

# Použití kultivovaných lidských autologních kmenových buněk kostní dřeně při rekonstrukci ruptury rotátorové manžety – studie bezpečnosti metody, předběžné výsledky

## Use of Cultured Human Autologous Bone Marrow Stem Cells in Repair of a Rotator Cuff Tear: Preliminary Results of a Safety Study

V. HAVLAS<sup>1</sup>, J. KOTAŠKA<sup>1</sup>, P. KONÍČEK<sup>1</sup>, T. TRČÍ<sup>1</sup>, Š. KONRÁDOVÁ<sup>2,3</sup>, Z. KOČÍ<sup>2,4</sup>, E. SYKOVÁ<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> Klinika dětské a dospělé ortopedie a traumatologie 2. LF UK a FN v Motole, Praha

<sup>2</sup> Oddělení neurovůd, Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Praha

<sup>3</sup> Ústav hematologie a krevní transfuze Praha

<sup>4</sup> Ústav neurovůd, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

### ABSTRAKT

#### PURPOSE OF THE STUDY

Rotator cuff tears are one of the most frequent shoulder disorders which are often associated with pain and interfere with proper arm function. In order to evaluate the safety and effectiveness of using cultured human autologous mesenchymal stem cells (MSC) applied to the suture site during arthroscopic repair of a rotator cuff tear, a prospective clinical study was designed and started recently at the authors' department. Its primary goal was to evaluate the safety of using cultured human MSCs, the secondary goal then was to study a therapeutic effect of their application. Preliminary results of the study on a limited number of patients are presented here.

#### MATERIAL AND METHODS

Ten patients who met the indication criteria for arthroscopic repair of a rotator cuff tear were included in the study. In addition, they also had to meet inclusion and lack exclusion criteria. According to the protocol, their bone marrow was harvested at 3 to 4 weeks before surgery. Subsequently, an arthroscopic repair of the rotator cuff tear was performed and an suspension of cultured MSCs was applied to the suture site at the end of the procedure. The isolation of MSCs from bone marrow and their cultivation was carried out by the company Bioinova, Ltd. The patients were followed up at 6 weeks and 3 and 6 months post-operatively. Their clinical assessment included physical examination of the shoulder, pain intensity evaluation according to the visual analogue scale (VAS), and subjective questionnaires for Constant and University of California (UCLA) scores. All patients underwent MRI examination at 6 post-operative months to evaluate the quality of rotator cuff reconstruction. The findings were compared with the pre-operative results.

#### RESULTS

A final evaluation was made in eight patients of 10. Two patients were excluded from the study because their exclusion criteria were fulfilled. The evaluated patients showed significantly better clinical outcomes as early as 6 weeks after surgery; also all pre-operative scores were improved at 3 and 6 months. The average values at 6 months post-operatively were: 0 points for the VAS score, 32 for the UCLA score and 84 for the Constant score. The MRI findings at 6 months after surgery showed fully healed and well-integrated tissue of the rotator cuff tendon attachment in all eight patients. No adverse effects of therapy were recorded during the follow-up period.

#### DISCUSSION

The use of autologous stem cells and growth factors in the treatment of tendons, muscles and cartilage is currently the topic of many experimental studies on animal models. Its utilisation in human clinical trials has been reported only marginally; the relevant studies have so far used only suspensions of non-cultured mononuclear cells. Our study, although on a small-size patient group, provides evidence that human cultured autologous MSCs can safely be used for tissue repair in the indications mentioned above.

#### CONCLUSIONS

Our preliminary short-term results show that using human cultured autologous MSCs in the treatment of rotator cuff tears is safe. However, further research is needed, particularly with regard to the effectiveness of the method.

**Key words:** rotator cuff tear, arthroscopic repair, mesenchymal stem cells, tendon, cell therapy.

## ÚVOD

Poškození rotátorové manžety je jedním z nejčastějších onemocnění ramenního kloubu a často ústí v klinicky významnou bolest a dysfunkci (10, 11, 12, 18, 22). Úspěšná léčba ruptury rotátorové manžety je často komplikována sníženou tendencí k hojení, a to i v případech chirurgického ošetření šlachy. Obtížné hojení šlachy je spojováno se zhoršeným cévním zásobením rotátorové manžety, souvisejícím s nedostatečnou migrací buněk účastnících se na hojících procesech ruptury šlachy (2, 5).

