

Využití peptigelu s nanovláknny k léčbě defektů kostní tkáně

Use of the Peptigel with Nanofibres in the Bone Defects Healing

R. SRNEC¹, R. DIVÍN², M. ŠKORIČ³, R. SNÁŠIL¹, M. KRBEC⁴, A. NEČAS¹

¹ Oddělení chirurgie a ortopedie, Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

² Oddělení tkáňového inženýrství, Ústav experimentální medicíny Akademie věd ČR, Praha

³ Ústav patologické morfologie a parazitologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

⁴ Ortopedicko-traumatologická klinika, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařská fakulta UK, Praha

ABSTRACT

INTRODUCTION

Traumatic bone injuries or pathological processes may sometimes result in very extensive bone defects. Currently, the standard procedure applied in clinical humane as well as veterinary medicine to fill a bone defect is the autogenous bone graft which, however, necessitates a more invasive procedure for the patient and in the cases of extensive defects it fails to provide adequate amount of graft. Synthetic bone replacements can be used with no further burden for the patient and can simultaneously be used as the carriers for bioactive molecules or therapeutic drugs. For clinical use, an easy and simple application is one of the requirements that have to be taken into consideration. These requirements are best satisfied by preparations in the form of gel, which may be injected into the defects of various shapes even through minimal surgical approach.

MATERIAL AND METHODS

Synthetic transparent PGD-AlphaProA hydro-peptide-gel was used as a basis to develop a composite hydrogel scaffold. This gel was enriched by cryogenically ground poly-ε-caprolactone nanofibers (PCL) in a ratio of 1 ml of gel to 16 µg of nanofibers. In experimental animals (laboratory rat Wistar, n=20), a single regular circular defect of 1.5 mm in diameter was drilled by a low speed drill machine across the whole width of distal femur diaphysis, identically in both the hind legs. In the right hindleg, this defect was filled by injection of 0.05 ml of the composite peptide gel with nanofibers (experimental defect). In the contralateral limb a similar defect was left untreated, without filling (control defect), for spontaneous healing. The group of experimental animals was subsequently divided into four sub-groups (A, B, C, D) for the purpose of further follow-up. One week after the surgical implantation, in the first group of experimental animals (Group A; n = 5) lege artis euthanasia was performed, a radiological examination of both the hind legs was carried out and a sample of the bone from both the control and experimental defect was collected for histologic examination. The other groups of experimental animals were evaluated similarly at 2, 4 and 6 weeks after the surgical procedure (Group B, C, D; n = 5). These groups of experimental animals were assessed using various histological techniques by two independent pathologists.

RESULTS

A difference between the control and the experimental bone defect was observed only at the healing stage at two weeks after the implantation, when a tendency for greater formation of new bone trabeculas was seen in the defect treated with the composite hydro-peptide-gel with PCL nanofibers. The results show a slightly higher angiogenesis and cellularity at the bone defect site with an increase of newly formed bone tissue and faster colonisation of lamellar bone structures by bone marrow cells at early stages of the healing process (1-2 weeks old defect). In the experimental and control groups, at the later stage of healing (4-6 weeks old defect), the process of healing and bone modelling at the defect site shows no detectable morphological differences.

CONCLUSIONS

The experimental use of hydro-peptide-gel with PCL nanofibers *in vivo* in laboratory rats shows very good applicability into the defect site and, compared to the untreated defect within two weeks after the implantation, accelerates the bone healing. This fact could be an advantage especially at the early stage of healing, and thus accelerate the healing of more extensive defects.

Key words: peptide gel, polycaprolactone, PCL, replacement, bone, healing, scaffold, nanofibers, biomaterial.

