

KLINIKA ÚRAZOVÉ CHIRURGIE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERZITY

MUDr. Milan Krtička Ph.D.

LUMBÁLNÍ INTERVERTEBRÁLNÍ DÉZA
POMOCÍ NOVĚ VYVINUTÉHO HYBRIDNÍHO
BIODEGRADABILNÍHO NANOKOMPOZITNÍHO
BIOIMPLANTÁTU

-

EXPERIMENTÁLNÍ STUDIE NA ZVÍŘECÍM MODELU

HABILITAČNÍ PRÁCE

Vedoucí pracoviště:

MUDr. Milan Krtička, Ph.D.

přednosta kliniky

V Brně dne 29. 12. 2020

Abstrakt

Úvod

Použití lumbální intervertebrální fúze (LIF) v USA i v Evropě v posledním desetiletí rychle narůstá. Navzdory technickému pokroku ve spondylochirurgii a vývoji nových materiálů se riziko selhání této metody stále pohybuje mezi 5–35 %. Užití autologního kostního štěpu u LIF je stále považováno za zlatý standard, avšak jeho odběr z lopaty kosti kyčelní je zatížen krátkodobou i dlouhodobou morbiditou postihující až 22 % těchto pacientů. Hlavním cílem naší experimentální studie bylo vyvinout nový hybridní biodegradabilní nanokompozitní implantát (HBNI) obohaceným o stabilizovaný Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2-stab) nebo o biogenní polyfosfát (bioPolyP) a následně porovnat schopnost provedení LIF mezi HBNI a autologním kostním štěpem.

Materiál a metodika

Nově vyvinutý HBNI se skládal z biokeramiky, nanostrukturovaného kolagenu, oxycelulózy a FGF2-stab nebo bioPolyP (scaffold 3. generace). Po in vitro vyloučení cytotoxicity bylo přistoupeno k in vivo ověření jeho biokompatibility. Do experimentální studie bylo zařazeno 36 experimentálních prasat. Všechna zvířata podstoupila operační zákrok v podobě laterální lumbální intervertebrální fúze. Diskektomie byla provedena v segmentu L2–3, s následnou implantací kostního štěpu (skupina A, n=12) nebo HBNI obohaceného o FGF2-stab (skupina B, n=12) nebo bioPolyP (skupina C, n=12) doplněné o suplementární fixaci osteosyntetickým materiálem. Kvalita provedené LIF byla hodnocena po eutanazii experimentálních zvířat po 8 a 16 týdnech trvání experimentu pomocí mikro-CT, biomechanických testů a histologie.

Výsledky

Na základě provedených in vitro testů byla vyloučena cytotoxicita a potvrzena biokompatibilita HBNI v jeho 2 modifikacích. Po 8 týdnech in vivo experimentu mikro-CT analýza vzorků páteří vykazovala podobné výsledky LIF ve skupině s kostním štěpem i HBNI obohaceného o FGF2-stab nebo bioPolyP. Naopak po 16 týdnech experimentu došlo ke statisticky významné progresi LIF ve skupině s HBNI v obou jeho modifikacích oproti skupině s kostním štěpem ($p=0,023$). Stejně tak biomechanické testy prokázaly statisticky významně vyšší pevnost operovaných páteří s implantovaným HBNI s FGF2-stab i bioPolyP ($p<0,05$). Histomorfologické vyšetření ve skupině s HBNI s FGF2-stab potvrdilo jeho

kopletní resorbci již po 8 týdnech od implantace a byl zde přítomný nárůst novotvořené kostní tkáně. Ve skupině s bioPolyP implantátem byla resorbce zpomalená, avšak nárůst novotvořené kostní hmoty byl nejvyšší. Kostní štěp v histologickém obraze podléhal resorbci a fibrózní přestavbě.

Závěr

Nově vyvinutý HBNI v obou jeho modifikacích vykazoval známky biokompatibility a žádné cytotoxicity. HBNI na bázi biokeramiky, kolagenu, oxycelulózy a FGF2-stab nebo bioPolyP prokázal signifikantní schopnost osteokondukce i osteoindukce a představuje možnost, jak zlepšit výsledky metody lumbální intervertebrální fúze v porovnání se standardně užívaným kostním štěpem.

Klíčová slova:

Mikro-CT, biomechanika, histologie, zvířecí model, lumbální intervertebrální fúze, autogenní kostní štěp, keramický bioimplantát, nanostrukturovaný kolagen, FGF2-stab, biogenní polyfosfát.

Abstract

Background

The use of lumbar fusion procedures in the USA and Europe has rapidly increased over the last decade and a large number of these procedures involve the use of bone grafts. Despite of technical progress of spinal surgery and operative materials the risk of vertebral fusion failure occurs in 5 – 35 % of cases. Autografting has been considered the gold standard for bone graft procedures. However, the harvesting from the iliac crest can be associated with short and long-term morbidity in up to 22 % of cases. Main goal of this experimental study was to develop and subsequently to compare newly developed hybrid biodegradable nanocomposit implant (HBNI) enriched by stabilized Fibroblast Growth Factor-2 (FGF2-stab) or biogenic polyphosphate (bioPolyP) against iliac crest bone graft as a new and better alternative for lumbar interbody fusion.

Material and methods

Bioabsorbable implant consists of bioceramics, nanostructured collagen, oxycellulose and FGF2-stab or bioPolyP. In the first step biocompatibility was verified by in vitro tests. Thirty six experimental pigs enrolled to our study underwent L2/3 discectomy with implantation of a tricortical iliac crest bone autograft (group A, n=12) or newly developed BNHI enriched FGF2-stab (group B, n=12) or bioPolyP (group C, n=12) followed by lateral intervertebral fixation. In the second step the quality of spinal fusion was assessed by micro computed tomography (Micro-CT) scanning, biomechanical testing and histological examination at 8 and 16 weeks after surgery.

Results

In vitro tests confirmed osteoconductivity and nontoxicity of both tested HBNI. While 8 weeks after implantation micro-CT analysis demonstrated similar fusion quality in groups of tricortical bone graft and HBNI enriched by FGF2-stab and bioPolyP, in contrast, spines with HBNI showed a significant increase in fusion quality in comparison to the autograft group 16 weeks post-surgery ($p=0,023$). Biomechanical testing revealed significantly higher stiffness for the BNHI group compared to the autograft group 16 weeks after operation ($p<0,05$). Histomorphological evaluation 16 weeks postoperatively showed significant progression of callus formation in the HBNI groups beside partially resorbed tricortical bone in the graft group.

Conclusions

Newly developed HBNI enriched by FGF-2 as well as by bioPolyP does not show any signs of cytotoxicity. Significant osteoconductive and osteoinductive effect of HBNI based on bioceramics, collagen, oxycellulose and FGF-2stab or bioPolyP could improve spinal fusion outcomes and attempt to achieve better outcomes seen in bone autografts.

Keywords:

Micro-CT, biomechanics, histology, animal model, lumbar spinal fusion, autogenous bone graft, ceramic bioimplant, nanostructured collagen, FGF-2, biogenic Polyphosphate

PŘEDMLUVA

Habilitační práce se zabývá problematikou in vitro a in vivo testování nového bioimplantátu, který byl vyvinut za účelem zlepšení výsledků intervertebrální dýzy, která představuje léčebnou modalitu jak u úrazů, tak u degenerativního postižení páteře.

Výše zmíněný bioimplantát se řadí mezi 3. generaci keramických scaffoldů, které kromě ostekonduktivních vlastností vykazují i schopnost osteoindukce. Současně oproti autogennímu kostnímu štěpu není bioimplantát zatížen zvýšenou morbiditou vyplívající z jeho odběru a ve srovnání s inertními materiály sice nevykazuje takovou pevnost, ale o to více simuluje biologické vlastnosti kostní tkáně.

Důvodem ke zpracování tohoto tématu je autorova afinita ke spinální traumatologii a současně i k biomedicínskému výzkumu, který je zaměřen na vývoj nových biomateriálů sloužících k náhradě a hojení kostní tkáně.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych velmi rád poděkoval svým spolupracovníkům a členům mé výzkumné skupiny, zejména pak kolegům z Oddělení pokročilých biomateriálů CEITEC VUT pod vedením doc. Ing. Lucy Vojtové, Ph.D., Výzkumného ústavu veterinárního lékařství pod vedením MUDr. Eduarda Göpferta, Ph.D., Laboratoře mechanických zkoušek ČVUT pod vedením Ing. Radka Sedláčka, Ph.D. a Institutu experimentální medicíny AVČR pod vedením RNDr. Věry Hedvičákové, Ph.D.

Moje osobní a výjimečné poděkování patří i mému příteli, panu prof. MUDr. Ladislavovi Plánkovi, Ph.D., díky kterému celý projekt výzkumu intervertebrální dězy vzniknul.

Zvláštní dík pak patří mým kolegům z Kliniky úrazové chirurgie FN Brno a LF MU MUDr. Vladimírovi Nekudovi a MUDr. Danielovi Irovi, Ph.D. za jejich precizní přístup k našemu společnému vědeckému bádání a také za moji výraznou podporu v průběhu celého experimentu.

Naposledním, a tedy nejvýznamnějším místě bych rád poděkoval těm nejmenším, Jendovi, Makyně a Terce Krtičkovým, kteří v době, kdy cítili potřebu abych se jim věnoval na 200 % jsem to zvládl jen na procent 100. A Tobě Kristýnko Irová, děkuji za Obr. 1, navždy už zůstane jen a jen autorsky Tvůj a bez Tvého svolení ho nikomu nepůjčím.