Histologické studie ukazují, že šlacha rotátoru se nehojí regenerací původního fibrokartilaginózního úponu šlachy, ale formací jizevnaté tkáně s vysokým obsahem kolagenu III, ke spontánnímu zhojení šlachy často nedojde vůbec (6, 21).

Recentní studie provedené na laboratorních potkaních poukazují na využití mezenchymálních kmenových buněk z kostní dřeně (mesenchymal stem cells, MSC) jako slibného terapeutického nástroje zlepšujícího hojení rotátorové manžety (8, 10, 19, 24). Byl prokázán pozitivní vztah mezi lokální aplikací MSC a neovaskularizací na principu imunomodulace procesu hojení šlachy (3, 13, 14). Kida a kol. prokázali také jasný pozitivní efekt MSC na hojení šlachy rotátoru po návrtech kosti v místě úponu šlachy (16).

Vlastností MSC je v současné době s velmi dobrými výsledky rutinně využíváno při léčbě šlachových poranění dostihových koní (7, 20). Pacini a kol. prokázali, že aplikace MSC do oblasti poškozené šlachy závodního koně jasně zlepšuje parametry hojení, což bylo prokázáno jak ultrasonograficky, tak srovnáním času návratu koně do plné závodní zátěže (20). Jiná studie prokázala na post-mortem histologických nálezech, že MSC aplikované injekčně do oblasti šlachové léze nezpůsobila ani v jednom případě imunologicky podmíněnou negativní buněčnou reakci či alteraci šlachy a jejího okolí (7).

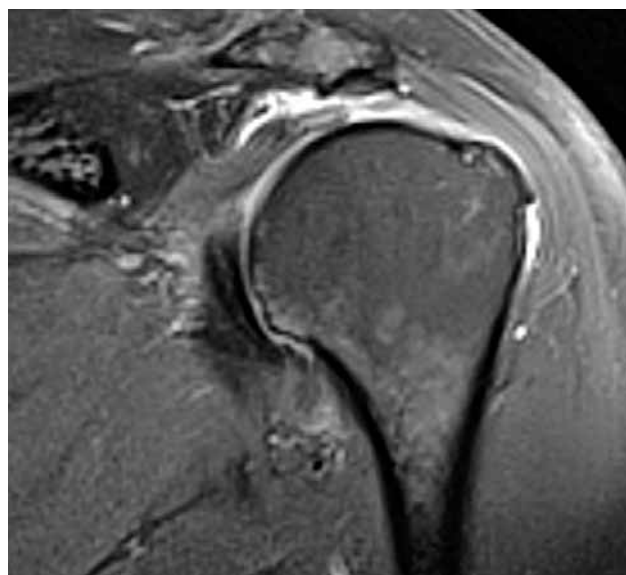
Za účelem zhodnotit bezpečnost a efektivitu použití lidských kultivovaných autologních MSC aplikovaných do místa sutury během artoskopické rekonstrukce ruptury šlachy rotátorové manžety byla vytvořena prospektivní klinická studie, která byla recentně spuštěna na pracovišti autorů a jejímž zadavatelem je Bioinova s. r. o.

Primárním cílem klinické studie je bezpečnost použití, sekundárním cílem pak terapeutický efekt použití lidských kultivovaných MSC. Autoři prezentují předběžné výsledky studie na limitovaném počtu pacientů.

## MATERIÁL A METODIKA

## Charakteristika souboru pacientů

10 pacientů bylo na základě indikačních kritérií pro artoskopickou opravu ruptury rotátorové manžety zařazeno do studie AMCS RC 001, Eudra CT no. 2010-024664-17, registrované Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL) dne 22. října 2012. Všichni pacienti byli seznámeni s cílem studie a poskytli informovaný souhlas verifikovaný místní etickou komisí a SÚKL. Součástí výběru pacientů bylo splnění vstupních/výstupních kritérií pro zařazení do studie tak, jak jsou popsána v tabulce 1. Po prvotním zhodnocení anamnézy, klinického vyšetření a MRI ramenního kloubu (obr. 1) byla potvrzena indikace k operačnímu řešení ruptury rotátorové manžety.



