

# Léčba kostního můstku transplantací mezenchymových kmenových buněk a chondrocytů v kompozitním nosiči u prasat – experimentální studie

## Treatment of a Bone Bridge by Transplantation of Mesenchymal Stem Cells and Chondrocytes in a Composite Scaffold in Pigs. Experimental Study

L PLÁNKA<sup>1</sup>, A. NEČAS<sup>2</sup>, M. CRHA<sup>2</sup>, P. PROKS<sup>2</sup>, L. VOJTOVÁ<sup>3</sup>, P. GÁL<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinika dětské chirurgie, ortopedie a traumatologie, Fakultní nemocnice Brno

<sup>2</sup> Klinika chorob psů a koček, Veterinární a farmaceutická fakulta v Brně

<sup>3</sup> Ústav chemie materiálů, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně

### ABSTRACT

#### PURPOSE OF THE STUDY

The presented experimental study describes the results of using a combination of allogeneic mesenchymal cells (MSCs) with chondrocytes (CHCs) and a novel scaffold based on type I collagen and chitosan fibres. This biocomposite was transplanted into a defect produced by excision of a bone bridge to induce new cartilaginous tissue formation. The left femur was treated by transplantation into a defect of distal epiphysis; the right femur with implantation of the scaffold only served as control. A better therapeutic result was therefore expected in the left femur – the reduction of growth and angular deformities, and the histological finding of a tissue similar to the cartilage excised from the left femur.

#### MATERIAL AND METHODS

The miniature pig was selected as an experimental model and 10 pigs were used. Mesenchymal stem cells derived from femoral bone marrow and chondrocytes derived from a sample harvested from the non-weight-bearing articular surface of the distal end of the femur were cultured in medium. The novel scaffold was based on collagen containing chitosan nanofibres. To make manipulation during implantation easier, the cylindrical scaffolds after lyophilisation were again placed in 96-well plates for seeding. The scaffolds before implantation were seeded with  $2 \times 10^6$  allogeneic MSCs and  $1 \times 10^6$  allogeneic CHCs. The outcomes of treatment were assessed by measuring the length of bone and the degree of distal femoral valgus deformity, and by the histological findings obtained (properties and maturity of the newly-formed tissue, detection of type II collagen, PAS reaction).

#### RESULTS

The right and left legs were examined for longitudinal bone growth and the valgus angle and compared. The treated left leg showed a higher average value for longitudinal growth than the untreated right leg ( $p = 0.004$ ). The average degree of angular deformity was lower in the left leg than in the right leg ( $p = 0.008$ ). The microscopic findings showed that a tissue similar to hyaline cartilage was more frequently present in the femoral bone defect of the left leg, as compared with that of the right leg. Type II collagen was detected more frequently and at higher amounts on the left than the right side ( $p = 0.033$ ). The PAS reaction was positive in all left limbs, with a high degree of positivity in 80 % of them, while this was not achieved in any of the right limbs ( $p = 0.001$ ).

#### DISCUSSION

The use of stem cells in the indication reported here has only been the matter of time since the information on encouraging results in neurology and cardiology was published. First studies with positive results have soon been reported. The initial hydrogel scaffolds were based on tissue adhesives. However, they were not stable enough and were difficult to handle during surgery. In further studies, therefore, the use was made of a three-dimensional scaffold with a self-supporting structure of collagen fibres. This structure also facilitated its hydrodynamic seeding with MSCs and CHCs, which is an effective and sparing procedure for the transplanted cells. Studies concerned with MSCs and/or CHCs transplantation for repair of a physeal defect following bone bridge excision, i.e. for bone bridge treatment, in a broader experimental design, however, are still missing.

#### CONCLUSION

Transplantation of a composite scaffold seeded with mesenchymal stem cells and chondrocytes into a physeal defect following bone bridge excision prevented growth disturbance and angular deformity development in the distal femoral epiphysis. In comparison with the control group, it resulted in a more frequent production of a tissue similar to hyaline cartilage, with a cell formation reminiscent of a typical columnar arrangement of the growth plate.

**Key words:** mesenchymal stem cells, growth plate, bone bridge, scaffold.

## ÚVOD

Pouřazový defekt růstové ploténky dětského skeletu může vést ke vzniku kostního můstku, který je příčinou defektního růstu kosti. Podle umístění a velikosti kostního můstku dochází k omezení růstu kosti do délky, což může vést zejména v mladším věku dítěte k zásadnímu rozdílu v délce kosti nebo k tvarovým deformitám příslušné části kosti ve smyslu úhlové deviace. Tyto závažné komplikace vyžadují následně ortopedickou léčbu, často i operační korekce s osteotomií a následnou stabilizací (zevní fixace (15), dlahová osteosyntéza), někdy s odběrem spongiózní kosti pro doplnění autospontio-plastiky nebo s nutností použití syntetického biomateriálu (7). Právě tato invazivita a náročnost léčby vede již řadu let odbornou veřejnost ke hledání nových možností léčby důsledků kostního můstku směrem k miniinva-zivitě a cílené náhradě tkáně růstové ploténky.

Předkládaná experimentální studie popisuje výsledky použití kombinace mezenchymových kmenových buněk s chondrocyty a nového nosiče složeného z kolagenu typu I a chitosanových vláken. Transplantace uvedeného biokompozitu do defektu vzniklého po resekci kostního můstku měla indukovat tvorbu nové chrupavčité tkáně, která by mohla restaurovat defekt růstové zóny nebo alespoň zamezit tvorbě kostní tkáně a vzniku můstku. Uvedená kombinace MSCs a CHC vychází z předpokladu, že dochází k diferenciacímu vlivu na přítomné MSCs a jejich diferenciaci je tak přesnější.

Jednou ze zásadních skutečností je výběr správného nosiče, který poskytne buněčnému transplantátu dostatečnou výživu a dále mechanickou oporu a stabilitu v živé tkáni. Předkládaná studie popisuje použití nově syntetizovaného nosiče a již v rámci chirurgické fáze experimentu prokázal nový kolagenový nosič výrazně lepší mechanické vlastnosti a v laboratorních podmínkách bylo prokázáno, že mezenchymové kmenové buňky se v něm velmi dynamicky proliferovaly a množily.

MSCs a CHC společně s nosičem byly transplantovány do defektu po resekci kostního můstku distální epifýzy levé stehenní kosti u miniaturního prasete. Do stejného defektu na pravé stehenní kosti byl implantován samotný nosič a sloužil jako kontrola pro experimentální skupinu. Byl očekáván lepší terapeutický výsledek na levé stehenní kosti – redukce růstové i úhlové deformity a histologický nálezn odpovídající tvorbě tkáně podobné chrupavce v resekováném defektu levé stehenní kosti.

## MATERIÁL A METODIKA

Experimentálním modelem bylo zvoleno miniaturní prase z certifikovaného chovu Ústavu živočišné fyziologie a genetiky české Akademie věd v Liběchově, experimentální skupinu tvořilo deset zvířat.

