

Schopnost kostní reparační u pacientů podstupujících implantaci TEP kyčelního kloubu

Bone Healing Capacity in Patients Undergoing Total Hip Arthroplasty

T. KUČERA¹, T. SOUKUP², O. KRS³, K. URBAN¹, P. ŠPONER¹

¹ Ortopedická klinika FN a LF UK Hradec Králové

² Ústav histologie a embryologie LF UK Hradec Králové

³ Ústav anatomie LF UK Hradec Králové

ABSTRACT

PURPOSE OF THE STUDY

To identify some characteristics of bone repair capacity in elderly patients who undergo total hip arthroplasty, which requires good healing ability of bone for implant osteointegration and bone defect repair, particularly if revision arthroplasty is necessary.

MATERIAL AND METHODS

In a group of 27 patients (mean age, 70±7 years; range, 60 to 81 years) a coincidence of osteoarthritis and osteopenia/osteoporosis was assessed, and mesenchymal stem cells (MSC) were isolated and their numbers, viability and proliferative capacity were evaluated. The MSC populations were examined for their behaviour on bone tissue scaffolds used in orthopaedic surgery for treatment of bone lesions. Each patient underwent bone densitometry examination before total hip arthroplasty. Bone marrow was harvested intra-operatively from the trochanteric region of the femur. From a portion of bone marrow, MSCs were isolated and cultured, and a mononuclear cell concentrate was obtained. Either whole bone marrow or a mononuclear cell concentrate was applied to selected matrices (allograft, demineralised bone matrix, porous beta-tricalcium phosphate (-TCP), pressed hydroxyapatite or calcium sulphate). The production of new collagen and extracellular mineralized matrix were first assessed in expansion medium and, when the production was low, differentiation medium was used.

RESULTS

A coincidence of osteoarthritis and osteopenia/osteoporosis was found in 50% of the patients. All were women with a low body mass index and had been post-menopausal for an average of 23 years. The isolated MSCs contained a high percentage of viable cells (mean, 95%).

The mesenchymal cells of patients with osteopenia, as compared with those having normal bone density, showed markedly lower numbers of fibroblastic colony forming units (CFU-F) per ml and had a lower proliferative capacity because the population doubling time during the first four passages was much longer. Of the scaffolds tested, allografts showed the most marked collagen and extracellular mineralized matrix production in expansion medium with either whole bone marrow or a monocyte concentrate; porous -TCP was the best of bone graft substitutes in collagen and extracellular mineralized matrix production by both whole bone marrow and a monocyte concentrate, but this was only in differential medium.

DISCUSSION

The coincidence of osteoarthritis with osteopenia/osteoporosis was found in a higher number of our patients than is reported in the literature. Also, a lower MSC proliferative capacity and a low number of CFU-F/ml in the patients with low bone density were interesting findings. Better bone regeneration would generally be achieved with higher MSC numbers and the use of growth factors for stimulation of osteoinduction and angiogenesis. Bone marrow harvesting for MSC isolation, cultivation and subsequent transplantation is currently feasible only in an experiment. A bone marrow aspirate can be applied, but it may not provide a sufficient number of MSCs. In addition to autologous bone grafts, the best collagen production was on allografts. In bone graft substitutes, the porous structure played an important role because on a non-porous material (calcium sulphate) the formation of collagen was very low. There was no difference in collagen and extracellular mineralized matrix production between whole bone marrow and monocyte concentrates.

CONCLUSIONS

Elderly patients have reduced bone healing capacity also because of osteopenia/osteoporosis that occurs more often than it is generally diagnosed, including its coincidence with osteoarthritis. The mesenchymal stem cells isolated from osteopenic bone give a lower number of CFU-F/ml and have a lower proliferative capacity. Of the matrices for new bone formation, allografts showed the best results because collagen was produced already in expansion medium. Of the graft substitutes, porous -TCP was the best, but with collagen production in differential medium. The use of bone marrow aspirate is currently a method of choice in order to increase MSC numbers at the site of bone healing. The use of growth factors is an expensive treatment. To achieve the goal of reliable promotion of osteogenesis with cultured MSC transplantation and use of composite materials with pro-osteogenic and pro-angiogenic factors will still require many experimental and clinical studies.

Key words: osteoporosis, mesenchymal stem cells, allogeneic bone graft, bone graft substitutes.

ÚVOD

Současná ortopedie, stejně jako ostatní lékařské obory, je konfrontována se skutečností, že se prodlužuje průměrný věk a stoupá počet seniorů. Z hlediska pohybového aparátu to znamená narůstající množství degenerativních kloubních onemocnění a zlomenin v osteoporotické kosti, ale také zvyšující se nároky na tento systém. Materiálově mechanický přístup vedl k náhradě poškozené kostní tkáně a rozvoji endoprotetiky. Vzhledem k nastoupenému trendu je v současné době nutné minimalizovat rizika selhání implantátů a prodloužit jejich životnost, což vede k hledání biologicky založených přístupů nejen při konstrukci povrchů protéz (15), ale také k podpoře a urychlení tkáňové reparace.