Obsah

1	TEORETICKÝ ÚVOD	11
1.1	Úvod do problematiky spinální dřezy (fúze)	11
1.2	Historie	12
1.2.1	Techniky meziobratlové fúze	12
1.2.2	Instrumentária používaná při spinální fúzi	14
1.2.3	Meziobratlové klece	14
1.2.4	Kostní materiály používané při meziobratlové fúzi	15
1.3	Metody meziobratlové kostní fúze	16
1.3.1	Zadní přístupy pro spinální fúzi	17
1.3.2	Přední přístupy	19
1.4	Možnosti využití materiálů při intervertebrální dřeze	21
1.4.1	Biologie spinální fúze	21
1.4.2	Princip ideální kostní náhrady	22
1.4.3	Typy kostních náhrad	22
1.5	Resumé	36
2	CÍLE PRÁCE	38
3	MATERIÁL A METODIKA	39
3.1	Struktura hybridního biodegradabilního nanokompozitního implantátu (HBNI) ...	39
3.1.1	Příprava a struktura HBNI s FGF2-stab.	39
3.1.2	Příprava a struktura implantátu s biogenním polyfosfátem	40
3.2	In vitro testování cytotoxicity keramického bioimplantátu	42
3.2.1	Osazování bioimplantátů mesenchymálními kmenovými buňkami ..	42
3.2.2	Test metabolické aktivity	42
3.2.3	Kvantifikace obsahu buněčné DNA	43
3.2.4	Barvení osteokalcinu	43
3.2.5	RT-PCR (<i>Reverse Transcriptase</i>) PCR	44

3. 2. 6	Vizualizace buněk	44
3. 2. 7	Statistika	45
3. 3	Zvířecí model a návrh studie	45
3. 3. 1	Chirurgická část	46
3. 3. 2	Pooperační průběh a provádění RTG kontrol	50
3. 3. 3	Utracení prasat a příprava preparátů páteří	53
3. 4	Micro-CT vyšetření vzorků páteře	53
3. 5	Biomechanické vyšetření vzorků páteře	55
3. 5. 1	Postup biomechanického testování	55
3. 5. 2	Princip zatěžování	57
3. 5. 3	Ohybová zkouška	58
3. 6	Histologické zhodnocení vzorků páteře	59
4	VÝSLEDKY	62
4. 1	Výsledky in vitro testování cytotoxicity keramického bioimplantátu	62
4. 1. 1	Buněčná proliferace a viabilita	62
4. 1. 2	Osteogenní diferenciaci buněk na nosičích	66
4. 1. 3	Závěr	67
4. 2	Chirurgická část	68
4. 2. 1	Per a pooperační průběh včetně komplikací	68
4. 2. 2	Rentgenové kontroly	69
4. 2. 3	Autoptické nálezy	70
4. 2. 4	Závěr	73
4. 3	Biomechanika	73
4. 3. 1	Měření tuhosti	73
4. 3. 2	Zatěžování do destrukce	77
4. 3. 3	Závěr	77
4. 4	Mikro – CT	78

4. 4. 1	Vyhodnocení skupiny A	79
4. 4. 2	Vyhodnocení skupiny B	80
4. 4. 3	Vyhodnocení skupiny C	82
4. 4. 4	Závěr.....	83
4. 5	Histologie	84
4. 5. 1	Mikroskopické zhodnocení	84
4. 5. 2	Vyhodnocení plochy novotvořené kosti	88
4. 5. 3	Závěr.....	89
5	DISKUSE	91
6	SOUPIS LITERATURY A PRAMENŮ	97
7	SEZNAM ZKRATEK	119
8	SEZNAM OBRÁZKŮ	123
9	SEZNAM TABULEK	126
10	SOUHRN POZNATKŮ HABILITAČNÍ PRÁCE	127

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Úvod do problematiky spinální dýzy (fúze)

Diskopatie, spondyloartróza, poranění obratlů v osteoporotickém terénu, páteřní deformity a nestability patří mezi nejrozšířenější onemocnění ve stárnoucí populaci. Bolesti bederní a krční páteře jsou celosvětově nejčastějším důvodem omezujícím tělesnou aktivitu a také značnou měrou zodpovídají za pracovní neschopnost či invaliditu.¹ Ekonomické náklady na léčbu onemocnění páteře jsou extrémně vysoké a jen ve Spojených státech činí kolem 90 miliard USD ročně.² V případě, že selhává konzervativní terapie, spinální fúze je jednou z nejčastějších možností operační léčby, která představuje kurativní řešení nebo alespoň zmírnění pacientových obtíží. Základním předpokladem těchto operací je použití kostního štěpu nebo speciálního implantátu v kombinaci s instrumentariem. Jinými slovy se jedná o „chirurgický stimul“ jehož cílem je kostěnné prohojení dvou nebo více sousedních obratlů.

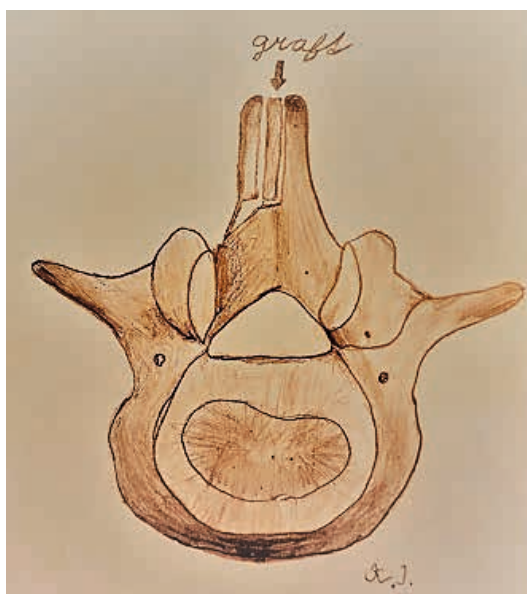
Počet provedených spinálních fúzí se rok od roku zvyšuje, což potvrzuje i fakt, že v USA se počet těchto operací zvýšil z 174 223 v roce 1998 na 413 171 v roce 2008.³ Prohojování a tvorba nové kostěnné formace je ovlivněna jak lokálními podmínkami, tak i vlastnostmi použitého štěpu. Iniciální stabilita fúzované oblasti je zajištěna páteřním instrumentariem, přičemž štěp je základem pro kostěnné hojení a remodelaci, které probíhají během delší časové periody. I když pokrok v oblasti instrumentarii, vývoji kostních náhrad a stejně tak i rozvoj celkového technického provedení operace výrazně zvýšil šanci na úspěšné prohojení a vytvoření fúze, tak pseudoartróza zůstává dominantní komplikací této operační procedury. I v současnosti se riziko vzniku pseudoartrózy v lumbální a cervikální oblasti pohybuje mezi 2 až 42 %⁴ a v případě vícesegmentálních krčních fúzí může tato hodnota dosahovat až 60 %.⁵⁻⁷ Tato skutečnost je velkou zátěží nejenom pro pacienta i lékaře, ale také zatěžuje celý zdravotní systém. Pacienti s nefúzovanými nebo jen částečně prohojenými segmenty mají špatné klinické výsledky a často tak vyžadují následnou reoperaci. Tyto revizní operace mají výrazně vyšší morbiditu a extenzivně zvyšují náklady na celkovou léčbu. Ve světle těchto skutečností zůstává velkou výzvou pro vědecké týmy složené ze spinálních chirurgů, biomateriálových specialistů, biomechaniků i radiodiagnostiků k vývoji a aplikaci nových materiálů a operačních technik s cílem dosažení dřívější stability meziobratlové fúze v porovnání se současně užívanými konvenčními postupy v dané oblasti.

1. 2 Historie

1. 2. 1 Techniky meziobratlové fúze

Úrazy, vrozené deformity, Pottova nemoc (spondylodiscitis tuberculosa) i degenerativní onemocnění patřily mezi závažné spinální onemocnění, se kterými museli bojovat lékaři i pacienti v 19. století.^{8,9} Teprve rozvoj antiseptiky v chirurgii reprezentované Josephem Listerem a inovace v anestezii, které přinesl William T.G. Morton, dodali chirurgům odvalu při snaze pomoci pacientům i pomocí operačních zákroků na páteři.^{10,11} Mezi první milníky spinální fúze, resp. stabilizace segmentů patří fixace^{6, a7.} spinálního výběžku pomocí drátu. Tento typ operace popisuje 1891 americký chirurg B. E. Hada u pacienta s luxační frakturou krčních obratlů a současně se zhoršujícím neurologickým deficitem. Podobný výkon u novorozence se spina bifida provedl v oblasti thorakolumbálního přechodu W.T. Wilkins ve stejné dekádě.^{8,12} Mnichovský profesor ortopedie Fritz Lange se v roce 1909 pokusil stabilizovat páteřní segmenty pomocí celulooidových, později pak i kovových tyčí a drátěných kliček, které fixoval k spinálním výběžkům.¹³ Historie opravdové spinální fúze se začala psát až na začátku dvacátých let dvacátého století v New Yorku. V roce 1911 Russel Hibbs a Fred Albee publikovali výsledky svých spondylodéz. Albee na základě experimentů na psech vypracoval metodu, kdy odebral autogenní štěp z tibie, který vložil mezi dva rozpůlené spinózní výběžky, viz Obr. 1. Při své práci Albee dokonce vytvořil i sterilizovatelnou motorovou pilu k odebrání kostěného pruhu z tibie.¹⁴ Hibbsova původní technika spočívala v resekci spinózních výběžků, které byly následně vloženy do interspinózního prostoru, tak aby vytvořily kostní fúzi.¹⁵ V pozdější době byla tato technika rozšířena o použití štěpu z lopaty kosti kyčelní. Oba tyto velikáni spinální chirurgie svými operacemi významně přispěli k léčbě pacientů s Pottovou nemocí.¹⁶ Hibbsova technika založená na fúzi bez přídavné instrumentace s vložením kostěného štěpu do lůžka byla modifikovaná Melvinem Watkinsem. Ve svém článku z roku 1953 popisuje techniku vložení štěpu mezi transversální výběžky přes posterolaterální přístup.¹⁷ Obdobná technika vložení štěpů ve tvaru zápalek do žlábků vytvořeného mezi transversálními výběžky byla popsána Thompsonem a dodnes je její princip užíván chirurgy při miniinvazivní lumbální fúzi.^{18,19} Spondylolistéza v lumbosakrálním přechodu byla poprvé definovaná v roce 1954 Hermannem Fridrichem Kilianem, který začal rozvoj techniky přední spinální fúze (Anterior lumbar interbody fusion – ALIF). V 30. letech 20. století se N. Carpener i B.H. Burns snažili korigovat a stabilizovat posun L5 pomocí kostního čepu vloženého mezi L5 a sakrum. B.H Burns použil tuto techniku přední bederní meziobratlové dýzy pomocí tibiálního štěpu u 14-letého pacienta s traumatickou spondylolistézou.^{20–22} Narozdíl od Capenera, v roce 1944 Milligan a Briggs publikovali

uložení drtě kostních štěpů do intervertebrálního prostoru ze zadního přístupu. Jimi popsaná technika je považována za předchůdce dnešní moderní posterolaterální fúze (Posterior lumbar interbody fusion – PLIF).²³ Tuto metodu dále rozvíjel Cloward, který v roce 1953 publikoval soubor 321 pacientů, u kterých použil autologní kortikospongiózní štěp z lopaty kosti kyčelní i aloštěp z kadaverů. Podařilo se mu dosáhnout fúze u 85 % případů.²⁴ Na počátku 80. let Bagby rozvinul Clowardovu metodu přední fúze krční páteře pomocí odvtření ploténky a přilehlých obratlových těl s následnou implantací klece z chirurgické oceli namísto Clowardem užívaného kostního štěpu.²⁵ Blume v roce 1985 popsal unilaterální přístup s resekci dvou třetin intervertebrálního kloubu vedený přes intervertebrální foramen. Tento přístup byl nazván unilaterální lumbální zadní meziobratlovou fúzí (Unilateral posterior lumbar interbody fusion = U-PLIF).²⁶ Rolinger společně s Harmsem v roce 1982 pak publikovali novou techniku, kdy meziobratlová klec vyplněná kostními štěpy byla zavedena do intervertebrálního prostoru transforaminální cestou. Tato technika nazvaná transforaminální lumbální intervertebrální fúze (Transforaminal lumbar interbody fusion – TLIF) byla nadále popularizována Harmsem.²⁷ Výhodou výše uvedené metody byla možnost provedení dekomprese v místě foraminální stenózy, se současnou eliminací jizvení v epidurálním prostoru.



