měřítko: 100 μ m

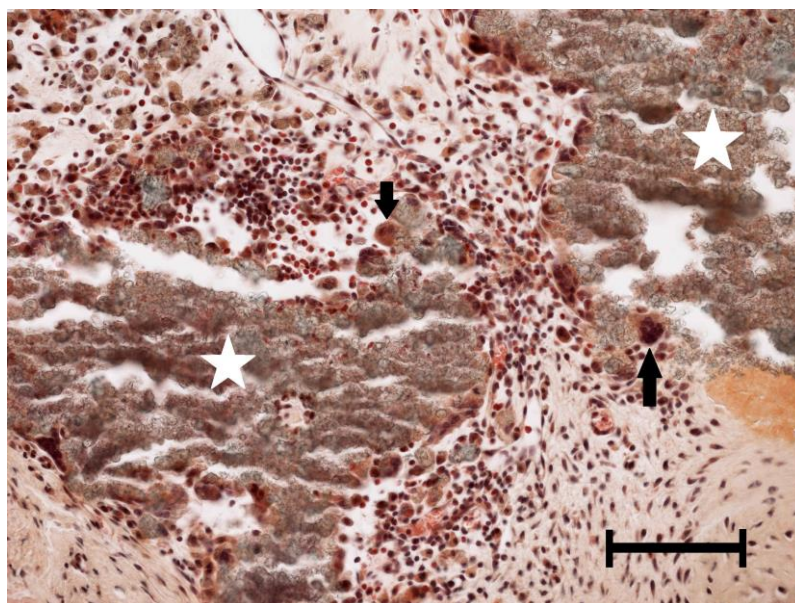
Naproti tomu ve skupině s čistým hydroxyapatitem (Skupina 5) jsme v některých řezech pozorovali smíšenou zánětlivou reakci v okolí augmentačního materiálu s neutrofily a makrofágy, formujícími se do obrovských buněk z cizích těles – obrázek 17. Barvení chloracetátesterázou ukázalo menší zánětlivou reakci ve skupině č. 6 (s hBMSCs) - obrázek 18. Ve skupině č. 5 byl i v tomto barvení augmentační materiál obklopen smíšenou zánětlivou reakcí s množstvím neutrofilů, makrofágů a obrovskojaderných buněk – obrázek 19.



Obrázek 17 – Histologické vyšetření segmentu páteře se spinální fúzí: granula augmentačního materiálu (bíla hvězdička) jsou obklopeny smíšenou zánětlivou celulizací obsahující větší počet neutrofilů (bíla šipka) a makrofágů, které formují obrovské mnohjaderné buňky z cizích těles (černá šipka). Experiment spinální fúze, skupina č. 5. Hematoxilin-eosin, měřítko: 100 μ m



Obrázek 18 – Histologické vyšetření segmentu páteře se spinální fúzí: granula augmentačního materiálu (bílé hvězdičky) jsou obklopeny větším počtem obrovských mnohoaderných buněk z cizích těles (bílý trojúhelník). Dále vidíme jen ojedinelé neutrofilů. Experiment spinální fúze, skupina č. 6. Barvení naftol AS-D chloracetáteterázou. Měřítko: 100 μ m

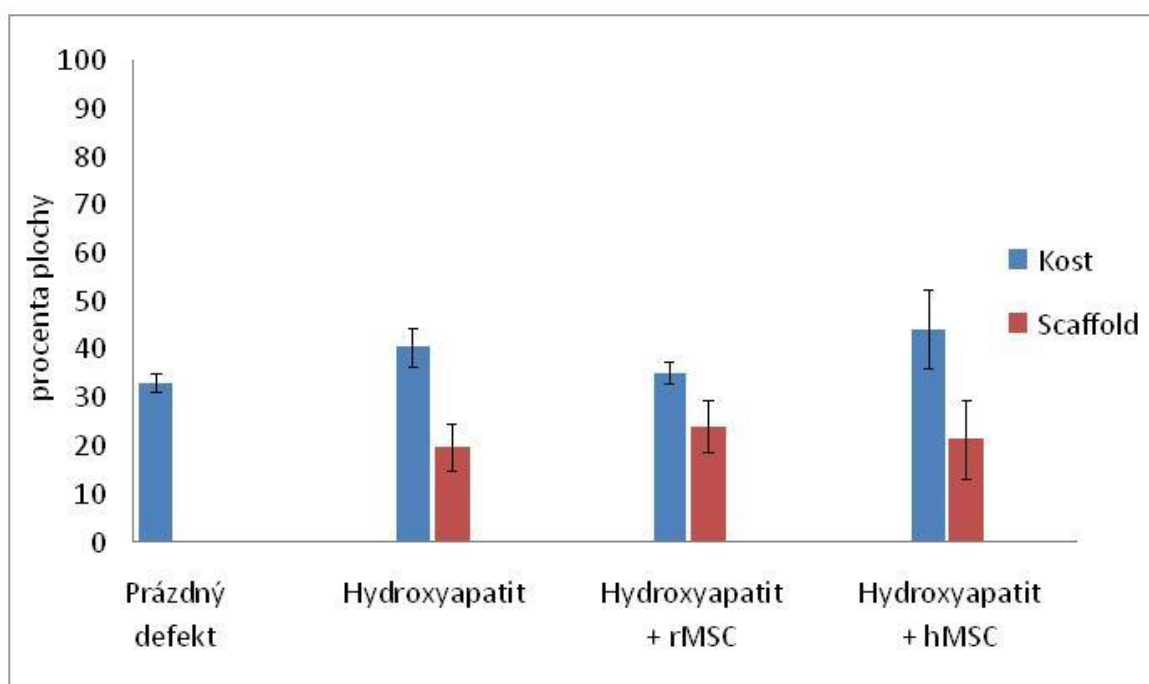


Obrázek 19 – Histologické vyšetření segmentu páteře se spinální fúzí: granula augmentačního materiálu (bílé hvězdičky) jsou obklopeny smíšenou zánětlivou celulizací obsahující početné neutrofilů (světle červená cytoplazma), makrofágy a obrovskými mnohoadernými buňkami z cizích těles (černé šipky). Experiment spinální fúze, skupina č. 5. Barvení naftol AS-D chloracetáteterázou. Měřítko: 100 μ m

Histomorfometrické vyšetření

a) Experiment s defektem obratlového těla:

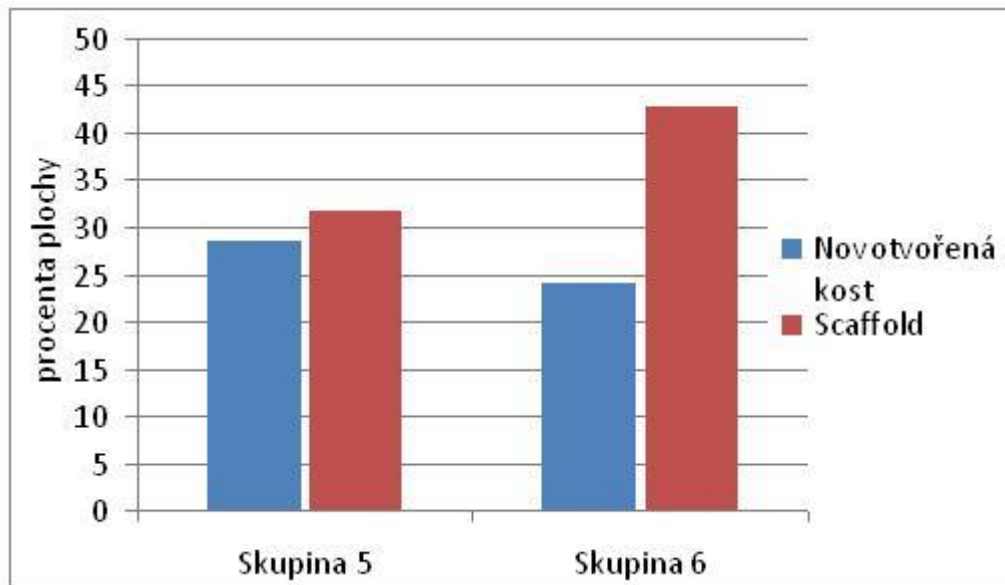
Kvantitativní analýza vzorků ukázala nesignifikantní rozdíl v procentu novotvořené kosti mezi skupinou s prázdným defektem (Skupina 1) ($33,84 \pm 1,84$ %) a skupinou léčenou samotným hydroxyapatitem ($40,34 \pm 3,85$ %). Toto zjištění naznačuje malý osteoindukční charakter hydroxyapatitu. Signifikantně 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 ($p < 0,01$). Množství reziduální matrix ve skupině č. 4 léčené hydroxyapatitem s 5 miliony hBMSCs se statisticky signifikantně nelišilo – obrázek 20.



Obrázek 20 – Histomorfometrické vyšetření experimentálních zvířat 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 ($40,34 \pm 3,85$ %). 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 ($p < 0,01$). Množství reziduální matrix ve skupině č. 4 léčené hydroxyapatitem s 5 miliony hBMSCs se statisticky signifikantně nelišilo. Vysvětlivky: 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 21.



Obrázek 21 – Histomorfometrické vyšetření experimentálních zvířat 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. Vysvětlivky: Scaffold - reziduální kostní matrix

Radiografické vyšetření

Prosté RTG snímky jsme prováděli pouze u experimentu se spinální fúzí, jak bylo vysvětleno výše. Standardní RTG vyšetření ve dvou na sebe kolmých projekcích jsme prováděli před odstraněním mikrodlah a šroubů pro kontrolu jejich mechanické stability. Verifikovali jsme pozici dlahy, uvolnění šroubů a ev. fraktury mikroplate. Nepozorovali jsme zlomeninu titanové mikrodlahy ani dislokaci šroubů - obrázek 22. Pouze jeden šroub se mírně uvolnil z oka dlahy aniž byl dislokován mimo oko mikrodlahy – obrázek 23.



Obrázek 22 – Radiografické vyšetření zvířat s experimentální fúzí 8 týdnů po implantaci: Nepozorovali jsme zlomeninu titanové mikrodlahy ani dislokaci šroubů 22

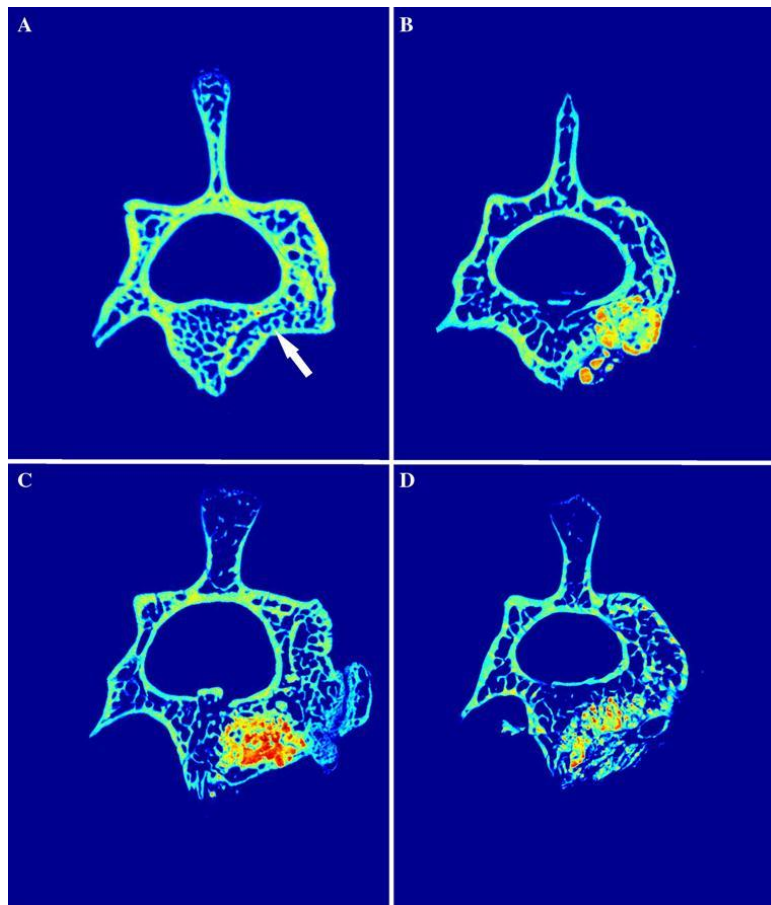


Obrázek 23 – Radiografické vyšetření zvířat s experimentální fúzí 8 týdnů po implantaci: uvolnění jednoho šroubu z oka dlahy aniž byl dislokován mimo oko mikrodlahy

MikroCT vyšetření

a) Experiment s defektem obratlového těla:

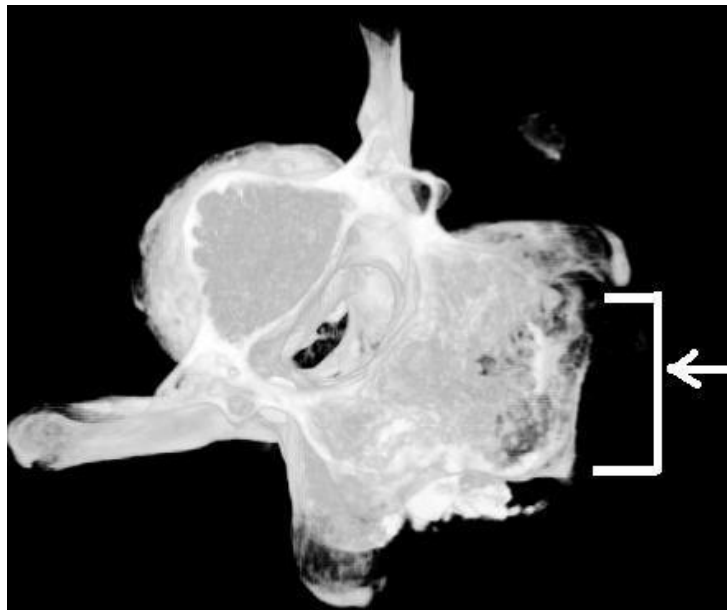
Osm týdnů po operaci jsme pomocí mikroCT ve skupině s prázdným defektem pozorovali nekompletní regeneraci defektu obratlového těla. Místo operace bylo zřetelně viditelné – obrázek 24A. Ve skupině č. 2 – jsme v defektu vyplněném samotným hydroxyapatitem pozorovali difuzní, nekompaktní depozita augmentačního materiálu – obrázek 24B. Naproti tomu ve skupině s hydroxyapatitem a 0,5 milionem hBMSCs jsme našli kompaktní výplň defektu s hypertrofií nad *niveau* okolní kosti – obrázek 24C. Tento nález odpovídá výsledku histologie, ve které jsme zaznamenali větší novotvorbu kosti a výraznější obklopení augmentačního materiálu novotvořenou kostí. 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 – obrázek 24D. Tento nález odpovídá histologickým (obrázek 7, 8) a histomorfometrickým nálezům (obrázek 20), které ukázaly statisticky vyšší novotvorbu kosti a vyšší resorpci hydroxyapatitu.



Obrázek 24A, B, C, D – MikroCT vyšetření zvířat v experimentu s defektem obratlového těla 8 týdnů po implantaci: 24A místo operace bylo ve skupině s prázdným defektem (skupina č. 1) viditelné a nekompletně zhojené (bílá šipka). 24B Ve skupině č. 2 – jsme v defektu vyplněném samotným hydroxyapatitem pozorovali difuzní, nekompaktní depozita augmentačního materiálu. 24C Naproti tomu ve skupině s hydroxyapatitem a 0,5 milionem hBMSCs jsme našli kompaktní výplň defektu s hypertrofií nad *niveau* okolní kosti. Tento nálezu odpovídá výsledku histologie, ve které jsme zaznamenali větší novotvorbu kosti a výraznější obklopení augmentačního materiálu novotvořenou kostí. 24D 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:

Před vlastním mikroCT jsme jemně odstranili titanový materiál, abychom se vyvarovali artefaktům na CT. Místo spinální fúze bylo na axiální projekci dobře patrné – obrázek 25. Ve skupině č. 6 (hydroxyapatit s 5 mil. hBMSCs) jsme zjistili vyšší novotvorbu kosti. Zbytková matrix dle mikroCT nebyla v kontaktu s kostí. Tento nálezu potvrzuje 3D mikroCT, kde se osifikace šíří od hranice vlastní kosti – obrázek 26. Tento nálezu odpovídá závěrům histologie, ve které jsme pozorovali vyšší novotvorbu kosti v kontaktu s vlastní kostí experimentálního zvířete.



Obrázek 25 – MikroCT vyšetření zvířat v experimentu s dorzolaterální fúzí lumbální páteře 8 týdnů po implantaci, axiální projekce: Místo spinální fúze je na axiální projekci dobře patrné (bílá šipka). Ve skupině č. 6 (hydroxyapatit s 5 mil. hBMSCs) jsme zjistili vyšší novotvorbu kosti. Zbytková matrix dle mikroCT nebyla v kontaktu s kostí



Obrázek 26 – 3D mikroCT vyšetření zvířat v experimentu s dorzolaterální fúzí lumbální páteře 8 týdnů po implantaci: osifikace šíří od hranice vlastní kosti, zbytková matrix (bílé šipky) dle mikroCT nebyla v kontaktu s kostí

5 Diskuse

Kostní štěpy, ať už autologní nebo alogenní, se široce používají v klinické medicíně. Alografty nelze považovat za zcela bezpečné nejen z hlediska infekčního, ale i imunitního, pro možné nastartování imunitní reakce proti štěpu s následnou rejekcí. Podle amerického centra pro nemoci a prevenci (Center for Disease Control and Prevention, CDC) se za posledních 30 let, kdy jsou DFDBA a FDBA alografty používány, nevyskytl žádný případ přenosu infekčního onemocnění. Naproti tomu při použití zmrazené kosti (FFB) byl hlášen v USA přenos HIV onemocnění ve 4 případech [Center for Disease Control and Prevention - online]. Odhaduje se, že riziko přenosu viru HIV allogenní kostí je přibližně 1:1,6 milionu případů [Boyce et al., 1999]. Přenos hepatitidy B allogenní náhradou byl dokumentován v jednom případě a u hepatitidy C ve 4 případech [Tomford 1995], [Conrad et al., 1995]. Z těchto důvodů byly zavedeny standardy Americké asociace tkáňových bank (American Association of Tissue Banks – AATB), které doporučují vyloučení kostních štěpů za určitých okolností, viz tabulka 3. Dle těchto standardů je používání štěpů DFDBA a FDBA bezpečné, štěpy FFB mají vyšší riziko přenosu infekce. Z chirurgického hlediska je práce s alogenní kostí obdobná jako s autologní, odpadáva morbidita vyplývající z dalšího místa odběru štěpu jako v případě autologní kosti. V současné době se těžiště výzkumu přesunulo k syntetickým náhradám, které by zastoupily klinické využití autologní a alogenní kosti. Jak vyplývá z výše uvedeného alografty nejsou zcela bezpečné, i když je jejich infekční potenciál při dodržení standardů nízký.