S problematikou obnovení tkáně – kostního hojení – se setkáváme v každodenní ortopedické a traumatologické praxi. Nejčastěji jsme nuceni léčit kostní defekty v rámci revizní endoprotetiky, dále při ošetření nádorům podobných afekcí, benigních, případně maligních kostních tumorů. V traumatologii je to pak hojení zlomenin a léčba paklobů. Cílem správného zhojení je tvorba plnohodnotné kostní tkáně schopné remodelace a přenosu zátěže. K dosažení tohoto výsledku je nutný dostatečný počet mezenchymálních kmenových buněk (MKB) a jejich diferenciaci v osteoprogenitorové buňky. Zároveň je nezbytná kvalitní angiogeneze k zajištění metabolismu. K vývoji kostní novotvorby jsou třeba prosteogenní růstové faktory a vhodná trojrozměrná matrice, ve které mají MKB optimální prostředí k proliferaci a diferenciaci. Touto maticí mohou být autologní nebo allogenní kostní štěpy včetně demineralizované kostní matrix a dále celá řada umělých náhrad kostních štěpů (7, 28).

Cílem této studie bylo zjištění základních parametrů schopnosti kostní reparace u starších pacientů podstupujících implantaci totální endoprotézy kyčelního kloubu, u nichž je nezbytné kvalitní kostní hojení pro osteointegraci endoprotézy a pro hojení kostních defektů, zejména v případě revizních operací.

SOUBOR PACIENTŮ A METODIKA

Hodnotili jsme soubor 27 pacientů podstupujících implantaci totální endoprotézy kyčelního kloubu pro diagnózu primární artrózy IV. stupně – 24 ženy a 3 muže s průměrným věkem 70 ± 7 let (60 až 81 let). Z hlediska vlivu osteopenie/porózy byly hodnoceny pouze ženy, u kterých bylo provedeno předoperační denzitometrické vyšetření.

V tomto souboru jsme sledovali koincidenci artrózy a osteopenie/porózy, izolovali jsme MKB a stanovovali jejich počet, viabilitu a proliferaci schopnost. Dále jsme zkoumali, jakým způsobem se MKB chovají na vybraných nosičích kostní tkáně užívaných v naší ortopedické praxi při léčbě kostních defektů.

Odběr kostní dřeně byl schválen etickou komisí od pacientů, kterým byla implantována totální endoprotéza kyčelního kloubu po podepsání informovaného souhla-

su. Vyloučení byli pacienti s anamnézou nádorového nebo infekčního onemocnění, nemocní podstupující dialyzační léčbu a nemocní po transplantaci, dále pacienti s farmakologickou anamnézou kortikosteroidní, cytostatické a imunosupresivní terapie. Před vlastní operací byla provedena denzitometrie a pacienti byli rozříděni na skupiny s normální a nízkou kostní denzitou dle T-skóre. Kritéria pro hodnocení osteoporózy dle T-skóre: (+/- 1) zdravá populace, (-1/-2,5) osteopenie, (-2,5 a méně) osteoporóza. Z předoperačního rtg byl stanoven Singhův index (23). Před provedením osteotomie krčku stehenní kosti jsme standardním způsobem pomocí troakáru aspirovali z trochanterické oblasti femuru ze dvou vpichů 2x 10 ml kostní dřeně do předem heparinované 10ml stříkačky. Všichni pacienti byli operováni ve spinální anestezii. Buněčná suspenze byla převedena do vychlazeného (4 °C) PBS pufru (Invitrogen, USA) ředěného s aqua pro inj. v poměru 1:10. Poměr kostní dřeně a PBS pufru byl 1:1. Za aseptických kautel byla dřeň transportována do laboratoře tkáňových kultur Ústavu histologie a embryologie. Zde byla část dřeně oddělena, z části byl získán mononukleární koncentrát a izolovány MKB. Mononukleární buňky byly získány centrifugací 30 min při 2800 ot/min na základě Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Švédsko) vztlakového gradientu a byla využita jejich adherence k plastům v případě nasazení plné kostní dřeně a hodnocení schopnosti tvořit kolonie (CFU). Buňky byly kultivovány na TPP Petriho miskách (Nunc, Dánsko) při 37 °C za aerobních podmínek (5% CO₂) v expanzním médiu obsahujícím 2 % fetálního telecího séra. Toto expanzní médium se skládalo z Eaglova minimálního esenciálního média v alfa modifikaci – alpha-MEM (Invitrogen, USA), fetálního telecího séra (PAA, Rakousko), 2-fosfátu kyseliny askorbové (Sigma, USA), dexamethasonu (Sigma, USA), L-glutaminu (Invitrogen, USA), penicilinu a streptomycinu (Invitrogen, USA). Po dosažení 70% splyvavosti byly buňky uvolněny 0,25% trypsin-EDTA (Invitrogen, USA). Buňky jsme počítali pomocí přístroje Z2 Counter (Beckman Coulter, USA). Viabilita byla analyzována přístrojem Vi-Cell XR (Beckman Coulter, USA). Primokultura byla pasážována mezi 7. až 14. dnem, podle vzhledu kolonií. Další pasáže byly indikovány vždy po dosažení 70% splyvavosti. V průběhu dlouhodobé kultivace v základních médiích byly pro každou pasáž stanovovány dvě základní biologické charakteristiky – počet populačních zdvojení (No. of population doublings) a čas potřebný na zdvojnásobení populace (Doubling time). K výpočtu jsme použili tři základní parametry – počet nasazených buněk, počet buněk v kultuře po pasáži a čas, který uplynul mezi pasážemi. Izolované MKB jsme vizualizovali mikroskopii s fázovým kontrastem. V další fázi jsme testovali chování MKB od vybraných dárců s normální kostní denzitou na trojrozměrných nosičích kostní tkáně. Vzhledem k tomu, že je v současné době nemožné použití nakultivovaných MKB v klinické praxi, nanášeli jsme na připravené nosiče buď 3 ml aspirované kostní dřeně nebo 3 ml monocytárního koncentrátu. Kultivace probíhala v expanzním médiu 2 týdny, poté byly vzorky zpra-