Obr. 1 – Zobrazení Albeeho techniky kostní fúze – kraniokaudální rozříznutí spinózního procesu a vložení tibiálního štěpu. Zdroj: archiv Kristýnky Irové, bezplatně propůjčeno.

1. 2. 2 Instrumentária používaná pri spinálnej fúzi

Potreba zabezpečiť dostatočnú prídavnú biomechanickú pevnosť v čase, keď páteřní segmenty fúzujú a dochádza k kostnej prestavbe, vedla k mnohým inováciám v oblasti páteřní fixácie. Vývoj páteřního instrumentária se na začátku váže k osobě Fritze Langeho, který použil ke stabilizaci páteřního segmentu drátěné kličky a tyče při léčbě traumat a skolióz páteře.¹³ Dalším významným momentem byla konstrukce Harringtonových tyčí v roce 1962, kdy Paul Harrington byl schopen pomocí tyčí a háčků korigovat skoliózu a podpořit vytvoření kostní fúze s excelentními pooperačními výsledky i po 20 letech od operace.²¹ ²⁸ Přetrvávající vysoké riziko pseudoartrozy vedlo k vývoji facetálních šroubů a později i k pevnostně výhodnější interpedikulární fixaci.²⁹ Raymond Roy-Camille byl prvním kdo v sedmdesátých letech minulého století popsal užití sagitálně orientovaných facetopedikulárních šroubů.^{29, 30} Tato třísloupcová fixační strategie je nadále používaná a další inovace jako polyaxiální šrouby či různé variace závitů vedly k vývoji robustnější a pevnější konstrukce s cílem maximálního dosažení fúze.³¹ Výzkum ukotvení šroubů v pediklu a těla obratle byl spjatý s inovacemi při jejich spojování pomocí dlah a tyčí. V sedmdesátých letech poprvé použil Roy Camille speciální dlahy ze slitiny kobaltu a chromu ke spojení šroubů při lumbosakrální fúzi a v osmdesátých letech Friedrich Magerl spojil pedikulární šrouby s externí fixací u pacientů s nestabilním páteřním poraněním.^{29, 32} Tyto inovace vydláždili cestu k dnešním „screw-rod“ konstrukcím.

Fúze v oblasti krční páteře provedená z předního přístupu byla prvně popsána Robertem Robinsonem a Georgem Smithem v roce 1955.³³ Cloward vylepšil tento přístup o použití kostního štěpu. Boni et al modifikovali Clowardovu techniku v případě multietážového postižení. Tato modifikace zahrnovala dekompresi míchy zepředu pomocí přední korpekтомie s diskektomií s následným zavedením autologního kostního štěpu do připraveného lůžka.³⁴ Postupně bylo vyvinuto velké množství instrumentárií typu šroubů a dlah sloužících k augmentaci provedeného výkonu a vytvoření lepších podmínek pro fúzi. Poslední inovace v oblasti přední krční diskektomie a fúze (Anterior cervical discectomy and fusion – ACDF) zahrnují použití dlah se zamykatelnými šrouby, variable-angle šrouby nebo také „stand-alone“ klece.^{35, 36} Signifikantní posun byl zaznamenán při vývoji zadního krčního instrumentária – od drátu a dlah k dnešním lateral-mass screw-rod konstrukcím.³⁷

1. 2. 3 Meziobratlové klece

Užití a vývoj intervertebrálních klecí je spjat se snahou o dosažení spinální fúze u koní s Wobblerovým syndromem v sedmdesátých letech 20. století. Po dekompresi míchy byl mezi obratle vložen cylindrický košík tak, aby biomechanicky augmentoval poraněný segment se

snahou zajistit pevnou krční spinální fúzi.³⁸ Následně byla tato technika aplikována Kuslichem i v humánní medicíně. Bagbyho a Kuslichova klec („BAK“ klec) byla používána pro ALIF s 91 % úspěšností fúze 2 roky od operace.³⁹ Kromě ALIF i další přístupy jako PLIF, laterální bederní meziobratlová fúze (Lateral lumbar interbody fusion – LLIF) či TLIF umožňovaly zajištění fúze pomocí podpory všech tří sloupců. R. Cloward jako první popisuje techniku PLIF s použitím auto a aloštěpů. V osmdesátých a devadesátých letech 20. století Harms s kolegy propagují TLIF přístup s použitím titanové klece, která je vyplněná kostními štěpy.⁴⁰ Brantigan et al v roce 1991 prezentovali použití klece s dutinou pro vložení štěpu vyrobené ze semi-krytalického polymeru typu polyetereterketonu (PEEK) vyztuženého karbonovými vlákny (carbon fibre-reinforced polymer – CFRP). Tyto klece z inertního pevného materiálu, který má podobný charakter jako kortikální kost a je vysoce odolný proti chemickým a fyzikálním vlivům, kombinovali se Steffeho transpedikulární stabilizací.⁴¹ Od této doby došlo k výraznému rozvoji PEEK klecí s použitím i jiných typů fúze. Nevýhodou PEEK klecí oproti titanovým je fakt, že tento materiál je hydrofobický, a tak může inhibovat kostní růst, tím dochází k vyššímu výskytu kostních cyst obratlů s progresí Modicových změn.^{42, 43} Pokroky v povrchových technologiích umožňují vylepšování vlastností implantátu při jejich osteointegraci.

1. 2. 4 Kostní materiály používané při meziobratlové fúzi

Použití kostěných náhrad se datuje do období starověkých civilizací. Použití tyrkysu jadeitu nebo zlata jako dentální náhrady je popisované u Mayů a později i v Římské říši.⁴⁴ ⁴⁵ V roce 1821 v Německu byl poprvé doložen případ použití kostního autoštěpu. V roce 1879 Sir Wiliam Macewem použil alograft k rekonstrukci kostěného defektu na humeru u čtyřletého chlapce.^{46, 47} Vývoj auto i alogenního materiálu pro náhradu kostí je komplexní a nacházíme zde mnoho cest při hledáního optimální substrátu. V roce 1911 použil Hibbs tibiální štěp k zadní fúzi a autologní štěp se postupně stal zlatým standardem pro spinální fúzi vzhledem k jeho osteoinduktivním, osteokonduktivním i ostogenním vlastnostem.¹⁵ V roce 1921 byl poprvé užit štěp z lopaty kyčelní při léčbě fraktury mandibuly a následně došlo i k jeho rozmachu a použití ve spondylochirurgii.⁴⁸ Použití alograftu při meziobratlové fúzi bylo poprvé popsáno v roce 1976, kdy alogenní štěp byl použit pro intervertebrální fúzi v oblasti krční páteře. Výše popsaná technika měla za cíl odstranit nevýhody spojené s použitím autoštěpu (morbidita spojená s odběrem autologního štěpu v oblasti lopaty kosti kyčelní). Nově ale vyvstaly otázky stran nedostatečné vaskularizace, osteoinduktivity a osteogenity alogenních štěpů.

Dalším milníkem byl vývoj demineralizované kostní hmoty (Demineralized bone matrix -DBM) a později i objev kostních morfogenních proteinů (Bone morphogenetic proteins

– BMPs) na základě prací Marshalla Urista.⁴⁹ V současnosti nadále dochází k prudkému rozvoji nových biomateriálů, které se přibližují svými vlastnostmi k ideální kostní náhradě.⁵⁰ Použití nanotechnologie, povrchových úprav materiálu, genového inženýrství, vývoj rekombinantních růstových faktorů, aplikace kmenových buněk či 3D tisku skafoldů – to vše přispělo k výraznému pokroku, který lze sledovat ve spondylochirurgii.

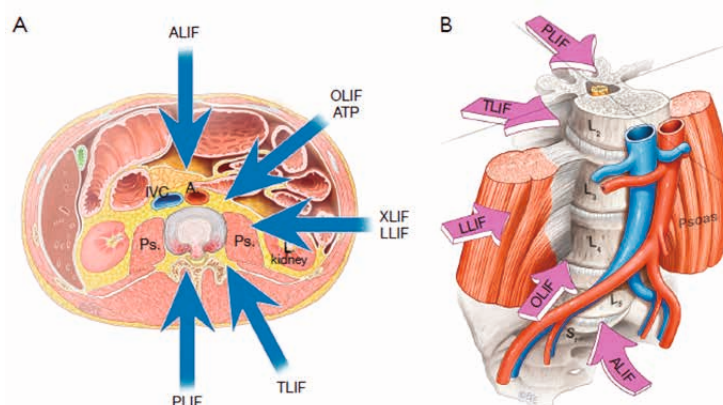
1.3 Metody meziobratlové kostní fúze

Lumbální intervertebrální fúze (Lumbar Intebody Fusion – LIF) se stala standardní metodou léčby pro široké spektrum spinálních onemocnění, kterými jsou degenerativní onemocnění, úrazy, infekce, deformity či neoplázie.⁵¹ Technika LIF zahrnuje odstranění meziobratlové ploténky, přípravu přilehlých krycích ploten obratlů v daném segmentu s následným vložením implantátu (klec, spacer nebo strukturální graft) do takto připraveného prostoru.

V současné době se používá 5 základních technik k vytvoření LIF:

- Posterior lumbar interbody fusion (PLIF),
- Transforaminal lumbar interbody fusion (TLIF) nebo její miniinazivní verze (MI-TLIF)
- Oblique lumbar interbody fusion/Anterior to psoas (OLIF/ATP)
- Anterior lumbar interbody fusion (ALIF)
- Lateral lumbar interbody fusion (LLIF).⁵²

Grafické zobrazení jednotlivých přístupů k páteři v rámci 5 základních technik je uvedeno na Obr. 2.



Obr. 2. – (A) Chirurgické přístupy k bederní páteři pro vytvoření meziobratlové fúze. Pět základních přístupů pro meziobratlovou fúzi je schématicky znázorněno na obrázku: přední přístup (ALIF), laterální nebo extrémně laterální přístup (LLIF nebo XLIF), šikmý/ventrální od musculus psoas přístup (OLIF/ATP), transforaminální přístup (TLIF nebo MI-TLIF) a zadní přístup (PLIF); (B) Chirurgické přístupy k bederní páteři pro meziobratlovou fúzi – základní anatomické struktury definující jednotlivé přístupy pro intervertebrální fúzi v různých etážích. Zdroj: Mobbs RJ, Phan K, Malham G, Seex K, Rao PJ. Lumbar interbody fusion: techniques, indications and comparison of interbody fusion options including PLIF, TLIF, MI-TLIF.