Jako zdroj mezenchymových kmenových buněk byla zvolena kostní dřev kyčelní kosti (18). Po pečlivé desinfekční přípravě operačního pole byla krev kostní dřev odebrána biotickou jehlou (Iliac-Crest 15G/70-mm bioptic needle (Somatex)) z kyčelní kosti (*tuber coxae*

*ala osis illii*) do dvou 10 ml stříkaček s 5 ml PBS (Phosphate Buffered Saline, Dulbecco) + 2% FBS (Fetal Bovine Serum, StemCell Technologies) a heparinem 5 IU/ml. Naředěná krev kostní dřev (zhruba 20 ml) byla za sterilních podmínek navrstvena na 15 ml roztoku FPP (Ficoll-Paque PLUS, StemCell Technologies). Po centrifugaci (400 × g, 30 minut) při pokojové teplotě došlo k odloučení erytrocytů a granulocytů ve formě pelety na dně zkumavky. Mononukleární buňky se objevily jako opaleskující vrstvička mezi Ficollem a krevní plazmou. Tuto vrstvičku jsme odebrali, provedli jsme oplach v kultivačním médiu (viz níže) a použili jsme ji pro kultivaci *in vitro*. Průměrné množství mononukleárních buněk získané z každé izolace bylo 60 × 10<sup>6</sup>. Celkový počet buněk a jejich životaschopnost byla zjištěna pomocí přístroje Vi-CELL (Series Cell Viability Analyzers) a bylo nalezeno více než 95 % životaschopných buněk. Před transplantací byla u buněk zjišťována pozitivita na tyto povrchové markery MSC (CD29, CD44, CD90, CD105 a nově dle některých prací i CD147). Byl použit následující panel protilátek: anti-CD29 (clone MEM-101A), anti-CD105 (clone MEM 229), anti-CD147 (clone MEM-M6/2, Exbio Praha a. s., Praha), anti-CD44 (clone IM7), anti-CD90 (clone 5E10, BD Biosciences, San Jose, CA USA), anti-CD45 (clone K252-1E4, AbD Serotec, Kidlington, UK) (39).

Zdrojem chondrocytů byl odebraný vzorek z nezátěžové části kloubní plochy distální epifýzy stehenní kosti a jejich další kultivace v živém médiu. Chrupavka byla rozvolněna v kolagenáze přes noc, uvolněné chondrocyty centrifugovány při 200g 5 min a nasazeny do kultivační láhve v roztoku v Iscove s Modified Dulbecco's Medium s 15 % fetálního kravského séra (FBS), 3 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 100 IU/ml penicillin, 100 g/ml streptomycin, 4 mM L-glutaminem, 20 g/ml L-askorbát-2-fosfátem.

## Kultivace kmenových buněk

Buňky byly vysazeny na kultivační láhve (150 cm<sup>2</sup>) v hustotě zhruba 1,3 × 10<sup>6</sup>/cm<sup>2</sup> a kultivovány při teplotě 37 °C v prostředí 5% CO<sub>2</sub>. Pro kultivaci bylo použito médium -MEM (Gibco) doplněné o 10% FBS (Sigma-Aldrich) a gentamycin (50 mg/ml, Sigma-Aldrich). Po 24 hodinách byly odstraněny neadherentní buňky a v průběhu následující kultivace (3 týdny) bylo médium měněno každé 3 dny. První kolonie MSC se objevily 4.–5. den kultivace a 80% pokrytí kultivační misky bylo dosaženo po 10 dnech kultivace. Byla provedena pasáž buněk v roztoku 0,5% trypsinu s EDTA (Sigma Aldrich) po dobu 5 minut při teplotě 37 °C a jejich opětovné vysazení na kultivační plastik při hustotě 15 000 buněk/cm<sup>2</sup>. Pro značení fluorescenčním barvivem CM-DiI (Molecular Probes) v koncentraci 5 g/2,5 ml PBS byly buňky získány v den transplantace a inkubace probíhala 5 minut při teplotě 37 °C a 15 minut při teplotě 4 °C. Poté byly buňky důkladně promyty v PBS. S cílem vyvolat diferenciaci směrem k chondrocytům (8) jsme značené buňky umístili do média -MEM s přidavkem 100 ng/ml lidského rekombinantního TGF β1 (R&D Systems), 100 nM dexametazonu (Medochemie),

50 g/ml roztoku askorbát-2-fosfátu (Sigma Aldrich) a 1% ITS (Insulin – Transferrin – Selenium A, Gibco) na dobu 30 minut. Poté byly buňky centrifugovány (700 × g, 5 minut) a buněčné pelety byly připraveny k přenesení do skafoldu.

Po 5 dnech v kultivační láhvi byly buňky pasážovány a k dalšímu pomnožení bylo použito stejné medium s 10% FBS. Po dosažení konfluence byly buňky trypsinovány a druhá pasáž použita na osazení buněk. Na každý scaffold byl nasazeno  $10^6$  chondrocytů.

V obou případech bylo použito alogenního štěpu, tedy i chondrocyty i MSCs k transplantaci byly připraveny od jiného prasete. Bylo však přísně dbáno na to, aby obě tyto buněčné složky pocházely od stejného zvířete.

### Příprava nosiče

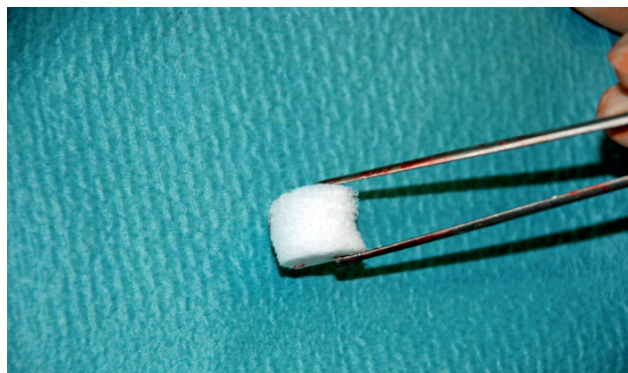
Nosiče byly připravovány zpočátku jako plošné porézní lyofilizáty požadovaných rozměrů, které byly do konečného tvaru připraveny přímo v 96l-jamkové destičce. Na základě hodnocení *in vitro* v Ústavu experimentální medicíny AV ČR Praha byl jako nejvhodnější materiál, vykazující jak požadované biologické chování a stabilitu v simulovaném tělním prostředí, tak biomechanickou odezvu a chování skafoldu v místě plánované implantace, vybrán skafold na bázi kolagenu obsahujícího mikro- a nanovlákná z chitosanu. Byla rovněž optimalizována lyofilizační procedura tak, aby bylo dosaženo propojených pórů s velikostí cca 150  $\mu$ m. Tímto postupným testováním vhodného složení trojrozměrného nosiče MSCs byla definována optimálně se jevící varianta porézního válečku ve složení 0,5 hm % kolagenu I se 30 hm % chitosanu (na obsah kolagenu), síťovaného EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) – carbodiimid hydrochloridu a katalyzováno NHS (N-hydroxysukcinimid 98%), se strukturou chitosanových nanovláken. Pro zjednodušení manipulace při implantaci byly válcovité substráty po lyofilizaci opět předány k osazení buňkami v 96l-jamkové destičce. Válečky byly před implantací osazeny  $2 \times 10^6$  alogenními MSC a  $1 \times 10^6$  alogenními CHC.