covány pro elektronovou mikroskopii – trojrozměrné agregáty byly fixovány 24 hodin ve 4% roztoku formaldehydu, po promytí destilovanou vodou byly vzorky odvodněny vzestupnou etanolovou řadou, převedeny do 100% hexamethylsilazanu a vysušeny na vzduchu v digestoři při teplotě laboratoře (24). Potom následovalo pokovení naprášením zlatem v tloušťce 15 nm v přístroji Polaron SC 7620 (Quorum Technologies, Velká Británie). Vzorky byly pozorovány a fotografovány v rastrovacím elektronovém mikroskopu Tesla BS 301 (Tesla, Česká republika) při zobrazení v módu sekundárních elektronů při urychlovacím napětí 25 kV.

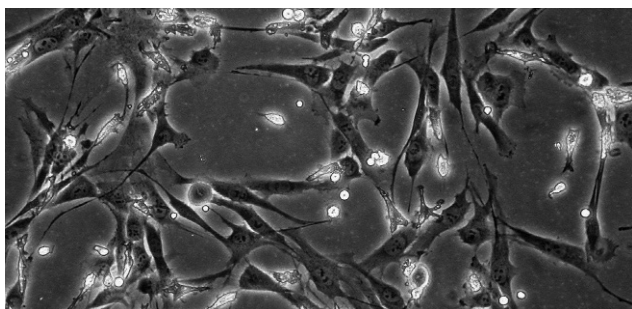
Hodnotili jsme přítomnost kolagenu. Tam, kde nebyla jeho tvorba dostatečná, jsme použili diferenciační médium s 10% FCS a přidavkem kyseliny L-askorbové (Sigma, USA) 0,5 mM/l, beta-glycerofosfátu (Sigma, USA) 10 mM/l a dexamethasonu (Sigma, USA) 0,1 M/l.

Z nosičů jsme testovali mražený allogení spongiózní kostní štěp a demineralizovanou kostní matrix z tkáňové ústředny. Čerstvý autologní kostní štěp jsme nepoužili, protože zvolenou metodou hodnocení přítomnosti kolagenu bychom neodlišili původní a nově vytvořený kolagen. Dále jsme testovali porézní β -trikalciemfosfát a lisovaný hydroxyapatit při 150 °C (Lasak, Česká republika), kalciumsulfát bez porézní struktury (Wright, USA).

VÝSLEDKY

Dle výsledku denzitometrie byly ženy rozděleny na pacientky s normální denzitou (12 žen) a nižší denzitou, resp. osteopenií (10 žen) nebo osteoporózou (2 ženy). U pacientek byla tedy koincidence artrózy a osteopenie nebo osteoporózy 50 %. Interval menopauza – operace byl ve skupině s normální kostní denzitou 15 let, ve skupině s nižší kostní denzitou 24 let. BMI u pacientek s normální denzitou byl průměrně 29, u pacientek s nižší denzitou 24. Zjištěný Singhův index se shodoval s výsledky denzitometrie u 7 z 24 žen.

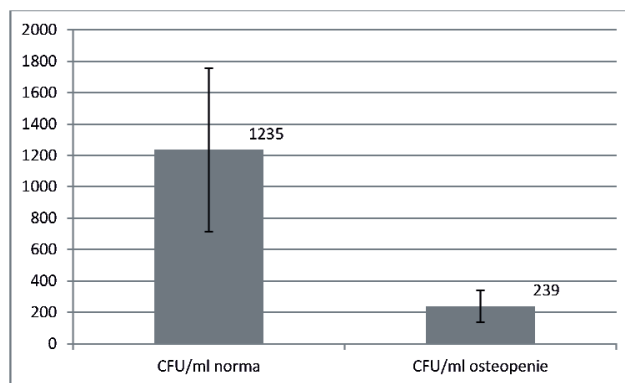
Na vztakovém gradientu Ficoll-Paque bylo izolováno v průměru při přímém měření 23×10^6 ($11,6 \times 10^6 - 125 \times 10^6$) mononukleárních buněk. Z těchto buněk adherovalo na dno kultivačních nádob 123 (10 – 1100) buněk, což odpovídá 1230 CFU-F/ml. Viabilita kultivovaných buněk byla dlouhodobě průměrně 95 % (85 % – 99 %) (obr. 1).



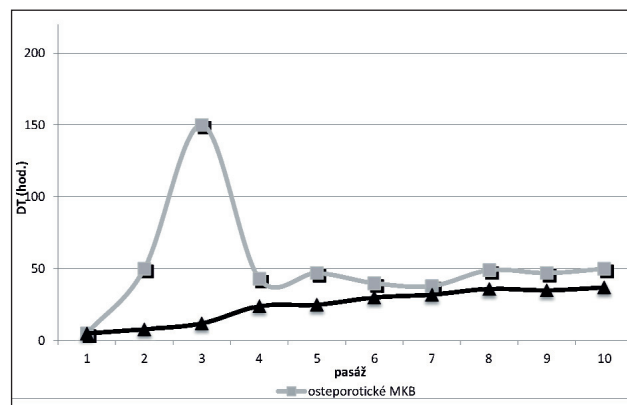
Obr. 1. Typický vřetenovitý tvar kultivovaných mezenchymálních kmenových buněk, mikroskopie s fázovým kontrastem, zvětšeno 200krát.