Autologní kostní štěp je zlatým standardem ortopedie, traumatologie, spondylochirurgie apod. Jeho nevýhodou je nutnost druhého operačního místa. Komplikace související s odběrovým místem dobře popsal autorský kolektiv Younger et Chapman (1989). Publikace analyzuje 239 ortopedických pacientů s 243 autologními kostními štěpy. Mezi závažné komplikace patřila infekce rány (2,5 %), rozsáhlé hematomy (3,3 %), reoperace (3,8 %), bolestivost rány trvající déle než 6 měsíců (2,5 %) a ztráta citlivosti (1,2 %). Mezi malé komplikace (20,6 %) autoři řadí střední nebo mírnou bolest, dočasnou ztrátu citlivosti a povrchovou infekci rány [Younger et Chapman 1989]. Banwart et al., (1995) posuzovali morbiditu spojenou s odběrovým místem u štěpů z lopaty kosti kyčelní. Celkem analyzovali 261 pacientů. Komplikace rozdělili na závažné a nezávažné. Z časných závažných komplikací nepozorovali žádnou zlomeninu pánve, hlubokou infekci, poranění *n. ischiadicus* nebo *a. glutea sup.* Nejistili ani žádnou závažnou pozdní komplikaci jako např. pánevní nestabilitu nebo frakturu. Nezávažné komplikace se vyskytly u 39 % pacientů [Banwart et al., 1995]. Jak je vidět z příkladu citovaných studií, hraje morbidita odběrového místa velkou roli a uvedené argumenty vedou ke hledání náhradních materiálů za autologní kost. Další nevýhodou autologního kostního štěpu je resorpce transplantované kosti. Alérico et al., (2014) testovali míru resorpce volných kostních bločků z *ramus mandibulae* k augmentaci kosti horní čelisti. Použili radiografické metody (CBCT) 10 a 180 dní po augmentaci. Testovali 22 pacientů s 36 augmentáty. Zjistili pouze 18% resorpci kostních štěpů po 180. dni od augmentace [Alérico et al., 2014]. Sbordone et al., (2012) sledovali pomocí počítačové tomografie dlouhodobou resorpci kostních štěpů z lopaty kosti kyčelní k augmentaci čelistních kostí. Po šesti letech došlo u augmentátů mandibuly k resorpci o 87 % a na maxile dokonce k resorpci o 105 %, tj. došlo k úbytku i vlastní kosti horní čelisti [Sbordone et al., (2012)]. Práce Sbordone et al., (2012) je validnější vzhledem k dlouhodobému sledování a není v rozporu s prací Alérico et al., (2014). Z popsaného je zřejmé, že hledání náhrad autologních nebo

alogenních kostních štěpů arteficiálním materiálem je potřebné. Při hledání vhodné matrix pro náš experiment jsme vycházeli z literatury.

Z hlediska osteogeneze je možné použít velké množství materiálů. Sumanasinghe et al (2006) a (2009) ukázali, že použití kolagenu jako trojrozměrné matrice pro lidské mezenchymální kmenové buňky (hMSCs) s cyklickým zatížením pokusného modelu vede bez použití růstových faktorů k osteogenezi [Sumanasinghe et al., 2006], [Sumanasinghe et al., 2009].

Želatiny se nejčastěji používá ve tkáňovém inženýrství ve formě kompozitních materiálů. Ideálním kompozitním materiálem je takový, který potlačuje nevýhodné vlastnosti jednotlivých komponent a zachovává výhodné, např. použitím želatiny a hydroxyapatitu jako zdroje anorganické matrix pro regeneraci kosti [Chang et al., 2003]. Ueki et al. (2003) použili kopolymeru kyseliny polymléčné a polyglykolové (PLGA - polylactic-co-glycolic acid) s želatinou s rekombinantním rhBMP-2 k léčbě kondylárních defektů králíků. Zvířata rozdělili na 3 skupiny. V kontrolní skupině, kde byla provedena kondylektomie dolní čelisti, nebyl pozorován žádný nárůst kosti. Ve skupinách s izolovanou matrix a matrix s rhBMP-2 byl pozorován nárůst kosti, ale obě skupiny se statisticky nelišily [Ueki et al., 2003]. Yao et al., (2004) použili mechanicky odolnější zesíťované želatiny spolu s TCP u králíků. Pozorovali vyšší nárůst kosti ve skupině s želatinou a β -TCP [Yao et al., 2005]. Côté et al (2003) použili úspěšně směsi kolagenu a želatiny k vytvoření matrice k postupnému uvolňování FGF-2. [Côté et al., 2004]. Želatiny se používá zejména jako kompozitu a také jako media s postupným uvolňování růstových faktorů. Samostatné použití želatiny v kostním tkáňovém inženýrství jsme v relevantní literatuře nenalezli.

Caletas et al., (2006) ukázali, že lidské mezenchymální kmenové buňky (hMSCs) podléhají osteogenní diferenciaci ve fibrinovém gelu. Diferenciace závisí na poměru fibrinogenu a trombinu. Pokud se hMSCs kultivovaly v mediu s vyšší koncentrací fibrinogenu, nediferencovaly se plně do osteoblastů [Caletas et al., 2006]. Fibrin je vhodné vehikulum k dodávce růstových faktorů do kultivačního media. Je vhodný i jako vlastní kultivační medium při diferenciaci kosti. Není ale dominantní látkou využívanou ve tkáňovém kostním inženýrství.

Meinel al., (2006) sledovali osteogenezi u myši s použitím mechanicky odolného a pomalu degradabilního materiálu z fibroinu s použitím mezenchymálních kmenových buněk. Ve skupině s fibroinem s osteogenně diferencovanými MSCs, byl *in vitro* pozorován signifikantně větší nárůst novotvořené kosti než u kontrolní skupiny [Meinel al., 2006]. Wang et al. (2010) porovnávali hojení kostního defektu u králíka s použitím fibroinového a hydroxyapatitového kompozitu a stromálních kmenových buněk z kostní dřevě (BMSCs). Ve skupině fibroin/hydroxyapatit s BMSCs byl výrazný nárůst kostní hmoty po 12 týdnech od implantace ve srovnání s kontrolní skupinou [Wang et al., 2010].

Grigolo et al., (2009) použili mezenchymálních kmenových buněk v kombinaci s hyaluronátem na králičím modelu k experimentální léčbě *osteoarthritis*. V pokusu byly vytvořeny osteochondrální defekty v kolenním kloubu králíků. Po 6 měsících byly vzorky vyšetřeny histologicky a imunohistochemicky: defekty léčené kombinací hyaluronát s mezenchymálními kmenovými buňkami (MSCs) vykazovaly vyšší kvalitu regenerace [Grigolo et al., 2009]. Chazono et al., (2004) srovnávali efektivitu beta-TCP a hyaluronátu s beta-TCP na úrovni osteokonduktivity a biodegradability. Materiál byl implantován do defektu v kondylech femuru u králíka. Obě skupiny testovaných materiálů stimulovaly osteogenezi podobně. Resorpce byla rychlejší u skupiny s beta-trikacium fosfátem kombinovaným s hyaluronátem. Naproti tomu beta-trikacium fosfát kombinovaný s hyaluronátem měl stejné osteokonduktivní vlastnosti jako beta-trikacium

fosfát. Materiál je studií hodnocen přesto pozitivně, protože kombinace beta trikaci fosfátu s hyaluronátem je injikovatelná a může být využitelná jako kostní výplň v klinické medicíně [Chazono et al., 2004].

Chestnutt et al., (2009) porovnávali chitosan a nano-hydroxyapatit s izolovaným nano-hydroxyapatitem. Vzorky byly testovány 1., 4., 7., 14. a 21. den po implantaci. Buněčnost, produkce kolagenu typu I a alkalické fosfatasy vykazovaly u obou skupin stejné výsledky. Osteokalcin jako marker osteoblastické diferenciaci vykazoval časnější nárůst a byl 3× vyšší u skupiny chitosanu s hydroxyapatitem [Chestnutt et al., 2009].

Na základě výše uvedeného jsme došli k závěru, že kolagen, želatina, fibrin, fibroin, hyaluronát i chitosan jsou materiály, ve kterých lze osteogenně diferencovat kmenové buňky a že lze dosáhnout novotvorby kosti, ale, jak je vidět z výše uvedeného, autoři si často pomáhali obohacením těchto poměrně mechanicky neodolných materiálů o hydroxyapatit nebo beta-trikalcium fosfát [Ueki et al., 2003], [Wang et al., 2010], [Chazono et al., 2004], [Chestnutt et al., 2009]. Výše popsané materiály se hodí spíše jako vehikulum pro růstové faktory. V kostním tkáňovém inženýrství se používají nejčastěji obohacené o osteogenní materiály, jako jsou hydroxyapatit a beta-TCP.

Filion et al. (2011) syntetizovali kompozitní materiál z polyhydroxyethylmetakrylátu (pHEMA) a 50 hmotnostních procent nanokrystalického hydroxyapatitu. Tento materiál testovali s heterodimery rhBMP-2/7. Po 12 týdnech pozorovali remodelaci kompozitního materiálu a zhojení defektu femuru u potkana. Materiál podle autorů vykazoval osteoindukční a osteokonduktivní chování a takto získaný kompozit byl resorbovatelný [Filion et al., 2011]. Mabileau et al., (2008) použili kopolymeru pHEMA s 2-vinylpyrrolidone- p(HEMA-co-VP) jako vehikula fibroblastového růstového faktoru 2 (FGF-2) na králičím modelu. Tento kopolymer se osvědčil, ale výsledky byly diskutabilní. Ve skupině p(HEMA-co-VP) s FGF-2 byl po 2 měsících nárůst kosti signifikantně vyšší než v kontrolní skupině, ale po 3 měsících se množství novotvořené kosti vyrovnalo [Mabileau et al.2008]. Polyhydroxyethylmetakrylát (pHEMA) je špatně resorbovatelný. Proto se ho obvykle v kostním tkáňovém inženýrství používá jako kopolymeru. Jak je vidět z práce [Mabileau et al.2008], není to materiál s jasně přesvědčivými výsledky.

Yukna et al., (2009) uvádějí, že Bioplant™ HTR polymer se při imediátní implantaci neresorbuje a zachovává tloušťku alveolární kosti s dobrým estetickým výsledkem [Yukna et al., 2009]. Froum et al., (2000) docházejí k názoru, že Bioplant™ HTR polymer je vhodným aloplastickým materiálem, který zachovává výšku a šířku alveolární kosti. Histopatologicky byla efektivita tohoto aloplasty verifikována od 8 měsíců od augmentace až do 11 let. Partikule augmentačního materiálu byly obklopeny novotvořenou alveolární kostí. Okolo mikrosfér aloplasty nebyly pozorovány známky zánětu [Froum et al., 2000]. Využití bioplastu HTR s kmenovými buňkami nebylo v relevantní literatuře nalezeno. Přesvědčivé výsledky tohoto materiálu existují jen v indikacích čelistně-chirurgických. Zprávy o jeho použití např. ve spondylochirurgii nebo traumatologii jsem nenalezl. To byl také důvod, proč jsme tento materiál nezvolili jako experimentální.

Sagomyants et al., (2007) testovali různé typy polyetheretherketonů např. PEEK zesílený uhlíkovými vlákny aj. Toto *in vitro* testování ukázalo různé kvality tohoto materiálu vzhledem ke stimulaci osteogeneze. Obecně autoři konstatují, že *in vitro* má PEEK stejný osteogenní potenciál jako titan [Sagomyants et al., 2008], jeho schopnosti osseointegrace jsou široce známy, a je jich proto využíváno. Toth et al., (2005) testovali materiál *in vivo* na ovcích. Z tohoto materiálu vytvořili trojrozměrnou schránku, kterou vyplnili autologní kostí zvířat nebo rekombinantním lidským kostním morfogením

proteinem (rhBMP-2) na kolagenní matrix, a implantovali ji místo intervertebrálního disku. Po 6 měsících takto fúzovaný segment testovali radiologicky, mechanicky a histologicky. V žádné skupině nepozorovali degradaci materiálu ani zvýšený otěr. Materiál autoři považují za použitelný v humánní medicíně ke spinální fúzi [Toth et al., 2005]. Z literatury vyplývá, že biomateriály založené na PEEK nebo PEEK kompozity (nejčastěji s hydroxyapatitem nebo trikalciemfosfátem) jsou přijímány jako materiály volby zejména ve spinální chirurgii, navíc jako přirozeně RTG kontrastní alternativa metalických biomateriálů. Cook et al., (1995) použili PEEKu potaženého titanem jako dentálních implantátů. Testovali implantáty na psech. Autoři zkoumali histologicky apozici kosti na implantátech, testovali mechanickou pevnost vazby mezi implantátem a kostí. PEEK s naneseným titanem vykazoval histologicky větší apozici kosti než PEEK implantáty samotné. Mechanická pevnost se mezi skupinou vlastního PEEK a kompozitu PEEK/Ti nelišila. Autoři ukazují, že polyethereterketony jsou možnou alternativou i v použití dentálních implantátů [Cook et Rust-Dawicki 1995]. V literatuře je velké množství prací, ve kterých autoři testují kompozitní materiál PEEK/HA (hydroxyapatit) nebo PEEK/b-TCP (b-tricalcium fosfát) [Kurtz et Devine 2007]. Nejslabším místem těchto kompozitních materiálu bývá omezená mechanická pevnost vazby mezi vlastním PEEK a HA, respektive b-TCP [Fan et al., 2004]. Používání hydroxyapatitu (HA) a beta-trikalciemfosfátu (b-TCP) v kompozitním materiálu s PEEK je kompromisem mezi mechanickými vlastnostmi PEEK a zlepšením jeho bioaktivity. Se zvětšujícím se množstvím poměrného zastoupení HA/b-TCP klesá i mechanická pevnost [Kurtz et Devine 2007]. PEEK, jak zjistil [Toth et al., 2005] nepodléhá otěru, lze jej použít i jako dentálních implantátů [Cook et Rust-Dawicki 1995]. Naším cílem bylo použít materiál, který by se biologicky a funkčně vyrovnal kosti, z tohoto důvodu jsme PEEK nepoužili.

Teng et al.(2002) použil kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové (angl. PLGA - polylactic-co-glycolic acid) v poměru 50:50 PGA a PLA s neurálními kmenovými buňkami (angl. neural stem cells – NSC) u dospělých potkanů do místa poranění míchy s dobrým efektem [Teng et al., 2002]. Jenner et al., (2007) použili rekombinantního lidského transformujícího růstového faktoru beta (rhTGF- β) a růstového diferenciacního faktoru 5 (growth differentiation factor-5 - GDF-5) s mezenchymálními kmenovými buňkami z kostní dřevě (BMSCs) kultivované v 3D matrix z PLGA. Nebyla nalezena žádná diferenciac směřem ke osteoblastům nebo chondrocytům, ale byla zjištěna různá buněčnost v závislosti na použitém růstovém faktoru. Bylo ověřeno, že PLGA je dobrou modelovou maticí [Jenner et al., 2007]. Bible et al., (2008) využil PLGA opět jako 3D kostry s NSC do léze po CMP [Bible et al., 2008]. Kopolymer PLGA může být dále upravován a obohacován o biomateriály z jiných skupin. Douglas et al., (2009) testovali směs biodegradabilních polymerů, tj. kopolymerů kyseliny mléčné a polyglykolové, s hydroxyapatitovou keramikou. Tento materiál představuje 3D prostorovou síť tvořenou PLGA s adsorbovaným hydroxyapatitem (HA). Materiál se vyznačuje dobrou biokompatibilitou a podporuje růst osteoblastů [Douglas et al., 2009]. Vyznačuje se i zachováním doby degradace jako u PLGA a zlepšením adheze osteoblastů. Materiálu se používá v tkáňovém inženýrství s kmenovými buňkami. Li et al., (2009) studovali vztah PLGA/HA v kombinaci s mezenchymálními kmenovými buňkami a zjistili, že ve skupině, kde byl PLGA/HA kombinován s mezenchymálními kmenovými buňkami (MSCs), byla signifikantně vyšší regenerace chrupavky u potkanů než u PLGA/HA bez MSCs. V kontrolní skupině byla regenerace chrupavky ještě nižší než ve skupině s kopolymerem PLGA s hydroxyapatitem bez mezenchymálních kmenových buněk. Ukazuje to na důležitost PLGA/HA jako 3D sítě pro mezenchymální kmenové buňky, ale i na vlastní důležitost kmenových buněk [Li et al., 2009]. U PLGA se dostáváme k materiálům

s vynikající resorbovatelností, ale malou mechanickou pevností. Stejně jako u materiálů typu kolagenu, želatiny, hyalaganu apod. zde vidíme tendenci nahrazovat tento nedostatek PLGA směsí např. s hydroxyapatitem [Li et al., 2009], [Douglas et al., 2009]. PLGA není ideálním anorganickým substrátem pro osteogenezi a je nutné jej používat ve směsích, např. s hydroxyapatitem.

Polykapronolakton (Poly- ϵ -kaprolakton - PCL) nemá osteokonduktivní ani osteoindukční vlastnosti, což snižuje možnosti jeho použití v tkáňovém inženýrství. Navázání růstových faktorů, např. BMP, do kostry tohoto materiálu tyto vlastnosti zlepšuje [Zhang et al., 2010]. Dalším příkladem výroby kopolymerů je kopolymer kyseliny polymléčné a PCL. Kang et al., (2012) použili membrány z β -TCP a PLGC – kopolymeru kyseliny polymléčné a kapronolaktonu - spolu s kmenovými buňkami z různých zdrojů: z pupečnicku (UCBMCs – umbilical cord blood-MSCs), z Whartonova pupečnickového rosolu (WJMSCs - Wharton's jelly MSCs), MSC z tukové tkáně (ATMSCs – adipose tissue MSCs) a kmenových buněk z kostní dřevě BMSCs. Vytvořili defekt radia na psech a testovali schopnost osteogeneze MSCs z různých tkání. Defekt vyplnili beta-trikalcium fosfátem (β -TCP) vždy s jedním typem kmenových buněk a samotným β -TCP jako kontrolou. Vyplněné defekty překryli membránou z kopolymeru kyseliny polymléčné a polyglykolové s β -TCP (β -TCP + PLGC). Testovali osteogenní potenciál různých kmenových buněk *in vitro* a *in vivo*. Zjistili, že AT-MSCs měly nejvyšší proliferační potenciál a BMSCs produkovaly nejvíce vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF). Nejvyšší osteogenní diferenciaci měly AT-MSCs a UCB-MSCs [Kang et al., 2012].