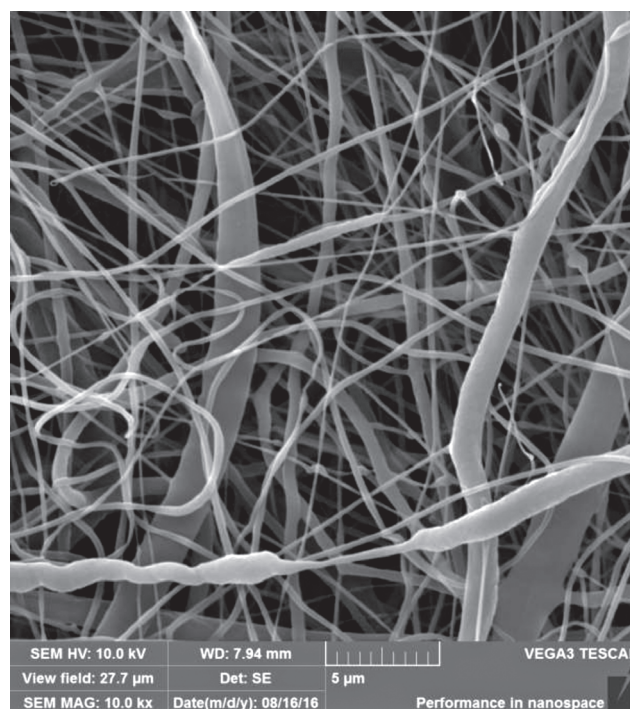
ÚVOD

V důsledku traumatických poranění kostí nebo následkem patologických procesů mohou vznikat i velmi rozsáhlé defekty kostní tkáně. Pro úspěšnou léčbu těchto defektů je vedle vhodné stabilní rigidní fixace postižené kosti nutné provést náhradu kostní hmoty k zachování kontaktu kostních ploch (osteokondukce) a indukce procesu hojení kostní tkáně (sekundární kostní hojení) (9). Taktéž může být poměrně rozsáhlý defekt v integritě kostní tkáně získán iatrogeně po vyjmutí implantátů po zhojení fraktury nebo je součástí neoplastických procesů (10, 18). Zlatým standardem současné doby v klinické humánní i veterinární medicíně pro výplň defektu kostní tkáně je autogenní spongiózní nebo kortiko-spongiózní kostní štěp. Autogenní kostní štěp má všechny komponenty nezbytné pro regeneraci kostní tkáně: osteokonduktivitu, bioaktivní molekuly a buňky (4). To ovšem vyžaduje zvýšení invazivity zákroku na straně pacienta a v případech rozsáhlých defektů neumožňuje dostatečné množství náhradní tkáně. Tuto problematiku pak řeší synteticky vyráběné kostní náhrady, které mají často charakter prefabrikovaných tvarů vyrobených z kalciumfosfátu. Komerčně dostupné kalciumfosfátové biomateriály se odlišují v původu (přírodní nebo syntetické), složení (hydroxyapatit, beta-trikalciumfosfát a dikalciumfosfáty), formě (partikule, bloky, cement, povlak metalických implantátů, kompozity s polymery) a také ve fyzikálně-chemických vlastnostech (pevnost, porozita, kationtové a aniontové složení) (14). Výhodou použití syntetických kostních náhrad je bezesporu také možnost využít materiál jako nosiče bioaktivních molekul nebo léčiv (4). Také naše předchozí práce poukazují na další možnosti biologické stimulace kostní tkáně k podpoře hojení např. v podobě mezenchymálních kmenových buněk nebo dalších syntetických materiálů (5, 16). Pro klinické praktické využití nových materiálů pro výplně defektů kostní tkáně je ovšem také nezanedbatelným požadavkem snadná a jednoduchá aplikace. Takové požadavky nejvíce naplňují gelové formy preparátů, jež se i s minimálním přístupem dají injekčně aplikovat do defektů různorodých tvarů (7, 25). V naší předcházející studii jsme testovali podobný materiál z pohledu mechanické podpory kostní tkáně s velmi dobrými výsledky (19, 20).

Cílem této studie bylo vytvořit vhodný materiál pro náhradu defektů kostní tkáně s dobrou aplikační formou, maximální podporou hojení a potenciálem využití materiálu jako nosiče dalších substancí. Práce směřuje k cíli vytvořit materiál pro praktické klinické využití v humánní i veterinární medicíně.

MATERIÁL A METODIKA

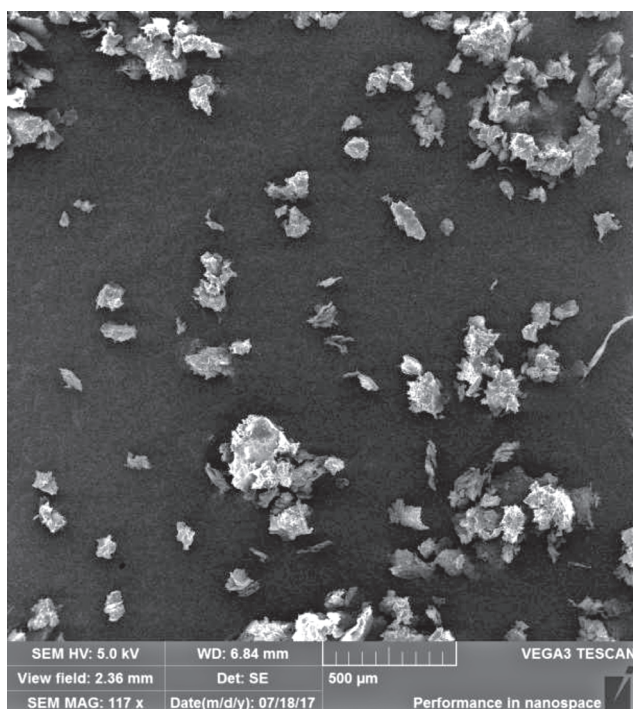
Příprava peptigelu s nanovláknky: Pro vývoj kompozitního gelového skafoldu byl jako základ použit syntetický transparentní PGD-AlphaProA hydropeptigel (Pepti-GelDesign Technologies, X3052). Hydropeptigel využívá specifické peptidy, které se vlivem změn prostředí samouspořádají z tekutých prekurzorů do propletené 3D



Obr. 1. Poly-ε-kaprolaktonová nanovláknka (PCL) vyrobená metodou elektrostatického zvlákňování – snímek SEM.

struktury hydratovaných nanovláken ve formě peptidových beta-helixů. Tento gel byl těsně před implantací v průběhu chirurgického zákroku smísen s mletými poly-ε-kaprolaktonovými nanovláknky (PCL). Pro potřeby experimentu byl využit kompozit vzniklý smícháním 1 ml peptigelu s 16 μg PCL nanovláken. PCL nanovláknka byla vyrobena metodou elektrostatického zvlákňování z roztoku PCL na vysokonapětovém zařízeníTM NS 1S500U společnosti Elmarco, s.r.o. Roztok PCL byl připraven rozpuštěním 24 g granulovaného PCL (MW 40 000, Sigma-Aldrich) ve 100 ml 90% roztoku chloroformu s etanolem (PENTA, 90 ml chloroform a 10 ml etanol). Připravenou matici tvořila vlákna, jejichž průměr byl v rozmezí několika nano- až mikrometrů (obr. 1). Nanovláknka byla následně namleta na mikročástice metodou kryogenního mletí (FreezerMill, Spex, Certiprep, USA) (obr. 2). Jako chladicí médium byl použit kapalný dusík. Mletí bylo provedeno ve třiceti cyklech, kde jeden cyklus se skládal z jedné minuty mletí a jedné minuty ochlazování vzorku.