U osteopenických pacientů byl nižší počet CFU-F/ml (fibroblast colony-forming units) (graf 1) a mezenchymální buňky se lišily od pacientů s normální denzitou v proliferační aktivitě, kdy během prvních 4 pasáží potřebovaly výrazně delší čas ke zdvojení populace (graf 2).

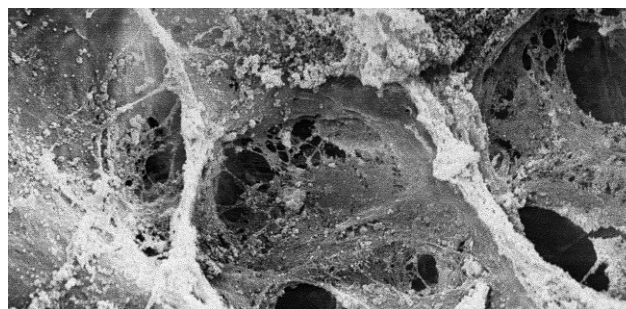
Graf 1. Porovnání počtu CFU-F/ml u pacientů s normální a patologickou kostní denzitou



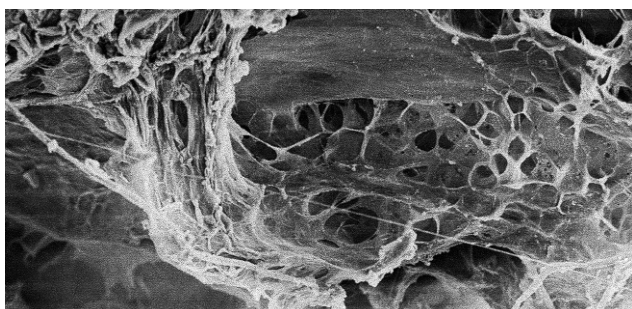
Graf 2. Porovnání času potřebného ke zdvojení populace MKB u pacientů s normální a patologickou kostní denzitou



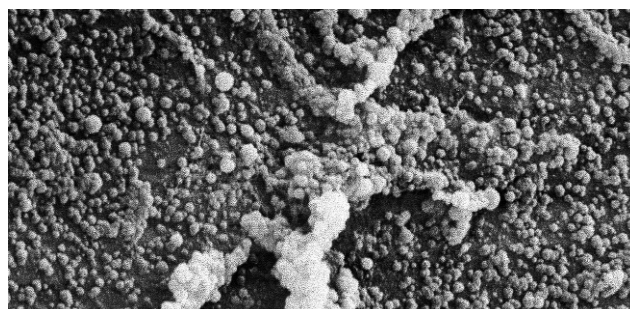
V případech aktivity MKB na nosičích byla nejvýraznější tvorba kolagenu v expanzním médiu na allogéním štěpu při nanesení kompletní kostní dřevě i monocytárního koncentrátu (obr. 2 a 3).



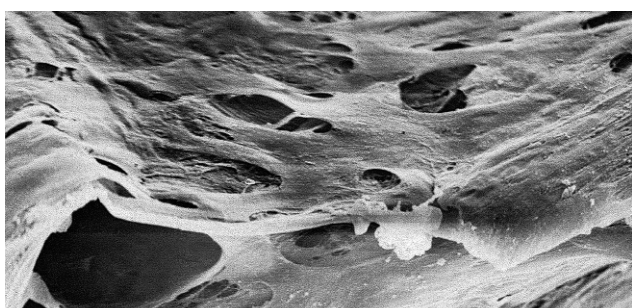
Obr. 2. Alloštěp – kompletní kostní dřevě, expanzní médium: Výrazná tvorba kolagenních vláken na alloštěpu, zvětšeno 600krát.



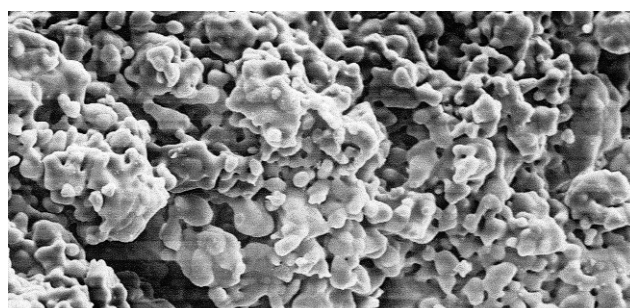
Obr. 3. Alloštep – monocytární koncentrát, expanzní médium: Stejně výrazná tvorba kolagenu na alloštetu v širší perspektivě při menším zvětšení, zvětšeno 102krát.



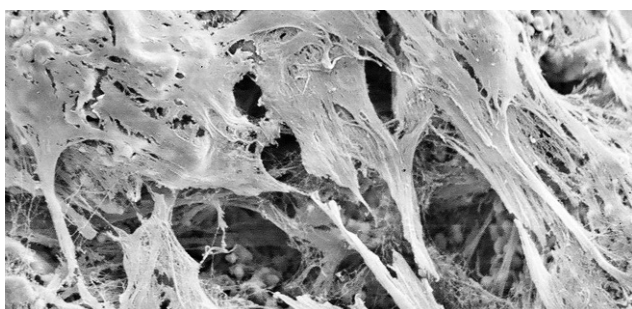
Obr. 4. Demineralizovaná matrix – kompletní kostní dřev, expanzní médium: Tvorba kolagenu nevýrazná. Při velkém zvětšení (1010krát) patrna kolagenní vlákna.