Tento materiál nemá osteokonduktivní ani osteoindukční vlastnosti, proto jsme jej nepovažovali za materiál ideální pro matrix v kostním tkáňovém inženýrství.

Henslee et al., (2011) testovali pevný polypropylen fumarát (PPF), který formovali do hřebu k fixaci femuru na potkaním modelu. Pevný PPF pokryli porózním PPF s adsorbovanými mikrokuličkami PLGA s BMP-2. Pevnost kosti po 12 týdnech testovali mechanicky, pomocí RTG, mikroCT a histologicky. Po 12 týdnech pozorovali u všech skupin lepší mechanické vlastnosti novotvořené kosti než u skupiny kontrolní. Při použití solidního PPF pozorovali sníženou tvorbu kosti. Ve srovnání skupin s porózním PPF a BMP nepozorovali větší nárůst kosti [Henslee et al., 2011]. Kempen et al., (2009) implantovali u koz subkutánně PPF s mikrosférami PLGA s BMP-2 a mezenchymálními kmenovými buňkami z kostní dřevě (BMSCs). Zjistili, že *in vitro* uvolňování BMP-2 z PPF s mikrosférami PLGA je pozvolnější a nemá tak prudký nástup. *In vivo* zjistili, že vyšší osteogenní potenciál měl polypropylen fumarát s mikrosférami PLGA a BMP. Přítomnost BMSCs neměla na osteogenezi signifikantní vliv [Kempen et al., 2009]. Shin et al., (2011) použili mikrostereolithografie a vytvořili polymer polypropylen fumarátu a diethylfumarátu PPF/DEF. Tento polymer má vynikající mechanické vlastnosti, ale je hydrofobní. Aby tuto nevýhodu změnili použili tři peptidové modifikace povrchu RGD, cykloRGD a směs RGD-KRSR. Tento přístup využívá tzv. CAM – cell adhesion molecules. Jsou to proteiny umístěné na površích buněk a zajišťující vazby mezi buňkami navzájem a mezi buňkami a extracelulární matrix. Jsou nepostradatelné ve fázi embryonálního vývoje pro soudržnost buněk a tkání [Ganong et al., 1995]. Jednou ze skupin adhezivních molekul jsou integriny, které hrají roli v adhezi, buněčné signalizaci, tvaru buněk, mobilitě a v regulaci buněčného cyklu. Ubikvitěním receptorem buněčných integrinů je oligopeptid ve složení arginin-glycin-kyselina asparagová (RGD). Podobně existují další sekvence aminokyselin, které zprostředkovávají vazbu na adhezivní molekuly specifických buněk. Např. lysin-arginin-serin-arginin (KRSR) s vazbou na osteoblasty [Nelson 2006]. Shin et al., (2011) zjistili, že směs ligandů RGD-KRSR umožňovala

adhezi buněk na matrix a kompenzovala tak hydrofobní povrch matrix [Shin et al., 2011]. Při použití solidního PPF pozorovali sníženou tvorbu kosti, porozní PPF nevedl k vyšší osteogenezi [Henslee et al., 2011]. Polymer polypropylen fumarátu a diethylfumarátu je hydrofobní [Shin et al., 2011], což dále snižuje jeho možnost být ideálním osteogenním materiálem.

V kostním inženýrství se používají polyhydroxyalkanoátové kompozitní materiály s hydroxyapatitem a trikalcium fosfátem. Alves et al., (2011) použili kompozitů ze 70 % polyhydroxybutyrátu (PHB) a 30 % hydroxyapatitu. Kompozitní materiál implantovali ektopicky subkutánně a ortotopicky do stehenní kosti koček. V intervalu 15–90 dní testovali tyto implantáty. Zjistili, že v obou případech provokoval tento materiál granulomatozní zánětlivou reakci [Alves et al., 2011]. Mnoho dalších autorů testovalo polyhydroxyalkanoáty s pozitivním efektem. Ni et al., (2002) prokázali, že hydroxyapatit (HAP) s PHB měl bioaktivní vlastnosti a že míru bioaktivitivy a mechanických vlastností lze ovlivnit poměrem mezi jednotlivými složkami v kompozitu [Alves et al., 2011]. Kompozity z PHB/HA a PHBV/HA měly mechanické vlastnosti v tlaku prakticky stejné jako lidská kost. Toto zjištění ukazuje, že tato skupina látek je vhodná pro kostní tkáňové inženýrství, protože jsou tyto preparáty odbouratelné, bioaktivní, některé mají kosti odpovídající mechanické vlastnosti a můžeme je kombinovat s jinými polymery nebo organickými látkami [Qiang Chen et Wu 2005]. Ni et Wang (2004) inokulovali *in vitro* buňky králičí kostní dřeně s matrix z PLA, poly,3-hydroxybutyrátu (PHB) a poly(3-hydroxybutyrátu ko-3-hydroxyhexanoátu (PHBHHx). Testovali biokompatibilitu a chování buněk. Nejlepší výsledky, vazbu a proliferaci pozorovali ve skupině s PHBHHx. Fenotyp buněk odpovídal osteoblastům. Růst buněk byl vyšší ve skupině s PHBHHx o 40 % než u PHB a o 60 % vyšší než u PLA [Ni et Wang 2004]. Použití polyhydroxyalkanoátu *in vivo* je nutné dále testovat, protože většina výsledků je pouze *in vitro*. Někteří autoři naznačují, že materiál se může chovat prozánětlivě [Alves et al., 2011].

Nuttelman et al., (2004) použili polyethylenglykolové 3D matrice s lidskými mezenchymálními kmenovými buňkami (hMSCs) v osteogenním kultivačním mediu *in vitro*. Po 1 týdnu byla potvrzena exprese osteonektinu a alkalické fosfatasy, což jsou látky charakteristické pro osteogenní diferenciaci. Tato práce sice potvrdila PEG jako možnou matrix v kostním tkáňovém inženýrství [Nuttelman et al., 2004], ale jedná se pouze o experiment *in vitro*. Benoit et Anseth (2005) použili PEG modifikovaný heparinem spolu s hMSCs. Heparin v této studii spolu s polyethylenglykolem stimuloval adhezi, proliferaci a osteogenezi [Benoit et Anseth 2005]. Materiál se široce v kostním tkáňovém inženýrství nepoužívá.

V kostním tkáňovém inženýrství se někdy používají syntetické polypeptidy např. polymery RADA 16-I (RADA - arginin-alanin-kyselina asparagová-alanin) nebo RADA 16-II (RARADADA - arginin-alanin-arginin-alanin-kyselina asparagová-alanin- kyselina asparagová-alanin). Gareta et al., (2006) použili myších embryonálních kmenových buněk (mESC) v kultuře polypeptidů RADA 16-I [Gareta et al., 2006]. Byly úspěšně ověřeny i kombinace jiných materiálů např. hydroxyapatitu a peptidové sítě RADA 16-I [Garreta et al., 2007]. Peptidy tvoří významnou a perspektivní skupinu syntetické extracelulární matrix v kostním tkáňovém inženýrství. Jedná se ale o molekuly zlepšující adhezi buněk na anorganickou matrix, nelze je použít samostatně.

Zajímavou práci s čistým nanostrukturálním hydroxyapatitem publikovali Pezzatinim et al. (2007). Použili fibrinového gelu se stopovým množstvím hydroxyapatitu 2–10 µg/ml. Ve skupině s HAP zjistili signifikantně vyšší tvorbu fibroblastového růstového faktoru 2 (FGF-2), zvýšenou citlivost buněk na vaskulární endoteliální faktor (VEGF) a pozorovali zvýšenou tvorbu kapilár [Pezzatini et al., 2007]. Lee et al., (2008)

Použili *in vitro* čtyř různých koncentrací hydroxyapatitu v kopolymeru s PPF. Testovali jejich vlastnosti. Přidaný hydroxyapatit zlepšil hydrofilní vlastnosti PPF (Polypropylen fumarát), měl vyšší absorpci sérových proteinů kultury, což vedlo k lepší vazbě, proliferaci a rozšíření preosteoblastů v materiálu [Lee et al., 2008].

Na základě výše uvedené recenze literatury jsme v našem experimentu zvažovali použití hydroxyapatitového keramického kompozitu. Vycházeli jsme z práce Roldána et al., (2010), kde autoři použili hydroxyapatitového keramického kompozitu s poměry hydroxyapatitu/ β -TCP 60/40 s mezenchymálními kmenovými buňkami (MSCs) a testovali účinnost BMP-7, VEGF samostatně i dohromady a v kombinacích s MSCs. Na myším modelu implantovali tento materiál subkutánně, mimo kost, tj. ektopicky. V žádné skupině nepozorovali vyšší osteogenezi ani v elektronovém mikroskopu, ani histologicky [Roldán et al., 2010]. Na vlastní výsledek osteogeneze měla zřejmě vliv i ektopická, subkutánní implantace materiálu.

Čistý hydroxyapatit, který jsme použili v našem experimentu, jsme z výše popsaných důvodů považovali za nevhodnější matrix.

Další otázkou v našem experimentu bylo použití růstových faktorů. Některé z nich jsou již schválené pro klinické použití. V současné době je k dispozici komerční preparát Infuse© (Medtronic, Inc. USA), což je rekombinantní kostní morfogenní protein 2 (angl. recombinant human bone morphogenetic protein 2 - rhBMP-2) s kolagenním nosičem. Preparát je určený pro augmentaci čelistních defektů v maxilofaciální chirurgii. Americká agentura kontroly potravin a léků (angl. U.S. Food and Drug Administration - FDA) povolila jeho užívání v humánní medicíně. Dalším preparátem je GEM21S© (BioMimetic Pharmaceuticals, Inc., USA), rekombinantní destičkový růstový faktor (rhPDGF-BB) na beta-trikalcium fosfátové matrix. Preparát je schválen FDA a je indikován pro regeneraci kostních defektů parodontologii. Přestože v USA jsou tyto růstové faktory povolené k užívání, jedná a o indikace stomatologické nebo čelistně-chirurgické. Využití v traumatologii, ortopedii a spondylochirurgii je otázkou k dalšímu výzkumu. Z těchto důvodů jsme se rozhodli použít co nejjednodušší model, který nezahrnoval testování růstových faktorů.

V první části naší práce jsme hodnotili vliv kmenových buněk při použití hydroxyapatitové matrix (Cem-Ostetic®) 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. V této části experimentu jsme ukázali, že kombinace hydroxyapatitové matrix a kmenových buněk vede k lepší novotvorbě kosti. Důležitým poznatkem experimentu je kvantita, respektive iniciální bolus kmenových buněk, kdy 0,5 milionu hBMSCs se ukázala jako nedostatečná. Předchozí studie ukázaly, že defekt obratle je dobrým modelem ke studiu novotvorby kosti a testování kvalit různých biomateriálů [Fujishiro et al., 2007], [Kobayashi et al., 2009]. Liang et al., (2010) použili také defekt obratlového těla, ale na rozdíl od naší studie použili jako matrix kombinaci PLGA a BMP. Autoři se domnívají, že tento model je vhodný zejména ke simulaci defektu obratlového těla po odstranění nádorové tkáně [Liang et al., 2010].

Domníváme se, že mezenchymální kmenové buňky jsou dobrým nástrojem ke zlepšení hojení kostních defektů v ortopedii, traumatologii, spondylochirurgii a maxilofaciální chirurgii. Před vlastním klinickým použitím je nutné ověřit bezpečnost, jednoduchost a funkčnost kmenových buněk. V našem experimentu jsme použili jednoduché přípravy vlastní matrix spolu s kmenovými buňkami. Současně jsme tyto

připravovali v rámci „Správné výrobní praxe“ a metodikou odsouhlasenou SÚKL. 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]. Pro klinické použití musí být metodika přípravy matrix a kmenových buněk jednoduchá. Z tohoto důvodu jsme se chtěli vyvarovat prodloužené kultivace, diferenciaci a expanze buněk před vlastní implantací. Místo toho jsme buňky použili ihned po rozmrazení a vypláchnutí zmrazovacího media.

V literatuře je možné nalézt různé protokoly přípravy MSCs [Nakajima et al., 2007], [Choi et al., 2011]. Ke klinickému použití se většinou tyto protokoly nehodí, protože v nemocničním prostředí musí být použití rychlé a jednoduché. Naše výsledky ukazují, že pro úspěch rekonstrukce defektu obratlového těla bylo zásadní použití vyšší hustoty kmenových buněk. Choi et al., (2011) pracovali na defektu stehenní kosti s použitím fibronektinem povlakovaného mixu HA/TCP. Matrix kombinovali s kmenovými buňkami. Použili nejprve 0,75 milionu ASCs, ale nedosáhli signifikantně lepší novotvorby kosti oproti kontrole. Poté zvýšili hustotu buněk na 7,5 milionu a pozorovali výrazně vyšší nárůst kosti. Poté opět zvýšili množství ASCs na 75 milionů, ale došlo jen k malému, nesignifikantnímu nárůstu novotvorby kosti [Choi et al., 2011].

Obdobný výsledek předložili Minamide et al., (2005), kteří implantovali jeden milion a 100 milionů BMSCs do oblasti dorzolaterální fúze a zjistili signifikantně vyšší novotvorbu kosti ve skupině se 100 miliony kmenových buněk [Minamide et al., 2005]. Došli jsme ke stejnému závěru jako výše zmíněná skupina: novotvorba kosti je závislá na denzitě kmenových buněk v matrix. Ideální hustota se pohybuje zřejmě kolem 5,0-7,5 milionů buněk/ml. V našem experimentu obratlového defektu jsme nepozorovali signifikantně vyšší resorpci zbytkové matrix ve skupině s nejvyšším nárůstem novotvorby kosti, tj. skupině č. 4.

Zerbo et al., (2005) pozorovali, že degradace hydroxyapatitu se děje spíše chemickým rozpouštěním, než aktivitou osteoklastů [Zerbo et al., 2005]. Tento závěr je v souladu s našim pozorováním. Nenašli jsme žádné známky osteoklastické resorbce hydroxyapatitu, pouze známky osteoklastické přestavby novotvořené kosti. Mechanismus, kterým se kmenové buňky podílejí na novotvorbě kosti, není přesně znám [Zerbo et al., 2005].

Huang et al., (2011) ukázali, že MSCs kombinované s hydroxyapatitem/PLGA/kolagenem I se diferencují v osteoblasty a produkují extracelulární matrix v dorzolaterální spinální fúzi [Huang et al., 2011]. Jiní autoři ukázali, že transplantované MSCs přežívají pouze po krátkou dobu a nepřímo podporují migraci vlastních buněk organismu, což vede k novotvorbě kosti [Boukhechba et al., 2011].

V našem experimentu obratlového defektu jsme ve skupině prázdného defektu (skupina 1) pozorovali reaktivní osteoplazii 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. Přítomnost ostrůvků chrupavky můžeme interpretovat jako eventuální časnou enchondrální osifikaci, což by mohlo podporovat myšlenku mobilizace vlastních kmenových buněk. Pokud jsme kombinovali matrix s MSCs, chrupavčitou tkáň jsme nepozorovali a ukládání kostního materiálu bylo patrné na povrchu augmentačního materiálu. Enchondrální typ osifikace nastává při nižší tenzi kyslíku [Shapiro et al., 2008] a je primárním mechanismem sekundárního kostního hojení.

Tortelli et al., použili hydroxyapatitu s MSCs a ukázali na ektopickém modelu u myši, že dochází k enchondrální osifikaci a novotvořená kost na tomto základě byla kostí

hostitelského organismu [Tortelli et al., 2010]. Další autoři však ukázali, že použití diferencovaných osteoblastů nevede k osifikaci přes formování chrupavky, ale přes intramembranózní osifikaci. Tento postup vedl k novotvorbě kosti na myším modelu [Baraniak et al., 2010]. 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. Můžeme jen spekulovat, že 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. V našem experimentu jsme pozorovali v defektu obratlového těla granulomatozní reakci typu cizích těles na rozhraní augmentančního materiálu u skupiny se samotným hydroxyapatitem.

V kontrastu s tímto poznatkem jsme ve skupině s MSCs pozorovali výrazně redukovanou zánětlivě granulomatozní reakci. Toto zjištění vysvětluje imunomodulační efekt MSCs [Nauta et Fibbe 2007], který může signifikantně vést k zlepšení kostního hojení [Hoogduijn et al., 2010]. V naší studii jsme používali cyklosporin A k imunosupresi hostitelského organismu. Někteří autoři pozorovali potencování imunosupresního efektu cyklosporinu A a kmenových buněk [Le Blanc et al., 2004], [Maccario et al., 2005]. Vyšší novotvorbu kosti ve skupině s MSCs nemůžeme vysvětlit imunosupresí, ale spíše přítomností MSCs, protože ve skupině se samotným hydroxyapatitem jsme cyklosporinu A použili také a nedošlo k signifikantnímu nárůstu kosti. Movsowitz et al., (1988) popsali efekt cyklosporinu na kostní remodelaci. Zjistili, že může docházet ke ztrátě kostní hmoty *in vivo* [Movsowitz et al., 1988]. McCauley et al., (1992) potvrdili tyto předpoklady na potkaních osteoblastech *in vitro*. Autoři popsali inhibici proliferace osteoblastů, která vede k poklesu jejich počtu a poklesu hladin alkalické fosfatázy [McCauley et al., 1992]. Když jsme se rozhodovali, jakou imunosupresi využijeme, hledali jsme studie, které by testovaly použití MSCs s cyklosporinem: Horwitz et al., (1999) léčili 3 pacienty s *osteogenesis imperfecta* pomocí MSCs. Použili cyklosporin jako chemoprolaxi proti GVHD. Bez ohledu na cestu podání cyklosporinu pozorovali růst celkového kostního minerálu mezi 21 - 29 gramy v porovnání s fyziologickými hodnotami mezi 0 - 4 gramy u zdravých dětí se stejnou růstovou aktivitou. Tento nárůst byl v přímé úměře s nárůstem kosti, růstem výšky a sníženým rizikem zlomenin [Horwitz et al., 1999]. V literatuře můžeme nálezt různé přístupy k transplantaci xenogenních buněk s použitím imunosuprese. Isomoto et al., (2007) použili imunosupresi cyklosporinem A spolu s mezenchymálními kmenovými buňkami z kostní dřeně. Podle autorů neměl cyklosporin A žádný vliv na osteogenezi [Isomoto et al., 2007]. Tcacencu et al., (2012) implatovali lidské MSCs v hydrogelu do defektu mandibuly u myši imunosuprimovaných cyklosporinem A. Zjistili vyšší denzitu kosti alveolu a snížení množství osteoklastů v místě poranění, které přisoudili imunomodulačnímu efektu MSCs a jejich interakci s hostitelskými makrofágy a monocyty [Tcacencu et al., 2012]. Z těchto důvodů jsme se rozhodli cyklosporin A použít. Na druhé straně Kim et al., (2008) uveřejnili práci o použití xenogenních MSCs s matrix z hydroxyapatitu s beta-trikalcium fosfátem na modelu dorzolaterální fúze u králíka. Zjistili, že došlo k vysoké novotvorbě kosti bez imunosuprese. Autoři se domnívají, že MSCs mají nízkou imunogenicitu a vysoké přežití [Kim et al., 2008]. Toto tvrzení je v rozporu s naším experimentem, kde jsme zaznamenali jen minimum lidských MSCs na konci experimentu.