Experimentální implantace: Všechny experimenty na pokusných zvířatech byly provedeny v souladu legislativními pravidly, schváleny etickou komisí VFU Brno a prováděny na základě schváleného Projektu pokusu č. PP 23/2016. Pokusná skupina byla složena pouze ze samců laboratorních potkanů Wistar v průměrném věku 96 dní (min. 92 dní, max. 101 dní) s průměrnou vahou 539 g (min. 474 g, max. 653 g). U modelových experimentálních zvířat (n = 20) byla navozena celková anestezie intraperitoneálním podáním medetomidinu (Domitor, OrionPharma) v dávce 0,05 ml a ketaminu (10% Narketan, Vetoquinol) v dávce 0,15 ml pro toto.



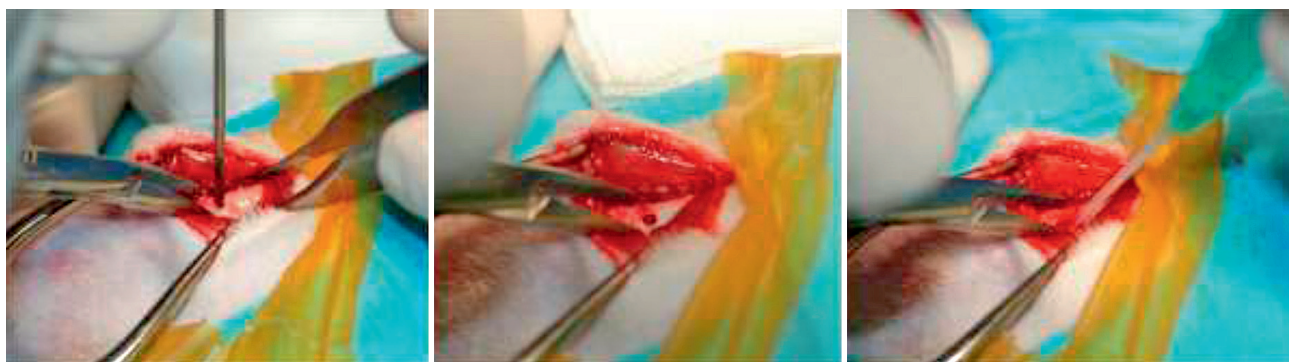
Obr. 2. Poly-ε-kaprolaktonová nanovláknina (PCL) po kryogením mletí – snímek SEM.

Anestezie byla dále vedena inhalační maskou kombinací Isofluranu (Aerrane Isoflurane USP, Baxter) a medicijnálního kyslíku. Před vlastním chirurgickým výkonem byl aplikován amoxicilin klavulanát v dávce 0,1 ml pro toto i.m. (Synulox RTU, Pfizer) a meloxicam v dávce 0,05 ml pro toto s.c. (Metacam, Boehringer Ingelheim). V rámci experimentu byl v celkové anestezii proveden otevřený přístup k distální diafýze femuru na obou pánevních končetinách. Pod vizuální kontrolou byl nízkootáčkovou vrtačkou vyvrtán jeden pravidelný kruhový defekt vrtákem o průměru 1,5 mm v celé šířce distální diafýzy femuru totožně na obou pánevních končetinách pokusného zvířete. Na levé končetině byl defekt ponechán ke spontánnímu vyhojení (kontrolní defekt) a na pravé končetině byl tento defekt vyplněn injektáží kompozitu peptigelu s nanovlákniny (experimentální defekt). Do ex-