Tyto operace mohou být prováděny i mini-open technikami či minimálně invazivními přístupy (MIS). V současné době světové publikační výstupy nepřinášejí přesvědčivé důkazy nebo studie, které by jednoznačně prokazovaly výhodnost jednoho z výše uvedených přístupů, ve smyslu dosažení lepší kvality LIF či lepších klinických výsledků.⁵³ Definující anatomicou strukturou pro rozdělení přístupů je transversální výběžek. Přední techniky ošetření bederní páteře, kterými jsou ALIF, OLIF a LLIF využívají přístup ventrálně od transversálního výběžku, a jsou prováděny z retroperitoneálního přístupu. Zadní techniky (PLIF, TLIF, MI-TLIF) používají operační přístup zasahující dorsálně od transversálního výběžku (prochází buď přes páteřní kanál nebo přes oblast foramen intervertebrale) a touto cestou také umožní přístup do oblasti intervertebrálního disku. Prvně používané přístupy ALIF a PLIF byly postupně doplněny o nové později popisované techniky TLIF, OLIF a LLIF.

1. 3. 1 Zadní přístupy pro spinální fúzi

Posterior lumbar interbody fusion (PLIF)

V případě PLIF spinální chirurg proniká do oblasti intervertebrálního prostoru pomocí zadního přístupu v pronační poloze. Zadní sloupec obratlového těla může být dosažen pomocí otevřeného přístupu incizí ve střední čáře s bilaterální skeletizací páteře nebo pomocí paramediálního miniinvazivního přístupu (Wiltse muscle-splitting approach)⁵⁴. Poté co je obnažen a identifikován spinózní výběžek s obloukem, v daném segmentu je provedena laminectomie/laminotomie mediálně od kloubních facet s následnou retrakcí dury. Tímto způsobem je vytvořen koridor, kterým je zpřístupněn intervertebrální disk. Po dekompresi páteřního kanálu a eventuálně i kořenů následuje oboustranné odstranění meziobratlové ploténky a odstranění chrupavčitých částí krycích plotének s otevřením spongiózy (spongializace) obratlových těl. Následně je do meziobratlového prostoru vložen kostní štěp nebo implantát složený z biokompatibilních materiálů (klec, spacer). Zadní přístup je vhodný pro pacienty s degenerativním onemocněním páteře, která vyžaduje LIF. Vybraní pacienti se segmentální nestabilitou, rekurentní hernií disku, symptomatickou stenózou nebo pseudoartrózou mohou také profitovat z této procedury. Mezi kontraindikace k zadní fúzi patří extenzivní epidurální jizvení, arachoiditida a aktivní infekce.⁵³ PLIF metoda nabízí několik výhod ve srovnání s jinými technikami. PLIF je tradičním přístupem k páteři, a proto většina spondylochirurgů má s ním dostatečné zkušenosti. Dále PLIF technika umožňuje adekvátní obnovení meziobratlové výšky a nabízí excellentní vizualizaci nervových kořenů bez nutnosti mobilizace velkých cév, nervů či svalů a současně umožňuje provedení dekomprese při zachování podpory dorzálních struktur.⁵⁵ Taktéž je možné pomocí této metody provést 360 stupňovou fúzi daného segmentu páteře

z jednoho přístupu. Nevýhodu a limitaci této metody představuje riziko významného postižení paraspinálních svalů vznikající v důsledku jejich prolongované retrakce. Toto svalové postižení může dále oddalovat mobilizaci a prodlužovat celkovou rekonvalescenci pacienta.⁵⁶ Příprava krycích plotének je komplikovanější ve srovnání s předními přístupy. Dalšími potenciálním rizikem je retrakční poranění nervových kořenů způsobující fibrózu a chronickou radikulopatii.⁵⁷

Transforaminal lumbar interbody fusion (TLIF)

Dalším zadním přístupem je TLIF, který je určen především pro léčbu pacientů s degenerativním onemocněním páteře, u kterých selhala konzervativní terapie. Princip TLIF spočívá v unilaterální transforaminální diskektomii se současnou rekonstrukcí meziobratlového prostoru společně s implantací materiálu indukujícího vytvoření intervertebrální fúze (štěp, náhrada ploténky).⁵⁸ Pacient je operován v pronační poloze s použitím řezu ve střední čáře nebo pomocí bilaterálních paramediálních „mini-open“ incizí v úrovni postižených segmentů. Výkon se zpravidla kombinuje s transpedikulární stabilizací. Ke spinálnímu kanálu se přistupuje přes unilaterální laminektomii s následným odstraněním spodní facety intervertebrálního kloubu. Mezi nejčastější indikace provedení TLIF patří degenerativní postižení plotének (Degenerative disc disease – DDD), recidivující výhřez ploténky s axiálními bolestmi v kříži, symptomatická spondylóza, degenerativní nebo istmická spondylolistéza a taktéž lze tuto metodu použít při řešení krátkých spinálních deformit či úrazovém postižení.^{52, 58} Kontraindikace se shodují s PLIF technikou, zvláště se jedná o extensivní epidurální jizvení, arachnoiditis, aktivní infekce, spojené nervové kořeny a těžkou osteoporózu. Jednoznačnou výhodou TLIF představuje relativně jednoduchý přístup k obratlovým strukturám jako je lamina, kloubní facety či ligamentum flavum. Zásadním přínosem této techniky je šetření svalového aparátu, snížení rizika poškození nervových struktur, redukce krevní ztráty a včasná mobilizace pacienta. Otevřením neurálního foramina se na jedné straně snižuje riziko poranění důležitých anatomických struktur jako jsou nervové kořeny, dura mater nebo ligamentum flavum. Ve srovnání s PLIF technikou, TLIF šetří vazivové struktury, které slouží k zachování biomechanické stability postiženého pohybového segmentu.^{59, 60} Podobně jako i jiné techniky i TLIF může být provedena otevřeným přístupem nebo miniinvazivně či mini-open technikou s použitím kratších incizí a mikroskopu (MI-TLIF). Nevýhodou TLIF podobně jako u PLIF je výskyt paraspinálního iatrogenního postižení s prolongovanou svalovou retrakcí a také horší dosažitelnost krycích plotének ve srovnání s předními přístupy.

1. 3. 2 Přední přístupy

Anterior Lumbar Interbody Fusion (ALIF)

ALIF metoda využívá přední retroperitoneální přístup k obnažení celé ventrální plochy meziobratlového prostoru. Tento přístup umožňuje důkladnější disektomii, přímé vložení většího implantátu do plošně rozsáhlejšího intervertebrálního prostoru. Při této technice je pacient operován v supinační poloze s použitím střední, paramediální nebo Mini-Pfannenstiel (L5/S1) incize s vytvořením retroperitoneálního koridoru spolu s vaskulární mobilizací. ALIF přístup je vhodný pro etáže L4/L5 a L5/S1 díky vaskulárním anatomickým podmínkám. U etáží L2/L3 a L3/4 je tento přístup aplikován vzácně vzhledem k nutnosti velké retrakce peritonea ledviny, co může vést trombóze a. mesenterica superior. Tato technika je vhodná pro terapii degenerativního postižení meziobratlových plotének, spondylolistéz, tumorů, deformit, traumat nebo při revizích při selhání zadní fúze.⁶¹ Mezi kontraindikace ALIF patří morbidní obezita, předchozí abdominální operace se srůsty, solitární ledvina na straně výkonu, nepříznivá vaskulární anatomie, aktivní infekce, těžká ischemická choroba dolních končetin nebo osteoporóza. Istmická spondylolistéza v etáží L5/S1 je relativní kontraindikací a vyžaduje kombinaci zadní fixace s ALIF technikou.⁶² ALIF je spojena s několika klíčovými výhodami. Prvně tato technika přináší přímý pohled na meziobratlový prostor s dostatečným odhalením laterálních části obratlových těl, což umožňuje efektivní přípravu intervertebrálního prostoru a krycích plotýnek. Maximalizace velikosti implantátu a kontaktní plochy umožňuje korekci lordózy a obnovení foraminální výšky což přispívá k vysokému procentu úspěšnosti LIF.^{63, 64} ALIF taktéž šetří zadní paraspinální ligamenta a musculus psoas, tím snižuje pooperační bolest a současně zachovává posturální podporu páteře. Mezi komplikace související s předním přístupem, které vyplývají z blízkosti iliackých tepen, žil a truncus sympatikus, patří sexuální dysfunkce, retrográdní ejakulace, močová inkontinence nebo viscerální či cévní poranění.⁶⁵

Lateral lumbar interbody fusion (LLIF)

LLIF nebo XLIF (extreme lateral interbody fusion) technika popsána Ozgurem et al v roce 2006 představuje přístup k disku laterálním retroperitoneálním transpsoatickým koridorem.⁶⁶ LLIF je výhodným přístupem při potřebě vytvoření intersomatické fúze od segmentu Th12/L1 až k segmentu L4/L5. Etáž L4/L5 je nedostupná vzhledem k přítomnosti lopaty kosti kyčelní. V úrovni kaudálnějších segmentů se ventrálně nachází lumbální plexus a laterálně probíhají iliacká tepna a žíla, ty svým anatomickým průběhem zvyšují riziko iatrogenního poranění těchto struktur. Pacienti jsou operováni v poloze na levém nebo pravém boku v závislosti na výšce operované etáže páteře, a také dle preference chirurga.

Malá laterální incize je provedena na základě polohy disku při rentgenovém zobrazení. Tento přístup vyžaduje neuromonitoraci vzhledem k disekci přes musculus psoas a lumbální plexus. LLIF přístup je vhodný pro všechny degenerativní indikace – DDD (Degenerative Disc Disease) nebo u pacientů s FBSS (Failed back surgery syndrome). Je velmi dobrou volbou ke korekci sagitální a koronální deformit především u pacientů s bederní degenerativní skoliózou a laterolistézou⁶⁷. V některých případech (FBSS bez recidivy herniace ale s přítomností nestability segmentu) lze ponechat implantát i „stand alone“, tedy bez zajištění přídatné fixace. Stand alone LLIF metoda bez zadní instrumentace by neměla být používána v místech zvýšeného biomechanického stresu (kloubní artropatie, instabilita a deformity sousedící s již fúzovaným segmentem nebo u multietážového postižení). Také páteřní deformity typu degenerativní skoliózy nebo pseudoartrózy, inveterované zlomeniny po předchozí zadní transpedikulární stabilizaci jsou vhodné indikace k provedení LLIF. LLIF není vhodný u pacientů s těžkou centrální stenózou kanálu nebo těžkou spondylolistézou. Kontraindikovány jsou pacienti po předchozí retroperitoneální operaci, pacienti s retroperitoneálním abcesem, nádorem páteře nebo s abnormální cévní anatomií. Výhodou je možnost miniinvazivního (MIS) „muscle splitting“ přístupu která nabízí rychlou pooperační mobilizaci. Pomocí LLIF lze dosáhnout korekci značných deformit s velkými implantáty a s vysokým procentem úspěšnosti fúze, avšak při zvýšeném riziku poškození lumbálního plexu, musculus psoas nebo střev, zvláště v etáži L4/5.⁶⁸ Cévní poranění je závažnou komplikací laterálního transpsoatického přístupu z důvodu obtížné kontroly perioperačního krvácení.