### Operační postup

Operační výkon byl prováděn v celkové anestezii. U všech zvířat byl intramuskulárně aplikován Tiletamin-Zolazepam (Zoletil 100, Virbac, Francie) v dávce 2 mg/kg, Xylazin (Sedazine, Fort Dodge, USA) v dávce 0,5 mg/kg a Ketamin (Ketaset, Fort Dodge, USA) v dávce 2 mg/kg. Látky byly aplikovány společně jednou stříkačkou. Po nástupu sedace, tj. 10 minut po aplikaci, byl zaveden do ušní žíly intravenózní katétr. Do něj byl aplikován Propofol (Propofol 1%, Fresenius, Rakousko) v dávce 0,5–1 mg/kg (do účinku) a prase bylo orotracheálně intubováno. Anestezie byla dále vedena formou totální intravenózní anestezie Propofolem aplikovaným pomocí injektomatu do ušní žíly v dávce 0,1–0,3 mg/kg/min. Prase bylo uloženo do polohy na pravém boku a napojeno na anesteziologický inhalační přístroj. Zvířatům byla podávána směs kyslíku a rajského plynu (1:1) v dávkování 25 ml/kg/min s isofluranem. Všechna zvířata byla napojena na monitor životních

funkcí (Datex Cardocap II, USA). Byla sledována srdeční frekvence (heart rate – HR), dechová frekvence (respiratory rate – RR), střední arteriální tlak (mean arterial pressure – MAP), saturace (hemoglobin saturation by oxygen – SpO<sub>2</sub>) a koncentrace CO<sub>2</sub> na konci výdechu (end-tidal CO<sub>2</sub> concentration – ETCO<sub>2</sub>). HR bylo měřeno za pomoci 3svodového EKG s elektrodami umístěnými na hrudníku zvířete. Střední arteriální tlak byl měřen krvavě katetrem zavedeným do ušní arterie a napojeným na tlakový převodník. Dechová frekvence a ETCO<sub>2</sub> byly zjišťovány sidestreamovou metodou se senzorem umístěným na kraji endotracheální rourky. SpO<sub>2</sub> bylo měřeno pomocí senzoru umístěného na jazyku zvířete.

Po provedení všech popsanych procedur byl každému zvířeti proveden rentgenogram celé stehenní kosti v kraniokaudální a lateromediální projekci. Zvíře bylo dále zbaveno srsti v oblasti obou zadních končetin, provedena očista mýdlovým roztokem a dezinfekce chlorhexidinem. V této fázi bylo přeloženo na operační stůl v poloze na pravém boku a po dostatečné době působení dezinfekčního roztoku bylo sterilně zarouškováno operační pole včetně nalepení ochranné fólie. K levému distálnímu konci stehenní kosti bylo proniknuto laterální artrotomií, byla provedena luxace stehenní kosti zevně do operační rány a vizuálně byl ověřen průběh růstové zóny. Vrtákem o zevním průměru 4,5 mm (drill 4,5 mm, SYNTHES) byl vytvořen defekt o hloubce 12 mm napříč růstovou ploténkou (obr. 1). Po laváži defektu u kloubu byl přenesen kombinovaný štěp tvořený třemi bločky kolagen-chitosanového nosiče (obr. 2), alogenními mezenchymovými kmenovými buňkami ve dvou z nich a alogenními chondrocyty v prostředním bloku, metodou press and fit do vyvrtaného defektu. Správná kombinace byla zajištěna vrstvením tří biokompozitů na sebe, první vrstvu nejhlouběji do defektu uloženou tvořil nosič a MSCs, prostřední část tvořil stejný nosič osazený chondrocyty a zevní vrstvu opět nosič s MSCs. Pro lepší bezpečnost transplantátu byl přešit vstupní otvor periostálním lalokem (obr. 3), monofilamentním vláknem (PDS 0; ETHICON). Po repozici stehenní kosti v kolenním kloubu byla prováděna postupná sutura artrotomie po atomických vrstvách. Kloubní pouzdro bylo suturováno monofilamentním vláknem jednotlivými křížovými stehy (PDS 2/0; ETHICON), fascie svalů a pod-

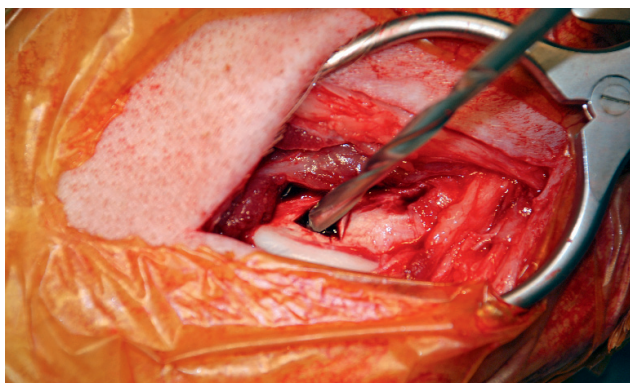


Obr. 1. Vzorek použitého nosiče.

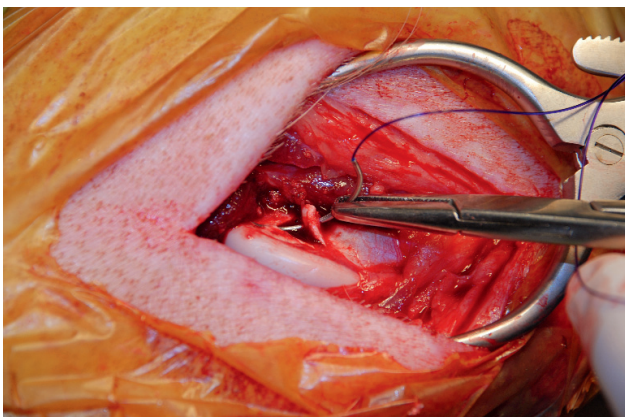


kožní tkáň pokračovacím stehem (PDS 2/0; ETHICON). Incize kůže byla uzavřena jednotlivými stehy nevstřebatelným monofilem (Ethilon 3/0; ETHICON). Pod dohledem anesteziologa bylo zvíře otočeno na levý bok a stejným způsobem byla provedena zevní artrotomie pravého kolenního kloubu, do vyvrtaného defektu byl vložen samotný nosič bez mezenchymových kmenových buněk. Sutura po anatomických vrstvách byla provedena identicky jako na levé straně. Bezprostředně po operačním výkonu byly operační rány ošetřeny roztokem Novikovu a experimentální zvíře bylo uloženo do samostatného boxu k doznění účinku celkové anestezie. Po operaci byla každému zvířeti aplikována profylaktická dávka antibiotika, dávkování 2,5 mg/kg (DRAXXIN 100MG/ML A.U.V. 250 ML Injekční roztok, Pfizer, UK).