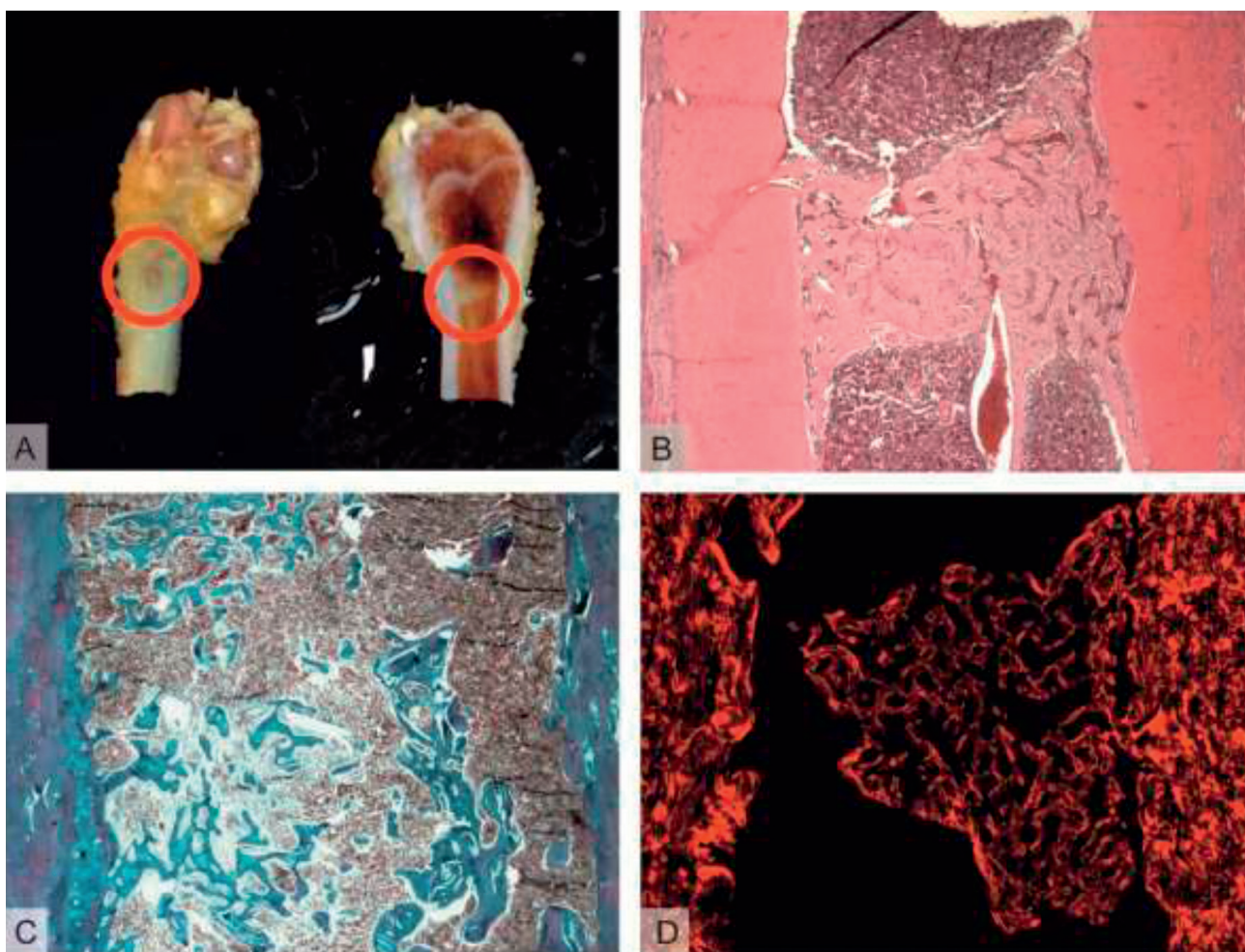
perimentálního defektu byl scaffold injektován 1 ml stříkačkou přes flexibilní intravenózní kanylu o průměru 1,3 mm (18G). Do každého defektu bylo injektováno 0,05 ml kompozitu (obr. 3). Po implantaci byl proveden chirurgický uzávěr rány. Soubor experimentálních zvířat byl pro další sledování rozdělen do čtyř skupin (A, B, C, D). Jeden týden po chirurgické implantaci byla první skupina pokusných zvířat (sk. A; $n = 5$) lege artis utracena, bylo provedeno rtg vyšetření obou pánevních končetin a odběr vzorku kosti z kontrolního i experimentálního defektu k histologickému hodnocení. Další skupiny pokusných zvířat byly obdobně vyhodnoceny v období 2, 4 a 6 týdnů po chirurgickém zákroku (sk. B, C, D; $n = 5$).

Histologické hodnocení: Získané histologické vzorky byly rozděleny na dvě části a každá byla nezávisle posouzena jedním histologem za využití rozdílných metod hodnocení.

První část histologických vzorků byla získána ze dvou experimentálních a jednoho kontrolního defektu z každé skupiny (A, B, C, D), tj. celkem 4 kontrolní a 8 experimentálních defektů. Jeden kontrolní defekt z každé skupiny, tj. 4 kontrolní vzorky byly znehodnoceny technickou chybou při zpracování a vzorky nebyly dále posuzovány. Všechny posuzované vzorky byly po dobu osmi týdnů dekalifikovány ve 12,5% roztoku kyseliny etylenediaminotetraoctové (EDTA, Komplexon III p.a., Penta, Prague, Czech Republic) neutralizované na pH = 7 přidáním 1,25% (w/w) NaOH. Po osmi týdnech byl ze vzorku roztok EDTA 24 hodin vymýván fyziologickým roztokem. Tkáňové bloky byly získány rozříznutím každého vzorku v centrální části defektu na dvě stejné části, které byly následně samostatně zpracovány. Z každého fixovaného parafinového tkáňového bloku byly vytvořeny histologické řezy o síle 5 μ m. Histologické řezy byly získány z centrální části hojení kostního defektu a následně barveny s využitím tří odlišných histologických metod: hematoxylin-eosin, Verhoeffovo hematoxylinové barvení se zeleným trichromem (13) a barvení pikrosaturnovou červení (obr. 4). Pikrosaturnová červená (Direct Red 80, Sigma Aldrich, Munich, Germany) rozpuštěná v nasyceném roztoku kyseliny pikrové byla použita k vizualizaci kolagenu typu I (17). Z každého tkáňového bloku byly pořízeny čtyři mikrofotografie



Obr. 3. Vytvoření kostního defektu 1,5 mm v distální části diafýzy femuru u laboratorního potkana a implantace kompozitního scaffoldu hydropeptigel/PCL.



Obr. 4. Metodika A – Experimentální defekt v distální části diafýzy femuru u laboratorního potkana, vzorek k histologické analýze před zpracováním; B – histologický řez kostním defektem v barvení hematoxylin-eosin; C – histologický řez kostním defektem v barvení Verhoeffovým hematoxylinem se zeleným trichromem; D – histologický řez kostním defektem v barvení pikro-saturnovou červení pozorován v polarizovaném světle.