Obr. 1. Předoperační nález MRI s kompletní rupturou šlachy m. supraspinatus.

Tab. 1. Hodnocení průběhu klinické studie

Vyhodnocení	Prvotní vyšetření – 5 ±1 týdnů	Kontrola I – 4 ±1 týdnů	Kontrola II – 3 to – 1 dnů	Kontrola III 0 den	Kontrola IV + 6 ±1 týdnů	Kontrola V + 6 ±1 měsíců	Kontrola VI + 12 ±1 měsíců
Informovaný souhlas	X						
Anamnéza	X		X				
Klinické vyšetření	X		X		X	X	X
VAS			X		X	X	X
Constant skóre			X		X	X	X
UCLA skóre			X		X	X	X
MR ramenní kloub	X						X
Průvodní medikace	X	X	X	X	X	X	X
Operace RM				X			
Odběr kostní dřeně		X					
Laboratorní výsledky – hodnocení			X				
Nepříznivé vlivy – hodnocení		X	X	X	X	X	X

Tab. 2. Vstupní a vylučující kritéria pro zařazení (RM = rotátorová manžeta)

Vstupní kritéria	Vylučující kritéria
Muži a ženy mezi 40–65 lety věku	Ruptura RM zahrnující šlachy m. subscapularis i biceps brachii
Kompletní unilaterální ruptura RM na předoperačním MRI a klinickém vyšetření	Střední nebo těžká artróza glenohumerálního kloubu
Indikace k artroskopickému řešení ruptury RM v porovnání s kontralaterální stranou	Ztráta pasivní elevace ve všech směrech
Souhlas s nasazením ortézy na 4 týdny po operaci snímku m. supraspinatus nebo infraspinatus	Tuková infiltrace větší než 50 % na sagitálním
Podepsaný informovaný souhlas	Předchozí operace RM
Minimální hodnota hemoglobinu předoperačně > 110 g/l	Masivní ruptura RM s kontrakcí paží bez možnosti mobilizace zjištěná peroperačně
Předoperační počet krevních destiček > 150000/l mm <sup>3</sup>	Infekce, osteomyelitida, sepse
	Další onemocnění, která mohou omezovat pooperační sledování (imunodeficit, hepatitis, tuberkulóza, neoplazmata, septická artritida)
	Osteomalacie nebo jiné metabolické onemocnění s dysfunkcí kostí nebo měkkých tkání
	Vaskulární insuficience, muskulární atrofie nebo neuromuskulární onemocnění na postižené paži
	Anamnesticky přítomnost hematologického onemocnění
	Těhotné nebo kojící ženy
	Závislí na alkoholu, uživatelé drog
	Pacienti na terapii kortikosteroidy, immunosupresivy nebo antikoaguačními léky
	Ženy ve fertilním období neužívající adekvátní antikoncepci

Tab. 3. Výsledky

	Vyhodnocení	Kontrola – 3 dny	Kontrola 6 týdnů	Kontrola 3 měsíce	Kontrola 6 měsíců
Pacient č. 1	VAS	50	29	11	0
	Constant skóre	21	34	27	87
	UCLA skóre	16	20	19	32
Pacient č. 2	VAS	70	0	0	0
	Constant skóre	29	44	62	89
	UCLA skóre	10	21	24	30
Pacient č. 3	VAS	80	13	0	0
	Constant skóre	36	68	91	75
	UCLA skóre	18	25	35	28
Pacient č. 4	VAS	35	16	5	0
	Constant skóre	87	48	79	85
	UCLA skóre	32	14	31	33
Pacient č. 5	VAS	35	10	10	0
	Constant skóre	51	74	85	88
	UCLA skóre	14	28	30	32
Pacient č. 6	VAS	40	15	10	0
	Constant skóre	43	60	50	86
	UCLA skóre	20	15	28	31
Pacient č. 7	VAS	55	20	5	0
	Constant skóre	35	20	70	80
	UCLA skóre	17	25	26	34
Pacient č. 8	VAS	60	10	10	0
	Constant skóre	25	55	74	85
	UCLA skóre	20	15	30	36
Průměr	VAS	53	14	6	0
	Constant skóre	41	50	68	84
	UCLA skóre	18	20	27	32