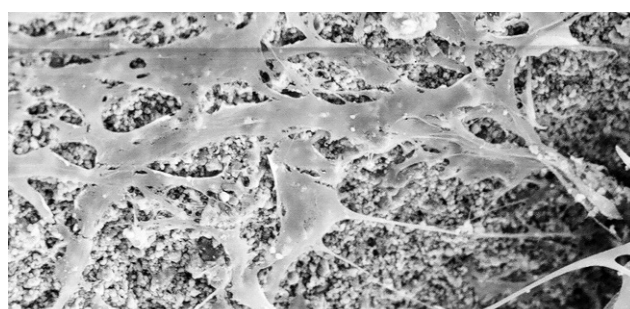
Obr. 5. Demineralizovaná matrix – monocytární koncentrát, expanzní médium: Zřejmá tvorba kolagenu již při menším zvětšení (600krát).



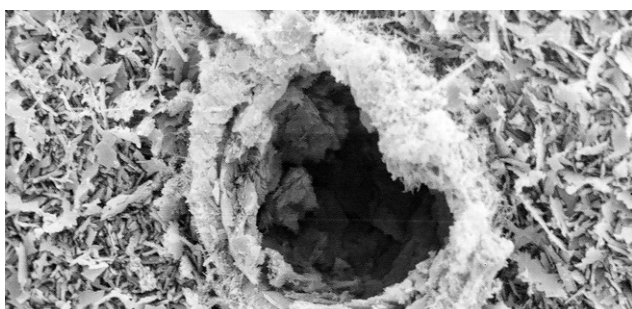
Obr. 6. Porézní β -TCP – monocytární koncentrát, expanzní médium: Patrna porézní struktura nosiče, ale tvorba kolagenu minimální, zvětšeno 610krát.



Obr. 7. Porézní β -TCP – monocytární koncentrát, diferenciační médium: Výrazná tvorba kolagenu i uvnitř materiálu, zvětšeno 580krát.



Obr. 8. Lisovaný β -TCP – monocytární koncentrát, diferenciační médium: Tvorba kolagenu po povrchu materiálu, zvětšeno 550krát.



Obr. 9. Kalciumsulfát – monocytární koncentrát, diferenciační médium: nevýrazná tvorba kolagenu pouze v oblasti dutin neporézního materiálu, zvětšeno 630krát.

Na demineralizované matrix byla tvorba kolagenu rovněž velmi dobrá, ale převážně při nanesení monocytárního koncentrátu (obr. 4, obr. 5).

U náhrad kostních štěpů (porézní β -trikalciumfosfát, lisovaný hydroxyapatit, kalciumsulfát) jsme našli jen nevýraznou tvorbu kolagenu v expanzním médiu (obr. 6).

Při použití diferenciačního média u těchto náhrad kostních štěpů byla pozorována výrazná tvorba kolagenu v celém rozsahu u porézního β -TCP (obr. 7), zatímco u lisovaného hydroxyapatitu převládala na povrchu (obr. 8).

Nejméně kolagenu jsme našli u neporézního kalciumsulfátu, kde byl tvořen pouze v oblasti dutin v materiálu (obr. 9).

Monocytární koncentrát nevykázal lepší výsledky než kompletní kostní dřeň.

DISKUSE

Jednou z podmínek úspěšné kostní reparační je dostatečný počet a kvalita MKB v místě předpokládaného hojení. Splnění tohoto předpokladu je závislé na věku a pohlaví pacienta (6, 20), místních a celkových onemocněních. Z místních vlivů je to zejména přítomnost infektu, nekrózy, stavu po ozáření, z celkových pak imunosupresivní a maligní onemocnění, podvýživa. Zejména u postmenopauzálních žen se uplatňuje faktor osteopenie/porózy (13, 14). V předkládané práci jsme odebírali kostní dřeň u starších pacientů s koxartrózou. U poloviny žen byla zjištěna nižší kostní denzita, přičemž bylo nutné provést denzitometrické vyšetření, neboť stanovení Singhova indexu z rentgenového snímku nebylo spolehlivé. O koincidenci osteopenie/porózy a osteoartrózy jsou vedeny spory (8, 9, 25). Glowacki et al. našli 25% výskyt osteopenie u koxartrózy v souboru 68 žen s průměrným věkem 69 let (8). V našem souboru je tato koincidence (50 % žen) adekvátní při menším počtu sledovaných pacientek, zejména u žen s nižším BMI a delším odstupem od menopauzy (průměrně 23 let).

Za normálních okolností se v kostní dřeni vyskytuje 2 až 5 MKB na 1 milion mononukleárních buněk (17). U našich pacientů odpovídala hodnota 5 MKB na 1 milion. Dle Cuomo et al. existuje široká variabilita v koncentraci MKB v aspirátu kostní dřene – 1010 ± 960 CFU-F/ml, v koncentrátu 6150 ± 6660 CFU-F/ml. Počet monocytárních buněk v aspirátu kostní dřene je $21\,000 \pm 7\,000/\mu\text{l}$, v koncentrátu $91\,000 \pm 19\,000/\mu\text{l}$ (4). V Connollyho studii obsahoval aspirát kostní dřene 1,4 až 2,6 milionů monocytárních buněk v jednom mililitru a v koncentrátu 3,0 až 8,6 milionů monocytárních buněk v jednom mililitru (2). Námí zjištěný průměrný počet CFU-F/ml u pacientů s normální kostní denzitou (1235 ± 500 CFU-F/ml) odpovídá výše uvedeným literárním údajům. Na druhé straně průměrný počet CFU-F/ml u pacientů s nízkou denzitou byl výrazně nižší (239 ± 150 CFU-F/ml). Zároveň se ukázalo, že u osteopenické kosti je aktivita MKB nižší a při kostním hojení v tomto terénu bude třeba hledat způsoby, jak tento proces stimulovat. V klinické praxi by bylo s výhodou obohatit místo hojení autologními MKB tam, kde jich je nedostatek – pakloby, kostní defekty apod., nebo mají sníženou proliferativní aktivitu – osteopenická kost. V současné době to lze provést peroperační aspirací kostní dřene, kterou například při léčbě kostních defektů mísim s β -trikalciemfosfátem. Další možností je centrifugace aspirátu k získání monocytárního koncentrátu ještě v rámci uzavřeného systému při operačním zákroku. Nicméně obecně se jedná o ne zcela spolehlivou metodu, neboť u jednotlivých pacientů je různá kvalita kostní dřene (4), přičemž závisí též na technice jejího odběru (18). Nelze tedy říci, zda konkrétní aspirát nebo koncentrát obsahuje dostatečný počet kvalitních MKB. Connolly et al. aplikovali aspirát kostní dřene do 20 pa-