Oblique lumbar interbody fusion/anterior to psoas (OLIF/ATP)

OLIF nebo ATP přístup byl prvně popsán v roce 1977 Michaelem Mayerem a představuje miniinvazivní přístup k meziobratlovému prostoru koridorem mezi peritoneem a musculus psoas. OLIF je alternativou k LLIF a taktéž nevyžaduje zadní přístup, laminektomii, facetectomii nebo skeletizaci s poraněním paraspinální a spinální muskulatury. Narozdíl od laterálního transpsoatického přístupu při OLIF/ATP přístupu nedochází k disekci musculus psoas a výrazně se snižuje riziko poranění lumbálního plexu. Při této metodě spinální fúze je pacient v laterální pozici na pravém nebo levém boku.⁶⁹ Laterální a paramediální incize je provedena na základě angulace disku při rentgenovém zobrazení u napolohovaného pacienta. Neuromonitoring není potřebný vzhledem k tomu, že vytvořený koridor se nachází před musculus psoas. OLIF/ATP technika je vhodná v segmentech L1-S1 a není limitována polohou lopaty kosti kyčelní. Indikace k OLIF/ATP se prolínají s indikacemi k LLIF; patří sem degenerativní onemocnění,

korekce sagitálních a koronárních deformit obzvlášť lumbální laterální skolióza s laterolistézou. Kontraindikaci k výkonu představuje těžká centrální stenóza páteřního kanálu a významná spondylolistéza. K výhodám OLIF přístupu patří možnost provedení výkonu miniinvazivně s následnou rychlou mobilizací. Poranění plexu a musculus psoas jsou méně pravděpodobné vzhledem přístupu ventrálně od svalu. OLIF si zachovává výhodu předního přístupu, kterou je možnost značné korekce deformit s vysokým procentem úspěšné fúze, při eliminaci hlavních nevýhod LLIF. Rizikem OLIF/ATP přístupu zůstávají možnosti vzniku sympatických dysfunkcí a cévního poranění.⁷⁰⁻⁷²

V současnosti je dostupných několik výše uvedených technik neboli přístupů k vytvoření LIS. Studie z posledních let sice poskytují široký přehled indikací, výhod, nevýhod, či rizik jednotlivých typů LIF. Srovnání jednotlivých přístupů prozatím nedokazuje jednoznačnou výhodnost jednoho z nich stran úspěšnosti kostní fúze nebo klinického výsledku.

1. 4 Možnosti využití materiálů při intervertebrální déze

Hojení kosti a tvorba nové kostní hmoty jsou klíčové pro vznik spinální fúze. Tento proces je ovlivněn lokálními podmínkami, celkovým stavem organismu, charakterem a složením materiálu, který je použit jako náhrada disku či obratlového těla. Iniciální stabilita fúzované oblasti je zajištěna většinou spinálním instrumentářiem a samotný štep či náhrada je základem pro hojení a remodelaci procesu, který probíhá během delšího časového úseku. Pacienti s nezhojenými nebo jen částečně zhojenými segmenty mají horší klinické výsledky a přetrvávající potíže, které často vyžadují revizní operace.

1. 4. 1 Biologie spinální fúze

Vhojování kostních štěpů probíhá ve 4 fázích podobně jako u hojení zlomenin.

1. *Zánětlivá fáze* – zde dochází k tvorbě hematomu, zánětlivé reakci a chemotaxi mesenchymálních buněk do místa štěpu.
2. *Proliferační fáze* – představuje osteoblastickou diferenciaci, která probíhá pod vlivem kostních morfogenních proteinů a dalších růstových faktorů se souběžnou revascularizací.
3. *Materiálová fáze* – je charakteristická resorpcí štěpu a ukládáním osteoidu.
4. *Remodelační fáze* – v důsledku působení mechanického stresu dochází k postupné náhradě implantovaného štěpu vyzrálou lamelární kostí.

1. 4. 2 Princip ideální kostní náhrady

Ideální kostní náhrada by měla poskytovat podporu a strukturální intergritu během celého procesu osteogeneze a jejího vhojování. Všeobecně lze konstatovat, že vlastnosti ideální kostní náhrady by měly splňovat následující čtyři základní principy:

1. Osteogeneze

Osteogeneze představuje schopnost vytvářet novou kost. Graft obsahuje živé osteoblastické buňky, které jsou schopny přímé novotvorby kosti. V současnosti jen čerstvý autogenní štěp splňuje tyto charakteristiky. Jiné typy náhrad se spoléhají na získané hostitelské progenitorové buňky, které jsou schopny se diferencovat na buňky tvořící kost.

2. Osteokondukce

Osteokondukce je schopností materiálu nebo nosiče poskytnout třídímní matrici pro vrůstání kapilár, perivaskulární tkáně a osteoprogenitorových buněk. Čistě osteoinduktivní materiály se chovají pasivně, podporují proces inkorporace graftu a eventuálně snižují množství použitého autograftu. Jsou také definovány jako „graft extenders“.

3. Osteoindukce

Osteoindukce představuje schopnost stimulovat a diferencovat osteoprogenitorové buňky na osteoblasty formující kost. Tyto látky – především BM proteiny jsou také popisovány jako „graft enhancers“.

4. Osteopromoce

Osteopromoce je podporou kostního hojení, nejedná se však o přímou indukci novotvorby kosti.

1. 4. 3 Typy kostních náhrad

Náhrady kostní tkáně (Bone Substitute Materials – BSM) jsou definované jako anorganické, syntetické nebo biologicky organické kombinované materiály, které se implantují do místa kostěného defektu za účelem jeho prohojení. BSM se užívají jako náhrada za autogenní nebo alogenní kostní štěp.⁷³ V minulosti byly používány především inertní materiály k náhradě kostních defektů, které především plnili roli „space holder“ během procesu hojení. Současným modelem je použití nových „inteligentních“ biomateriálů, které nejen podporují, ale také iniciují kostěné prohojení.⁷⁴ Dle „diamantového konceptu“ tkáňového inženýrství by měla ideální kostní náhrada nabízet třídímní osteoinduktivní strukturu, obsahovat osteogenní buňky a osteoinduktivní faktory, a také by měla indukovat vaskularizaci. To vše při dostatečné mechanické pevnosti materiálu.⁷⁵ I přes rozsáhlý výzkum tento materiál

podobný kostěnému autograftu nebyl doposud úspěšně vytvořen. Současným konceptem je tedy vytvoření kombinace nosiče nebo třídimenzionální konstrukce s živými buňkami a biologicky aktivními molekulami – Tissue engineering construct (TEC).⁷⁶

BSM se dělí dle jejich původu do 5 následujících skupin:

1. BSM přírodního původu

Zařazujeme sem autogenní a allogení kostní štěpy, demineralizovanou kostní hmotu (DBM), xenogenní materiály jako je přírodní hydroxyapatit zvířecích kostí nebo také fyto-ogenní materiály získávané z řas nebo korálů.

Autologní kostní štěp (Autoštěp)

Autologní kostní štěp je živou kostí získanou přímo od pacienta. Je nadále považován za „zlatý standard“, se kterým jsou srovnávány jiné potenciální náhrady kosti. Jeho výhody spočívají v tom, že má přirozený charakter a strukturu kosti. Přirozeně má osteoinduktivní, osteokonduktivní a osteogenní vlastnosti. Spongiózní kost nabízí výrazně lepší osteoinduktivní, osteokonduktivní a osteogenní potenciál ve srovnání s kostí kortikální, která zase nabízí lepší strukturální podporu.^{77, 78}

Na základě odběrového místa můžeme v případě obratlové fúze kostní štěpy rozdělit na lokální a štěpy z lopaty kosti kyčelní. Lokální štěpy z oblouku, klouků a spinózních výběžků jsou často odebírané při dekompresi kanálu. Jejich výhodou je, že jejich odběr nevyžaduje další operační přístup. Tím odpadá morbidita odběrového místa a snižuje se riziko možných komplikací. Lokální štěpy jsou s ohledem na možné místo odběru tvořeny z velké části kostí kortikální, která na jedné straně poskytuje mechanickou stabilitu, ale na straně druhé vede k omezené migraci osteoprogenitorových buněk, což vede k nižšímu procentu prohojení a možnému rozvoji nestability. Lopata kosti kyčelní je nejčastějším místem odběru autologního kostního štěpu, protože je jednoduše dostupná a nabízí relativně dostatečné množství kostní hmoty pro vytvoření monokortikálního, bikortikálního, trikortikálního nebo čistě spongiózního štěpu.⁷⁹⁻⁸¹ Tyto štěpy jsou levné a dostupné prakticky kdykoliv během operace. I přesto, že je autograft považovaný za zlatý standard, je spojen s několika zásadními nevýhodami. Hlavní nevýhodou představuje morbidita vyplývající z odběrového místa. Kde se vyskytují následující komplikace: hluboká infekce, fraktura, abdominální hernie, retroperitoneální krvácení, poranění kožních nervů, krevní ztráty a cévní poranění. Dle některých studií výskyt těchto komplikací dosahuje až 10 %. Méně závažné komplikace jako je povrchní infekce, seromy v ráně, menší hematomy jsou popisovány u 10-21 % pacientů.⁸¹⁻⁸³ I když štěpy z lopaty kyčelní splňují podmínky

optimálního graftu, procento úspěšnosti instrumentované lumbální intersegmentální fúze se pohybuje v širokém rozsahu od 40 do 100 %.^{84, 85} Tyto limity vedou tkáňové inženýry a spondylochirurgy k dalšímu hledání „ideálního graftu“.

Alogenní kostní štěp (Aloštěp)

Aloštěp představuje kadaverózní kost, která byla sterilizována, tak aby byla zbavena infekčních agens a obsahovala jenom inertní materiál. Je často používána jako alternativa autologního štěpu při bederní či krční fúzi, avšak jen v roli „graft expanderu“. Alogenní kostní štěpy mají prokázané dobré osteokonduktivní vlastnosti, avšak jeho osteoinduktivní schopnosti jsou minimální a osteogenní potenciál je roven prakticky nule. Růstové faktory a živé buňky jsou z aloštěpu odstraněny během procesu přípravy, tak aby byla minimalizována jeho antigenicita. Užití aloštěpu i přes všechny opatření v sobě nese teoretické riziko přenosu infekčních nemocí (hepatitida B nebo C, HIV).⁴⁷ Aloštěpy jsou dostupné v několika formách: spongiózní, kortikální, kortikospongiózní a ve formě demineralizované kostní matrice (DBM – demineralized bone matrix). Kortikální aloštěpy mají dobrou strukturální stabilitu, ale jejich remodelace a resorpce je poměrně dlouhá. Naopak kortikospongiózní aloštěpy nabízí minimální mechanickou podporu. Avšak díky jejich velké ploše je proces jejich remodelace a resorpce výrazně rychlejší.⁸⁶ Metody zpracování se liší dle výrobce a zahrnují iradiaci, mechanický debridement, vysokotlakové promytí vodou a nasáknutí antibiotiky či etanolem. Aloštěpy prokázaly povzbuzující bezpečnost a efektivitu především u krčních stabilizací. Retrospektivní studie srovnávající použití aloštěpu a autoštěpu u pacientů, kteří podstoupili multietážovou přední krční diskektomii a fúzi (ACDF), prokázala úspěšnost fúze v 94,3 % respektive ve 100 %.⁷⁸ V systematické studii Miller et al publikovali srovnatelné výsledky stran rentgenového a klinického zhodnocení při ACDF s použitím alo i autoštěpu. Jediný zaznamenaný rozdíl byl v délce hojení.⁸⁷ Minimální morbidita, podobné výsledky a výborná dostupnost jsou důvodem chirurgovy preference aloštěpů namísto autoštěpů.