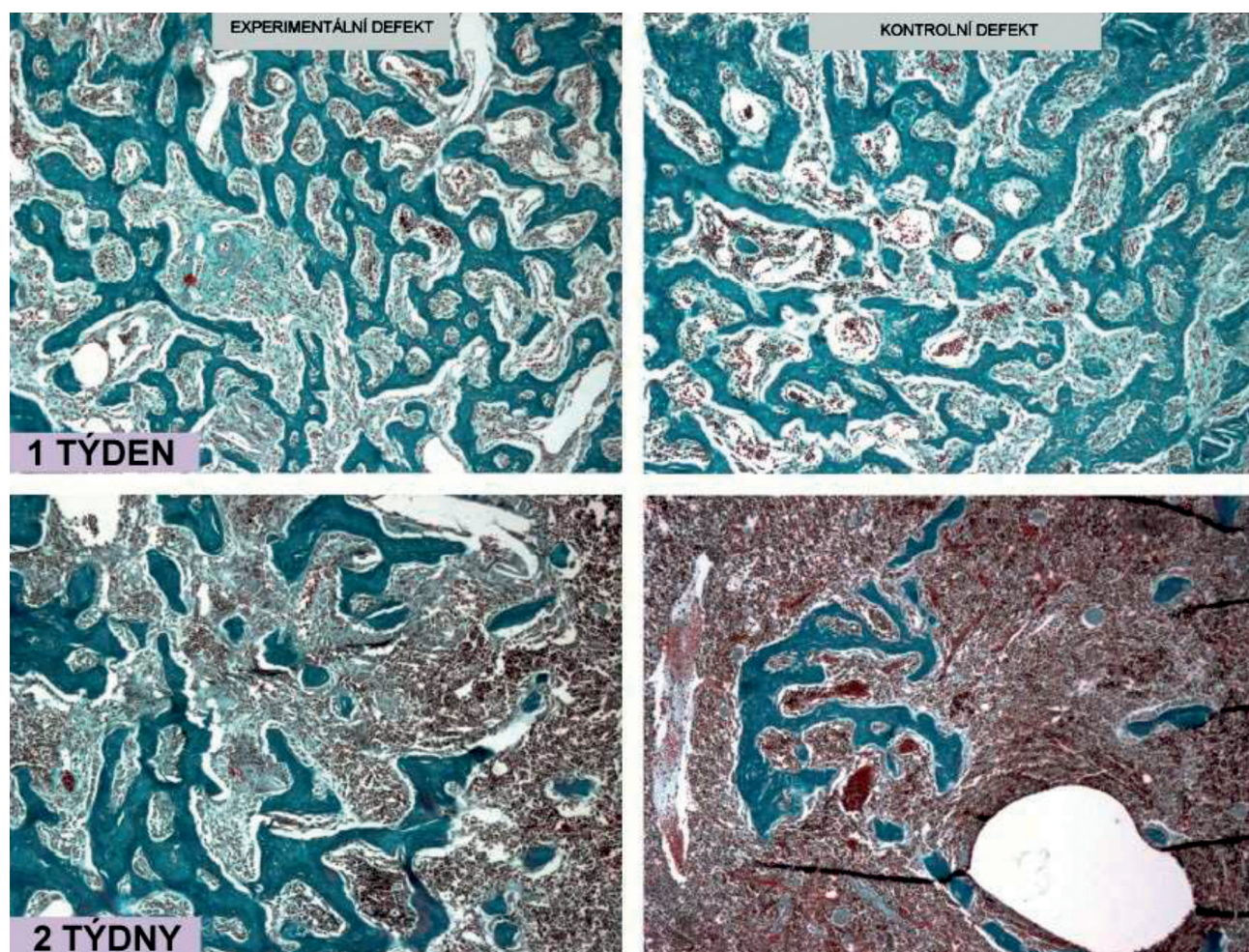
s 4násobným zvětšením objektivu. Kvantifikace objemu kostní tkáně respektive objemu kolagenu typu I ve sledovaném defektu byla provedena s využitím softwaru Ellipse (ViDiTo, Košice, Slovak Republic) s bodovou mřížkou (15). V této části hodnocení nebyla využita statistická analýza pro srovnání kontrolních a experimentálních vzorků (pro malý počet vzorků v každé testované skupině).

Druhá část histologických vzorků byla získána ze tří experimentálních a tří kontrolních defektů z každé skupiny (A, B, C, D), tj. celkem 12 kontrolních a 12 experimentálních defektů. V histologických řezech kontrolního a experimentálního defektu kostní tkáně byla sledována celularita/osteoblastická aktivita v novotvořené kostní tkáni v místě defektu (měřeno v zorném poli při velkém zvětšení 400x) jako průměrný počet buněk v celkem deseti zorných polích. Vzorky byly v tomto hodnocení porovnány v rámci skupiny vždy samostatně u jednoho pokusného zvířete párovým způsobem (kontrolní versus experimentální defekt) a statisticky porovnána parametrickým t-testem pro párová data (KyPlot version 2.0 beta 15–32 bit).

VÝSLEDKY

Délka anestezie zvířat v průběhu experimentu byla průměrně 79 minut (min. 60 minut, max. 115 minut) a ve všech případech bylo probuzení z anestezie bez komplikací. Délka vlastního chirurgického zákroku byla průměrně 32 minut (min. 20 minut, max. 45 minut) s bezproblémovým průběhem. Ve sledovaném období byla velmi dobrá klinická odezva u všech pokusných zvířat (kompletní zhojení operační rány, chůze bez kulhání).

V případě prvního histologického hodnocení nebyl zjištěn rozdíl mezi kontrolním a experimentálním defektem u skupiny A po 1 týdnu hojení. Nově vytvořené kostní trabekuly byly distribuovány stejnoměrně v místě hojení kosti. Vzorek kostního defektu z experimentální skupiny B vyplněný kompozitem hydropeptigelu/PCL po dvou týdnech hojení obsahoval více kostních trabekul uvnitř defektu v porovnání s kontrolním defektem (obr. 5). Po 4 a 6 týdnech hojení (skupina C a D) nebyl dále zaznamenán rozdíl mezi vzorky kontrolními a experimentálními. V tomto intervalu hojení bylo navíc



Obr. 5. Srovnání formace nových kostních trabekul (tmavě modrá) u experimentálního a kontrolního defektu kosti za 1 a 2 týdny procesu hojení (skupina A a B).