Pacienti zařazení do studie byli sledováni v intervalech 6 týdnů, 3 a 6 měsíců od operace. Klinické zhodnocení zahrnovalo klinické vyšetření ramenního kloubu, zjištění intenzity bolesti dle VAS, vyplnění subjektivních dotazníků Constant score a University of California score evaluation (UCLA), (tab. 2). Všichni pacienti podstoupili MRI kontrolu v odstupu 6 měsíců

ke zhodnocení kvality rekonstrukce rotátorové manžety. Výsledky byly korelovány s předoperačním nálezem. Klinické předoperační nálezy u pacientů zařazených do souboru jsou shrnuty v tabulce 3. Eventuální nežádoucí účinky byly sledovány v souladu s protokolem studie.

### Odběr a aplikace kmenových buněk

Po poskytnutí informovaného souhlasu podstoupili všichni pacienti zařazení do studie virologické a bakteriologické testy v souladu s protokolem klinické studie. Následně, 3–4 týdny před operačním výkonem, byl proveden odběr kostní dřeně. Celkem 12 ml kostní dřeně pacienta bylo získáno aspirací z crista ilaca v sedací a lokální anestezii. Punkce byla prováděna aspirační jehlou v poloze na zádech. K odběru byla použita speciální 20 ml injekční stříkačka obsahující fyziologický roztok s heparinem o koncentraci 750 IU/ml a gentamycin o koncentraci 68 µg/ml (Bioinova s. r. o., Praha, ČR). Stříkačka obsahující kostní dřeň byla transportována v rámci platných pravidel tkáňového zařízení.

Expanze MSC z kostní dřeně byla provedena podle pravidel Správné výrobní praxe (SVP, angl. Good Manufacturing Practice) a zajištění kvality dle protokolů Bioinova, s. r. o. Po transportu do zařízení SVP byla izolována mononukleární frakce kostní dřeně. Mononukleární frakce byla nasazena do plastových kultivačních lahví (40 000–70 000 buněk/cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko) a ponechána po dobu 24–48 hodin ke spontánní adhezi. Neadherentní buňky byly odstraněny náhradou média. Adherentní buňky byly kultivovány při teplotě 37 °C ve zvlhčené atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub> v médiu MEM Alpha (Lonza,

Walkersville, Maryland, USA) obohaceném o lyzát krevních destiček (Bioinova, s. r. o., Praha, ČR) a gentamycin (Gentamicine Lek®; Lek Pharmaceuticals, Ljubljana, Slovinsko). Médium bylo měněno dvakrát týdně. MSC byly identifikovány na základě vřetenovitého tvaru buněk a jejich adheze k plastiku kultivačních lahví. Po dosažení konfluency byly buňky extra-



hovány pomocí TrypLE™ (Life Technologies, Carlsbad, California, USA), poté přeneseny a znovu nasazeny na čistý plastový povrch kultivačních lahví. Výsledná suspenze buněk byla získána ve třetí pasáži. MSC byly charakterizovány z hlediska počtu, viability a určení povrchových markerů. Dále byla provedena zkouška sterility a následně byly MSC propuštěny aplikaci. Konečný léčebný přípravek použitý k léčbě ruptury rotátorové manžety obsahoval  $10 \pm 4,5 \times 10^6$  MSC.

### Chirurgie rotátorové manžety

Všichni pacienti zařazení do studie byli operováni stejným operátorem na pracovišti prvního autora. Operace byla provedena v poloze na boku v celkové anestezii. Zárok vždy začal diagnostickou gleno-humerální artroskopií za použití standardního zadního vstupu s artroskopickou pumpou zajišťující tlak 50 mm Hg. Technikou outside-in byly zhotoveny standardní horní přední, posléze i laterální přístupy. Ruptura rotátorové manžety byla vždy nejprve intraartikulárně označena PDS vláknem vsunutým perkutánně přes jehlu. Optika byla poté přesunuta do subakromiálního prostoru, kde byla lokalizována léze manžety. Tvar léze byl klasifikován dle tvaru (L typ, U typ, srpkovitý typ). Rozměry léze v předozadním průměru byly měřeny artroskopickou milimetrovou měrkou a zaznamenány (klasifikace dle DeOrio a Cofielda: menší než 1 cm = malá, 1–3 cm = střední, 3–5 cm = velká, 5 cm a více = masivní). Po okrvavení okrajů léze i úponu šlachy v oblasti tuberculum major bylo následně přistoupeno k provedení sutury rotátorové manžety za použití kotvicího materiálu Fastin (Mitek, USA). Následně byla po testu mobility a pevnosti sutury provedena standardní akromioplastika. Během finální fáze operace byla pod artroskopickou kontrolou po vypnutí tlakové pumpy a vypuštění proplachové laváže do lože sutury mezi obě části šlachy injikovaná suspenze s MSC o obsahu 1,5 ml (obr. 2, 3, 4, 5).