Demineralizovaná kostní matrice (DBM)

DBM se vyrábí kyselinovou extrakcí alogenní kosti, výsledkem čehož je ztráta většiny minerální komponenty kosti. Výsledný substrát obsahuje růstové faktory (včetně nízkomolekulárního BMP), nekolagenní proteiny a kolagen mající osteokonduktivní a osteoinduktivní vlastnosti. DBM je dostupná v rozličných formách (tmel, pasta, gel) a nemá strukturální pevnost, proto se používá v kombinaci s autologním nebo alogenním štěpem. Bae et al dokumentovali přítomnost rozličného množství a aktivitu BMP v komerčně dostupné DBM.⁸⁸ Použití DBM mixované s koncentrátem kostní dřeně u pacientů s PLIF dosáhlo srovnatelného procenta kostní fúze jako při použití autogenního

kostního štěpu.⁸⁹ Vědecké studie prokázaly variabilní hodnoty kostěné fúze při použití DBM. V 17 studiích se pohybovalo procento fúze od 83 % u neinstrumentovaného výkonu až po 60–100 % úspěšnosti fúze u instrumentované procedury. S ohledem na výše uvedené se dá konstatovat, že DBM naplňuje některé podmínky „graft extenderu“ a „graft enhanceru“, obzvláště v kombinaci s autograftem nebo koncentrátem kostní dřeviny, nicméně použití jako „stand alone“ graftu je sporné.

2. Syntetické materiály

Do této skupiny patří keramické materiály jako je bioaktivní sklo, trikalcium fosfát (TCP), hydroxyapatit (HA), kalciumfosfát (CP) nebo skleněné ionomerové cementy. Taktéž tato skupina zahrnuje materiály, kterými jsou: titan, polymery obsahující polymetylmetakrylát (PMMA), polyglykozidy nebo kopolymery jako polykaprolakton (PCL).

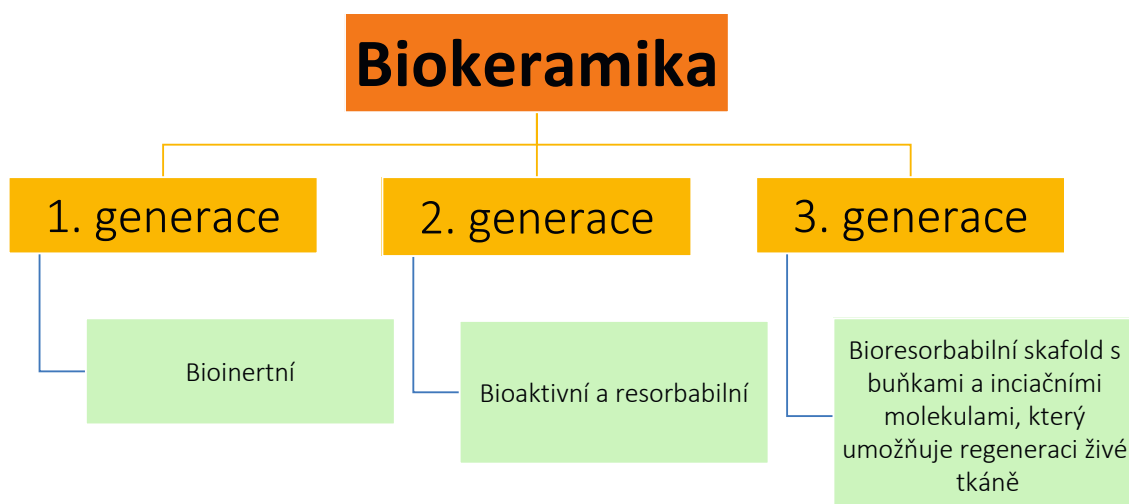
Keramika

Keramické nosiče jsou krystalické struktury anorganických nemetalických minerálních solí, produkované při vysokých teplotách a jsou navrženy tak, aby získaly podobné chemicko-fyzikální vlastnosti jako kost ve své mineralizační fázi.⁹⁰ Vzhledem k limitům auto i aloštěpů byly vyvinuty biosyntetické keramické nosiče jako alternativní substrát k podpoře vzniku fúze. Tyto inertní materiály obsahující vápník mají strukturu podobnou kosti, osteokonduktivní potenciál a nabízí jen limitovanou osteoindukci. Jsou křehké struktury, mají malou mechanickou pevnost, může docházet k jejich zlomení, ale na druhé straně jsou biodegradabilní, dostupné v neomezeném množství, neimunogenní a bez rizika přenosu infekce.⁸⁵ Biokeramické nosiče mohou být formované a řezané do požadovaných tvarů umožňujících víceúčelové použití v ortopedii a mohou být také nosiči DBM, kolagenu nebo růstových faktorů. Při jejich aplikaci je vhodné použití vnitřní fixace k eliminaci zátěžových sil vzhledem k jejich mechanické nestabilitě. Mezi nejčastěji používané keramické nosiče patří kalcium-fosfáty, hydroxyapatit (HA), β -trikalciumfosfát (β -TCP), kalcium sulfát nebo jejich kombinace. HA i β -TCP jsou porézními materiály s velikostí póru odpovídající spongiózní kosti. Délka jejich resorpce je různá, od několika týdnů po měsíce v případě β -TCP, u HA je tato doba v řádu až několika let u HA.⁹¹ V polovině 80 let byl představen bifázický kalciumfosfát (BCP), který kombinoval HA a β -TCP v poměru 60:40 a tím vyvažoval jejich benefity a nevýhody. V randomizované studii pacientů s lumbální stenózou, kteří podstoupili instrumentovanou spinální fúzi s HA, v porovnání se štěpem z lopaty kyčelní nebo s jejich kombinací byla popisována 100% úspěšnost kostní

fúze.⁹² V případě, že byl vložen BCP nebo autograf do PEEK klece u pacientů, kteří podstoupili ACDF bylo dokonce dosaženo lepších výsledků než při použití samotného BCP. Kalcium-fosfátové nosiče, které ještě přesněji kopírují složení kosti, jsou v klinické praxi užívány při spinální artrodéze. Na rozdíl od jiných typů keramiky, u kterých je remodelace zajištěna makrofágy, při užití kalcium-fosfátu byla zjištěna osteoklasty mediovaná resorpce podobná jak u živé kostní tkáně. Z výše uvedeného důvodu nedochází k vrůstání měkkých tkání do materiálu což, vytváří lepší prostředí pro remodelaci, a také nenacházíme okolní zánětlivou reakci jako u TCA⁹³ Dalšími keramickými materiály využívanými v praxi jsou Coralline Hydroxyapatite nebo silicate–substituted calcium phosphate (SiCaP). Bioaktivní sklo, duální HA kompozit skládající se ze solidních a porózních částí nebo vysokoporézní HA jsou dalšími materiály testované v animálních studiích se slibnou vyhlídkou k dalšímu použití.^{94, 95} I když bylo dosaženo dobrých výsledků kostní fúze při použití keramiky jako osteokonduktivního nosiče, její další potenciál spočívá ve schopnosti být nosičem osteogenních a osteoinduktivních agens. Grafické zobrazení námi navrženého prototypu takového nosiče uvádí Obr. 3. Cílem první generace biokeramiky bylo pouhé nahrazení kosti. V případě druhé generace biokeramika napodobňuje především funkce související s biomineralizací. Až třetí generace biokeramiky poskytuje adekvátní bioresorbabilní matici, která pomáhá relevantním buňkám při novotvorbě kosti. Přehled generací biokeramických nosičů je zobrazen v Tab. 1.



Obr. 3 – (A) Schématické znázornění kompozitního keramického skafoldu. (B, C, D) – reálné zobrazení keramického implantátu s tvrdým HA/TCP prstencem (B) který je vyplněn biopolymerem s nanon-HA (C) a posléze opláštěn biopolymerem s nano-HA (D)



Tab. 1 – Přehled tří generací biokeramiky.

Titanové implantáty

Titan byl prvním materiálem, který byl použit k vytvoření intersomatické fúze díky nízké denzitě, odolnosti vůči korozi a potenciálu k osteointegraci.^{96,97} Titanové klece jsou efektivní při dosažení kostní fúze, nicméně jejich náchylnost k proboření a dislokaci do obratlového těla (subsidence) je zjevnou nevýhodou.^{98,99} Předpokládá se že toto „proboření“ titanové klece do sousedících obratlových těl je důsledkem velkého rozdílu mezi rigiditou titanu (definováno Youngovým modulem elasticity) a kostní hmotou obratlového těla.¹⁰⁰ V případě použití titanových klecí při ACDF je ten jev patrný až ve 24.9 %, nicméně často bez klinické korelace.¹⁰¹

PEEK implantáty

Odpovědí na nevýhody titanových klecí byl vývoj náhrad z polyetereterketonu (PEEK), který má nižší modul elasticity než titan a přibližuje se tak k elastickému modulu kosti. Výše uvedený fakt vedl ke snížení „stress shiedling“ efektu, sníženému dosedání implantátu a zlepšení kostní fúze. PEEK klece (viz Obr. 4) jsou používány ve všech technikách kostní dězy s vysokým procentem úspěšné kostní fúze při relativně nízkém riziku proboření do obratlových těl. Další výhodou PEEK implantátu je jejich radiolucence, která umožňuje lepší hodnocení prohojení fúzovaného segmentu na rentgenových snímcích. PEEK je taktéž inertní sloučeninou s minimální buněčnou adhezivitou a tím snižuje riziko infekce. Naopak nevýhodou je PEEK indukce aseptického zánětlivého prostředí kolem implantátu, což vede k fibrózní enkapsulaci a zvýšenému riziku pseudoartrózy.¹⁰² V systematické souhrnné studii srovnávající

PEKK a titanové implantáty Seaman et al zjistili vyšší procento fúzí u titanových implantátů nežli u PEEK klecí (86,2 % versus 78,9 %) a naopak nepřekvapivě vyšší procento probořování u titanových implantátů ve srovnání s PEEK klecemi (35 % versus 28 %).¹⁰³



Obr. 4 – Radiolucentní implantát pro přední cervikální fúzi (Cervios chronOS – DePuy Synthes Spine, Inc., USA) Implantát se skládá z PEEK klece, která je vyplněná syntetickým β -TCP (náhrada spongiózní kosti). Obrazový materiál přebrán z Cervios and Cervios chronOS sales sheet (036.000.277 DSEM/SPN/0914/0173 12/15 – DePuy Synthes)

PEEK implantáty s titanovým pláštěm

Vývoj PEEK implantátů s titanovým pláštěm souvisí se snahou spojit benefity obou výše uvedených materiálů do jednoho meziobratlového implantátu, grafické zobrazení implantátu viz Obr. 5. Mobbs et al ve své studii prezentoval 95 % úspěšnost fúzí, kdy aplikoval klece vytvořené kombinací obou materiálů pomocí ALIF techniky.¹⁰⁴ Naopak Rickert et al při srovnání kombinovaných klecí a PEEK klecí použitých TLIF metodou nezaznamenal žádný rozdíl v kostěném prohojení.¹⁰⁵



Obr. 5 – Klec s PEEK jádrem a titanovým integrovaným povrchem (PROTi 360^o™ – DePuy Synthes Spine, Inc., USA). Titanový bioaktivní povrch podporuje přichycení a růst kost formujících buněk. Obrazový materiál přebrán z ProTi_Sell Sheet. (094993-180712 08/18 – DePuy Synthes)

3-D tištěné klece (3-D printed cages)

Vzhledem k výše uvedeným slabinám PEEK i titanových klecí je v posledních letech zaznamenáván rozvoj třídimenziálního (3-D) tisku, jakožto techniky, která může ještě zlepšit techniku intersomatické fúze. 3-D bioprinting nabízí i možnost přidání biologického agens, nebo provedení povrchových úprav pomocí biomateriálů ke zlepšení osteointegrace implantátu.^{106, 107} Příklad 3-D tištěného implantátu uvádí Obr. 6.