V poslední době se v literatuře studuje role MSCs s jejich protizánětlivými vlastnostmi. Podle nejnovějších studií MSCs snižují aktivitu buněk imunitního systému. INF- γ v kombinaci s jedním z prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1 α nebo IL-1 β mohou stimulovat MSCs k produkci vysokých hladin imunosupresivních látek, chemokinů a

adhezivních molekul jako CXCR3 a CCR5 ligandy, ICAM-1 (angl. intercellular adhesion molecule-1) a VCAM-1 (angl. vascular cell adhesion molecule-1) [Ren et al., 2008], [Ren et al., 2010], [Ma et al., 2014]. Schopnost imunoprese a antiinflatorní působení MSCs může vést k potlačení alogenní rejekce. Mechanismus působení kmenových buněk není popsán. Diskutuje se o nižší imunogenicitě MSCs nižší expresí HLA I a absencí exprese kostimulačních molekul, vlivem MSCs na maturaci a fungování dendritických buněk, omezování proliferace T-lymfocytů a interakce s NK buňkami pomocí rozpustných cytokinů [Lanza et Alata 2014]. Přestože není mechanismus těchto interakcí popsán, MSCs se používají v klinické medicíně: Kurtzberg et al., (2014) použili lidské MSCs u pediatrických pacientů s akutní formou reakce štěpu proti hostiteli (aGVHD) rezistentní na imunopresiva. Zlepšení stavu po 28 dnech nastalo v 61.3% případů a toto zlepšení bylo přímo úměrné přežití pacientů nad 100 dní od infúze MSCs [Kurtzberg et al., 2014]. Podle amerických vládních zdrojů (U.S. National Institutes of Health <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01510431>) probíhá klinický výzkum MSCs u pacientů s Crohnovou chorobou rezistentní na běžnou léčbu. Výsledky nejsou k dispozici, ale výše popsané ukazují na imunopresivní charakter MSCs.

V souladu s dalšími experimenty jsme i my nezaznamenali tvorbu nádorových struktur [Centeno et al., 2011]. Také jsme nepozorovali 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. V literatuře jsou popsány různé modely ventrální a dorzolaterální spinální fúze [Khana et al., 2004]. Dorzolaterální fúze je velmi častou procedurou v lidské medicíně [Nakajima et al., 2007]. Muschler et al., (2010) ve své práci uvádějí, že bychom se měli vyvarovat dorzolaterální fúze u malých zvířat. V protikladu s tím je fakt, že modelů 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]. Naš nový experimentální model fixace *processus spinosus* ukazuje, že je bezpečný vzhledem k nulové morbiditě a mortalitě. Žádné experimentální zvíře neutrpělo zlomeninu titanového mikroplate a nedošlo ke ztrátě fixačních šroubů. V rámci našeho experimentu jsme nezaznamenali žádný neurologický deficit. Obě testované skupiny nevykazovaly žádné známky změny příjmu potravy.

V některých studiích dorzolaterální fúze nejsou obratle nijak fixovány [Nakajima et al., 2007], přestože fixace se považuje za podmínku, bez které není možná tvorba kosti. Za zlatý standard se v kostním tkáňovém inženýrství považuje triangulární koncept: současné využití kmenových buněk, růstových faktorů a kostní matrix. Giannoudis et al., (2007) přidává k tomuto konceptu pojem „mechanical environment“, tedy důležitost mechanické stability jako klíčového faktoru hojení kosti [Giannoudis et al., 2007]. Cílem našeho druhého experimentu bylo vytvoření jednoduchého modelu spinální fúze na malém zvířeti. Obdobný výsledek jako Choi et al., (2011) předložili Minamide et al., (2005), kteří implantovali jeden milion a 100 milionů BMSCs do oblasti dorzolaterální fúze. Zjistili signifikantně vyšší novotvorbu kosti ve skupině se 100 miliony kmenových buněk [Minamide et al., 2005].

Kmenové buňky, respektive hBMSCs, jsme připravovali pro druhou část našeho experimentu zcela stejně. Experimentální zvířata jsme ošetřovali ve stejných podmínkách, použili jsme imunoprese cyklosporinem A. Oproti nálezům ve skupině s hydroxyapatitem s MSCs (Skupina 6) jsme v histologickém vyšetření ve skupině s čistým hydroxyapatitem (Skupina 5) viděli časté obrovské mnohojaderné buňky z cizích těles, smíšenou zánětlivou reakci v okolí augmentačního materiálu s neutrofily a makrofágy.

Tento nále z koresponduje s předchozím zjištěním diskutovaným výše, že kmenové buňky mají imunomodulační efekt a snižují zánětlivou odpověď hostitele. V souladu s tímto nálezem je i absence zánětlivé reakce v okolí augmentátu ve skupině s MSCs. Kvalita kosti byla podle histologického vyšetření lepší ve skupině s MSCs, pozorovali jsme lépe integrovanou novotvořenou kost do okolní kosti. Shluky augmentačního materiálu byly na některých místech zcela obklopeny novotvořenou kostí. Trabekuly novotvořené kosti byly obklopeny aktivními osteoblasty a rozptýlenými osteoklasty jako následek aktivní remodelace kosti. Přesto v kvantitativním histomorfometrickém srovnání jsme nezaznamenali vyšší novotvorbu kosti ve skupině s MSCs. V experimentu s defektem obratlového těla se třístěnný defekt hojí hůře než výše popsáný defekt jednostěnný. Důvodem může být rozsah defektu. Podobný efekt může mít nedodržení principů řízené kostní regenreace, kdy fibroblasty rychleji obsazují augmentát a brání osteogenezi. V protikladu s tímto tvrzením je ale vyšší kvalita kosti dle histologického vyšetření ve skupině s MSCs. K srovnatelnému výsledku mezi skupinami mohla vést i mírná pohyblivost mezi obratli, která je dána použitím fixace v jedné rovině. S tímto tvrzením je ale v rozporu práce Nakajima et al., 2007, kteří nepoužili žádné fixace u dorzolaterální fúze.

V našem experimentu jsme použili fixace obratlů titanovou dlahou. I přes tuto stabilizaci docházelo k diskrétní pohyblivosti fúzovaných obratlů. Ve skupině s MSCs (skupina 6) jsme zaznamenali vyšší novotvorbu kosti, která se však signifikantně nelišila od novotvorby kosti u skupiny bez MSCs (skupina 5). Pokud by mírná pohyblivost byla příčinou nevýrazné novotvorby kosti ve skupině s MSCs, pak by velmi pravděpodobně proporcionalně horších výsledků dosahovala i skupina se samotným hydroxyapatitem. Vlastnosti mikroprostředí se mohou výrazně lišit a ovlivňovat novotvorbu kosti mezi zhojením metafyzárního defektu a dorzolaterální fúzi [Boden et al., 1999].

Naše studie ukazují, že hydroxyapatit s lidskými mezenchymálními kmenovými buňkami jsou vhodným augmentačním materiálem, který u jednostěnných defektů vede k signifikantní novotvorbě kosti. Testovali jsme jednoduchou přípravu matrix a kmenových buněk, vhodnou k použití v klinické medicíně.

6 Závěr

V traumatologii, ortopedii, spondylochirurgii a maxilofaciální chirurgii vede nedostatek kostní tkáně k nedokonalému a kompromisnímu ošetření mnoha pacientů. V naší práci jsme se zabývali ověřením osteogenních schopností mezenchymálních kmenových buněk spolu s matrix z hydroxyapatitu. Experimentálně jsme ověřili, že použití mezenchymálních kmenových buněk vede u jednostěnného defektu obratlového těla potkana k signifikantně 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 signifikantně vyšší ve srovnání s kontrolou. Důvodem mohl být fakt, že se jednalo o 4 stěnný defekt, který je pro tělo mnohem těžší zhojit. U modelu defektu obratlového těla a obratlové fúze jsme zjistili, že kmenové buňky dárce přežívají po 8 týdnech od implantace velmi málo a jejich efekt bude spíše imunomodulační, v potlačení zánětlivé odpovědi hostitelského organismu. Kmenové buňky budou velmi pravděpodobně secernovat zatím nezjištěné cytokiny a jiné působky, které pravděpodobně vedou k mobilizaci vlastních kmenových buněk organismu a tím vyšší novotvorbě kosti.

Oba popsané modely, tj. model defektu obratlového těla a spinální fúze, byly levné, bezpečné, snadno reprodukovatelné a s nulovou mortalitou.

7 Literatura

Abbaspour, A., Takata, S., Sairyo, K., Katoh, S., Yukata, K., Yasui, N.: Continuous local infusion of fibroblast growth factor-2 enhances consolidation of the bone segment lengthened by distraction osteogenesis in rabbit experiment. *Bone*. 42, 2008, s. 98–106.

Abdouh, M., Facchino, S., Chato, W., Balasingam, V., Ferreira, J., Bernier, G.: BMI1 sustains human glioblastoma multiforme stem cell renewal. *J Neurosci*. 29, 2009, s.8884–8896.

Alérico, FA., Bernardes, SR., Fontão, FN., Diez, GF., Alérico, JH., Claudino, M.: Prospective tomographic evaluation of autogenous bone resorption harvested from mandibular ramus in atrophic maxilla. *J Craniofac Surg*. 25(6), 2014, s.543-6.

Almeida, JD., Arisawa, EA., da Rocha, RF., Carvalho, YR.: Effect of calcitonin on bone regeneration in male rats: a histomorphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 36(5), 2007, s. 435-40.

Alonso, N., Tanikawa, DY., Freitas, RS., Canan, L. Jr., Ozawa, TO., Rocha, DL.: Evaluation of maxillary alveolar reconstruction using a resorbable collagen sponge with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in cleft lip and palate patients. *Tissue Eng Part C Methods*. 16(5), 2010, s. 1183-9.

Alves, EG., Rezende, CM., Serakides, R., Pereira, MM., Rosado, IR.: Orthopedic implant of a polyhydroxybutyrate (PHB) and hydroxyapatite composite in cats. *J Feline Med Surg*. Aug;13(8), 2011, s. 546-52.

Amemori, T., Romanyuk, N., Jendelova, P., Herynek, V., Turnovcova, K., Prochazka, P., Kapcalova, M., Cocks, G., Price, J., Sykova, E.: Human conditionally immortalized neural stem cells improve locomotor function after spinal cord injury in the rat. *Stem Cell Res Ther*. 7;4(3), 2013, s.68.

Andrae, J., Gallini, R., Betsholtz, C.: Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*. 15;22(10), 2008, s. 1276-312..

Annes, JP., Munger, JS., Rifkin, DB.: Making sense of latent TGFbeta activation. *J. Cell. Sci*. 116, 2003, s. 217–24.

Arese, M., Chen, Y., Florkiewicz, RZ., Gualandris, A., Shen, B., Rifkin, DB.: Nuclear activities of basic fibroblast growth factor: potentiation of low-serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localization signals. *Mol Biol Cell*. 10(5), 1999, s. 1429-44.

Arisawa, EA., Brandão, AA., Almeida, JD., da Rocha, RF.: Calcitonin in bone-guided regeneration of mandibles in ovariectomized rats: densitometric, histologic and histomorphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 37(1), 2008, s. 47-53.

Armelin, HA.: Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 70(9), 1973, s. 2702-6.

Arnold, J., Gruber, R., Nitsch, A., Merten, HA., Funke, M., Ludwig, A.: CT-density and CT-volumetry after sinus augmentation with GDF-5 coated beta-TCP. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 36, (11), 2007, s. 1013.

Arpornmaeklong, P., Kochel, M., Depprich, R., Kübler, NR., Würzler, KK.: Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 33(1), 2004, s. 60-70.

Assoian, RK., Komoriya, A., Meyers, CA., Miller, DM., Sporn, MB.: Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem*. 258(11), 1983, s. 7155-60.

Bačáková, L., Filová, E., Rypáček, F., Svorcík, V., Starý, V.: Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiol Res*. 53 Suppl 1, 2004, s. 35-45.

Baharvand, H., Hashemi, SM., Kazemi Ashtiani, S., Farrokhi, A.: Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. *Int J Dev Biol*. 50(7), 2006, s. 645-52.

Baker, J., Liu, JP., Robertson, EJ., Efstratiadis, A.: Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*. 75, 1193, s. 73–82.

Banwart, JC., Asher, MA., Hassanein, RS.: Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine*. 1;20(9),1995, s. 1055-60.

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

Barsa, P.: Vertebroplasty—treatment options for structurally insufficient vertebrae. *Cesk Slov Neurol N*. 75, 2012, s. :8–17.

Beenken, A., Mohammadi, M.: The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 8(3), 2009, s. 235-53.

Behr, B., Sorkin, M., Manu, A., Lehnhardt, M., Longaker, MT., Quarto, N.: Fgf-18 is required for osteogenesis but not angiogenesis during long bone repair. *Tissue Eng Part A*. 17(15-16), 2011, s. 2061-9.

Ben-Dov, IZ., Galitzer, H., Lavi-Moshayoff, V., Goetz, R., Kuro-o, M., Mohammadi, M., Sirkis, R., Naveh-Many, T., Silver, J.: The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest*. 117(12), 2007, s. 4003-8.

Benoit, DS., Anseth, KS.: Heparin functionalized PEG gels that modulate protein adsorption for hMSC adhesion and differentiation. *Acta Biomater*. Jul;1(4),2005, s. 461-70.

Bessa, PC., Balmayor, ER., Hartinger, J., Zanoni, G., Dopler, D., Meinl, A., Banerjee, A., Casal, M., Redl, H., Reis, RL., van Griensven, M.: Silk fibroin microparticles as carriers

for delivery of human recombinant bone morphogenetic protein-2: in vitro and in vivo bioactivity. *Tissue Eng Part C Methods*. 16(5), 2010, s. 937-45.

Bible, E., Chau, DY., Alexander, MR., Price, J., Shakesheff, KM., Modo, M.: The support of neural stem cells transplanted into stroke-induced brain cavities by PLGA particles. *Biomaterials*. Jun;30(16), 2009, s. 2985-94.

Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Roveri, N., Rubini, K.: Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials*. 23(24), 2002, s. 4827-32.

Bikle, D., Majumdar, S., Laib, A., Powell-Braxton, L., Rosen, C., Beamer, W., et al.: The skeletal structure of insulin-like growth factor I-deficient mice. *J Bone Miner Res*. 16, 2001, s. 2320-9.

Bikle, DD., Harris, J., Halloran, BO., Roberts, CT., LeRoith, D., Morey-Holton, E.: Expression of the genes for insulin-like growth factors and their receptors on bone during skeletal growth. *Am J Physiol*. 267, 1994, s. 278-286.

Bilezikian, JP., Raisz, LG., Martin, TJ.: *Principles of Bone Biology (Third Edition)* 2008, Elsevier Inc. Part I, Str. 98. ISBN: 978-0-12-373884-4

Boden, S.: Overview of the biology of lumbar spine fusion and principles for selecting a bone graft substitute. *Spine*. 27, 2002, s. 26-31

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

Bölükbaşı, N., Yeniyol, S., Tekkesin, MS., Altunatmaz, K.: The use of platelet-rich fibrin in combination with biphasic calcium phosphate in the treatment of bone defects: a histologic and histomorphometric study. *Curr Ther Res Clin Exp*. 75, 2013, s. 15-21.

Bork, P.: The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett*. 26;327(2), 1993, s. 125-30.

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.

Boyce, T., Edwards, J., Scarborough, N.: Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am*. 30(4), 1999, s. 571-81.

Bratthall, G., Lindberg, P., Havemose-Poulsen, A., Holmstrup, P., Bay, L., Söderholm, G., Norderyd, O., Andersson, B., Rickardsson, B., Hallström, H., Kullendorff, B., Sköld Bell, H.: Comparison of ready-to-use Endogain-gel and Emdogain in patients with chronic adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 28(10), 2001, s. 923-9.

Breen, A., O'Brien, T., Pandit, A.: Fibrin as a delivery system for therapeutic drugs and biomolecules. *Tissue Eng Part B Rev*. Jun;15(2), 2009, s. 201-14.

Brennan-Speranza, TC., Rizzoli, R., Kream, BE., Rosen, C., Ammann, P.: Selective osteoblast overexpression of IGF-I in mice prevents low protein-induced deterioration of bone strength and material level properties. *Bone*. 49(5), 2011, s. 1073-9.

Brigstock, DR.: The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr Rev*. 20(2), 1999, s. 189-206.

Brookes, SJ., Robinson, C., Kirkham, J., Bonass, WA.: Biochemistry and molecular biology of amelogenin proteins of developing dental enamel. *Arch Oral Biol*. 40(1), 1995, s.1-14. Review

Cammack, GV., Nevins, M., Clem, DS., Hatch, JP., Mellonig, JT.: Histologic evaluation of mineralized and demineralized freeze-dried bone allograft for ridge and sinus augmentations. *Int J Periodontics Restorative Dent*: Jun;25(3), 2007, s. 231-237.

Castellon, P., Yukna, RA.: Immediate Dental Implant Placement in Sockets Augmented With HTR Synthetic Bone. *Implant Dent*. Mar;13(1), 2004, s. 42-8.

Catelas, I., Sese, N., Wu, BM., Dunn, JC., Helgerson, S., Tawil, B.: Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrin gels in vitro. *Tissue Eng*. Aug;12(8), 2006, s. 2385-96.

Centeno, CJ., Schultz, JR., Cheever, M., Freeman, M., Faulkner, S., Robinson, B., Hanson, R.: Safety and complications reporting update on the re-implantation of culture-expanded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique. *Curr Stem Cell Res Ther*. 6(4), 2011, s. 368-78.

Centers for Disease Control and Prevention. CDC [online]. Atlanta: CDC, © October 25, 2013 [vid. 22. února 2015]. Dostupný z: <http://www.cdc.gov/OralHealth/Infectioncontrol/faq/allografts.htm>

Centrella, M., Canalis, E.: Transforming and nontransforming growth factors are present in medium conditioned by fetal rat calvariae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82(21), 1985, s. 7335-7.