kloubů tibie, přičemž 18 z nich se zhojilo (3). Hernigou et al. užívali koncentrát kostní dřene do 60 paklobů tibie, uvedli zhojení u 53 a stanovili minimální počet 30 000 progenitorových buněk nutných v místě hojení, resp. koncentraci vyšší než 1500 CFU-F/ml (10, 11). Podle našich výsledků by tuto koncentraci dosáhla pouze část našich pacientů vyššího věku s normální kostní denzitou. Právě věk pacienta je důležitý pro schopnost expanze MKB (21). Další kostní reparaci lze ještě posílit přidáním proosteogenních růstových faktorů, např. rekombinantními BMP-2 nebo BMP-7, ale širšímu klinickému použití brání dosud vysoká cena preparátů. Řešením nedostatku MKB by byl dvoudobý postup, nejprve aspirace kostní dřene, separace a kultivace MKB k získání jejich dostatečného množství a potom jejich transplantace na místo kostního hojení. Tento postup má však svá úskalí, jako je používání zvířecího séra při pěstování MKB s rizikem přenosu virových onemocnění a anafylaktické reakce na zvířecí bílkovinu, zejména při nutnosti opakované transplantace (16), relativně dlouhá doba mezi odběrem a transplantací, otevřený systém s možností infekční kontaminace. Závažná je možnost ztráty schopnosti diferenciaci MKB v kostní tkáni (26), případně selekce geneticky modifikovaných buněk s rizikem kancerogeneze. V současné době se na odstranění jednotlivých překážek klinického použití napěstovaných MKB intenzivně pracuje. Dokladem je navržený postup kultivace eliminující použití zvířecího séra (22).

Vzhledem k možnostem klinické praxe jsme tedy na připravené nosiče aplikovali kompletní aspirovanou kostní dřeň nebo monocytární koncentrát. Nosiče, na kterých se vytváří kostní tkáň jsou trojrozměrné matrice, které musí umožnit přichycení MKB, jejich přežití, proliferaci a diferenciaci. Zároveň musí umožnit vaskularizaci. Vaskularizace a na ní závislý metabolismus nutričních a kyslíku je klíčový pro tvorbu plnohodnotné kosti (19). Dalšími atributy jsou i přítomné signální molekuly a kvalita okolní kosti. V případě allogenního štěpu jsme pozorovali velmi dobrou tvorbu kolagenu při nanesení celé kostní dřene i monocytárního koncentrátu již v expanzním médiu. Empiricky je tato skutečnost úspěšně prokazována již dlouhodobě při léčbě defektů kostí po resekci tumorů, u primárních a revizních náhrad kloubů spojených s kostními defekty, v léčbě paklobů. Výhodou allogenních štěpů je jejich dostatečné množství, k jejich odběru není nutná další operační rána s možnými komplikacemi. Nevýhodou je riziko přenosu infekce a relativní nevýhodou jsou převážně pouze osteokonditivní vlastnosti (5). Osteointegraci alloštěpu lze zlepšit přidáním osteoprogenitorových buněk v aspirátu kostní dřene nebo monocytárním koncentrátem a přidáním růstových faktorů, např. rhBMP-2 (29). Tato metoda je však z výše uvedených finančních důvodů v běžné praxi těžko realizovatelná. Zlepšení angiogeneze a remodelace štěpu je v experimentu zkoušeno jeho potažením geneticky upraveným adeno-associated virem kódujícím růstový faktor VEGF (Vascular endothelial growth factor) a RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) (12). Na demineralizované