Obr. 6 – Titanové 3-D tištěné implantáty (CONDUIT™ Interbody Platform EIT™ Cellular Titanium – DePuy Synthes Spine, Inc., USA), které se vyznačují 80 % porézní makro-, mikro- a nanostrukturami. Implantáty jsou navrženy tak, aby co nejlépe imitovali kortikální a spongiózní kost, a tak napomáhali vzniku fúze. Obrazový materiál přebrán z Conduit Interbody- EIT Sales Sheet (103973-181211 DSUS/EM 2019 – DePuy Synthes)

Povrchová úprava materiálů

Implantáty ve spinální chirurgii lze upravovat dvěma technikami – aditivně a substrakčně.¹⁰⁸ Aditivní technika spočívá v 3-D tisku, tedy ve vytváření 3-D objektu pomocí postupného vrstvení, které je procesované pomocí počítačového softwaru.¹⁰⁹ Tento aditivní proces lze použít na vytváření objektů z keramiky, kovů nebo polymerů.¹¹⁰ Užití titanového spreje na PEEK klec je běžným příkladem aditivního „post processingu“, který vede ke zlepšení jejich povrchových vlastností.

Princip substrakční metody spočívá v povrchovém odstraňování části materiálu. Abrasivní čištění a kyselinové leptání představují dvě základní formy substrakčního zpracování materiálu.¹⁰⁹ V případě použití takto upraveného materiálu ve spondylochirurgii, je titanový povrch implantátu zdrsňován a dochází k vytváření povrchové submikroní textury, což vede k lepší osteoblastické diferenciaci, osteointegraci a novotvorbě kosti.¹¹¹ Zdrsňené titanové povrchy nanotechnologií indukují in vitro větší diferenciaci osteoblastů z mezenchymálních buněk (Mesenchymal stem Cells – MSCs) oproti povrchově upravenému povrchu PEEK. Olivares-Navarrete et al potvrdili nejvyšší koncentraci TGF- β , FGF-2, VEGF-A (vascular endothelial growth factor A) na zdrsňěném titanovém povrchu.

Povrchově zdrsňený titanový povrch je také schopen zlepšovat prostředí pro osteogenezi indukci stimulace BMPs.^{102, 107, 112} Infekce implantovaného materiálu může být život ohrožující komplikací při operacích na páteři. Bakterie adherují na povrch implantovaného materiálu, vytvářejí glykokalyxový komplex, který je chrání před antibiotiky a sťažuje jejich eradikaci. Povrch implantátu upravený nanotechnologií vykazují významně nižší bakteriální adhezi především u *Stafalococcus aureus*, *epidermidis* a *Pseudomonas aeruginosa*^{113, 114} Stříbrné nanočástice mohou být aplikovány na implantát pomocí plazmové iontové impregnace nebo párového nanášení (vapor deposition). Stříbrné nanočástice mají prokázaný baktericidní efekt, přičemž zůstávají biokompatibilní s kostí.¹¹⁵

3. Kompozitní materiály

Kompozitní materiály jsou definované jako kombinace různých materiálů, např. keramiky a polymerů. Spojením materiálů s různou strukturou a biochemického charakteru lze dosáhnout lepších vlastností kompozitu například, co se týče biodegradability.

Polymery

Další výzvou pro tkáňové inženýrství a spondylochirurgii je i vývoj polymerních bioabsorbovatelných implantátů, které by znovu vytvářeli extracelulární matrix, postupně se zcela vstřebaly, a tak byly zcela nahrazeny vlastní kostí hostitele.

Přírodní polymery

Mezi přírodní polymery zařazujeme hlavně proteiny (kolagen) a polysacharidy (chitosan, alginát, kyselina hyaluronová a celuloza). Většinou obsahují biofunkční molekuly, které zabezpečují jejich bioaktivitu, biomimetický povrch a přírodní remodelaci. Na druhé straně imunitní odpověď, potencionální mikrobiální kontaminace, nekontrolovatelná degradace a malá mechanická pevnost mohou limitovat jejich použití v tkáňovém inženýrství.¹¹⁶ Jedním z nejvíce studovaných přírodních polymerů je kolagen. Kolagen je enzymaticky biodegradabilní, nabízí možnost navázání kostních buněk a podporuje ukládání kostní matrix. V roce 1997 Mizuno et al ve své studii dokládá osteogenní vlastnosti kolagenu I.¹¹⁷ Tento fakt potvrzují i další in vitro studie přinášející informace o osteoblastické proliferaci a osteogenní diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk v kolagenních skafoldech.¹¹⁸ Z dalších použitelných polymerů v dané indikaci se nyní profiluje celuloza jako jeden z nejslibnějších polymerních materiálů vhodných pro kostní regeneraci. Celuloza má výborné vlastnosti stran buněčné adheze, osteoblastické diferenciaci, podpory osifikace a navíc disponuje excelentními mechanickými vlastnostmi.¹¹⁹

Syntetické polymery

Syntetické polymery představují skupinu materiálů s výbornou mechanickou odolností, predikovatelnou degradací, kterou lze přizpůsobovat pomocí chemického složení, krystalinity a molekulové hmotnosti. Na druhé straně ve srovnání s přírodními polymery mají nižší bioaktivitu a osteokonduktivitu.¹¹⁶ Zlepšení těchto vlastností lze docílit přidáním bio-keramických částic. Jednou z možností využitelnosti syntetických polymerů ve spinální problematice se nabízí vytvoření meziobratlové klece z polymléčné kyseliny (Polylactic acid – PLA). Tento implantát je biomechanicky pevný a vstřebatelný, nicméně sám o sobě má slabou osteokonduktivitu. Ke zlepšení osteokonduktivních vlastností lze inkorporovat do klece nanostrukturovaný β -TCP. Tento typ bioabsorbovatelného implantátu, který vyvinul Cao et al byl použit k vytvoření krční fúze na ovčím modelu. Implantát prokázal větší biomechanickou stabilitu jako trikortikální štěp z lopaty kyčelní a PEEK klece a po čase došlo k jeho přestavbě a resorbci.¹²⁰ V roce 2015 Tang et al publikovali slibné výsledky, kdy vyrobili implantát pro meziobratlovou fúzi kombinací rychle degradabilního polymeru citrátu a hydroxyapatitu.¹²¹ Polyester poly ϵ -caprolactone (PCL) je příkladem polymeru, který může být navržen tak, aby imitoval kolegenní matrix, nabízel strukturální porozitu a osteokonduktivní vlastnosti.¹²² Dalšími používanými syntetickými polymery jsou polymery kyseliny mléčné, glykolové a jejich kombinace (PDLA, PLLA, PLGA) Většinu polymerových kostních náhrad lze použít jako nosiče pro bioaktivní molekuly a růstové faktory.¹²³

4. BSM kombinované s růstovými faktory

Přírodní nebo rekombinantní růstové faktory představuje např. bone morphogenic protein (BMP), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- β (TGF- β), insuline-like-growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF) a fibroblast growth factor (FGF). Tyto faktory jsou přidány do nosiče, aby zvýšily jeho biologickou aktivitu. Příkladem může být kompozitní materiál – tzv. mPCL-TCP nosič (medical-grade-poly-caprolactone-tricalciumphosphate) kombinovaný s rekombinantním humánním BMP-7, který byl použit přemostění defektu kosti na modelu ovce.

Osteoinduktivní faktory

Růstové faktory zahrnující kostní morfogenní proteiny (BMP), transforming growth factor β (TGF- β) a platelet-derived growth factor (PDGF), jsou signálními proteiny, které indukují buněčnou diferenciaci a syntézu kostní matrix.

Kostní morfogenetické proteiny (Bone Morphogenetic proteins – BMPs)

V roce 1965 provedl Dr. Marshall Urist průlomovou studii kdy byla implantována demineralizovaná kost do svalu králíka, následně došlo k indukované novotvorbě kosti v okolní tkáni. Dr. Urist předpokládal, že za tento „fenomén“ jsou zodpovědné nějaké typy proteinů a nazval je jako „bone morphogenetic proteins“ (BMPs), kterých je popsáno 20 a jsou zařazeny do tzv. „transforming growth factor superfamily“ na základě jejich aminokyselinových sekvencí.⁴⁹ BMPs představují diferenciační faktory pro mezenchymální kmenové buňky, které je transformují na kost nebo chrupavku tvořící buňky (bone/cartilage forming cells). Tento efekt je zajištěn speciálními receptory nacházejícími se na povrchu těchto buněk. V nižších koncentracích BMPs indukují enchondrální ossifikaci, kdy se mezenchymální kmenové buňky diferencují na chondrocyty tvořící chrupavčitou matrix, kdežto ve vyšších koncentracích dochází přímo k formování kosti¹²⁴.¹²⁵ Pro klinické použití jsou dostupné dva typy těchto růstových faktorů: rekombinantní BMP-2 a 7 (rh BMP-2, rhBMP-7), které jsou získávané z mamálních buněčných kultur.⁴⁹ Tyto proteiny aplikované na kolagenních nebo keramických kalcium-fosfátových nosičích mohou být dodány do místa fúze. Takto upravené nosiče slouží jako osteokonduktivní agens a současně retinují osteoinduktivní BMPs. Komplexní role rh BMP-2 tkví v jeho vlivu na funkci osteoblastů osteoklastů, kdy svým působením zlepšují kostní růst a současně indukují kostní resorpci.¹²⁶ Simmonds et al prezentoval výsledky 11 studií, u kterých byly použity BMPs. Ve výše uvedených studiích (1302 pacientů) bylo zaznamenáno zlepšení Oswestry Disability Indexu (ODI) po 24 měsících od operace ve srovnání s použitím autograftu a také došlo k 12 % nárůstu úspěšnosti kostní fúze.¹²⁷ Rozšířené použití BMPs přineslo i výskyt následujících komplikací: potenciálně vyšší riziko vzniku nádorového onemocnění, retrográdní ejakulace, osteolýza, vznik seromové formace, radikulitidy, cystické formace nebo ektopické novotvorby kosti.^{128, 129} Od použití rh BMP-2 při předních krčních fúzích bylo vzhledem ke komplikacím zahrnujícím dysfagii, resorpci krycích plotének obratlů a výraznému pooperačnímu otoku úplně odstoupeno. Použití při bederních artrodézách je nadále používáno vzhledem k vysokému procentu úspěšnosti fúze a minimu komplikací v dané lokalitě.^{130, 131} Zatímco BMPs potencují buněčnou diferenciaci (přeměnu mezenchymálních buněk na osteoblasty) PDGF a TGF- β jsou růstovými faktory, které podporují dělení buněk a zvyšují produkci strukturálních proteinů.¹³²