### VÝSLEDKY

Konečné hodnocení v 6 měsících od operace bylo provedeno u 8 pacientů z 10. Dva pacienti (druhý a třetí v pořadí) byli ze studie vyřazení na základě naplnění vylučovacích kritérií – jeden z důvodu výskytu akutní angíny v době časování definitivního operačního zákroku po pomnožení MSC, druhý z důvodu nesplnění indikačních kritérií v peroperačním nálezu (nález pouze parciální netransmurální ruptury šlachy supraspinatu a současná masivní SLAP léze). Souhrn výsledků získaných během sledování pacientů v daných intervalech je shrnut v tabulce 3. U všech pacientů došlo k signifikantnímu zlepšení klinického nálezu již v 6. týdnu od operace, všechna sledovaná klinická skóre byla zlepšena v 6 týdnech, ve 3 i 6 měsících, ve srovnání se stavem před operací. Průměrné hodnoty při kontrole 6 týdnů od operace byly následující: VAS = 14, Constant skóre = 50, UCLA skóre = 20. Průměrné hodnoty 6 měsíců od operace byly VAS = 0, Constant skóre = 84, UCLA skóre = 32. MRI nález v 6 měsících ukázal plně zhojenou a prostavěnou tkáň úponu



Obr. 2. Artroskopický nález mírné degenerace šlachy m. supraspinatus (identický pacient s obrázkem 1).



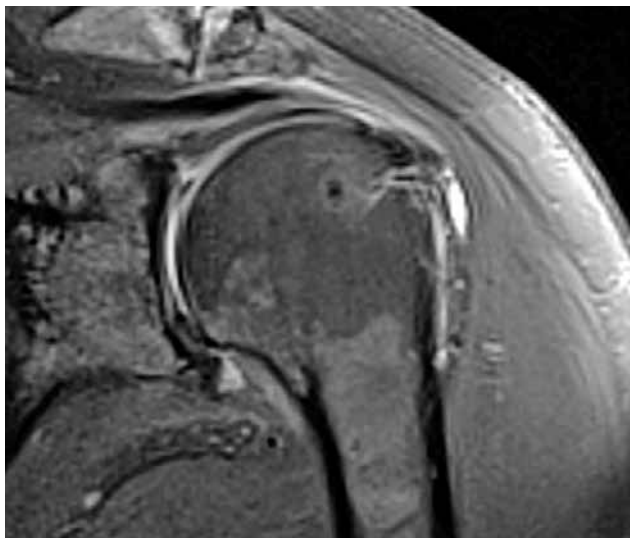
Obr. 3. Artroskopický nález ruptury šlachy m. supraspinatus (identický pacient s obrázkem 1).



Obr. 4. Artroskopický nález po rekonstrukci šlachy m. supraspinatus za použití side-to-side techniky (identický pacient s obrázkem 1).



Obr. 5. Jehlová aplikace MSC do místa sutury šlachy m. supraspinatus; foto před vypuštěním tlakové pumpy (identický pacient s obrázkem 1).



Obr. 6. Pooperační nález MRI 6 měsíců od sutury šlachy m. supraspinatus (identický pacient s obrázkem 1).

rotátorové manžety u všech 8 hodnocených pacientů (obr. 6). V průběhu období sledování nebyly zaznamenány žádné nežádoucí účinky léčby, žádný z pacientů nebyl vyřazen z důvodu výskytu komplikací léčby.