kostní matrix v našem experimentu byla vykazována tvorba kolagenu také v expanzním médiu, ale převážně při nanesení monocytárního koncentrátu a v menší míře než u alloštěpu. Těto matrix je přisuzován významný obsah růstových faktorů, nicméně záleží na kostní kvalitě dárce a technickém zpracování. Osteoinduktivní vlastnosti byly pozorovány spíše v experimentu na zvířatech než v klinických studiích (5). Použití demineralizované kostní matrix se tak nejeví jako výhodnější než využití nedemineralizovaného allogenního štěpu. Také Cuomo et al. prokázali, že samotná kostní dřev s demineralizovanou kostní matrix nezvyšuje osteogenezu (4). Společnou vlastností testovaných umělých náhrad kostních štěpů byla jen nepatrná tvorba kolagenu v expanzním médiu. Naproti tomu v diferenciačním médiu jsme pozorovali tvorbu kolagenu různé intenzity závislou na vlastnostech biomateriálu. Obecně je kvalita kostní náhrady odvislá od své architektury (zvláště výhodná je porozita), od povrchových chemických vlastností, osmolarity, typu degradačních produktů u vstřebatelných materiálů (19). U kalciumsulfátu může hrát roli i kyselá pH během degradace. V současné době se hledají cesty, jak zlepšit osteointegraci těchto materiálů. Vznikají tak kompozitní biomateriály, jejichž vlastnosti vedou k výsledkům podobným při použití autologních kostních štěpů, např. použití bifazického kalciumfosfátu, bovinního kolagenu a autologní kostní dřevě (1). V rámci experimentů jsou zkoušeny biomateriály předem osázené nakultivovanými MKB nebo endotemem, impregnované růstovými faktory, včetně VEGF ke zlepšení angiogeneze. Implantují se biomateriály do vysoce vaskularizované tkáně jako např. do mezenteria, zde se předpokládá vrůst cév a následně se transplantují do kostního defektu. Jsou vyvíjeny trojrozměrné matrice na bázi nanomateriálů (27).

Pro velké množství různých faktorů ovlivňujících osteogenezi je složité vytvořit experimentální model *in vitro* nebo na zvířeti, jehož výsledky by byly spolehlivě transformovatelné do humánní medicíny. Širšímu použití nových metod také brání nedostatek randomizovaných kontrolovaných klinických studií (5).

ZÁVĚR

Reparační schopnosti u seniorů jsou omezené nejen vlivem věku, případné polymorbidity a medikace, ale i výskytem osteopenie/porózy, který je vyšší, než se obecně diagnostikuje, a je významná koincidence s artrózou, zejména u žen s nižším BMI a delším odstupem od menopauzy. Stanovení Singhova indexu není v diagnostice osteopenie/porózy spolehlivé a je nutné denzitometrické vyšetření. Snížená reparační schopnost u osteopenie/porózy je také daná nižším počtem a snížením proliferační schopnosti MKB vyjádřené výrazně vyšším časem potřebným ke zdvojnásobení populace.

Z hlediska biomateriálů nejlepší vlastnosti vykazoval allogenní kostní štěp, kde MKB tvořily velké množství kolagenu již v expanzním médiu a ve formě aspirátu kostní dřevě.

MKB na umělých kostních náhradách vyžadovaly pro tvorbu kolagenu přítomnost diferenciačního média. Klíčovou roli hrála porézní struktura, kdy v našem experimentu byl patrný rozdíl v tvorbě kolagenu – výrazná produkce u porézního β -TCP, dobrá produkce u lisovaného hydroxyapatitu, ale pouze na povrchu, kde byla porozita patrná, a minimální produkce u neporézního kalciumsulfátu.

Výhledy do budoucna

Při léčbě defektů po uvolněných endoprotézách, v osteopenické/porotické kosti nebo obecně v místě nedostatku MKB a růstových faktorů by se nabízela kombinace allogenních kostních štěpů, aspirátu kostní dřevě a případně proosteogenních a proangiogenních růstových faktorů, které však výrazně zvyšují cenu léčby. Jako velmi výhodné by se jevílo obohacení počtu MKB jejich nakultivováním a zpětnou transplantací, tato metoda je však zatím možná pouze experimentálně.

Posílení osteoinduktivních vlastností β -TCP v kompozitních materiálech ho předurčuje jako spolehlivou kostní náhradu, ale před zavedením do rutinní praxe jsou ještě třeba další experimentální práce a klinické studie.

Nové metody a biomateriály jsou příslibem vyřešení řady obtížných klinických problémů, nicméně při volbě správné léčebné metody je nutné kritické hodnocení experimentálních prací a dostatečné množství dobře vedených klinických studií. Další výzkum je tedy nezbytný, protože cesta od izolace MKB ke spolehlivé podpoře osteogeneze v klinické praxi je ještě dlouhá.

Literatura

1. CHAPMAN, M. W., BUCHOLZ, R., CORNELL, C.: Treatment of acute fractures with a collagen-calcium phosphate graft material. A randomized clinical trial. *J. Bone Jt Surg.*, 79-A: 495–502, 2007.
2. CONNOLLY, J. F., GUSE, R., LIPPIELLO, L., DEHNE, R.: Development of an osteogenic bone-marrow preparation. *J. Bone Jt Surg.*, 71-A: 684–691, 1989.
3. CONNOLLY, J. F., GUSE, R., TIEDMAN, J., DEHNE, R.: Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clin. Orthop.*, 266: 259–70, 1991.
4. CUOMO, A. V., VIRK, M., PETRIGLIANO, F., MORGAN, E. F., LIEBERMAN, J. R.: Mesenchymal stem cell concentration and bone repair: potential pitfalls from bench to bedside. *J. Bone Jt Surg.*, 91-A: 1073–1083, 2009.
5. DE LONG JR, W. G., EINHORN, T. A., KOVAL, K., MCKEE, M., SMITH, W., SANDERS, R., WATSON, T.: Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. *J. Bone Jt Surg.*, 89-A: 649–658, 2009.
6. D'IPPOLITO, G., SCHILLER, P. C., RICORDI, C., ROOS, B. A., HOWARD, G. A.: Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J. Bone Miner. Res.*, 14: 1115–22, 1999.
7. GÁL, P., ONDRUŠ, Š., ŠKVARIL, J., STRAKA, M., JOCHYMEK, J., PLÁNKA, L.: Syntetický biokompatibilní degradabilní materiál v léčbě juvenilních kostních cyst. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 76: 495–500, 2009.
8. GLOWACKI, J., HURWITZ, S., THORNHILL, T. S., KELLY, M., LE BOFF, M. S.: Osteoporosis and vitamin-D deficiency among postmenopausal women with osteoarthritis undergoing total hip arthroplasty. *J. Bone Jt Surg.*, 85-A: 2371–2377, 2003.
9. HEALEY, J. H., VIGORITA, V. J., LANE, J. M.: The coexistence and characteristics of osteoarthritis and osteoporosis. *J. Bone Jt Surg.*, 67-A: 586–592, 1985.