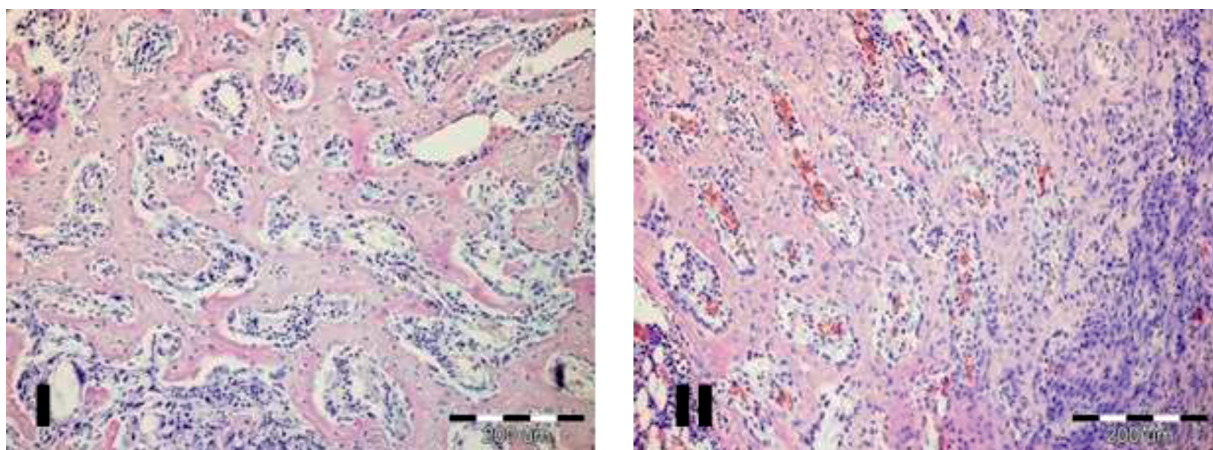
menší množství formované kosti uvnitř pozorovaného defektu než u vzorků (kontrolních i experimentálních) po 1 a 2 týdnech hojení (skupina A a B). Po dvou týdnech hojení byly v histologickém řezu také četně za-

Tab. 1. Individuální hodnoty objemu kostní tkáně a kolagenu typu I (mm^3) v průběhu hojení u kontrolních i experimentálních kostních defektů

Skupina	Vzorek	Výplň kontrolní/ experimentální (mm^3)	Týdny hojení	Objem kosti uvnitř defektu (mm^3)	Objem kolagenu I uvnitř defektu
A	1	experimentální	1	0,031	0,028
	2	experimentální	1	0,032	0,032
	1	kontrolní	1	0,034	0,033
B	6	experimentální	2	0,016	0,022
	7	experimentální	2	0,017	0,021
	6	kontrolní	2	0,008	0,006
C	11	experimentální	4	0,004	0,002
	12	experimentální	4	0,001	0,001
	11	kontrolní	4	0,000	0,000
D	16	experimentální	6	0,008	0,003
	17	experimentální	6	0,003	0,002
	16	kontrolní	6	0,000	0,000

stoupeny kost resorbující osteoklasty. Objem kostní tkáně uvnitř defektu vykazoval významnou pozitivní korelaci s objemem kolagenu typu I (Spearman $R = 0,97$; $P < 0,05$) (tab. 1).

V případě druhého histologického hodnocení byla u skupiny A (1 týden po operaci) a B (2 týdny po operaci) plocha novotvořené kostní tkáně u experimentálního defektu hustěji osídlena osteoblasty (průměrný počet buněk v zorném poli při zvětšení 400x u sk. A = 212, resp. u sk. B = 300) ve srovnání s kontrolním defektem (průměrný počet buněk v zorném poli při zvětšení 400x u sk. A = 132, resp. u sk. B = 176; $P \leq 0,01$) (obr. 6). Zároveň byla pozorována proliferace perivaskulárních a endoteliálních buněk cévních anastomóz s depozicí lamelární kosti a tvorbou osteonů. U skupin C a D (4 a 6 týdnů po operaci) nebyly morfologicky pozorovány rozdíly ve stavbě kostní tkáně a kostní dřeně v místě defektu mezi experimentálním a kontrolním defektem. V místě defektu v lokalizaci periostu byla u skupin C a D (kontrolní i experimentální kostní defekt) pozorována depozice trámečků vláknité kosti aktivovanými periostálními osteoblasty (obecná reakce/proces hojení v místě narušení periostu).



Obr. 6. Histologický preparát z místa defektu na distálním femuru, sk. B – 2 týdny po vytvoření defektu, barvení hematoxylin-eosin, zvětšení 200x: I – kontrolní defekt bez výplně; II – experimentální defekt výplněný kompozitem hydropeptigel/PCL.