Claro, FA., Lima, JR., Salgado, MA., Gomes, MF.: Porous polyethylene for tissue engineering applications in diabetic rats treated with calcitonin: histomorphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 20(2), 2005, s. 211-9.

Clemmons, DR.: Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 6, 2007, s. 821–33.

Cocks, G., Romanyuk, N., Amemori, T., Jendelova, P., Forostyak, O., Jeffries, AR., Perfect, L., Thuret, S., Dayanithi, G., Sykova, E., Price, J.: Conditionally immortalized stem cell lines from human spinal cord retain regional identity and generate functional V2a interneurons and motoneurons. *Stem Cell Res Ther*. 7;4(3), 2013, s. 69.

Conrad, EU., Gretch, DR., Obermeyer, KR., Moogk, MS., Sayers, M., Wilson, JJ., Strong, DM.: Transmission of the hepatitis-C virus by tissue transplantation. *J Bone Joint Surg Am.* 77(2), 1995, s. 214-224.

Cook, SD., Rust-Dawicki, AM.: Preliminary evaluation of titaniumcoated PEEK dental implants. *J Oral Implantol.* 21(3), 1995, s. 176–81.

Côté, MF., Laroche, G., Gagnon, E., Chevallier, P., Doillon, CJ.: Denatured collagen as support for a FGF-2 delivery system: physicochemical characterizations and in vitro release kinetics and bioactivity. *Biomaterials.* 25(17), 2004, s.3761-72.

De Kok, IJ., Hicok, KC., Padilla, RJ., Young, RG., Cooper, LF.: Effect of vitamin D pretreatment of human mesenchymal stem cells on ectopic bone formation. *J Oral Implantol.* 32(3), 2006, s. 103-9.

Demetri, GD., Griffin JD.: Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood.* 78, 1991, s. 2791–2808.

Depprich, R., Handschel, J., Sebald, W., Kubler, NR., Wurzler, KK.: Comparison of the osteogenic activity of bone morphogenetic protein (BMP) mutants. *Mund Kiefer Gesichtschir* 9, 2005, s. 363-8.

Di Bella, C., Aldini, NN., Lucarelli, E., Dozza, B., Frisoni, T., Martini, L., Fini, M., Donati, D.: Osteogenic protein-1 associated with mesenchymal stem cells promote bone allograft integration. *Tissue Eng Part A.* 16(9), 2010, s. 2967-76.

Dimar, JR., Glassman, SD., Burkus, KJ., Carreon, LY.: Clinical outcomes and fusion success at 2 years of single-level instrumented posterolateral fusions with recombinant human bone morphogenetic protein-2/compression resistant matrix versus iliac crest bone graft. *Spine.* 31, 2006, s.2534–9.

Dohan Ehrenfest, DM., Doglioli, P., de Peppo, GM., Del Corso, M., Charrier, JB.: Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Arch Oral Biol.* 55(3), 2010, s. 185-94.

Dohan, D.: Platelet Rich Fibrin (PRF): un nouveau biomateriau de cicatrisation. 2e`me partie: Plaquettes et cytokines. *Implantodontie.* 13, 2004, s. 99-108.

Dohan, DM., Choukroun, J., Diss, A., et al.: Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II : Plateletrelated biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 101, 2006, s. 45-50.

Dohan, DM., Choukroun, J.: PRP, cPRP, PRF, PRG, PRGF, FC . . . How to find your way in the jungle of platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 103, 2006, s. 305-6.

Dohan, S., Choukroun, J., Dohan, A., Donsimoni, JM., Gabrieleff, D., Fioretti, F., Korb, G.,

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz, E., Nakajima, T., Iizuka, H., Tsutsumi, S., Kayakabe, M., Takagishi, K.: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8(4), 2006, s.315-7.

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.

Douglas, T., Pamula, E., Hauk, D., Wiltfang, J., Sivananthan, S., Sherry, E., Warnke, P.H.: Porous polymer/hydroxyapatite scaffolds: characterization and biocompatibility investigations. *J Mater Sci Mater Med*. Sep;20(9), 2009, s. 1909-15.

Doyle, C., Tanner, E.T., Bonfield, W.: In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite. *Biomaterials* 12, 1991, s. 841–7.

Duneas, N., Crooks, J., Ripamonti, U.: Transforming growth factor-beta 1: Induction of bone morphogenetic protein genes expression during endochondral bone formation in the baboon and synergistic interaction with osteogenic protein-1. *Growth Factors* 15, 1998, s. 259–277.

E, L.L., Xu, L.L., Wu, X., Wang, D.S., Lv, Y., Wang, J.Z., Liu, H.C.: The interactions between rat-adipose-derived stromal cells, recombinant human bone morphogenetic protein-2, and beta-tricalcium phosphate play an important role in bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 16(9), 2010, s. 2927-40.

Eglitis, M.A., Mezey, E.: Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15;94(8), 1997, s. 4080-5.

Ehrhart, N.P., Hong, L., Morgan, A.L., Eurell, J.A., Jamison, R.D.: Effect of transforming growth factor- β_1 on bone regeneration in critical-sized bone defects after irradiation of host tissues. *Am J Vet Res*. 66, 2005, s.1039-45.

Ekrol, I., Hajducka, C., Court-Brown, C., McQueen, M.M.: A comparison of RhBMP-7 (OP-1) and autogenous graft for metaphyseal defects after osteotomy of the distal radius. *Injury*. 39(Suppl. 2), 2008, s. 73–82.

Elangovan, S., D'Mello, S.R.O.V., Hong, L., Ross, R.D., Allamargot, C., Dawson, D.V., Stanford, C.M., Johnson, G.K., Sumner, D.R., Salem, A.K.: The enhancement of bone regeneration by gene activated matrix encoding for platelet derived growth factor. *Biomaterials*. 35(2), 2014, s. 737-47.

Eshraghi, S., Das, S.: Mechanical and microstructural properties of polycaprolactone scaffolds with one-dimensional, two-dimensional, and three-dimensional orthogonally oriented porous architectures produced by selective laser sintering. *Acta Biomater*. Jul;6(7), 2010, s. 2467-76.

Esposito, M., Grusovin, MG., Coulthard, P., Worthington, HV.: Enamel matrix derivative (Emdogain) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects (Review). The Cochrane Library, 2009, Issue 1

Eswaramoorthy, R., Chang, CC., Wu, SC., Wang, GJ., Chang, JK., Ho, ML.: Sustained release of PTH(1-34) from PLGA microspheres suppresses osteoarthritis progression in rats. *Acta Biomater.* 8(6),2012, s. 2254-62.

Fan, JP., Tsui, CP., Tang, CY., Chow, CL.: Influence of interphase layer on the overall elasto-plastic behaviors of HA/PEEK biocomposite. *Biomaterials* 25(23), 2004, s. 5363–73.

Fang, Z., Yang, Q., Xiong, W., Li, GH., Liao, H., Xiao, J., Li, F.: Effect of CGRP-adenoviral vector transduction on the osteoblastic differentiation of rat adipose-derived stem cells. *PLoS One.* 30;8(8), 2013, s. 72738.

Fassmann a kol. . Kostní tkáňové inženýrství v orofaciální oblasti. Nukleus HK, 1. vydání, 2006a ISBN-10: 80-86225-82-8.

Feldman, B., Poueymirou, W., Papaioannou, VE., DeChiara, TM., Goldfarb, M.: Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science.* 267, 1995, s. 246–249.

Ferrara, N., Henzel, WJ.: Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 161, 1989, s. 851–8.

Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., Mavilio, F.: Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 6;279(5356), 1998, s.1528-30.

Ferreira, CL., Abreu, FA., Silva, GA., Silveira, FF., Barreto, LB., Paulino, TP., Miziara, MN., Alves, JB.: TGF- β 1 and BMP-4 carried by liposomes enhance the healing process in alveolar bone. *Arch Oral Biol.* 58(6), 2013, s. 646-56.

Filion, (tm)., Li, X., Mason-Savas, A., Kreider, JM., Goldstein, SA., Ayers, DC., Song, J.: Elastomeric osteoconductive synthetic scaffolds with acquired osteoinductivity expedite the repair of critical femoral defects in rats. *Tissue Eng Part A.* Feb;17(3-4), 2011, s. 503-11.

Francis-West, PH., Abdelfattah, A., Chen, P., Allen, C., Parish, J., Ladher, R., Allen, S., MacPherson, S., Luyten, FP., Archer, CW.: Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development.* 126(6), 1999, s. 1305-15.

Frazier, K., Williams, S., Kothapalli, D., Klapper, H., Grotendorst, GR.: Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol.* 107, 1996, s. 404–411.

Frechette, JP., Martineau, I., Gagnon, G.: Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res.* 84(5), 2005, s. 434–9.

Friedlaender, GE., Perry, CR., Cole, JD., Cook, SD., Cierny, G., Muschler, GF., Zych, GA., Calhoun, JH., LaForte, AJ., Yin, S.: Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am.* 83-A Suppl 1(Pt 2), 2001, s. 151-8.

Froum, S., Orlowski, W.: Ridge preservation utilizing an alloplast prior to implant placement--clinical and histological case reports. *Pract Periodontics Aesthet Dent.* May;12(4), 2000, s. 393-402.

Fujishiro, T., Bauer, TW., Kobayashi, N., Kobayashi, H., Sunwoo, MH., Seim, HB. 3rd., Turner, AS.: Histological evaluation of an impacted bone graft substitute composed of a combination of mineralized and demineralized allograft in a sheep vertebral bone defect *J Biomed Mater Res A.* 1;82(3), 2007, s. 538-44.

Ganong, WF.: *Přehled lékařské fyziologie.* Nakladatelství a vydavatelství H+H, 1995.

Garreta, E., Gasset, D., Semino, C., Borrós, S.: Fabrication of a three-dimensional nanostructured biomaterial for tissue engineering of bone. *Biomol Eng.* Feb;24(1), 2007, s. 75-80.

Garreta, E., Genové, E., Borrós, S., Semino, CE.: Osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells and mouse embryonic fibroblasts in a three-dimensional self-assembling peptide scaffold. *Tissue Eng.* Aug;12(8), 2006, s. 2215-27.

Gebhardt, A., *Rapid Prototyping,* Hanser Gardner Publications, Inc., Cincinnati. 2003

Geiger, F., Lorenz, H., Xu, W., Szalay, K., Kasten, P., Claes, L., Augat, P., Richter, W.: VEGF producing bone marrow stromal cells (BMSC) enhance vascularization and resorption of a natural coral bone substitute. *Bone.* 41(4), 2007, s.516-22.

Ghannam, S., Bouffi, C., Djouad, F., Jorgensen, C., Noël, D.: Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther.* 15;1(1), 2010, S. 2.

Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, MP., Morshed, M., Nasr-Esfahani, MH., Ramakrishna S.: Electrospun poly(epsilon-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials.* 2008 Dec;29(34):4532-9.

Giannoudis, PV., Jones, E., Einhorn TA.: Fracture healing and bone repair. *Injury* Jun;42(6), 2011, s. 549-50.

Godara, A., Raabe, D., Green, S.: The influence of sterilization processes on the micromechanical properties of carbon fiber-reinforced PEEK composites for bone implant applications. *Acta Biomater.* Mar;3(2), 2007,s .209-20.

Goldfarb, M.: Fibroblast growth factor homologous factors: evolution, structure, and function. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 2005, s. 215–220.

Griffin, M., Iqbal, SA., Bayat, A.: Exploring the application of mesenchymal stem cells in bone repair and regeneration. *J Bone Joint Surg Br.*93(4), 2011, s. 427-34.

Grigolo, B., Lisignoli, G., Desando, G., Cavallo, C., Marconi, E., Tschon, M., Giavaresi, G., Fini, M., Giardino, R., Facchini A.? Osteoarthritis treated with mesenchymal stem cells on hyaluronan-based scaffold in rabbit. *Tissue Eng Part C Methods.* Dec;15(4), 2009, s. 647-58.

Guimarães, GN., Cardoso, GB., Naves, LZ., Correr-Sobrinho, L., Line, SR., Marques, MR.: Short-term PTH administration increases dentine apposition and microhardness in mice. *Arch Oral Biol.* 57(10), 2012, s. :1313-9.

Harsha, AP., Tewari, US.: The effect of fibre reinforcement and solid lubricants on abrasive wear behavior of polyetheretherketone composites. *J Reinforc Plast Compos* 22(8), 2003, s. 751-67.

He, J., Rosen, CJ., Adams, DJ., Kream, BE.: Postnatal growth and bone mass in mice with IGF-I haploinsufficiency. *Bone.* 38(6), 2006, s.826-35.

He, L., Lin, Y., Hu, X., Zhang, Y., Wu, H.: A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 108(5), 2009, s. 707-13.

Hedberg, EL., Shih, CK., Lemoine, JJ., Timmer, MD., Liebschner, MA., Jansen, JA., Mikos, AG.: In vitro degradation of porous poly(propylene fumarate)/poly(DL-lactic-co-glycolic acid) composite scaffolds. *Biomaterials.* Jun;26(16), 2005, s. 3215-25.

Hejcl, A., Urdzikova, L., Sedy, J., Lesny, P., Pradny, M., Michalek, J., Burian, M., Hajek, M., Zamecnik, J., Jendelova, P., Sykova, E.: Acute and delayed implantation of positively charged 2-hydroxyethyl methacrylate scaffolds in spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg Spine.* 8(1), 2008, s. 67-73.

Henslee, AM., Spicer, PP., Yoon, DM., Nair, MB., Meretoja, VV., Witherel, KE., Jansen, JA., Mikos, AG., Kasper, FK.: Biodegradable composite scaffolds incorporating an intramedullary rod and delivering bone morphogenetic protein-2 for stabilization and bone regeneration in segmental long bone defects. *Acta Biomater.* Oct;7(10), 2011, s. 3627-37.

Hock, JM., Fitzpatrick, LA., Bilezikian, JP.: Actions of parathyroid hormone. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan G, editors. *Principles of Bone Biology*, 2nd ed. San Diego Academic Press; 2002. p. 463–82

Hoffman, R., Benz, EJJ., Shattil, SJ., Furie, B., Cohen, HJ., Silberstein, LE., et al.: *Hematology: basic principles and practice*. Philadelphia: Churchill Livingstone. 2000.

Hong, L., Tabata, Y., Miyamoto, S., Yamada, K., Aoyama, I., Tamura, M., Hashimoto, N., Ikada, Y.: Promoted bone healing at a rabbit skull gap between autologous bone fragment and the surrounding intact bone with biodegradable microspheres containing transforming growth factor-beta1. *Tissue Eng.* 6(4), 2000, s. 331-40.

Hong, L., Tabata, Y., Yamamoto, M., Miyamoto, S., Yamada, K., Hashimoto, N., Ikada, Y.: Comparison of bone regeneration in a rabbit skull defect by recombinant human BMP-2 incorporated in biodegradable hydrogel and in solution. *J Biomater Sci Polym Ed.* 9(9), 1998, s. 1001-14.

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.

Horwitz, EM., Prockop, DJ., Fitzpatrick, LA., Koo, WWK., Gordon, PL., Neel, M., Sussman, M., Orchard, P., Marx, JC., Pyeritz, RE., Brenner, MK.: Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Medicine.* 5, 1999, s. 309 – 313.

Hsu, WK., Sugiyama, O., Park, SH., Conduah, A., Feeley, BT., Liu, NQ., Krenek, L., Virk, MS., An, DS., Chen, IS., Lieberman, JR.: Lentiviral-mediated BMP-2 gene transfer enhances healing of segmental femoral defects in rats. *Bone.* 40(4), 2007, s. 931-8.

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.

Hughes, FJ., Howells, GL.: Interleukin-11 inhibits bone formation in vitro. *Calcif Tissue Int.* 53(5), 1993, s. 362-4.

Chan, BP., Hui, TY., Yeung, CW., Li, J., Mo, I., Chan, GC.: Self-assembled collagen-human mesenchymal stem cell microspheres for regenerative medicine. *Biomaterials.* 28(31), 2007, s. 4652-66.

Chang, JK., Chang, LH., Hung, SH., Wu, SC., Lee, HY., Lin, YS., et al.: Parathyroid hormone 1–34 inhibits terminal differentiation of human articular chondrocytes and osteoarthritis progression in rats. *Arthritis Rheumatol.* 60, 2009, s. 3049–60.

Chang, MC., Ko, CC., Douglas, WH.: Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite. *Biomaterials.* 24(17), 2003, s.2853-62.

Chang, PC., Dovban, AS., Lim, LP., Chong, LY., Kuo, MY., Wang, CH.: Dual delivery of PDGF and simvastatin to accelerate periodontal regeneration in vivo. *Biomaterials.* 34(38), 2013, s. 9990-7.

Chazono, M., Tanaka, T., Komaki, H., Fujii, K.: Bone formation and bioresorption after implantation of injectable beta-tricalcium phosphate granules-hyaluronate complex in rabbit bone defects. *J Biomed Mater Res A.* Sep 15;70(4), 2004, s. 542-9.

Chen, D., Zhao, M., Mundy, GR.: Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 22(4), 2004, s. 233-41.55.

Chen, FM., Zhang, M., Wu, ZF.: Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomaterials*. 31(24), 2010, s. 6279-308.

Chen, GQ., Wu, Q.: The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*. Nov;26(33),2005, s. 6565-78.

Chesnutt, BM., Yuan, Y., Buddington, K., Haggard, WO., Bumgardner, JD.: Composite chitosan/nano-hydroxyapatite scaffolds induce osteocalcin production by osteoblasts in vitro and support bone formation in vivo. *Tissue Eng Part A*. Sep;15(9), 2009, s. 2571-9.

Chhabra, A., Zijerdi, D., Zhang, J., Kline, A., Balian, G., Hurwitz, S.: BMP-14 deficiency inhibits long bone fracture healing: a biochemical, histologic, and radiographic assessment. *J Orthop Trauma*. 19(9), 2005, s. 629-34.

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.

Choi, BH., Zhu, SJ., Kim, BY., Huh, JY., Lee, SH., Jung, JH.: Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 34(4), 2005, s. 420-4.

Choukroun, J., Simonpieri, A., Girard, MO., Fioretti, F., Dohan, S., Dohan, D.: Platelet-rich fibrin (PRF): Un nouveau biomate´riau de cicatrisation. 4e`me partie: Implications the´rapeutiques. *Implantodontie*. 13, 2004, s. 229-35.

Chung, R., Foster, BK., Zannettino, AC., Xian, CJ.: Potential roles of growth factor PDGF-BB in the bony repair of injured growth plate. *Bone*. 44(5), 2009, s. 878-85.

Ianus, A1., Holz, GG., Theise, ND., Hussain, MA.: In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest*. 111(6), 2003, s. 843-50.