## DISKUSE

Využití autologních kmenových buněk a růstových faktorů pro terapii šlach, svalů a chrupavek je v současné době předmětem řady výzkumných studií na experimentálních zvířecích modelech, s ne zcela konzistentními výsledky (9, 24, 26), přičemž klinické využití je zmiňováno zatím pouze okrajově.

Během posledních 15 let bylo provedeno mnoho studií na zvířecím modelu za použití širokého spektra adjuvantních biologických faktorů, včetně MSC. V rámci hodnocení histologického obrazu, pevnosti a biomechanických vlastností zhojené šlachy bylo zvažováno také použití

nejrůznějších nosičů, jako jsou kolagenní gely, kolagení sítě, fibrinové nosiče, apod., s cílem udržení buněčných preparátů v místě léze, ať již v oblasti Achillovy šlachy, patelárního ligamenta, či manžety rotátoru ramenního kloubu. Většina studií hodnotí oblast buněčné augmentace hojení šlachy jako významnou, ve smyslu techniky aplikace, množství a koncentrace MSC však stále neexistuje jasný konsensus (1, 8, 17, 20, 25). Yokoya a kol. prokázali na králičím modelu pozitivní efekt MSC na regeneraci šlachy rotátorové manžety jak při jejím úponu, tak při přechodu na svalové bříško (26). Naproti tomu Gulotta a kol. na modelu laboratorního potkana neprokazují změnu struktury či síly šlachy ve fázi hojení po přidání MSC (9).

Pracoviště autorského kolektivu se problematice klinického terapeutického využití MSC a růstových faktorů při hojení chrupavky, šlach a svalů v posledních několika letech usilovně věnuje (10, 23). Autoři ve vlastní preklinické studii prokázali, že lidské multipotentní MSC po aplikaci do oblasti šlachové léze u laboratorního potkana urychlují neovaskularizaci a reorganizaci tkáně šlachy v procesu hojení, což bylo prokázáno vyšší produkcí kolagenu I a III a lepší histologickou strukturou novotvořené šlachy, ve srovnání s kontrolní skupinou bez terapie (24).

K dnešnímu dni neexistuje humánní klinická studie s využitím kultivovaných kmenových buněk získaných z kostní dřeně. Existuje pouze jedna lidská studie (Level IV) hodnotící klinické využití nekultivovaných mononukleárních buněk (MNC), ve které Ellera-Gomes a kol. (4) prokázali na 14 pacientech zlepšení klinického skóre a „dobrou reparační integritu“ na MRI po operaci ruptury rotátorové manžety s adjuvantní aplikací nekultivovaných MNC. MSC byly v dané studii získány před zákrokem z crista iliaca, zpracovány pomocí Ficoll-Hypaqueova gradientu hustoty, a poté znovu resuspendovány ve fyziologického roztoku obohaceného 10% autologním sérem. Autoři neporovnávali výsledky s kontrolní skupinou, přičemž hlavním cílem jejich studie byla, obdobně jako v naší práci, bezpečnost metody se související limitací výstupů ve vztahu k efektivitě terapie (Level IV).

Žádná z publikovaných studií k dnešnímu dni neprokazuje karcinogenní potenciál či nežádoucí buněčné mutace MSC při jejich lokální aplikaci do oblasti pojivové tkáně. Přestože díky autolognímu původu MSC není předpoklad vzniku lokálních či systémových nežádoucích účinků, aplikace MSC není z pohledu vývojových toxikologických studií doporučována těhotným ženám a pacientům ve věku do 18 let (15).

Předložená práce je předběžným výstupem z probíhající klinické studie, jejíž souhrnné závěry budou po ukončení studie taktéž publikovány, přičemž primárním cílem klinické studie je posouzení bezpečnosti použití kultivovaných autologních MSC. První předběžné výsledky v našem souboru pacientů potvrzují bezpečnost a dobrý efekt použití autologních kultivovaných MSC, jakkoli validace výstupů ve smyslu efektu metody bude do budoucna záviset na zhodnocení většího počtu pacientů zařazených do studie, včetně jejich korelace s konvenční



technikou ošetření ruptury rotátorové manžety bez použití adjuvantní buněčné terapie. V prezentovaném souboru 8 pacientů nebyly v šestiměsíčním sledování zaznamenány žádné klinické ani laboratorní nežádoucí účinky spojené s terapeutickým využitím kultivovaných lidských MSC, jakožto ani žádné další komplikace léčby.