DISKUSE

Výzkum materiálů v oblasti tkáňového inženýrství kostních struktur je progresivně rostoucí obor úzce spojený s rozvojem materiálových technologií. Vývoj v tomto odvětví se odehrává paralelně v rámci acelulárních a celulárních systémů (3). Experimentálně se mohou využít k výplni defektů kostí materiály přírodního charakteru (24), ale nejrozšířenějšími materiály pro výrobu scaffoldů jsou biodegradabilní syntetické polymery a jejich kompozity (2, 12). Z hlediska designu scaffoldů pro kostní náhrady jsou velmi důležitými vlastnostmi biofunkcionalita, biokompatibilita, bioresorbovatelnost, biodegradabilita, mechanické vlastnosti a porozita. Z dalších vlastností je zohledňována úloha scaffoldu jako nosiče léčiv, radiolucence, tvarovatelnost, sterilizovatelnost a stabilita při skladování (23). Velmi aktuálními trendy v chirurgických oborech posledních let jsou obecně miniinvasivní techniky. V našem případě byl vytvořený defekt v distální části diáfýzy femuru relativně malé velikosti se zachováním mechanické pevnosti stehenní kosti. Proto nebylo nutné posílení mechanické pevnosti kosti fixací v průběhu experimentu. Tato situace demonstruje defekty kosti po vyjmutí implantátů, kdy nedokončená remodelace kosti a defekty po vyjmutých implantátech mohou za určitých podmínek přispět ke komplikacím ve formě refraktur. Pro analýzy kostního hojení u rozsáhlejších defektů (imitace kominutivních fraktur a ostektomií) je ovšem mechanická podpora kosti nezbytná (přemostující osteosyntéza interními metodami fixace, externí fixace). V případě léčby zlomenin miniinvasivními technikami jsou upřednostňovány stabilní ploténkové systémy s minimalizovaným přístupem k linii lomu (8). Možnosti aplikace syntetických pevných náhrad kostní tkáně v těchto případech jsou velmi omezené. Do popředí se tak dostávají scaffoldy s možností injekční aplikace do místa defektu (7, 11, 25). Vývoj těchto materiálů je proto stále velmi aktuální. U některých vyvíjených materiálů se v průběhu testování zjistí jejich horší biologická snášenlivost, jako v případě syntetického *poly(caprolactone-trifumarate)*, kde výsledky ukazují střední cytotoxicitu (1). Nejčastěji využívaným nosným

médium jsou popisovány hydrogely s velmi dobrými výsledky. Hydrogely vykazují dobrou snášenlivost a mechanickými i strukturálními vlastnostmi se podobají extracelulární matrix. Zlepšení bioaktivity mechanické odolnosti je pak dosaženo tvorbou kompozitů přidáním pevných nanočástic (6, 22). Obdobnou koncepci kompozitu jsme zvolili při designování našeho scaffoldu, kdy nosným médium byl peptigel podpořen přidáním nanočástic PCL. Materiál vykazoval velmi dobrou aplikovatelnost. Je však nutné kontrolovat perioperační krvácení, kdy v případech většího krvácení se má tendenci kompozit z místa aplikace vyplavovat. To by mohl být větší problém zejména v případech rozsáhlých defektů. Částečně by tento jev mohl být omezen změnou poměru peptigelu a PCL. Tato pilotní studie sledovala pouze vliv kompozitního scaffoldu jako celku na průběh hojení defektu. Velmi důležitou informací by ovšem také bylo srovnání hojení defektu s využitím pouze samotného peptigelu (druhá kontrola) a různého poměru PCL nanovláken (experimentální defekty). Takto by bylo možné nejenom zhodnotit míru vlivu samotných PCL nanovláken na proces hojení, ale také strukturální změny kompozitního scaffoldu, které mají vliv na aplikovatelnost scaffoldu do místa defektu. Každopádně vliv PCL nanovláken v hydropeptigelu je taktéž ve schopnosti nést další navázané látky. Menší mechanická podpora defektu injektovatelnými scaffoldy je vyvážena vlastnostmi dobré aplikovatelnosti a možnostmi adice dalších bioaktivních látek a léčiv (21). Výsledky hojení kostního defektu po aplikaci peptigel/PCL kompozitu vykazují akceleraci v počáteční fázi procesu hojení nezávisle v obou histologických hodnoceních. V hodnocení byla u skupiny A (1 týden po operaci) a B (2 týdny po operaci) plocha novotvořené kostní tkáně u experimentálního defektu hustěji osídlena osteoblasty, což je pravděpodobně pozitivní efekt kompozitního scaffoldu, kdy je podpořena migrace, diferenciace a růst osteoblastů. Po jednom týdnu hojení však ještě nebyl pozorován rozdíl v objemu kostní hmoty u vzorků bez ošetření – kontrolní defekt a u vzorků ošetřených implantací kompozitem hydropeptigel/PCL – experimentální defekt. Nově formované kostní trabekuly byly rovnoměrně

distribuoány uvnitř hojeného defektu. Četný výskyt osteoklastů po dvou týdnech hojení pravděpodobně znamená počátek absorpce nově vzniklých kostních trabekul v další fázi hojení kosti. Resorbce nově tvořených kostních trabekul byla pravděpodobně rychlejší u kontrolního defektu než u defektu s peptigelem/PCL v delším časovém úseku hojení, protože objem kostní tkáně byl u defektů s implantovaným materiálem po dvou týdnech hojení větší. Resorbce byla pozorována zejména v oblasti dřevové dutiny, kde za fyziologických podmínek je jen malé množství kostních trabekul. I přes limitovanou velikost posuzovaného souboru experimentálních zvířat jsou závěry podpořeny faktem dvou nezávislých histologických posouzení. Přesto by další rozsáhlejší studie byla přínosem. Testování kompozitu v rozsáhlejších kostních defektech může přinést další cenné informace. V těchto případech by ovšem bylo nezbytné využití vhodné fixace a přemostění kostního defektu mechanickou podporou. Tato pilotní studie ukazuje pozitivní vliv kompozitního skafoldu hydropeptigel/PCL, avšak k dokonalému komplexnímu posouzení míry podpory procesu hojení skafoldem jsou nezbytné další navazující studie.