Intini, G.: The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials*. 30, 2009, s. 4956–4966.

Ishida, K., Matsumoto, T., Sasaki, K., Mifune, Y., Tei, K., Kubo, S., Matsushita, T., Takayama, K., Akisue, T., Tabata, Y., Kurosaka, M., Kuroda, R.: Bone regeneration properties of granulocyte colony-stimulating factor via neovascularization and osteogenesis. *Tissue Eng Part A*. 16(10), 2010, s. 3271-84.

Isomoto, S., Hattori, K., Ohgushi, H., Nakajima, H., Tanaka, Y., Takakura, Y.: Rapamycin as an inhibitor of osteogenic differentiation in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Sci*. 12(1), 2007, s. 83-8.

- Jones, EA., Tosh, D., Wilson, DI., Lindsay, S., Forrester, LM.: Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Exp Cell Res.* 1;272(1), 2002, s. 15-22.
- Jenner, JM., van Eijk, F., Saris, DB., Willems, WJ., Dhert, WJ., Creemers, LB.: Effect of transforming growth factor-beta and growth differentiation factor-5 on proliferation and matrix production by human bone marrow stromal cells cultured on braided poly lactic-co-glycolic acid scaffolds for ligament tissue engineering. *Tissue Eng.* Jul;13(7), 2007, s. 1573-82.
- Jeon, E., Yun, YR., Kang, W., Lee, S., Koh, YH., Kim, HW., Suh, CK., Jang, JH.: Investigating the role of FGF18 in the cultivation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 7(8), 2012, s. 43982.
- Jeong, SM., Lee, CU., Son, JS., Oh, JH., Fang, Y., Choi, BH.: Simultaneous sinus lift and implantation using platelet-rich fibrin as sole grafting material. *J Craniomaxillofac Surg.* 42(6), 2014, s. 990-4.
- Jiang, HX., Zhi, L., Uludag, H., Bagnall, K.: Dosage Effect of BMP7 on Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *Tissue Engineering Part A.* 16(8), 2010, s: A-1-A-29. Abstracts—bone-tec 2009, International Bone-Tissue-Engineering Congress October 8–11, 2009 Hannover, Germany.
- Jiang, J., Lichtler, AC., Gronowicz, GA., Adams, DJ., Clark, SH., Rosen, CJ., Kream, BE.: Transgenic mice with osteoblast-targeted insulin-like growth factor-I show increased bone remodeling. *Bone.* 39(3), 2006, s. 494-504.
- Jiang, X., Zou, S., Ye, B., Zhu, S., Liu, Y., Hu, J.: bFGF-Modified BMMSCs enhance bone regeneration following distraction osteogenesis in rabbits. *Bone.* 46(4), 2010, s. 1156-61.
- Jones, AL., Bucholz, RW., Bosse, MJ., Mirza, SK., Lyon, TR., Webb, LX., Pollak, AN., Golden, JD., Valentin-Opran, A.: Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects. A randomized, controlled trial. BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma-Allgraft (BESTT-ALL) Study Group. *J Bone Joint Surg Am.* 88(7), 2006, s.1431-41.
- Kabasawa, Y., Asahina, I., Gunji, A., Omura, K.: Administration of parathyroid hormone, prostaglandin E2, or 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D3 restores the bone inductive activity of rhBMP-2 in aged rats. *DNA Cell Biol.* 22(9), 2003, s. 541-6.
- Kanaan, RA., Aldwaik, M., Al-Hanbali, OA.: The role of connective tissue growth factor in skeletal growth and development. *Med Sci Monit.* 12(12), 2006. s. 277-281.
- Kanczler, JM., Ginty, PJ., White, L., Clarke, NM., Howdle, SM., Shakesheff, KM., Oreffo, RO.: The effect of the delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenic protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation. *Biomaterials.* 31(6), 2010, s. 1242-50.

Kang, BJ., Ryu, HH., Park, SS., Koyama, Y., Kikuchi, M., Woo, HM., Kim, WH., Kweon, OK.: Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *J Vet Sci. Sep*;13(3), 2012, s. 299-310.

Kanyama, M., Kuboki, T., Akiyama, K., Nawachi, K., Miyauchi, FM., Yatani, H., Kubota, S., Nakanishi, T., Takigawa, M.: Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. *Arch Oral Biol.* 48(10), 2003, s. 723-30.

Kasten, P., Vogel, J., Geiger, F., Niemeyer, P., Luginbühl, R., Szalay, K.: The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials.* 29(29), 2008, s. 3983-92.

Katzer, A., Marquardt, H., Westendorf, J., Wening, JV., von Foerster, G.: Polyetheretherketone cytotoxicity and mutagenicity in vitro. *Biomaterials* 23(8), 2002, s. 1749-59.

Kawaguchi, H., Nakamura, K., Tabata, Y., Ikada, Y., Aoyama, I., Anzai, J., et al.: Acceleration of fracture healing in nonhuman primates by fibroblast growth factor-2. *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 2001, s. 875–80.

Kawamura, M., Urist, MR.: Human fibrin is a physiologic delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res.* Oct;(235), 1988, s.302-10.

Kempen, DH., Creemers, LB., Alblas, J., Lu, L., Verbout, AJ., Yaszemski, MJ., Dhert, WJ.: Growth factor interactions in bone regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 16(6), 2010, s.551-66.

Kempen, DH., Kruyt, MC., Lu, L., Wilson, CE., Florschütz, AV., Creemers, LB., Yaszemski, MJ., Dhert, WJ.: Effect of autologous bone marrow stromal cell seeding and bone morphogenetic protein-2 delivery on ectopic bone formation in a microsphere/poly(propylene fumarate) composite. *Tissue Eng Part A.* Mar;15(3), 2009, s. 587-94.

Kempen, DH., Lu, L., Heijink, A., Hefferan, TE., Creemers, LB., Maran, A., Yaszemski, MJ., Dhert, WJ.: Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration. *Biomaterials.* 30(14), 2009, s. 2816-25.

Keramaris, NC., Calori, GM., Nikolaou, VS., Schemitsch, EH., Giannoudis, PV.: Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury.* 39 Suppl2, 208, s. S45-57.

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

Khojasteh, A., Eslaminejad, MB., Nazarian, H.: Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelete-rich plasma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 106(3), 2008, s. 356-62.

- Kikuchi, K., Kadono, T., Ihn, H., Sato, S., Igarashi, A., Nakagawa, H., Tamaki, K., Takehara, K.: Growth regulation in scleroderma fibroblasts: increased response to transforming growth factor-beta 1. *J Invest Dermatol.* 105(1), 1995, s. 128-32.
- Kikuchi, T., Kubota, S., Asaumi, K., Kawaki, H., Nishida, T., Kawata, K., Mitani, S., Tabata, Y., Ozaki, T., Takigawa, M.: Promotion of bone regeneration by CCN2 incorporated into gelatin hydrogel. *Tissue Eng Part A.* 14(6), 2008, s.1089-98.
- 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.
- Kim, J., Hematti, P.: Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol.* 37, 2009. s.1445–1453.
- Kleinheinz, J., Stratmann, U., Joos, U., Wiesmann, HP.: VEGF-activated angiogenesis during bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg.* 63(9), 2005, s. 1310-6.
- Kleinschmidt, K., Ploeger, F., Nickel, J., Glockenmeier, J., Kunz, P., Richter, W.: Enhanced reconstruction of long bone architecture by a growth factor mutant combining positive features of GDF-5 and BMP-2. *Biomaterials.* 34(24), 2013, s. 5926-36.
- Knight, PG., Glistler, C.: TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction.* 132(2), 2006, s.191-206.
- Kobayashi, H., Fujishiro, T., Belkoff, SM., Kobayashi, N., Turner, AS., Seim, HB. 3rd., Zitelli, J., Hawkins, M., Bauer, TW.: Long-term evaluation of a calcium phosphate bone cement with carboxymethyl cellulose in a vertebral defect model. *J Biomed Mater Res A* 88, 2009, s. 880–888.
- Kobayashi, M., Kawase, T., Horimizu, M., Okuda, K., Wolff, LF., Yoshie, H.: A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals.* 40(5), 2012, s. 323-9.
- Krause, DS., Theise, ND., Collector, MI., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., Sharkis, SJ.: Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell.* 4;105(3), 2001, s. 369-77.
- Kruger, JP., Hondke, S., Endres, M., Pruss, A., Siclari, A., Kaps, C.: Human platelet-rich plasma stimulates migration and chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells. *J Orthop Res: Off Publ Orthop Res Soc.* 30,2012, s. 845-52.
- Kubota, K., Iseki, S., Kuroda, S., Oida, S., Iimura, T., Duarte, WR., Ohya, K., Ishikawa, I., Kasugai, S.: Synergistic effect of fibroblast growth factor-4 in ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. *Bone.* 31(4), 2002, s. 465-71.
- Kumar, V., Cotran, RS., Robbins, SL.: Tissue repair: cell regeneration and fibrosis. *Basic pathology.* 7th ed. Philadelphia: Saunders. 2003, s. 61–78.

Kuroda, R., Matsumoto, T., Miwa, M., Kawamoto, A., Mifune, Y., Fukui, T., Kawakami, Y., Niikura, T., Lee, SY., Oe, K., Shoji, T., Kuroda, T., Horii, M., Yokoyama, A., Ono, T., Koibuchi, Y., Kawamata, S., Fukushima, M., Kurosaka, M., Asahara, T.: Local transplantation of G-CSF-mobilized CD34(+) cells in a patient with tibial nonunion: a case report. *Cell Transplant.* 20(9), 2011, s. 1491-6.

Kuroda, R., Matsumoto, T., Niikura, T., Kawakami, Y., Fukui, T., Lee, SY., Mifune, Y., Kawamata, S., Fukushima, M., Asahara, T., Kawamoto, A., Kurosaka, M.: Local transplantation of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34+ cells for patients with femoral and tibial nonunion: pilot clinical trial. *Stem Cells Transl Med.* 3(1), 2014, s. 128-34.

Kurtz, SM., Devine, JN.. PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants. *Biomaterials.* Nov;28(32), 2007, s. 4845-69.

Kurtzberg, J., Prockop, S., Teira, P., Bittencourt, H., Lewis, V., Chan, KW., Horn, B., Yu, L., Talano, JA., Nemecek, E., Mills, CR., Chaudhury, S.: Allogeneic human mesenchymal stem cell therapy (remestemcel-L, Prochymal) as a rescue agent for severe refractory acute graft-versus-host disease in pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 20(2), 2014, s. 229-35.

Kütük, N., Baş, B., Soylu, E., Gönen, ZB., Yilmaz, C., Balcioğlu, E., Özdamar, S., Alkan, A.: Effect of platelet-rich plasma on fibrocartilage, cartilage, and bone repair in temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg.* 72(2), 2014, s. 277-84.

Kwon, HR., Wikesjö, UM., Park, JC., Kim, YT., Bastone, P., Pippig, SD., Kim, CK.: Growth/differentiation factor-5 significantly enhances periodontal wound healing/regeneration compared with platelet-derived growth factor-BB in dogs. *J Clin Periodontol.* 37(8), 2010, s. 739-46.

Kytyr, D., Jirousek, O., Dammer, J.: High resolution X-ray imaging of bone-implant interface by large area flat-panel detector. *J Instrum.* 6, 2011, s. 1–5.

Lacoste, E., Martineau, I., Gagnon, G.: Platelet concentrates: effects of calcium and thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release. *J Periodontol.* 74(10), 2003, s. 1498–507.

Landesberg, R., Moses, M., Karpatkin, M.: Risk of using platelet-rich plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg.* 56, 1998, s. 1116-7.

Lane, JM.: Bone graft substitutes. *Western J Med.* Dec, 1995, s.565-567.

Langdahl, BL., Knudsen, JY., Jensen, HK., Gregersen, N., Eriksen, EF.: A sequence variation: 713-8delC in the transforming growth factor-beta 1 gene has higher prevalence in osteoporotic women than in normal women and is associated with very low bone mass in osteoporotic women and increased bone turnover in both osteoporotic and normal women. *Bone.* 20(3), 1997, s. 289-94.

Lanza, R., Atala, A.: *Essentials of Stem Cell Biology*, Third edition. 2014, Elsevier Inc. S. 255-59. ISBN-13: 978-0124095038.

Laurencin, C., Khan, Y., El-Amin, S.F.: Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices*. Jan;3(1), 2006, s. 49-57.

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.

Leach, J.K., Kaigler, D., Wang, Z., Krebsbach, P.H., Mooney, D.J.: Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. *Biomaterials*. 27(17), 2006, s. 3249-55.

Leask, A.: CCN2/decorin interactions: a novel approach to combating fibrosis? *J Cell Commun Signal*. 5(3), 2011, s. 249-50.

Lee, J.S., Wikesjö, U.M., Jung, U.W., Choi, S.H., Pippig, S., Siedler, M., Kim, C.K.: Periodontal wound healing/regeneration following implantation of recombinant human growth/differentiation factor-5 in a beta-tricalcium phosphate carrier into one-wall intrabony defects in dogs. *J Clin Periodontol*. 37(4), 2010, s. 382-9.

Lee, J.W., Kang, K.S., Lee, S.H., Kim, J.Y., Lee, B.K., Cho, D.W.: Bone regeneration using a microstereolithography-produced customized poly (propylene fumarate)/diethyl fumarate photopolymer 3D scaffold incorporating BMP-2 loaded PLGA microspheres. *Biomaterials*. Jan;32(3), 2011, s. 744-52.

Lee, K.W., Wang, S., Yaszemski, M.J., Lu, L.: Physical properties and cellular responses to crosslinkable poly(propylene fumarate)/hydroxyapatite nanocomposites. *Biomaterials*. Jul;29(19), 2008, s. 2839-48.

Lee, T.H., Huang, Y.H., Chang, N.K., Lin, W.C., Chien, P.W., Su, T.M., Hsieh, D.J., Lee, T.C.: Characterization and spinal fusion effect of rabbit mesenchymal stem cells. *BMC Res Notes*. 10;6, 2013, s. :528.

Lee, Y.M., Park, Y.J., Lee, S.J., Ku, Y., Han, S.B., Klokkevold, P.R., Chung, C.P.: The bone regenerative effect of platelet-derived growth factor-BB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier. *J Periodontol*. Mar;71(3), 2000, s. 418-24.

Leon, E.R., Iwasaki, K., Komaki, M., Kojima, T., Ishikawa, I.: Osteogenic effect of interleukin-11 and synergism with ascorbic acid in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*. 42(6), 2007, s. 527-35.

Leung, A.Y., Verfaillie, C.M.: All-trans retinoic acid (ATRA) enhances maintenance of primitive human hematopoietic progenitors and skews them towards myeloid differentiation in a stroma-noncontact culture system. *Exp Hematol*. 33(4), 2005, s. 422-7.

- Li, F., Liu, X., Zhao, S., Wu, H., Xu, HH.: Porous chitosan bilayer membrane containing TGF- β 1 loaded microspheres for pulp capping and reparative dentin formation in a dog model. *Dent Mater.* 30(2), 2014, s.172-81.
- Li, H., Zheng, Q., Xiao, Y., Feng, J., Shi, Z., Pan,, Z.: Rat cartilage repair using nanophase PLGA/HA composite and mesenchymal stem cells. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 24(1), 2009, s. 83-99.
- Liang, H., Wang, K., Shimer, AL., Li, X., Balian, G., Shen, FH.: Use of a bioactive scaffold for the repair of bone defects in a novel reproducible vertebral body defect model. *Bone.* 47(2), 2010, s. 197-204.
- Liu, JP., Baker, J., Perkins, AS., Robertson, EJ., Efstratiadis, A.: Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75, 1993, s. 59–72.
- Liu, S., Guo, R., Simpson, LG., Xiao, ZS., Burnham, CE., Quarles, LD.: Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX. *J Biol Chem.* 26;278(39), 2003, s. 37419-26.
- Liu, Z., Xu, J., Colvin, JS., Ornitz, DM.: Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. *Genes Dev.* 16, 2002, s. 859–869.
- Luize, DS., Bosco, AF., Bonfante, S., de Almeida, JM.: Influence of ovariectomy on healing of autogenous bone block grafts in the mandible: a histomorphometric study in an aged rat model. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 23(2), 2008, s. 207-14.
- Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., Wang, Y.: Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death and Differentiation.* 21, 2004, s. 216–225.
- Mabilleau, G., Aguado, E., Stancu, IC., Cincu, C., Baslé, MF., Chappard, D.: Effects of FGF-2 release from a hydrogel polymer on bone mass and microarchitecture. *Biomaterials.* 29(11), 2008, s. 1593-600.
- Mabilleau, G., Moreau, MF., Filmon, R., Basle, MF., Chappard, D.: Biodegradability of poly (2-hydroxyethyl methacrylate) in the presence of the macrophage cell line. *Biomaterials.* 25, 2004, s. 5155-62.
- Maccario, R., Moretta, A., Cometa, A., Montagna, D., Comoli, P., Locatelli, F., Podestà, M., Frassoni, F.: Human mesenchymal stem cells and cyclosporin a exert a synergistic suppressive effect on in vitro activation of alloantigen-specific cytotoxic lymphocytes. *Biol Blood Marrow Transplant.* 11(12), 2005, s. 1031-2.
- Magit, DP., Maak, T., Trioano, N., Raphael, B., Hamouria, Q., Polzhofer, G., et al.: Healos/recombinant human growth and differentiation factor-5 induces posterolateral lumbar fusion in a New Zealand white rabbit model. *Spine* 31, 2006 , s. 2180-8.

Machoň, V., Foltán, R., Hirjak, D., Řehořová, M.: Platelet-rich plasma in temporomandibular joint osteoarthritis therapy: a 3-month follow-up pilot study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 42, 10, 2013, s. 1365.

Marie, P.J.: Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene*. 16, 203, s.:23-32.

Marx RE.: Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 62(4), 2004, s. 489-96.

Marx, RE., Carlson, ER., Eichstaedt, RM., Schimmele, SR., Strauss, JE., Georgeff, KR.: Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 85(6), 1998, s. 638-46.

Marzouk, KM., Gamal, AY., Al-Awady, AA., Sharawy MM.: Osteoconductive effects of vinyl styrene microbeads in rat calvarial defects. *J Oral Maxillofac Surg.* 65(8), 2007, s.1508-16.

Masuhara, K., Nakase, T., Suzuki, S., Takaoka, K., Matsui, M., Anderson, HC.: Use of monoclonal antibody to detect bone morphogenetic protein-4 (BMP-4). *Bone.* 16(1), 1995, s.91-6.