## ZÁVĚR

Předběžné výsledky ukazují, že terapie s využitím kmenových buněk pro reparaci a regeneraci šlachy a svalu je slibným terapeutickým přístupem v chirurgii ramenního kloubu. Třebaže v rámci in vivo prováděných studií na laboratorních zvířatech byly prokázány slibné výsledky této metody ve smyslu posílení hojení šlachy rotátoru, užití MSC v chirurgii ramenního kloubu by mělo být stále považováno za experimentální techniku a je zapotřebí dalšího klinického výzkumu k průkazu efektu této adjuvantní metody hojení šlachy. Publikovaná práce prokazuje bezpečnost metody na omezeném počtu pacientů v šestiměsíčním sledování. Další výsledky probíhající klinické studie budou publikovány po jejím vyhodnocení.

## Literatura

1. AHMAD, Z., WARDALE, J., BROOKS, R., HENSON, F., NOORANI, A., RUSHTON, N.: Exploring the application of stem cells in tendon repair and regeneration. *Arthroscopy*, 28: 1018–1029, 2012.
2. BENJAMIN, M. RALPHS, J. R.: Tendons and ligaments – an overview. *Histol. Histopathol.*, 12: 1135–1144, 1997.
3. COHEN, S., LESHANSKY, L., ZUSSMAN, E., BURMAN, M., SROUJI, S., LIVNE, E., Abramov, N., Itskovitz-Eldor, J.: Repair of full-thickness tendon injury using connective tissue progenitors efficiently derived from human embryonic stem cells and fetal tissues. *Tissue Eng. Part A*, 16: 3119–3137, 2010.
4. ELLERA GOMES, J. L., DA SILVA, R. C., SILLA, L. M., ABREU, M. R., PELLANDA, R.: Conventional rotator cuff repair complemented by the aid of mononuclear autologous stem cells. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*, 20: 373–377, 2012.
5. FUNAKOSHI, T., IWASAKI, N., KAMISHIMA, T., NISHIDA, M., ITO, Y., KONDO, M., MINAMI, A.: In vivo visualization of vascular patterns of rotator cuff tears using contrast-enhanced ultrasound. *Am. J. Sports Med.*, 38: 2464–2471, 2010.
6. GALATZ, L. M., SANDELL, L. J., ROTHERMICH, S. Y., DAS, R., MASTNY, A., HAVLIOGLU, N., SILVA, M. J., THOMOPOULOS, S.: Characteristics of the rat supraspinatus tendon during tendon-to-bone healing after acute injury. *J. Orthop. Res.*, 24: 541–550, 2006.
7. GUEST, D. J., SMITH, M. R., ALLEN, W. R.: Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study. *Equine Vet. J.*, 40: 178–181, 2008.
8. GULOTTA, L. V., KOVACEVIC, D., EHTESHAMI, J. R., DAGHER, E., PACKER, J. D., RODEO, S. A.: Application of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rotator cuff repair model. *Am. J. Sports Med.*, 37: 2126–2133, 2009.
9. GULOTTA, L. V., KOVACEVIC, D., PACKER, J. D., DENG, X. H. AND RODEO, S. A.: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells transduced with scleraxis improve rotator cuff healing in a rat model. *Am. J. Sports Med.*, 39: 1282–1289, 2009.
10. HAVLAS, V., KOTAŠKA, J., LESNÝ, P., SEVASTYANOVÁ, O., TRČ, T.: Vliv PRP na hojení rotátorové manžety – první zkušenosti/Effect of PRP on Healing of Arthroscopic Rotator Cuff Repair – First Experience. *Ortopedie* 7: 96–99, 2013.
11. HAWKINS, R. J., KENNEDY, J. C.: Impingement syndrome in athletes. *Am. J. Sports Med.*, 8: 151–158, 1980.
12. HERRMANN, S. J., IZADPANAH, K., ŠŮDKAMP, N. P., STROHM, P. C.: Trhliny rotátorové manžety. Příčiny – diagnostika – léčení. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 81: 256–266, 2014.