ZÁVĚR

Rozdíl mezi kontrolním a experimentálním kostním defektem byl pozorován jen ve fázi hojení dva týdny po implantaci. Zde byla sledována tendence tvorby většího množství nových kostních trabekul u defektu ošetřeného kompozitem hydropeptigelu s PCL nanovláknky v porovnání s neošetřeným kontrolním defektem. Výsledky ukazují mírně vyšší angiogenezi a celularitu v místě kostního defektu s nárůstem novotvořené kostní tkáně a rychlejší osídlování lamelárních kostních struktur buňkami kostní dřevě, a to převážně v časných fázích procesu hojení (stáří defektu 1–2 týdny). U experimentálních i kontrolních skupin v pozdější fázi hojení (stáří defektu 4–6 týdnů) je morfologicky vzhled dalšího procesu hojení a modelace kosti v místě defektu obdobný, tj. bez detekovatelných morfologických rozdílů.

Tato intenzivnější aktivita osídlování osteoblasty, projevující se v časné fázi hojení kostních defektů vyplněných kompozitem peptigelu s nanovláknky, by za příznivých podmínek mohla mít výrazný vliv na rychlost zhojení zejména u rozsáhlejších kostních defektů.

Literatura

- Al-Namnam NM, Kim KH, Chai WL, Ha KO, Siar CH, Ngeow WC. A biokompatibilit study of injectable poly(caprolactone-trifumarate) for use as a bone substitute material. *Front Life Sci.* 2015;8:215–222.
- Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* 2012;30:546–554.
- Burg KJL, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2000;21:2347–2359.
- Carson JS, Bostrom MPG. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. *Injury.* 2007;38(S1):S33–S37.
- Crha M, Nečas A, Srnc R, Janovec J, Stehlík L, Raušer P, Urbanová L, Plánka L, Jančář J, Amler E. Mesenchymal stem cells in bone tissue regeneration and application to bone healing. *Acta Vet. Brno.* 2009;78:635–642.
- Dhivya S, Saravanan S, Sastry TP, Selvamurugan N. Nanohydroxyapatite-reinforced chitosan composite hydrogel for bone tissue repair in vitro and in vivo. *Nanobiotechnol.* 2015;13:40.
- Fang J, Yang Z, Tan S, Tayag C, Nimni ME, Urata M, Han B. Injectable gel graft for bone defect repair. *Reg Med.* 2013;9:41–51.
- Hudson CC, Pozzi A, Lewis DD. Minimally invasive plate osteosynthesis: Applications and techniques in dogs and cats. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2009;22:175–182.
- Hulse D, Hyman B. Fracture biology and biomechanics In: Slatter D. Textbook of small animal surgery. Saunders, Philadelphia, 1993, pp 1785–1792.
- Chanoit G, Mathon DH, Autefage A. Principles of bone healing. Application to segmental bone defects. *Rev Med Vet.* 1999;150:851–866.
- Chen Z, Zhang X, Kang L, Xu F, Wang Z, Cui F, Guo Z. Recent progress in injectable bone repair materials research. *Front Mater Sci.* 2015;9:332–345.
- Liu X, Holzwarth JM, Ma PX. Functionalized synthetic biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Macromol Biosci.* 2012;12:911–919.
- Kočová J. Overall staining of connective tissue and the muscular layer of vessels. *Folia Morphol.* 1970;18:293–295.
- Legeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates. *Clin Orthop. Relat Res.* 2002;395:81–98.
- Mouton PR. Principles and practices of unbiased stereology. An introduction for biologists. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, USA, 2002.
- Nečas A, Plánka L, Srnc R, Raušer P, Urbanová L, Lorenzová J, Crha M, Jančář J, Gál P. Biomaterials and stem cells in the treatment of articular cartilage, meniscal, physeal, bone, ligamentous and tendinous defects. *Acta Vet Brno.* 2008;77:277–284.
- Rich L, Whittaker P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz J Morphol Sci.* 2005;22:97–104.
- Rosson J, Egan J, Shearer J, Monro P. Bone weakness after the removal of plates and screws – cortical atrophy or screw holes. *J Bone Joint Surg Br.* 1991;73:283–286.
- Srnc R, Fedorová P, Pěňčík J, Vojtová L, Sedlinská M, Nečas A. Ex vivo testování mechanických vlastností metakarpálních/metatarsálních kostí psů po simulovaném vyjmutí implantátů. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech.* 2016;83:111–116.
- Srnc R, Urbanová L, Kořínek M, Bareš F, Harazinová K, Nečas A. Využití nového biomateriálu s nanovláknky k léčbě defektů kostní tkáně. Sborník konference Interní grantové agentury VFU Brno. 2016:54–56.
- Tommasi G, Perni S, Prokopovich P. An injectable hydrogel as bone graft material with addend antimicrobial properties. *Tissue Eng Part A.* 2016;22:862–872.
- Van TD, Tran NQ, Nguyen DH, Nguyen CK, Tran DL, Nguyen PT. Injectable hydrogel composite based gelatin-PEG and biphasic calcium phosphate nanoparticles for bone regeneration. *Miner Met Mater Soc.* 2016;45:2415–2422.
- Velasco MA, Narváez-Tovar CA, Garzón-Alvarado DA. Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering. *BioMed Res Int.* 2015;2015:729076.
- Vuola J, Böhring T, Kinnunen J, Hirvensalo E, Asko-Seljavaara S. Natural coral as bone-defect-filling material. *J Biomed Mater Res.* 2000;51:117–122.
- Yasmeen S, Lo MK, Bajracharya S, Roldo M. Injectable scaffolds for bone regeneration. *Langmuir.* 2014;30:12977–12985.

Korespondující autor:

MVDr. Robert Srnc, Ph.D.
Oddělení chirurgie a ortopedie
Klinika chorob psů a koček,
Fakulta veterinárního lékařství
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Palackého tř. 1946/1
612 42 Brno
E-mail: srncr@vfu.cz