May, R., Mark, HF., Bikales, NM., Overberger, CG., Menges, G., Kroschwitz, JI.: Polyetheretherketones. *Encyclopedia of polymer science and engineering.* New York: Wiley; 1988, s. 313–20.

McCauley, LK., Rosol TJ., Capen, CC.: Effects of cyclosporin A on rat osteoblasts (ROS 17/2.8 cells) in vitro. *Calcif Tissue Int.* 51(4), 1992, s. 291-7.

Meinel, L., Betz, O., Fajardo, R., Hofmann, S., Nazarian, A., Cory, E., Hilbe, M., McCool, J., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G., Merkle, HP., Rechenberg, B., Kaplan, DL., Kirker-Head C.: Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects. *Bone.* Oct;39(4), 2006, s. 922-31.

Mifune, Y., Matsumoto, T., Kawamoto, A., Kuroda, R., Shoji, T., Iwasaki, H., Kwon, SM., Miwa, M., Kurosaka, M., Asahara, T.: Local delivery of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34-positive progenitor cells using bioscaffold for modality of unhealing bone fracture. *Stem Cells.* 26(6), 2008, s. 1395-405.

Michellini, M., Franceschini, V., Sihui Chen, S., Papini, S., Rosellini, A., Ciani, F., Margolis, L., Revoltella, RP.: Primate embryonic stem cells create their own niche while differentiating in three-dimensional culture systems. *Cell proliferation* 39, 2006, s. 217–229.

Min, CK., Wikesjö, UM., Park, JC., Chae, GJ., Pippig, SD., Bastone, P., Kim, CS., Kim, CK.: Wound healing/regeneration using recombinant human growth/differentiation factor-5 in an injectable poly-lactide-co-glycolide-acid composite carrier and a one-wall intra-bony defect model in dogs. *J Clin Periodontol.* 38(3), 2011, s. 261-8.

Minagawa, T., Tabata, Y., Oyama, A., Furukawa, H., Yamao, T., Yamamoto, Y.: Controlled release of granulocyte colony-stimulating factor enhances osteoconductive and biodegradable properties of Beta-tricalcium phosphate in a rat calvarial defect model. *Int J Biomater.* 2014, 2014, s.134521.

Minamide, A., Yoshida, M., Kawakami, M., Yamasaki, S., Kojima, H., Hashizume, H., Boden, SD.: The use of cultured bone marrow cells in type I collagen gel and porous hydroxyapatite for posterolateral lumbar spine fusion. *Spine.* 15;30(10), 2005, s. 1134-8.

Mishra, A., Tummala, P., King, A., Lee, B., Kraus, M., Tse, V., et al.? Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Tissue Eng Part C, Methods,* 15, 2009, s. 431-5.

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.

Moore, EE., Bendele, AM., Thompson, DL., Littau, A., Waggie, KS., Reardon, B., Ellsworth, JL.: Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 13(7), 2005, s. 623-31.

Morgan, DO., Edman, VJ., Standring, DN., Fried, V., Smith, MC., Roth, RA., Rutte,r WJ.: Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* 329, 1987, s. 301–307.

Movsowitz, C., Epstein, S., Fallon, M., Ismail, F., Thomas, S.: Cyclosporin-A in vivo produces severe osteopenia in the rat: effect of dose and duration of administration *Endocrinology.* 23(5), 1998, s. 2571-7.

Murakami, M., Horibe, H., Iohara, K., Hayashi, Y., Osako, Y., Takei, Y., Nakata, K., Motoyama, N., Kurita, K., Nakashima, M.: The use of granulocyte-colony stimulating factor induced mobilization for isolation of dental pulp stem cells with high regenerative potential *Biomaterials.* 34(36), 2013, s. 9036-47.

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.

Myers, TJ., Yan, Y., Granero-Molto, F., Weis, JA., Longobardi, L., Li, T., Li, Y., Contaldo, C., Ozkhan, H., Spagnoli, A.: Systemically delivered insulin-like growth factor-I enhances mesenchymal stem cell-dependent fracture healing *Growth Factors.* 30(4), 2012, s. 230-41.

Mygind, T., Stiehler, M., Baatrup, A., Li, H., Zou, X., Flyvbjerg, A., Kassem, M., Bünger, C.: Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials.* 28(6), 2007, s.1036-47.

Naik, B., Karunakar, P., Jayadev, M., Marshal, VR.: Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review. *J Conserv Dent.* 16(4), 2013, s. 284-93.

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.

Nakamae, A., Sunagawa, T., Ishida, O., Suzuki, O., Yasunaga, Y., Hachisuka, H., Ochi, M.: Acceleration of surgical angiogenesis in necrotic bone with a single injection of fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J Orthop Res.* 22(3), 2004, s. 509-13.

Nakamura, Y., Tensho, K., Nakaya, H., Nawata, M., Okabe, T., Wakitani, S.: Low dose fibroblast growth factor-2 (FGF-2) enhances bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)-induced ectopic bone formation in mice. *Bone.* 36(3), 2005, s. 399-407.

Nakanishi, T., Nishida, T., Shimo, T., Kobayashi, K., Kubo, T., Tamatani, T., Tezuka, K., Takigawa, M.: Effects of CTGF/Hcs24, a product of a hypertrophic chondrocyte-specific gene, on the proliferation and differentiation of chondrocytes in culture. *Endocrinology.* 141(1), 2000, s. 264-73.

Naot, D., Cornish, J.: The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism. *Bone.* 43(5), 2008, s. 813-8.

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

Nauth, A., Ristevski, B., Li, R., Schemitsch, EH.: Growth factors and bone regeneration: how much bone can we expect? *Injury.* 42(6), 2011, s. 574-9.

Nelson, M., Balasundaram, G., Webster, TJ.: Increased osteoblast adhesion on nanoparticulate crystalline hydroxyapatite functionalized with KRSR. *Int J Nanomedicine.* 1(3), 2006, s. 339-49.

Ni, J., Wang, M.: In vitro evaluation of hydroxyapatite reinforced polyhydroxybutyrate composite. *Mater Sci Eng C-Bio S.* 20.2002, s. 101-9.

Niemeyer, P., Fechner, K., Milz, S., Richter, W., Suedkamp, NP., Mehlhorn, AT., Pearce, S., Kasten P.: Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials.* 31(13), 2010, s. 3572-9.

Nikolidakis, D., Meijer, GJ., Oortgiesen, DA., Walboomers, XF., Jansen, JA.: The effect of a low dose of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) on the early bone-healing around oral implants inserted in trabecular bone. *Biomaterials.* 30(1), 2009, s. 94-9.

Nishida, T., Nakanishi, T., Asano, M., Shimo, T., Takigawa, M.: Effects of CTGF/Hcs24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product, on the proliferation and differentiation of osteoblastic cells in vitro. *J Cell Physiol.* 184(2), 2000, s.197-206.

Nuttelman, CR., Tripodi, MC., Anseth, KS.: In vitro osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells photoencapsulated in PEG hydrogels. *J Biomed Mater Res A*. Mar 15;68(4), 2004, s. 773-82.

O'Connor, R.: Survival factors and apoptosis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 62, 1998, s. 137-166.

Obruča, S.: Polyhydroxyalkanoáty - přirozeně odbouratelné plasty [online]. 13-07-2007 [vid. 22. února 2015]. Dostupné z <http://inovace.cz/novinky/726-polyhydroxyalkanoaty-prirozene-odbouratelne-plasty>.

Ogawa, S., Oku, A., Sawano, A., Yamaguchi, S., Yazaki, Y., Shibuya, M.: A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem*. 20;273(47), 1998, s. 31273-82.

Ohbayashi, N., Shibayama, M., Kurotaki, Y., Imanishi, M., Fujimori, T., Itoh, N., Takada, S.: FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev*. 1;16(7), 2002, s. 870-9.

Ono, M., Kubota, S., Fujisawa, T., Sonoyama, W., Kawaki, H., Akiyama, K., Oshima, M., Nishida, T., Yoshida, Y., Suzuki, K., Takigawa, M., Kuboki, T.: Promotion of attachment of human bone marrow stromal cells by CCN2. *Biochem Biophys Res Commun*. 25;357(1), 2007, s. 20-5.

Ono, M., Kubota, S., Fujisawa, T., Sonoyama, W., Kawaki, H., Akiyama, K., Shimono, K., Oshima, M., Nishida, T., Yoshida, Y., Suzuki, K., Takigawa, M., Kuboki, T.: Promotion of hydroxyapatite-associated, stem cell-based bone regeneration by CCN2. *Cell Transplant*. 17(1-2), 2008, s. 231-40.

Orlando, G., Lerut, J., S, RJ.: *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation*. New York: Elsevier, 2013, s. 792-794. ISBN: 978-0-12-398523-1

Pandey, PM.: On the Rapid Prototyping Technologies and Applications in Product Design and Manufacturing. In *Materials Science Forum* 710 (02), 2012, s.101-109.

Perbal, A., Takigawa, M., Perbal B.? *CCN Proteins in Health and Disease* Springer, 2010, eBook ISBN 978-90-481-3779-4.

Petersen, BE., Bowen, WC., Patrene, KD., Mars, WM., Sullivan, AK., Murase, N., Boggs, SS., Greenberger, JS., Goff, JP.: Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 14;284(5417), 1999, s. 1168-70.

Pettway, GJ., Schneider, A., Koh, AJ., Widjaja, E., Morris, MD., Meganck, JA., Goldstein, SA., McCauley, LK.: Anabolic actions of PTH (1-34): use of a novel tissue engineering model to investigate temporal effects on bone. *Bone*. 36(6), 2005, s. 959-70.

Pezzatini, S., Morbidelli, L., Solito, R., Paccagnini, E., Boanini, E., Bigi, A., Ziche, M.: Nanostructured HA crystals up-regulate FGF-2 expression and activity in microvascular endothelium promoting angiogenesis. *Bone*. 41(4), 2007, s.523-34.

Pospíšil, J., Bioactive molecules for the modification of materials in tissue engineering. Brno, 2012. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta MU, Ústav experimentální biologie, Oddělení genetiky a molekulární biologie. Vedoucí práce Ing. Josef Jaroš, Ph.D. Dostupné také z: http://is.muni.cz/th/357959/prif_b/Bakalarska_prace.txt

Powell-Braxton, L., Hollingshead, P., Warburton, C., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Dalton, D., et al.: IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev.* 7, 1993, s. 2609–17.

Pripatnanont, P., Nuntanaranont, T., Vongvatcharanon, S., Phurisat, K.: The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects. *J Craniomaxillofac Surg.* 41(8), 2013, s. 191-200.

Pulak, MP., Rapid prototyping technologies, applications and part deposition planning [online]. Nedatováno. [vid. 25. února 2015]. Dostupné z: http://web.iitd.ac.in/~pmpandey/MEL120_html/RP_document.pdf.

Qu, Z., Andrukhov, O., Laky, M., Ulm, C., Matejka, M., Dard, M., Rausch-Fan, X.: Effect of enamel matrix derivative on proliferation and differentiation of osteoblast cells grown on the titanium implant surface. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 111(4), 2011, s. 517-22.

Ratner, BD., Hoffman, AS., Schoen, FJ., Lemons, JE.: *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2nd. London: Elsevier, Academic Press; 2004.

Ravn, P., Overgaard, K., Spencer, EM., Christiansen, C.: Insulin-like growth factors I and II in healthy women with and without established osteoporosis. *Eur J Endocrinol.* 132, 1995, s. 313–319.

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

Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, AI., Zhao, RC., Shi, Y.: Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell.* 7;2(2), 2008, s. 141-50.

Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L'Huillier, A., Ling, W., Roberts, AI., Le, AD., Shi, S., Shao, C., Shi, Y.: Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol.* 1;184(5), 2010, s. 2321-8.

Rezwan, K., Chen, QZ., Blaker, JJ., Boccaccini, AR.: Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 27(18), 2006, s. 3413-31.

Rifkin, DB.: Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *Biol Chem.* 4;280(9), 2005, s. 7409-12.

Riley, EH., Lane, JM., Urist, MR., Lyons, KM., Lieberman, JR.: Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res.* 324, 1996, s. 39-46.

Riminucci, M., Collins, MT., Fedarko, NS., Cherman, N., Corsi, A., White, KE., Waguespack, S., Gupta, A., Hannon, T., Econs, MJ., Bianco, P., Gheron Robey, P.: FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting. *J Clin Invest.* 112(5), 2003, s. 683-92.

Ríos, CN., Skoracki, RJ., Miller, MJ., Satterfield, WC., Mathur, AB.: In vivo bone formation in silk fibroin and chitosan blend scaffolds via ectopically grafted periosteum as a cell source: a pilot study. *Tissue Eng Part A.* Sep;15(9), 2009, s. 2717-25.

Roldán, JC., Detsch, R., Schaefer, S., Chang, E., Kelantan, M., Waiss, W., Reichert, TE., Gurtner, GC., Deisinger, U.: Bone formation and degradation of a highly porous biphasic calcium phosphate ceramic in presence of BMP-7, VEGF and mesenchymal stem cells in an ectopic mouse model. *J Craniomaxillofac Surg.* 38(6), 2010, s.423-30.

Rosenfeld, MG., Mermod, JJ., Amara, SG., Swanson, LW., Sawchenko, PE., Rivier, J., et al.: Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature.* 304, 1983, s. 129–35.

Rossmann, W., Schulte-Hermann, R.: Biology of transforming growth factor beta in hepatocarcinogenesis. *Microsc Res Tech* 52, 2001, s. 430–436.

Rozen, N., Ish-Shalom, S., Rachmiel, A., Stein, H., Lewinson, D.: Interleukin-6 modulates trabecular and endochondral bone turnover in the nude mouse by stimulating osteoclast differentiation. *Bone.* 26(5), 2000, s. 469–74.

Rozen, N., Lewinson, D., Bick, T., Jacob, ZC., Stein, H., Soudry, M.: Fracture repair: modulation of fracture-callus and mechanical properties by sequential application of IL-6 following PTH 1-34 or PTH 28-48. *Bone.* 41(3),2007, s. 437-45.

Růžička, J., Romanyuk, N., Hejčl, A., Vetrík, M., Hrubý, M., Cocks, G., Cihlár, J., Přádný, M., Price, J., Syková, E., Jendelová, P.: Treating spinal cord injury in rats with a combination of human fetal neural stem cells and hydrogels modified with serotonin. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 73(1), 213, s. 102-15.

Rýgllová, Š., Částicové kompozitní materiály a některé jejich bioaplikace [online]. Bulletin č. 1/2006 [vid. 25. února 2015]. Dostupné z: http://www.irsm.cas.cz/materialy/oddeleni/5/bulletin/2006_bulletin.pdf.

Sabir, MI., Xu, X., Li, L.: A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *Journal of Materials Science,* 44(21), 2009, s. 5713-5724.

Sagomonyants, KB., Jarman-Smith, ML., Devine, JN., Aronow, MS., Gronowicz, GA.: The in vitro response of human osteoblasts to polyetheretherketone (PEEK) substrates compared to commercially pure titanium. *Biomaterials*. Apr;29(11), 2008, s. 1563-72.

Sanchez, AR., Sheridan, PJ., Kupp, LI.: Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 18, 2003, s. 93-103.

Sarkar, MR., Augat, P., Shefelbine, SJ., Schorlemmer, S., Huber-Lang, M., Claes, L., Kinzl, L., Ignatius, A.: Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials*. 27(9), 2006, s. 1817-23.

Sbordone, C., Toti, P., Guidetti, F., Califano, L., Santoro, A., Sbordone, L.: Volume changes of iliac crest autogenous bone grafts after vertical and horizontal alveolar ridge augmentation of atrophic maxillas and mandibles: a 6-year computerized tomographic follow-up. *J Oral Maxillofac Surg*. 70(11), 2012, s. 2559-65.

Sedý, J., Urdzíkóvá, L., Jendelová, P., Syková E.: Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neurosci Biobehav Rev*. 32(3), 2008, s. 550-80.

Sedý, J., Urdzíkóvá, L., Likavcanová, K., Hejcl, A., Burian, M., Jendelová, P., Zicha, J., Kunes, J., Syková, E.: Low concentration of isoflurane promotes the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J Neurotrauma*. 24(9), 2007, s. 1487-501.

Senger, DR., Galli, SJ., Dvorak, AM., Perruzzi, CA., Harvey, VS., Dvorak, HF.: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 25, 1983, s. 983-5.

Seo, HS., Jung, JK., Lim, MH., Hyun, DK., Oh, NS., Yoon, SH.: Evaluation of Spinal Fusion Using Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells with or without Fibroblast Growth Factor-4. *Journal of Korean Neurosurgical Society*. 46(4), 2009, s. 397-402.

Shapiro, F.: Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater*. 1;15, 2008, s. 53-76.

Shi, Y., Massagué, J.: Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 113(6), 2003, s. 685-700.

Shimo, T., Nakanishi, T., Nishida, T., Asano, M., Kanyama, M., Kuboki, T., Tamatani, T., Tezuka, K., Takemura, M., Matsumura, T., Takigawa, M.: Connective tissue growth factor induces the proliferation, migration, and tube formation of vascular endothelial cells in vitro, and angiogenesis in vivo. *J Biochem*. 126(1), 1999, s. 137-45.

Shin, JH., Lee, JW., Jung, JH., Cho, DW., Lim, G.: Evaluation of cell proliferation and differentiation on a poly (propylene fumarate) 3D scaffold treated with functional peptides. *Journal of Materials Science*, 46(15), 2011, s. 5282-5287.

Schilephake, H.: Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 31(5), 2002, s. 469-84.

Schmidmaier, G., Wildemann, B., Bail, H., Lucke, M., Fuchs, T., Stemberger, A., Flyvbjerg, A., Haas, NP., Raschke, M.: Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone.* 28(4), 2001, s. 341-50.

Schwarz, F., Ferrari, D., Podolsky, L., Mihatovic, I., Becker, J.: Initial pattern of angiogenesis and bone formation following lateral ridge augmentation using rhPDGF and guided bone regeneration: an immunohistochemical study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 21(1), 2010, s. 90-9.

Simmons, CA., Alsberg, E., Hsiong, S., Kim, WJ., Mooney, DJ.: Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone.* 35(2), 2004, s.562-9.

Slater, M., Patava, J., Kingham, K., Mason, RS.: Modulation of growth factor incorporation into ECM of human osteoblast-like cells in vitro by 17 beta-estradiol. *Am J Physiol.* 267, 1994, s. 990–1001.

Smith, A.: The battlefield of pluripotency. *Cell.* 2;123(5), 2005, s. 757-60.

Smith, DM., Afifi, AM., Cooper, GM., Mooney, MP., Marra, KG., Losee, JE.: BMP-2-based repair of large-scale calvarial defects in an experimental model: regenerative surgery in cranioplasty *J Craniofac Surg.* 19(5), 2008, s. 1315-22.