V experimentu byla sledována možnost léčby vzniklého kostního můstku, proto byly prováděny dva operační výkony s časovým odstupem. V první době byly vytvořeny iatrogenní defekty na obou stranách (zevní kondyl pravé i levé stehenní kosti) bez jakékoli výplně. V časovém intervalu (Interval I) mezi první a druhou operací jsme očekávali tvorbu kostního můstku. Při druhé operaci byla stejným operačním postupem odvrtna vzniklá tkáň v defektu laterálního kondylu obou stehenních kostí (odvrtní kostního můstku) a teprve potom vložen stejný biokompozit s MSCs a CHC do defektu



Obr. 2. Vrtání defektu laterální části růstové ploténky distální epifyzy stehenní kosti prasete.



Obr. 3. Uzávěr periostálního krytu defektu.

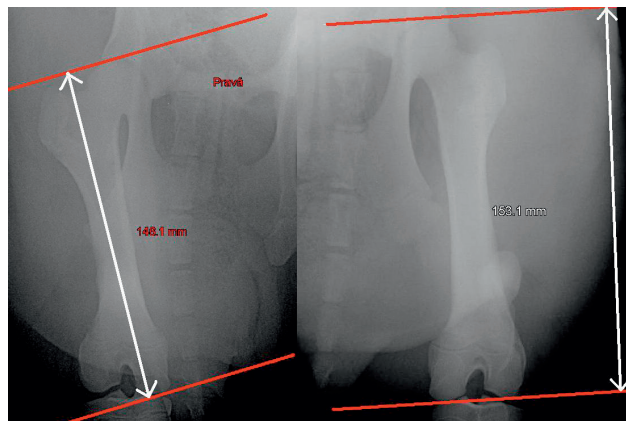
levé stehenní kosti a prázdný nosič do defektu zevního kondylu pravé stehenní kosti.

Doba sledování miniaturních prasat od transplantace do protokolárního utracení byla 16 týdnů. V průběhu této doby bylo pečováno zejména o čistotu operačních ran, prevenci úrazů jednotlivých zvířat a sledování případných pooperačních komplikací. Po skončení 16 týdne byla všechna zvířata protokolárně utracena, pro eutanázii byla intravenózně aplikována směs embutramidu, mebezonium-jodidu, tetrakain-hydrochloridu a dimethylformamidu (T61, Intervet, Holandsko) v dávce 5 ml i.v. *pro toto* a byl opět proveden rentgenogram stehenní kosti v kraniokaudální projekci. Po utracení byly vypreparovány obě stehenní kosti experimentálního zvířete a byla zkontrolována jejich délka a dále úhel svírající tečna vedená vrcholy obou kondylů a dlouhá osa kosti. Po pečlivé fotodokumentaci a opakovaném měření obou hodnot třemi nezávislými osobami byla ze stehenní kosti odříznuta pouze distální epifyza a vložena do roztoku 10% formalínu k fixaci a předána k histologickému zpracování.

### Rentgenologické měření

V experimentu byly srovnávány dva rentgenogramy. První z nich byl proveden před odvrtním kostního můstku při druhé operaci ve skupině B, druhý z nich po 16 týdnech od této operace. Bylo očekáváno omezení růstu stehenní kosti do délky, popřípadě valgizační deformace jejího dolního konce. Měření bylo vždy prováděno v kraniokaudální projekci a byly porovnávány naměřené hodnoty levé (experimentální) a pravé (kontrolní) stehenní kosti (obr. 4). Měření bylo provedeno třikrát vždy třemi nezávislými examinátory. Výslednou hodnotou byl průměr všech tří měření. Délka byla měřena od vrcholu hlavičky stehenní kosti po nejdálší bod na jednom z kondylů. Stejným způsobem jako při samostatném morfometrickém měření eventuální valgizační deformity dolního konce stehenní kosti byl měřen úhel i z uvedených rentgenogramů (úhel svírající dlouhá osa kosti a tečna vedená vrcholy obou kondylů).

Vyšetření bylo prováděno na rtg přístroji s přímou digitalizací se všemi nástroji na měření délek a úhlů. Proto lze měření považovat za velmi přesné. Aby byla



Obr. 4. Srovnání délek obou stehenních kostí.

zpětná kontrola správnosti měření, byly k dispozici i výsledky z přímého měření vypreparovaných stehenních kostí.

### Histologické vyšetření

Všechny preparáty distálního konce femuru byly ve fixačním roztoku převezeny na Ústav patologické anatomie Fakultní nemocnice Brno. Ihned po opláchnutí fixačního roztoku byly všechny kosti ponořeny do dekalifikačního roztoku, který byl pravidelně každý 2. den vyměňován. Samotný proces odvápnění trval 10–12 dní, po jeho skončení byl přířezem připraven blok kostní tkáně obsahující experimentální nebo kontrolní defekt růstové ploténky. Již makroskopicky bylo možné pozorovat vyhojení kostním můstkem nebo měkkou tkání podobnou chrupavce. Mikrotomem bylo vytvořeno několik řezů o síle 0,2 mikrometrů uvedenou oblastí a byly připraveny čtyři preparáty – barvení hematoxylinem – eozinem, PAS barvení, řez pro fluorescenční mikroskopii a imunohistochemická reakce k průkazu kolagenu typu II. Při mikroskopickém vyšetření preparátu barvených hematoxylinem-eozinem bylo hodnoceno zapojení novotvořené tkáně do okolní struktury původní chrupavky růstové ploténky a stupeň vyzrállosti chrupavky v uvedeném defektu. Kvalita vzniklé růstové chrupavky byla hodnocena 0–3 body a bylo použito modifikované O'Driscollovo skórování (30, 24) s přihlédnutím k eventuálnímu obnovení sloupovitosti architektiky růstové ploténky. Při reakci PAS byla hodnocena pozitivita přítomnosti kyselých a neutrálních mukopolysacharidů. Imunohistochemická reakce detekovala metodou ELISA kolagenová vlákna druhého typu a jejich četnost v mezibuněčné hmotě novotvořené tkáně v defektu růstové ploténky. Tkáňové řezy byly po odparafinování inaktivovány endogenní peroxidázou (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v methanolu 10 min) poté natráveny protei-

názou K (10 min) a inkubovány s primární protilátkou (Novocastra NCL-COLL-IIP, polyklonální, králíčí). Poté proběhla inkubace s detekčním systémem (EnVision+/HRP Rabbit (DAKO) po dobu 45 minut při pokojové teplotě. Následovala vizualizace diaminobenzidinem (DAB) (5 min v termostatu při 37 stupních C). Jádra byla dobarvena hematoxylinem, poté byly preparáty odvodněny v ethanolu, projasněny xylenem a zamontovány krycími sklíčky montovacím médiem (Entelan TM). Pozitivita byla opět odstupňována v závislosti na množství zachycených vláken (tab. 1). Fluorescenční mikroskopie měla detekovat fluorochrom CM-DiI, který byl před transplantací inkorporován do plazmatické membrány mezenchymových kmenových buněk. Získané číselné hodnoty jednotlivých vyšetření sloužily ke statistickému srovnání experimentální a kontrolní skupiny.

### Statistické hodnocení

Pro popis datového souboru byla použita standardní popisná statistika: počet a relativní zastoupení kategorií pro kategoriální data; medián doplněný o percentilové rozsahy (5, 95) a průměr se směrodatnou odchylkou pro spojitě parametry.