10. HERNIGOU, P., POIGNARD, A., BEAUJEAN, F., ROUARD, H.: Percutaneous autologous bone marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J. Bone Jt Surg.*, 87-A: 1430–7, 2005.
11. HERNIGOU, P., POIGNARD, A., MANICOM, O., MATHIEU, G., ROUARD, H.: The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. *J. Bone Jt Surg.*, 87-B: 896–902, 2005.
12. ITO, H., KOEFOED, M., TIYAPATANAPUTI, P., GROMOV, K., GOATER, J. J., CARMOUCHE, J., ZHANG, X., RUBERY, P. T., RABINOWITZ, J., SAMULSKI, R. J., NAKAMURA, T., SOBALLE, K., O'KEEFE, R. J., BOYCE, B. F., SCHWARZ, E. M.: Remodeling of cortical bone allografts mediated by adherent AAV-RANKL and VEGF gene therapy. *Nat. Med.*, 11: 291–297, 2005.
13. JUPITER, J. B., WYSS, H.: Stable fixation of osteoporotic fractures and nonunions in the upper limb – life before the „Locking plate“. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 77: 361–364, 2010.
14. KOUDELA, K., KASAL, E., MATĚJKA, J., VYSKOČIL, V.: Geriatrická traumatologie – vize nebo skutečnost? *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 76: 338–343, 2009.
15. LANDOR, I., VAVŘÍK, P., JAHODA, D., POKORNÝ, D., BAL-LAY, R., SOSNA, A.: Dlouhodobé zkušenosti s kombinovaným hydroxyapatitovým povrchem ARBOND v osteointegraci implan-tátu. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 76: 172–178, 2009.
16. MACKENSEN, A., DRÄGER, R., SCHLESIER, M., MERTELS-MANN, R., LINDENMAN, A.: Presence of IgE antibodies to bo-vine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vac-cination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, 49: 152–156, 2000.
17. MINGUEL, J. J., ERICES, A., CONGET, P.: Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.*, 226: 507–520, 2001.
18. MUSCHLER, G. F., BOEHM, C., EASLEY, K.: Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J. Bone Jt Surg.*, 79-A: 1699–709, 1997.
19. MUSCHLER, G. F., NAKAMOTO, C., GRIFFITH, L. G.: En-gineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J. Bone Jt Surg.*, 86-A: 1541–1558, 2004.
20. MUSCHLER, G. F., NIITTO, H., BOEHM, C. A., EASLEY, K. A.: Age- and gender related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J. Ort-hop. Res.*, 19: 117–25, 2001.
21. PITTENGER, M. F., MARIN, B. J.: Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ. Res.*, 95: 9–20, 2004.
22. PYTLÍK, R., STEHLÍK, D., SOUKUP, T., KALBÁČOVÁ, M., RYPÁČEK, F., TRČ, T., MULINKOVÁ, K., MICHNOVÁ, P., KIDERYOVÁ, L., ŽIVNÝ, J., KLENER JR, P., VESELÁ, R., TRNĚNÝ, M., KLENER, P.: The cultivation of human multipo-tent mesenchymal stromal cells in clinical grade medium for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 30: 3415–3427, 2009.
23. SINGH, M., NAGRATH, A. R., MAINI, P. S.: Changes in trabe-cular pattern of the upper end of the femur as an index of osteo-porosis. *J. Bone Jt Surg.*, 52-A: 457–467, 1970.
24. SLÍŽOVÁ, D., KRS, O., POSPÍŠILOVÁ, B.: Alternative method of rapid drying vascular specimens for scanning electron micro-scopy. *J. Endovasc. Ther.*, 10: 285–287, 2003.
25. STEWART, A., BLACK, A., ROBINS, S. P., REID, D. M.: Bone density and bone turnover in patients with osteoarthritis and osteo-porosis. *J. Rheumatol.*, 26: 622–626, 1999.
26. SUGUIRA, F., KITO, H., ISHIGURO, N.: Osteogenic poten-tial of rat mesenchymal stem cells after several passages. *Bio-chem. Biophys. Res. Commun.*, 316: 233–239, 2004.
27. SZPALSKI, C., BARR, J., WETTERAU, M., SAADEH, P. B., WARREN, S. M.: Cranial bone defects: current and future strate-gies: in vivo animal models of cranial defects. *Neurosurg. Focus*, 29: E8, 2010.
28. URBAN, K., ŠPONER, P.: Rekonstrukce rozsáhlých acetabulár-ních defektů bioaktivní sklokeramikou u revizních operací totál-ních endoprotéz. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 65: 17–23, 1998.
29. WIENTROUB, S., GOODWIN, D., KHERMOSH, O., SALAMA, R.: The clinical use of autologous marrow to improve osteogenic potential of bone grafts in pediatric orthopedics. *J. Pediatr. Ort-hop.*, 9: 186–190, 1989.

Korespondující autor:

MUDr. Tomáš Kučera
Pernštýnské nám. 64
530 02 Pardubice
E-mail: kucertom@fnhk.cz