Sojo, K., Sawaki, Y., Hattori, H., Mizutani, H., Ueda, M.: Immunohistochemical study of vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenetic protein-2, -4 (BMP-2, -4) on lengthened rat femurs. *J Craniomaxillofac Surg.* 33(4), 2005, s. 238-45.

Song, I., Kim, BS., Kim, CS., Im, GI.: Effects of BMP-2 and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of adipose stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 29;408(1), 2011 s. 126-31.

Sonnleitner, D., Huemer, P., Sullivan, DY.: A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: A technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 15, 2000, s. 879-82.

Srouji, S., Blumenfeld, I., Rachmiel, A., Livne, E.: Bone defect repair in rat tibia by TGF-beta1 and IGF-1 released from hydrogel scaffold. *Cell Tissue Bank.* 5(4), 2004, s. 223-30.

Srouji, S., Rachmiel, A., Blumenfeld, I., Livne, E.: Mandibular defect repair by TGF-beta and IGF-1 released from a biodegradable osteoconductive hydrogel. *J Craniomaxillofac Surg.* 33(2), 2005, s. 79-84.

Stránský, Z.: Kontaktní čočky v praxi [online]. Brno, 2008. Diplomová práce. Lékářská fakulta MU. Vedoucí práce MUDr. Zdeňka Mašková. . [vid. 22. února 2015]. Dostupné také z: http://is.muni.cz/th/101055/lf_m/

Streit, S., Bange, J., Fichtner, A., Ihrler, S., Issing, W., Ullrich, A.: Involvement of the FGFR4 Arg388 allele in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 20, ;111(2), 2004, s. 213-7.

Suárez-González, D., Barnhart, K., Saito, E., Vanderby, R. Jr., Hollister, SJ., Murphy, WL.: Controlled nucleation of hydroxyapatite on alginate scaffolds for stem cell-based bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. Oct;95(1), 2010, s. 222-34.

Suga, K., Saitoh, M., Fukushima, S., Takahashi, K., Nara, H., Yasuda, S., Miyata, K.: Interleukin-11 induces osteoblast differentiation and acts synergistically with bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells. *J Interferon Cytokine Res*. 21(9), 2001, s. 695-707.

Suga, K., Saitoh, M., Kokubo, S., Nozaki, K., Fukushima, S., Yasuda, S., Sasamata, M., Miyata, K.: Synergism between interleukin-11 and bone morphogenetic protein-2 in the healing of segmental bone defects in a rabbit model. *J Interferon Cytokine Res*. 24(6), 2004, s. 343-9.

Sumanasinghe, RD., Bernacki, SH., Lobo, EG.: Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen matrices: effect of uniaxial cyclic tensile strain on bone morphogenetic protein (BMP-2) mRNA expression. *Tissue Eng*. 12(12), 2006, s. 3459-65.

Sumanasinghe, RD., Osborne, JA., Lobo, EG.: Mesenchymal stem cell-seeded collagen matrices for bone repair: effects of cyclic tensile strain, cell density, and media conditions on matrix contraction in vitro. *J Biomed Mater Res A*. 1;88(3), 2009, s. 778-86.

Sumner, DR., Turner, (tm)., Urban, RM., Viridi, AS., Inoue, N.: Additive enhancement of implant fixation following combined treatment with rhTGF-beta2 and rhBMP-2 in a canine model. *J Bone Joint Surg Am*. 88(4), 2006, s. 806-17.

Sunitha Raja, V., Munirathnam, Naidu. E.: Platelet-rich fibrin: evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res*. 19(1), 2008, s. 42-6.

Takeuchi, Y., Watanabe, S., Ishii, G., Takeda, S., Nakayama, K., Fukumoto, S., Kaneta, Y., Inoue, D., Matsumoto, T., Harigaya, K., Fujita, T.: Interleukin-11 as a stimulatory factor for bone formation prevents bone loss with advancing age in mice. *J Biol Chem*. 3;277(50), 2002, s. 49011-8.

Tamura, S., Kataoka, H., Matsui, Y., Shionoya, Y., Ohno, K., Michi, KI., Takahashi, K., Yamaguchi, A.: The effects of transplantation of osteoblastic cells with bone morphogenetic protein (BMP)/carrier complex on bone repair. *Bone*. 29(2), 2001, s.169-75.

Tcacencu, I., Karlström, E., Cedervall, J., Wendel, M.: Transplanted Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Seeded onto Peptide Hydrogel Decrease Alveolar Bone Loss. *Biores Open Access*. 1(5), 2012, s. 215-21.

Teng, YD., Lavik, EB., Qu, X., Park, KI., Ourednik, J., Zurakowski, D., Langer, R., Snyder, EY.: Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 5;99(5), 2002, s. 3024-9.

Thiede, MA., Smock, SL., Petersen, DN., Grasser, WA., Thompson, DD., Nishimoto, SK.: Presence of messenger ribonucleic acid encoding osteocalcin, a marker of bone turnover, in bone marrow megakaryocytes and peripheral blood platelets. *Endocrinology*. 135(3), 1994, s. 929–37.

Tieline, L., Puolakkainen, P., Pohjonen, T., Rautavuori, J., Törmälä, P., Rokkanen, P.: The effect of transforming growth factor-beta1, released from a bioabsorbable self-reinforced polylactide pin, on a bone defect. *Biomaterials*. 23(18), 2002, s.3817-23.

Toffler, M., Toscano, N., Holtzclaw, D., Corso, MD., Dohan Ehrenfest, DM.: Introducing Choukroun's platelet rich fibrin (PRF) to the reconstructive surgery milieu. *J Implant Adv Clin Dent*. 1, 2009, s. 21–30.

Tomford, WW.: Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg Am*. 77(11), 1995, s.1742-54.

Tomita, S., Li, RK., Weisel, RD., Mickle, DA., Kim, EJ., Sakai, T., Jia, ZQ.: Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*. 9;100(19 Suppl), 1999, s. 247-56.

Tortelli, F., Tasso, R., Loiacono, F., Cancedda, R.: The development of tissue-engineered bone of different origin through endochondral and intramembranous ossification following the implantation of mesenchymal stem cells and osteoblasts in a murine model. *Biomaterials*. 31(2), 2010, s. 242-9.

Toth, JM., Wang, M., Estes, BT., Scifert, JL., Seim, HB., Turner, AS.: Polyetheretherketone as a biomaterial for spinal applications. *Biomaterials*. Jan;27(3), 2006, s. 324-34.

Trindade-Suedam, I., Dearo de Morais, JA., Faeda, R., Leite, FR., Tosoni, G., Benatti, NC., Marcantonio, E. Jr., Scaf, G.: Bioglass associated with leukocyte-poor platelet-rich plasma in the rabbit maxillary sinus: histomorphometric, densitometric and fractal analysis. *J Oral Implantol*. Jun 14, 2010.

Turnovcova, K., Ruzickova, K., Vanecek, V., Sykova, E., Jendelova, P.: Properties and growth of human bone marrow mesenchymal stromal cells cultivated in different media. *Cytotherapy*. 11(7), 2009, s. 874-85.

Ueki, K., Takazakura, D., Marukawa, K., Shimada, M., Nakagawa, K., Takatsuka, S., Yamamoto, E.: The use of polylactic acid/polyglycolic acid copolymer and gelatin sponge complex containing human recombinant bone morphogenetic protein-2 following condylectomy in rabbits. *J Craniomaxillofac Surg.* 31(2), 2003, s.107-14.

Urist, MR., Strates, BS.: Bone morphogenetic protein. *J Dent Res.* 50(6), 1971, s. 1392-406.

Urist, MR.: Bone: formation by autoinduction. *Science.* 12;150(3698), 1965, s.893-9.

Vaccaro, AR., Patel, T., Fischgrund, J., Anderson, DG., Truumees, E., Herkowitz, HN., Phillips, F., Hilibrand, A., Albert, TJ., Wetzel, T., McCulloch, JA.: A pilot study evaluating the safety and efficacy of OP-1 Putty (rhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft in posterolateral lumbar arthrodesis for degenerative spondylolisthesis. *Spine (Phila Pa 1976).* 1;29(17), 2004, s.1885-92.

Vagaská, B., Bacáková, L., Filová, E., Balík, K.: Osteogenic cells on bio-inspired materials for bone tissue engineering. *Physiol Res.* 59(3), 2010, s. 309-22.

Vaněček, V., Klíma, K., Kohout, A., Foltán, R., Jiroušek, O., Šedý, J., Štulík, J., Syková, E., Jendelová, P.: 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.

Vardatsikos, G., Sahu, A., Srivastava, A.: The insulin-like growth factor family: molecular mechanisms, redox regulation and clinical implications. *Antioxid Redox Signal.* 11, 2009, s. 1165–90.

Varkey, M., Gittens, SA., Uludag, H.: Growth factor delivery for bone tissue repair: anupdate. *Expert OpinDrugDeliv.* 1, 2004, s.19-36.

Vavrik, D., Dammer, J., Jakubek, J., Jeon, I., Jirousek, O., Kroupa, M., Zlamal, P.: Advanced X-ray radiography and tomography in several engineering applications. *Nucl Instr Methods Phys Res Sect A Accel Spectrom Detect Assoc Equip.* 633,2011, s. 152–155.

Virolainen, P., Elima, K., Metsäranta, M., Aro, HT., Vuorio, E.: Incorporation of cortical bone allografts and autografts in rats: expression patterns of mRNAs for the TGF-betas. *Acta Orthop Scand.* 69, 1998, s. 537–44.

Wang, G., Yang, H., Li, M., Lu, S., Chen, X., Cai, X.: The use of silk fibroin/hydroxyapatite composite co-cultured with rabbit bone-marrow stromal cells in the healing of a segmental bone defect. *J Bone Joint Surg Br.* Feb;92(2), 2010, s. 320-5.

Washimi, Y., Ito, M., Morishima, Y., Taguma, K., Ojima, Y., Uzawa, T., Hori, M.: Effect of combined humanPTH(1-34) and calcitonin treatment in ovariectomized rats. *Bone.* 41(5), 2007, s. 786-93.

Weissman, IL.: Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution.

Cell. 100(1), 2000, s. 157-68.

Wenz, LM., Merritt, K., Brown, SA., Moet, A., Steffee, AD.: In vitro biocompatibility of polyetheretherketone and polysulfone composites. *J Biomed Mater Res* 24(2), 1990, s. 207-15.

Wesseling-Perry, K.: FGF-23 in bone biology. *Pediatr Nephrol.* 25(4), 2010, s. 603-8.

White, KE., Evans, WE., O'Riordan, JL., Speer, MC., Econs, MJ., Lorenz-Depiereux, B., Strom, TM.: Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nature genetics.* 26(3), 2000, s. 345-348.

Wichterle, O., Lim, D.: Hydrophilic gels in biologic use. *Nature* 09, 1960, s. 117 – 118.

Wildemann, B., Kandziora, F., Krummrey, G., Palasdiess, N., Haas, NP., Raschke, M., Schmidmaier, G.: Local and controlled release of growth factors (combination of IGF-I and TGF-beta I, and BMP-2 alone) from a polylactide coating of titanium implants does not lead to ectopic bone formation in sheep muscle. *J Control Release.* 5;95(2), 2004, s. 249-56.

Wilkstrom, P., Damber, JE., Bergh, A.: Role of transforming growth factor-beta1 in prostate cancer. *Microsc Res Tech* 52, 2001, s. 411–419.

Willerth, SM., Sakiyama-Elbert, SE.: Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery [online]. © 2008. [vid. 30. ledna 2015]. Dostupné z: <http://www.stembook.org/node/450>.

Williams, DF., McNamara, A., Turner, RM.: Potential of polyetheretherketone (PEEK) and carbon-fibre-reinforced PEEK in medical applications. *J Mater Sci Lett* 6(2), 1987, s. 188-90.

Wong, C., Inman, E., Spaethe, R., Helgerson, S.: Fibrin-based biomaterials to deliver human growth factors. *Thromb Haemost.* Mar;89(3), 2003, s. 573-82.

Wong, GL., Kotliar, D., Schlaeger, D., Brandes, SJ.: IGF-I production by mouse osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 5, 1990, s. 133–40.

Wozney, JM., Rosen, V., Celeste, AJ., Mitsock, LM., Whitters, MJ., Kriz, RW., Hewick, RM., Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* 16;242(4885), 1988, s.1528-34.

Yamano, S., Haku, K., Yamanaka, T., Dai, J., Takayama, T., Shohara, R., Tachi, K., Ishioka, M., Hanatani, S., Karunagaran, S., Wada, K., Moursi, AM.: The effect of a bioactive collagen membrane releasing PDGF or GDF-5 on bone regeneration. *Biomaterials.* 35(8), 2014, s. 2446-53.

Yamazaki, Y., Takani, K., Atoda, H., Morita, T.: Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). *J Biol Chem.* 26;278(52), 2003, s. 51985-8.

Yang, M., Yamauchi, K., Kurokawa, M., Asakura, T.: Design of silk-like biomaterials inspired by mussel-adhesive protein. *Tissue Eng. Dec*;13(12), 2007, s. 2941-7.

Yao, CH., Liu, BS., Hsu, SH., Chen, YS.: Calvarial bone response to a tricalcium phosphate-genipin crosslinked gelatin composite. *Biomaterials*. 26(16), 2005, s.3065-74.

Yeh, LC., Lee, JC.: Co-transfection with the osteogenic protein (OP)-1 gene and the insulin-like growth factor (IGF)-I gene enhanced osteoblastic cell differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 1763(1), 2006, s. 57-63.

Ylä-Herttuala, S., Markkanen, JE., Rissanen, TT.: Gene therapy for ischemic cardiovascular diseases: some lessons learned from the first clinical trials. *Trends Cardiovasc Med*. 14(8), 2004, s. 295-300.

Ylä-Herttuala, S., Rissanen, TT., Vajanto, I., Hartikainen, J.: Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol*. 13;49(10), 2007, s. 1015-26.

Yoon, JS., Lee, SH., Yoon, HJ.: The influence of platelet-rich fibrin on angiogenesis in guided bone regeneration using xenogenic bone substitutes: a study of rabbit cranial defects. *J Craniomaxillofac Surg*. 42(7), 2014, s. 1071-7.

Yosimichi, G., Nakanishi, T., Nishida, T., Hattori, T., Takano-Yamamoto, T., Takigawa, M.: CTGF/Hcs24 induces chondrocyte differentiation through a p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), and proliferation through a p44/42 MAPK/extracellular-signal regulated kinase (ERK). *Eur J Biochem*. 268(23), 2001, s. 6058-65.

Younger, EM., Chapman, MW.: Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma*. 3(3),1989, s. 192-5.

Yukna, RA., Sayed-Suleyman, A., Finley, JM., Hochstedler, J., Mayer, ET.: Use of HTR synthetic bone grafts in conjunction with immediate dental implants. *Compend Contin Educ Dent*. Sep;24(9), 2003, s. 649-52.

Zerbo, IR., Bronckers, AL., de Lange, G., Burger, EH.: Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous beta-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials*. 26(12), 2005, s. 1445-51.

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.

Zhang, L., Tang, P., Zhang, W., Xu, M., Wang, Y.: Effect of chitosan as a dispersant on collagen-hydroxyapatite composite matrices. *Tissue Eng Part C Methods*. Feb;16(1), 2000, s. 71-9.

Zhang, M., Wang, K., Shi, Z., Yang, H., Dang, X., Wang, W.: Osteogenesis of the construct combined BMSCs with beta-TCP in rat. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 63(2), 2010, s. 227-32.

Zhang, M., Xuan, S., Bouxsein, ML., von Stechow, D., Akeno, N., Faugere, MC., et al.: Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. *J Biol Chem.* 277, 2002, s.44005–12.

Zhang, S., Mao, T., Chen, F.: Influence of platelet-rich plasma on ectopic bone formation of bone marrow stromal cells in porous coral. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 40(9), 2011, s. 961-5.

Zhang, Y., Cheng, N., Miron, R., Shi, B., Cheng, X.: Delivery of PDGF-B and BMP-7 by mesoporous bioglass/silk fibrin scaffolds for the repair of osteoporotic defects. *Biomaterials.* 33(28), 2012, s. 6698-708.

Zhang, Y., Wang, Y., Shi, B., Cheng, X.: A platelet-derived growth factor releasing chitosan/coral composite scaffold for periodontal tissue engineering. *Biomaterials.* 28(8), 2007, s. 1515-22.

Zhao, L., Weir, MD., Xu, HH.: An injectable calcium phosphate-alginate hydrogel-umbilical cord mesenchymal stem cell paste for bone tissue engineering. *Biomaterials.* Sep;31(25), 2010, s. 6502-10.

Zheng, LW., Cheung, LK.: Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on mandibular distraction at different rates in a rabbit model. *Tissue Eng.* 12(11), 2006, s. 3181-8.

Zheng, Y., Wu, G., Zhao, J., Wang, L., Sun, P., Gu, Z.: rhBMP2/7 heterodimer: an osteoblastogenesis inducer of not higher potency but lower effective concentration compared with rhBMP2 and rhBMP7 homodimers. *Tissue Eng Part A.* 16(3), 2010, s. 879-87.

Zhu, XS., Zhang, ZM., Mao, HQ., Geng, DC., Zou, J., Wang, GL., Zhang, ZG., Wang, JH., Chen, L., Yang, HL.: A novel sheep vertebral bone defect model for injectable bioactive vertebral augmentation materials. *J Mater Sci Mater Med.* 22(1), 2011, s.159-64.

Zhu, Y., Yuan, M., Meng, HY., Wang, AY., Guo, QY., Wang, Y., Peng, J.: Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review *Osteoarthritis and Cartilage.* 21, 2013, s. 1627-1637.

Zimmermann, G., Wagner, C., Schmeckenbecher, K., Wentzensen, A., Moghaddam, A.: Treatment of tibial shaft non-unions: bone morphogenetic proteins versus autologous bone graft. *Injury.* 40, Suppl 3, 2009, s. 50-3.

Poděkování

Děkuji svému školiteli doc. MUDr. et MUDr. René Foltánovi, PhD., FEBOMS a svému konzultantovi MUDr. et MDDr. Jiřímu Šedému, PhD. za jejich pomoc, konzultace, odborné vedení a trpělivost, kterou mi poskytovali při práci na experimentech a na této disertaci. Dále děkuji za pomoc prim. MUDr. et MUDr. Gabriele Pavlíkové a as. MUDr. et MUDr. Vladimíru Machoňovi. Poděkování patří prof. MUDr. et MUDr. Jiřímu Mazánkovi, DrSc., emeritnímu přednostovi kliniky, a celé mé rodině, bez jejichž podpory bych nenapsal ani řádku.