Pro analýzu bylo využito jak párového, tak nepárového přístupu k testování hypotéz. Pomocí neparametrického párového Wilcoxonova testu a napárového Mann-Whitney testu bylo sledováno, zda je rozdíl mezi neléčenou pravou a léčenou levou končetinou ve spojitých parametrech (růst do délky v průběhu pokusu, rozdíl v úhlu valgizace). Dále pro srovnání končetin v kategoriálních parametrech (kvalita hojení chrupavky, PAS, IHC, fluorescence, Pearls), byly parametry nejdříve binarizovány a následně byl na takto upravená data, použit párový McNemarův test a nepárový Fisherův přesný test.

Pro analýzu dat bylo použito IBM SPSS Statistics 19 for Windows (Release 19.0.0, IBM Corporation 2010).

### VÝSLEDKY

V experimentální skupině byl sledován růst stehenní kosti a eventuální valgizace distální epifyzy v druhém intervalu (Interval II) tedy v období 16 týdnů od odvrtní jizevnaté tkáně kostního můstku vzniklé v defektu vytvořeném při první operaci po protokolární utracení. První interval byl měřený jako kontrolní (Interval I), jestli po zničení identické části růstové ploténky pravé i levé distální epifyzy stehenní kosti probíhal identický růst popřípadě angulární deformita. Naměřené hodnoty spolu skutečně korespondovaly (tab. 2).

Tab. 1. Histologické hodnocení

Výsledné hodnocení	Kvalita nové chrupavky		PAS	Col II
	O'Driscoll skóre	Sloupcovité uspořádání CHC		
0	0 – 7	ne	negativita	negativita
1	8 – 15	ne	lehká pozitivita	lehká pozitivita
2	15 a víc	ne	střední pozitivita	střední pozitivita
3	15 a víc	ano	silná pozitivita	silná pozitivita

Tab. 2. Měření růstu stehenních kostí do délky interval I

Zvíře	Růst levé stehenní kosti do délky (cm)	Růst pravé stehenní kosti do délky (cm)	Rozsah valgizace distální epifyzy levé stehenní kosti (°)	Rozsah valgizace distální epifyzy pravé stehenní kosti (°)
B1	0,5	0,5	5	5
B2	0,6	0,6	6	6
B3	0,7	0,6	4	5
B4	0,5	0,6	5	6
B5	0,8	0,5	2	3
B6	0,5	0,5	3	5
B7	0,6	0,6	7	8
B8	0,4	0,3	5	5
B9	0,5	0,4	4	4
B10	0,6	0,5	5	3



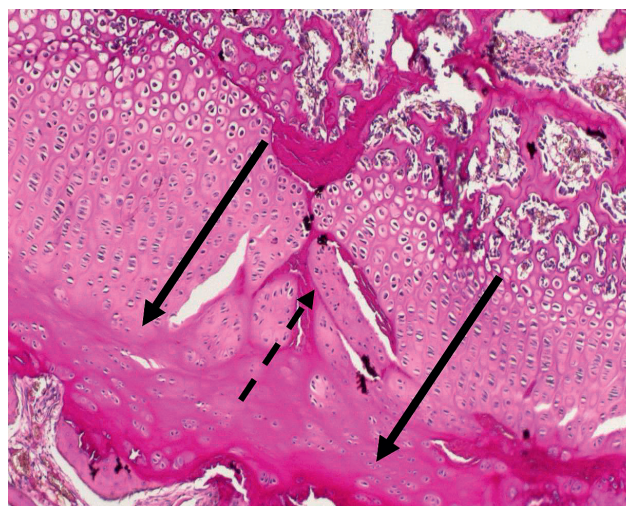
Měření délky stehenních kostí ukázalo, že levý femur s transplantovaným kombinovaným nosičem a směsí MSCs a CHC do defektu růstové chrupavky rostl více ( $1,79 \pm 2,9$  cm) ve srovnání s pravým femurem s defektem růstové chrupavky ponechaným bez transplantace MSCs a CHC ( $0,41$  cm  $\pm$   $0,1$  cm). Angulární (valgózní) deformita levého femuru s transplantovanými MSCs a CHC do defektu růstové chrupavky byla  $1,5^\circ \pm 0,8^\circ$ . Naproti tomu pravý femur s defektem růstové chrupavky ponechaným bez transplantace MSCs vykazoval signifikantně větší valgózní deformitu  $5,3^\circ \pm 2,0^\circ$  (tab. 3).

Histologicky byl v levé stehenní kosti nalezen větší nou defekt vyplněný tkání podobnou chrupavce (obr. 5). Jen ve třech případech byly nalezeny přímé znaky pro chrupavku s naznačenou sloupcovitou architektonikou. Průměrné hodnocení pozitivitu bylo  $1,2 \pm 1,24$ . V defektu pravé stehenní kosti byla ve dvou případech nalezena tkáň charakteru fibrochrupavky, jinak dle očekávaného kostní můstek (průměrné hodnocení  $0,2 \pm 0,8$ ). Novotvořená tkáň byla nadále podrobena imunohistochemickému vyšetření protilátkami proti kolagenu II, které bylo pozitivní v pěti případech, ale s nižším stupněm pozitivitu ( $1,2 \pm 1,2$ ). PAS reakce vykazovala v levé stehenní kosti i v tomto případě pozitivitu vysokou ( $2,8 \pm 0,32$ ). Vyšetření novotvořené tkáně v defektu pravé stehenní kosti vykazovalo ve všech případech negativní PAS reakci a nízkou detekci kolagenu II typu ( $0,8 \pm 0,2$ ) (tab. 4). Fluorescenční barvivo bylo prokázáno také v šesti případech, a rovněž ve stopovém množství. I tak lze konstatovat, že chondrocyty jsou diferencovány z transplantovaných MSCs, které byly předem barvivem CM-DiI označeny, neboť v kontrolní skupině se uvedený fluorochrom detekovat nepodařilo.

### Statistické hodnocení

Celkem bylo sledováno deset praset, rozdíl mezi neléčenou pravou a léčenou levou končetinou v parametrech růst do délky a rozdíl v úhlu valgizace. Rozdíl mezi pravou a levou končetinou u těchto parametrů je statisticky významný. Lze si všimnout, že léčená levá končetina má vyšší průměr růstu do délky během intervalu II oproti neléčené pravé končetině ( $p = 0,004$ ). Také u rozdílu v úhlu valgizace lze sledovat rozdíl mezi pravou a levou končetinou, průměrný úhel valgizace levé stehenní kosti je menší než průměrný úhel valgizace pravé stehenní kosti ( $p = 0,008$ ).

V defektu levé distální stehenní kosti byla častěji nalezena tkáň blízka hyalinní chrupavce než v mikroskopickém obraze defektu pravé distální epifýzy stehenní kosti. Při detekci kolagenu II byl na



Obr. 5. Prohojení defektu novotvořenou tkání, plné šipky označují okraje defektu, přerušovaná šipka hyalinní chrupavku prorůstající fibrózní tkání – obraz parciální regenerace/reparace, barvení PAS, zvětšení 20x (zvíře B10 – levá stehenní kost).

levé straně častěji pozitivní nález i s vyššími hodnotami pozitivitu než na pravé ( $p = 0,033$ ), tento rozdíl je statisticky významný. PAS pozitivní reakce byla u levé končetiny ve všech případech, v 80 % s vysokým stupněm pozitivitu, zatímco pravá končetina této hodnoty nedosáhla, opět je tento rozdíl statisticky významný ( $p = 0,001$ ).