13. CHEN, J. L., YIN, Z., SHEN, W. L., CHEN, X., HENG, B. C., ZOU, X. H., OUYANG, H. W.: Efficacy of hESC-MSCs in knitted silk-collagen scaffold for tendon tissue engineering and their roles. *Biomaterials*, 31: 9438–9451, 2010.
14. CHEN, J. M., WILLERS, C., XU, J., WANG, A., ZHENG, M. H.: Autologous tenocyte therapy using porcine-derived bioscaffolds for massive rotator cuff defect in rabbits. *Tissue Eng.*, 13: 1479–1491, 2007.
15. ISAAC, C., GHARAIBEH, B., WITT, M., WRIGHT, V. J., HUARD, J.: Biologic approaches to enhance rotator cuff healing after injury. *J. Shoulder Elbow Surg.*, 21: 181–190, 2012.
16. KIDA, Y., MORIHARA, T., MATSUDA, K., KAJIKAWA, Y., TACHIIRI, H., IWATA, Y., SAWAMURA, K., YOSHIDA, A., OSHIMA, Y., IKEDA, T., FUJIWARA, H., KAWATA, M., KUBO, T.: Bone marrow-derived cells from the footprint infiltrate into the repaired rotator cuff. *J. Shoulder Elbow Surg.*, 22: 197–205, 2013.
17. LAM, F., MOK, D.: Open repair of massive rotator cuff tears in patients aged sixty-five years or over: is it worthwhile?. *J. Shoulder Elbow Surg.*, 13: 517–521, 2004.
18. LEHMANN, L. J., CAFALTZIS, K., HÜNNEBECK, S., MOURSY, M.: Existují prognostické prediktivní parametry (PPP) v léčbě masivní trhliny rotátorové manžety pomocí transferu musculus latissimus dorsi?. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 80: 1250, 2013.
19. OKAMOTO, N., KUSHIDA, T., OE, K., UMEDA, M., IKEHARA, S., IIDA, H.: Treating Achilles tendon rupture in rats with bone-marrow-cell transplantation therapy. *J. Bone Jt Surg.*, 92-A: 2776–2784, 2010.
20. PACINI, S., SPINABELLA, S., TROMBI, L., FAZZI, R., GALIMBERTI, S., DINI, F., CARLUCCI, F., PETRINI, M.: Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng.*, 13: 2949–2955, 2007.
21. RODEO, S. A., ARNOCKY, S. P., TORZILLI, P. A., HIDAKA, C., WARREN, R. F.: Tendon-healing in a bone tunnel. A biomechanical and histological study in the dog. *J. Bone Jt Surg.*, 75-A: 1795–1803, 1993.
22. ŠMÍD, P., HART, P., PUSKEILER, M.: Tangent sign – spolehlivý prediktor rizika reruptury při rekonstrukci šlach svalu rotátorové manžety. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 81: 227–232, 2014.
23. TRČ, T., KOTAŠKA, J., SEVASTYANOVÁ, O., HAVLAS, V.: Klinické využití růstových faktorů získaných z krevní plazmy v ortopedii. *Ortopedie*, 7: 114–116, 2013.
24. URDŽIKOVA, L., SEDLACEK, R., SUCHY, T., AMEMORI, T., RUZICKA, J., LESNÝ, P., HAVLAS, V., SYKOVA, E., JENDELLOVA, P.: Human multipotent mesenchymal stem cells improve healing after collagenase tendon injury in the rat. *Biomed. Eng. Online*, 13: 42, 2014.
25. UYSAL, A. C., MIZUNO, H.: Differentiation of adipose-derived stem cells for tendon repair. *Methods Mol. Biol.*, 702: 443–451, 2011.
26. YOKOYA, S., MOCHIZUKI, Y., NATSU, K., OMAE, H., NAGATA, Y., OCHI, M.: Rotator cuff regeneration using a bioabsorbable material with bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Am. J. Sports Med.*, 40: 1259–1268, 2012.

## Korespondující autor:

Doc. MUDr. Vojtěch Havlas, Ph.D.  
Klinika dětské a dospělé ortopedie a traumatologie  
2. LF UK a FN v Motole  
V Úvalu 84  
150 06 Praha 5 - Motol  
E-mail: vojtech.havlas@lfmotol.cuni.cz