Tab. 3. Měření růstu stehenních kostí do délky interval II

Zvíře	Růst levé stehenní kosti do délky (cm)	Růst pravé stehenní kosti do délky (cm)	Rozsah valgizace distální epifýzy levé stehenní kosti (°)	Rozsah valgizace distální epifýzy pravé stehenní kosti (°)
B1	0,8	0,4	1	5
B2	0,9	0,5	0	6
B3	0,7	0,3	2	5
B4	0,9	0,4	1	7
B5	1,1	0,2?	2	6
B6	1,1	0,6	1	8
B7	1,2	0,5	2	7
B8	0,9	0,5	3	5
B9	0,8	0,4	2	2
B10	0,5	0,3	1	2

Tab. 4. Výsledky histologického vyšetření

Zvíře	Defekt distální epifýzy stehenní kosti					
	Kvalita chrupavky		PAS		Kolagen II	
	Levá	Pravá	Levá	Pravá	Levá	Pravá
B1	0	0	3	0	0	1
B2	3	0	3	0	3	0
B3	0	0	3	0	0	1
B4	0	1	2	0	0	1
B5	3	0	3	0	3	1
B6	0	0	2	0	0	1
B7	3	0	3	0	2?	1
B8	2	1	3	0	2	0
B9	0	0	3	0	0	1
B10	1	0	3	0	2	1

## DISKUSE

Hlavním podnětem pro dlouhodobý a komplexní experiment, který na pracovišti Kliniky dětské chirurgie, ortopedie a traumatologie Fakultní nemocnice Brno probíhá od roku 2000, byly omezené možnosti prevence a léčby závažného následku poranění epifyzy dětské kosti, jakou je porucha růstu. Donedávna existovala pouze možnost ortopedické korekce důsledku vzniklého kostního můstku, což znamenalo otevřenou operaci s osteotomií a různým druhem fixace, nejčastěji zevní. Až teprve metoda Langenskiolta a jeho nejprve experimentální reparace apofýzy tukovým štěpem v sedmdesátých letech (20) a následně navržená chirurgická léčba kostního můstku růstové ploténky v letech osmdesátých (21) ukázala na nové možnosti přístupu k poraněním růstové ploténky. Jako prevence vzniku kostního můstku po poranění růstové ploténky bylo obdobným operačním postupem použito i několik dalších materiálů jako interpositum po resekci můstku, např. sval (27), polymerní silikon (26, 22), kostní vosk (3) nebo kostní cement (19).

S nástupem moderní medicíny přicházely další možnosti díky rozvíjejícím se biotechnologiím a cytologii. Objevuje se možnost nahradit defektní růstovou ploténku tkání daleko bližší, než je autologní tuk vedoucí k zamezení tvorby kostního můstku. První autoři se tedy pokoušeli vytvořit v uvedeném defektu alespoň tkáň podobnou chrupavce, nejlépe pak obnovit chrupavku hyalinní a maximalistickou byla představa kompletní restaurace architektiky růstové chrupavky i s jejím vrstevným uspořádáním. Byla tak zahájena experimentální série sledující efekt transplantace chrupavčité tkáně či samotných chondrocytů.

První práce se zabývaly implantací chrupavčité nebo periostální tkáně do defektů v růstové ploténce. Konkrétně ve Wirthově studii (40) šlo o tibii u ovce. Při srovnání obou materiálů lépe vyhovovala tkáň chrupavky, při užití periostu se rychle vytvořila kostní formace. Použití autologních chondrocytů v léčbě defektu kloubní plochy začíná být dnes již rutinní procedurou s dobrými výsledky (11).

Použití kmenových buněk v uvedené indikaci bylo jen otázkou času po informacích o nadějně účinnosti při použití v neurologii (36) nebo kardiologii (2). Proběhly první studie s pozitivními výsledky ve světě (1) i na domácím pracovišti (6, 31, 32, 33).

Výběr distální epifyzy stehenní kosti nebyl samoúčelný, tato růstová zóna je odpovědná až za 70 % růstu stehenní kosti do délky a tvoří velmi dynamickou strukturu. Stehenní kost jako taková je navíc největší kostí v těle člověka i prasete a klinické i experimentální studie ji proto velmi často využívají jako ideální studijní materiál (34, 31, 29).

Jedním ze dvou hlavních problémů zůstává u všech obdobných metodik zejména přenos buněčného materiálu do tkáně in vivo. Experimentální zvíře navíc komplikuje situaci nemožností fixace končetin, jako se tomu předpokládá v humánní traumatologii. Z toho důvodu se přesouvá experimentální potenciál směrem k vývoji

a testování nových nosičů. I v předkládané práci jde mimo jiné o prověření nového nosiče, který by měl být více odolný při mechanické zátěži kosti a představovat pevnější oporu pro přenášené buňky. Jestliže první experimenty používaly gelovou formu nosiče na bázi tkáňového lepidla (31, 1, 36), pak bylo zcela zřejmé, že tento typ nesplňuje požadavky na odolnost a už vůbec na snadnost a jednoduchost operační techniky. Proto byl v dalších studiích použit již trojrozměrný nosič se samonosnou konstrukcí kolagenových vláken (38, 13). Nová konstrukce nosiče rovněž umožnila jeho hydrodynamické osazení MSCs a CHC, což je účinnější postup a šetrnější k transferovaným buňkám (14). Další inovací postupu bylo postupné vrstvení, okrajové části nosiče byly osazeny MSCs a centrální část chondrocyty.

Nejčastěji používané diferenciační faktory u experimentů in vitro a také in vivo jsou TGF-1 (23, 11) a TGF-3 (25). Součástí některých protokolů je také kombinace s BMP typu 2 až 6, které zřejmě hrají důležitou roli v procesu dozrávání chondrocytů in vivo (16, 17). Nejnovější studie hledají další možné faktory, jedním z nich je úspěšně testovaný Chondroitin sulfát C (4). Diferenciační postup použitý v této studii (27) se dobře osvědčil v předešlých experimentech a byl dále prověřen i v dalších pracích (8).

Rentgenologické vyšetření je snadno dostupné a umožňuje stanovit s relativně vysokou přesností délku rentgenované kosti a také její případnou angulární deformitu. Technika měření délky femuru u prasete vycházela z původní studie, jejímž autorem je Janarv (12), kdežto měření rozsahu valgózní deformity bylo konzultováno s odborníky na oblast deskriptivní geometrie již dříve pro účely předešlých studií autorů (6, 31).

Histologické vyšetření mikrořezů barvených hematoxylinem a eozinem (HE) poskytuje spolehlivé informace o vlastnostech a kvalitě chrupavky v iatrogeně vytvořených defektech. Výsledky našich vyšetření se plně shodovaly se stanovenou hypotézou a byly totožné s výsledky několika podobně orientovaných studií (1). Pro objektivizaci výsledků bylo třeba stanovit jednotnou hodnotící metodiku. Proto byla zvoleno O'Driscollovo skórování (30), které bylo v mnoha dalších studiích posuzujících kvalitu novotvořené hyalinní chrupavky ve smyslu použito jako objektivní kritérium (9, 24) a je nadále doporučováno i při definici nových skórovacích systémů (37). V rámci našeho hodnocení bylo ještě důležité přihlédnout k současné restituci sloupcové architektiky růstové chrupavky. Transplantace chondrocytů nebo MSCs po excizi již vzniklého kostního můstku v růstové chrupavce (11), tj. léčba kostního můstku, se v experimentech nadále objevuje zřídka.

Cílem této studie provedené na praseti bylo nejen prověřit účinnost metody léčby, ale zejména vyzkoušet nový nosič a prověřit diferenciační potenciál MSCs v prostředí samotných chondrocytů. Lze konstatovat, že manipulace s novým nosičem byla výrazně lepší a současně lze také říct, že ve skupině s terapeutickou transplantací bylo dosaženo klinicky lepších výsledků, než ve stejné koncipovaném experimentu s transplantací pouze MSCs v původním nosiči.

Existuje mnoho otázek, ale prakticky všechny práce se shodují v základní otázce – je třeba mít optimální zdroj MSCs, správný „koktail“ růstových a diferenciacních faktorů a dobrý nosič. I tak zůstává nejisté, jestli hojení bude probíhat díky exogenně dodaným MSCs nebo díky endogenním MSCs ze synovie nebo okolní kosti dřeně a transplantát bude mít třeba jen imunomodulační účinky (41).

## ZÁVĚR

Manipulace s novým nosičem byla jednoduchá, nedocházelo k jeho uvolňování z defektu. Transplantace tohoto kompozitního nosiče v kombinaci s MSCs a chondrocyty do defektu po resekci kostního můstku vedla k zamezení vzniku poruchy růstu a úhlové deformity distální epifyzy stehenní kosti. Ve srovnání s kontrolní skupinou (transplantace samotného nosiče) vznikla častěji tkáň podobná hyalinní chrupavce s naznačenou sloupcovitou formací typickou pro růstovou ploténku, což poukazuje na výhodnost přítomnosti chondrocytů v diferenciacním prostředí in vivo ovlivňující směrování kmenových buněk. Bylo prokázáno, že původ buněk obsažených v nové tkáni v defektu je z transplantovaného štetpu pomocí přímé fluorescence.

## Literatura

1. AHN, J. I., CANALE, T. S., BUTLER, S. D., HASTY, K. A.: Stem cell repair of physal cartilage. *J. Orthop. Res.*, 22:1215–1221, 2004.
2. AKAVIA, U. D., VEINBLAT, O., BENAYAHU, D.: Comparing the transcriptional profile of mesenchymal cells to cardiac and skeletal muscle cells. *J. Cell. Physiol.*, 216: 663–672, 2008.
3. BROUGHTON, N. S., DICKENS, O. R. V., COLE, W. G., MENE-LAUS, M. B.: Epiphysiolysis for partial growth plate arrest. *J. Bone Jt Surg.*, 71-B: 13–16, 1989.
4. CHEN, J. L., YIN, Z., SHEN, W. L. A.: Efficacy of hESC-MSCs in knitted silk-collagen scaffold for tendon tissue engineering and their roles. *Biomaterials*, 31: 9438–9451, 2010.
5. FILOVÁ, E., RAMPICHOVÁ, M., HANDL, M., LYTVYNETS, A., HALOUZKA, R., USVALD, D., HLUČILOVÁ, J., PROCHÁZKA, R., DEZORTOVÁ, M., ROLENCOVÁ, E., KOŠŤÁKOVÁ, E., TRČ, T., ŠTASTNÝ, E., KOLÁČNÁ, L., HÁJEK, M., MOTLÍK, J., AMLER, E.: Composite hyaluronate-type I collagen-fibrin scaffold in the therapy of osteochondral defects in miniature pigs. *Physiol. Res.*, 56: S5–S16, 2007.
6. GÁL, P., NEČAS, A., PLÁNKA, L., KECOVÁ, H., KŘEN, L., KRUPA, P., HLUČILOVÁ, J., USVALD, D.: Chondrocytic potential of allogenic mesenchymal stem cells transplanted without immunosuppression to regenerate physal defect in rabbits. *Acta Vet. Brno*, 76: 265–275, 2007.
7. GÁL, P., ONDRUŠ, Š., ŠKVAŘIL, J., STRAKA, M., JOCHYMEK, M., PLÁNKA, L.: Syntetický biokompatibilní degradabilní materiál v léčbě juvenilních kostních cyst. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 76: 495 – 500, 2009.
8. GAO, J., YAO, J. Q., CAPLAN, A. I.: Stem cells for tissue engineering of articular cartilage. *Proc. IMechE*, 221: 441–450, 2007.
9. GUO, X., WANG, C. H., ZHANG, Y., XIA, R., HU, M., DUAN, C., ZHAO, Q., DONG, L., LU, J., SONG, Y.: Repair of Large Articular Cartilage Defects with Implants of Autologous Mesenchymal Stem Cells Seeded into  $\beta$ -Tricalcium Phosphate in a Sheep Model. *Tissue Eng.* 10: 1818–1829, 2004.
10. HANDL, M., TRČ, T., HANUŠ, M., ŠTASTNÝ, E., FRICOVÁ-POULOVÁ, M., NEUWIRTH, J., ADLER, J., HAVRANOVÁ, D., VARGA, F.: Transplantace kultivovaných autologních chondrocytů hlezenného kloubu. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 74: 29, 2007.
11. HUI, J. H. P., LI, L., TEO, Y. H., OUYANG, H. W., LEE, E. H.: Comparative study of the ability of mesenchymal stem cells derived from bone marrow, periosteum, and adipose tissue in treatment of partial growth arrest in rabbit. *Tissue Eng.*, 11: 904–912, 2005.
12. JANARV, P. M., WIKSTRÖM, B., HIRSCH, G.: The influence of transphyseal drilling and tendon grafting on bone growth: an experimental study in the rabbit. *J. Pediatr. Orthop.* 18: 149–154, 1998.
13. JANČÁŘ, J., SLOVIKOVÁ, A., AMLER, E., KRUPA, P., KECOVÁ, H., PLÁNKA, L., GÁL, P., NEČAS, A.: Mechanical response of porous scaffolds for cartilage engineering. *Physiol. Res.*, 56: S17–S25, 2007.
14. JANČÁŘ, J., VOJTOVÁ, L., NEČAS, A., SRNEC, R., URBANOVÁ, L., CRHA, M.: Stability of Collagen Scaffold Implants for Animals with Iatrogenic Articular Cartilage Defects. *Acta Vet. Brno*, 78:643–U107, 2009.
15. JOCHYMEK, J., ŠKVAŘIL, J., ONDRUŠ, Š.: Analysis of the results of bone healing in femurs lengthened by the gradual distraction method in children and adolescents. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 76: 399–403, 2009.
16. JU, W., HOFFMANN, A., VERSCHUEREN, K., TYLZANOWSKI, P., KAPS, C., GROSS, G., HUYLEBROECK, D.: The bone morphogenetic protein 2 signaling mediator Smad1 participates predominantly in osteogenic and not in chondrogenic differentiation in mesenchymal progenitors C3H10T1/2. *J. Bone Miner. Res.* 15: 1889–1899, 2000.
17. KAPS, C., BRAMLAGE, C., SMOLIAN, H., HAISCH, A., UNGETHUM, U., BURMESTER, G., SITTINGER, M., GROSS, G., HAUPL, T.: Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction. *Arthritis Rheum.*, 46: 149–162, 2002.
18. KIM, T. K., SHARMA, B., WILLIAMS, C. G., RUFFNER, M. A., MALIK, A., MCFARLAND, E. G., ELISSEEFF, J. H.: Experimental model for cartilage tissue engineering to regenerate the zonal organization of articular cartilage. *Osteoarthr. Cartil.*, 11: 653–664, 2003.
19. KLASSEN, R. A., PETERSON, M. A.: Excision of physal bars: The Mayo Clinic experience 1968–1978. *Orthop. Trans.*, 2: 65, 1982.
20. LANGENSKIOLD, A.: An operation for partial closure of an epiphyseal plate in children, and its experimental basis. *J. Bone Jt Surg.*, 57-B: 325–330, 1975.
21. LANGENSKIOLD, A.: Surgical treatment of partial closure of the growth plate. *J. Pediatr. Orthop.*, 11: 3–11, 1981.
22. LEE, E. H., GAO, G. X., BOSE, K.: Management of partial growth arrest: physis, fat, or Silastic? *J. Pediatr. Orthop.*, 13: 368–72, 1993.
23. LI, W. J., TULLI, R., OKAFOR, C., DERFOUL, A., DANIELSON, K. G., HALL, D. J., TUAN, R. S.: A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 26: 599–609, 2005.
24. LIND, M., LARSEN, A., CLAUSEN, C., OSTHER, K., EVERLAND, H.: Cartilage repair with chondrocytes in fibrin hydrogel and MPEG polylactide scaffold: an in vivo study in goats. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*, 16: 690–698, 2008.
25. MACKAY, A. M., BECK, S. C., MURPHY, J. M., BARRY, F. P., CHICHESTER, C. O., PITTENGER, M. F.: Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.*, 4: 415–428, 1998.
26. MACKSOD, W. S., BRIGHT, R.: Bar resection and silastic interposition in distal radial physal arrest. *Orthop. Trans.* 13: 1–2, 1989.
27. MARTIANA, K., LOW, C. K., TAN, S. K., PANG, M. W.: Comparison of various interpositional materials in the prevention of transphyseal bone bridge formation. *Clin. Orthop.* 325: 218–24, 1996.



28. MIURA, Z., PARVIZI, J., FITZSIMMONS, J. S., O'DRISCOLL, S.W.: Brief exposure to high-dose transforming growth factor-beta1 enhances periosteal chondrogenesis in vitro: a preliminary report. *J. Bone Joint Surg.*, 84-A: 793–799, 2002.
29. NEUBAUER, T., RITTER, E., POTSCHKA, T., KARLBAUER, A., WAGNER, M. Retrográdní hřebování u zlomenin femuru. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 75: 158–166, 2008.
30. O'DRISCOLL, S. W., KEELEY, F. W., SALTER, R. B.: Durability of regenerated articular cartilage produced by free autologous periosteal graft in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. *J. Bone Jt Surg.*, 70-A: 595, 1988.
31. PLÁNKA, L., NEČAS, A., GÁL, P., KECOVÁ, H., FILOVÁ, E., KŘEN, L., KRUPA, P.: Prevention of bone bridge formation using transplantation of the autogenous mesenchymal stem cells to physal defects: An experimental study in rabbits. *Acta Vet. Brno*, 76: 253–263, 2007.
32. PLÁNKA, L., NEČAS, A., SRNEC, R., RAUŠER, P., STARÝ, D., JANČÁŘ, J., AMLER, E., FILOVÁ, E., HLUČILOVÁ, J., KŘEN, L., GÁL, P.: Use of allogenic stem cells for the prevention of bone bridge formation in miniature pigs. *Physiol. Res.* 58: 885–893, 2009.
33. PLÁNKA, L., STARÝ, D., HLUČILOVÁ, J., KLÍMA, J., JANČÁŘ, J., KŘEN, L., LORENZOVÁ, J., URBANOVÁ, L., CRHA, M., SRNEC, R., DVOŘÁK, M., GÁL, P., NEČAS A.: Comparison of Preventive and Therapeutic Transplantation of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells in Healing of the Distal Femoral Growth Plate Cartilage Defects in Miniature Pigs. *Acta Vet. Brno*, 78: 293–302, 2009.
34. PLÁNKA, L., CHALUPOVÁ, P., CHARVÁTOVÁ, M., POUL, J., GÁL, P. Rotační deformity při použití metody ESIN u zlomenin diafýzy stehenní kosti u dětí sledované magnetickou rezonancí. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 77: 39–42, 2010.
35. PORTMANN-LANZ, C. B., SCHOEBEDEIN, A., HUBER, A., SAGER, R., MALEK, A., HOLZGREVE, W., SURBEK, D.V.: Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am. J. Obstetr. Gynaecol.*, 194: 664–673, 2009.
36. RAMPICHOVA, M., FILOVA, E., VARGA, F., LYTVYNETS, A., PROSECKÁ, E., KOLÁČNÁ, L., MOTLÍK, J., NEČAS, A., VAJNER, L., UHLÍK, J., AMLER, E.: Fibrin/Hyaluronic Acid Composite Hydrogels as Appropriate Scaffolds for In Vivo Artificial Cartilage Implantation. *ASAIO J.*, 56: 563–568, 2010.
37. RUTGERS, M., VAN PELT, M. J. P., DHERT, W. J. A., CREAMERS, L. B., SARIS, D. B. F.: Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage. *Osteoarthr. Cartil.*, 18: 12–23, 2010.
38. SLOVIKOVÁ, A., VOJTOVÁ, L., JANČÁŘ, J.: Preparation and modification of collagen-based porous scaffold for tissue engineering. *Chem. Pap.*, 62: 417–422, 2008.
39. TISATO, V., NARESH, K., NAVARRETE, C., DAZZI, F.: Mesenchymal stem cells are effective at preventing but not at treating GvJD. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 13: 44–45, 2007.
40. WIRTH, T., BYERS, S., BYARD, R. W., HOPWOOD, J. J., FOSTER, B. K.: The implantation of cartilaginous and periosteal tissue into growth plate defects. *Int. Orthop.*, 18: 220–228, 1994.
41. XIAN, C. J., Foster, B. K.: Repair of injured articular and growth plate cartilage using mesenchymal stem cells and chondrogenic gene. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, 1: 213–229, 2010.

**Korespondující autor:**

Doc. MUDr. Ladislav Plánka, Ph.D.  
KDCHOT, Černopolní 9,  
613 00 Brno  
E-mail: lplanka@seznam.cz