Autologní deštičkový koncentrát

Obohacená krevní plazma (platelet rich plasma – PRP) získala významnou pozornost v ortopedické a vědecké komunitě vzhledem k širokým možnostem jejího použití. PRP je trombocytární koncentrát s malým množstvím plazmy derivované z krve pacienta. Trombocyty obsahují velké množství zánětlivých a růstových faktorů. Poté co jsou in vivo aktivované agonisty, kterým je např. trombin. Frechette identifikoval deštičkové faktory, které mohou dále participovat na novotvorbě kosti. Těmito faktory jsou: PDGF, TGF- α , TGF- β , epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth faktor (bFGF/FGF-2), insuline-like growth faktor (IGF) a vascular endothelial growth faktor (VEGF). Jejich funkcí je zejména podpora chemotaxe a proliferace mesenchymálních kmenových buněk a osteoblastů a mohou být kombinovány s auto i aloštěpy nebo jinými osteokonduktivními nosiči.

Fibroblast Growth Faktor proteiny

Skupinu FGF proteinů tvoří 23 zástupců (FGF-1 až FGF 23), nacházíme je ve většině tkání lidského těla a mají různé fyziologické funkce. FGF-2, FGF-8 a FGF-9 byly poprvé identifikovány v agregovaných mesenchymálních buňkách a osteoblastech během fetální periody, kdy pravděpodobně hrají důležitou roli v kostním vývoji. Genetické mutace FGF receptorů nebo i samotných růstových faktorů (FGF3) vedou k syndromům projevujícím se abnormálními kostními formacemi či dysplazií.^{133, 134} FGF-2, který se jeví být základním faktorem této skupiny pravděpodobně podporuje proliferaci a diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk. Lokálně zvyšuje počet osteoblastů a chondroblastů, podporuje tvorbu dalších růstových faktorů (TGF, IGF) a jejich vázacích proteinů. Tím přispívá k angiogenezi, hojení ran nebo reparaci kostní tkáně. Nevýhodou FGF-2 je jeho termolabilita, slabší odolnost vůči proteolytickým enzymům a krátký poločas rozpadu, který je in vivo kolem 12 hodin.¹³⁵ Z těchto důvodů je důležitý výzkum k nalezení vhodné nosiče nebo skafoldu, který byl schopen zajistit lokální působení faktoru během definované periody. Nadějným kandidátem aplikční formy je biodegradabilní želatinový hydrogel s inkorporovaným rekombinantním FGF-2 (rhFGF-2), který umožňuje jeho kontrolované uvolňování a zároveň slouží jako nosič pro buněčnou proliferaci a indukci biologické regenerace tkání.^{134, 136} Kromě in vitro a in vivo provedených studií na zvířecích modelech bylo dokumentováno již několik klinických aplikací rekombinantního FGF-2 (RhFGF-2) v humánní medicíně. Kawaguchi et al publikoval slibné použití injekcí s hydrogelem impregnovaným RhFGF-2, který byly aplikované do následujících lokací: tibiální osteotomie, tibiální fraktura nebo osteonekrotická hlavice femuru.¹³⁷⁻¹³⁹

5. BSM kombinované se živými buňkami

Mesenchymální kmenové buňky, stromální buňky kostní dřeně, periostální buňky, osteoblasty stejně tak i embryonální či dospělé kmenové buňky jsou používány v tkáňovém inženýrství. Tyto buňky mohou generovat tvorbu nové tkáně samostatně nebo v kombinaci se skafoldovými matricemi.¹⁴⁰

Mezenchymální kmenové buňky (Mesenchymal stem cells – MSCs)

Další možností, jak zvýšit osteoinduktivitu kostní tkáně nebo štetu je použití kmenových buněk. Za přesně definovaných podmínek mají i MSCs dospělého jedince pluripotentní potenciál, který jim dává schopnost proliferovat a diferencovat se v kostní, chrupavčité nebo tkáňové buňky. MSCs nacházíme v různých tkáních mesenchymálního původu, např. v kostní dřeni, svalové a tukové tkáni nebo periostu.¹⁴¹ Kostní dřev se stala standardním dárcovským místem pro získávání MSCs. Kmenové mesenchymální buňky kostní dřeně (bone marrow stem cells – BMSc) byly zkoušeny na různých zvířecích modelech, kde byl prokázán jejich dobrý potenciál při podpoře osteogeneze a vzniku kostní fúze.¹⁴² Wang et al na opičím modelu prokázal, že kompozit složený z kalcium-fosfátové keramiky a kultivovanými autologními MSCs může zlepšit kostní regeneraci a zároveň dosáhnout úspěšné kostní fúze v případě přední meziobratlové dězy.¹⁴³ Podobné výsledky úspěšné zadní spinální fúze (95 %) publikoval Gen et al při aplikaci MSCs v kombinaci s β -TCP.¹⁴⁴ Nevýhody BMSCs tkví v jejich malém množství a morbiditě vyplývající z odběrového místa. Není proto překvapivým faktem, že větší popularitu v použití získávají tukové kmenové buňky. Jejich odběr a izolace je jednodušší, lze je získat ve větším množství a mají prolongovaný osteogenický potenciál.¹⁴⁵ I když kmenové buňky prokázaly velký potenciál být silným nástrojem při tvorbě spinální fúze, tak v klinické praxi narážíme na některé limity, jako je pokles jejich kvality a počtu ve vyšším věku nebo při metabolických nemocích a kouření. Také jejich klinická aplikace je zatížena obtížnou legislativou a náročností přípravy pro aplikaci pacientovi.

Genetická terapie

Rekombinantní BMPs byly úspěšně použity v mnohých studiích. Nicméně při použití v humánní praxi je potřeba vysokých dávek BMPs, protože jejich molekuly jsou rozpustné, difundující do okolí nebo se in vivo stávají inaktivními. Vysoké finanční náklady vznikající v souvislosti s jejich výrobou společně s dalšími nevýhodami (zánětlivá reakce, ektopická novotvorba kosti) vedly ke snaze najít levnější, bezpečnější a efektivnější použití RhBMP terapie. Jejím cílem je vytvořit biomateriál, který by zajistil kontrolované a udržitelné uvolňování proteinů tak, aby jejich koncentrace byla v terapeutických mezích a jejich

půbení bylo pouze na lokální úrovni. K tomuto byla rozvinuta genová terapie pro spinální fúzi, při které je BMP gen zasazen do hostitelské buňky pomocí vektoru. Na zvířecím ex-vivo modelu byla pak prokázána schopnost tohoto způsobu genetické terapie ovlivnit osteoindukci.¹⁴⁶ Genová terapie může zajistit výbornou biologickou dostupnost pomocí trvalé lokální exprese BMP. Vektory mohou být virové (adenoviry nebo herpetické viry transfektující hostitelské buňky) nebo neviróvé (liposomy, elektroporace). Zasazení genu do hostitelské buňky může být provedeno buď ex vivo (implantace transfektovaných buněk do hostitele) nebo in vivo (injekcí genů přímo do hostitelských buněk).^{146, 147} Riew et al i další autoři prokázali že ex-vivo transvekované mesenchymální buňky kostní dřene pomocí genu pro BMP, které byly reimplantovány do pokusných králíků byly schopny vytvořit kostní fúzi.¹⁴⁸

V současnosti genová terapie nejvíce naráží na rizika spojená s imunitní odpovědí na virové vektory. Přestože byla shledána jako bezpečná v preklinických animálních experimentech, je potřeba dlouhodobých výsledků a dalších studií před použitím těchto vektorů v klinické praxi.¹⁴⁹ V Tab. 2 jsou přehledně zobrazeny jednotlivé BSM a jejich vlastnosti.

Náhrada kostní tkáně	Osteogeneze	Osteoindukce	Osteokondukce	Biomechanická pevnost	Morbidita odběrového místa
Autogenní spongiózní kost	+++	++	+++	-	++
Autogenní kortikální kost	+	+	+	+++	++
Allograft	-	+	++	+++	-
Xenograft	-	-	++	++	-
DBM	-	++	+	-	-
Keramika	-	-	++	+	-
Porézní kovy	-	-	+	+++	-
Kolagen	-	-	++	-	-
Degradabilní polymery	-	-	+	++	-
Kostní morfogenní proteiny	-	+++	-	-	-
Bioaktivní sklo	-	-	+	-	-
Osteoinduktivní GF	-	+++	-	-	-
Deštičkový koncentrát	++	+	-	-	+

Náhrada kostní tkáně	Osteogeneze	Osteoindukce	Osteokondukce	Biomechanická pevnost	Morbidita odběrového místa
Deštičkový koncentrát	++	+	-	-	+
MSCs	+++	-	-	-	+
Kompozitní skafold					
(HA/TCP + GF + kolagen)	-	+++	++	++	-
Genová terapie in vivo	-	+++	-	-	-
Genová terapie, ex vivo	++	+++	-	-	+
<p><i>Vysvětlivky: - = absentující, + = minimální, ++ = střední, +++ = intenzivní</i> <i>DBM – demineralizovaná kostní matrice, GF – růstový faktor, HA/TCP – hydroxyapatit/trikalciumfosfát,</i> <i>MSCs – mezenchymální kmenové buňky</i></p>					

Tab. 2 – Náhrady kostní tkáně a jejich vlastnosti.

1.5 Resumé

Ideální bioskafold by měl mít třídimenziální porézní strukturu, která by svou pevností byla srovnatelná s nativní kostí a umožňovala osteokondukci. Osteoinduktivita by měla být založena na přítomnosti povrchových proteinů sloužících k zachycení osteoblastů. Současně by implantát měl obsahovat osteoprogenitorové buňky a signální faktory, které by podporovaly osteogenezi. Stejně tak by měl být plně resorbovatelný a imunologicky inertní, tak aby nedocházelo k okolní fibrózní reakci a tím se eliminovalo riziko vzniku pseudoartrózy nebo aseptického uvolnění.^{140, 149, 150}

Do současné doby nebyl světovou literaturou popsán žádný bioimplantát, který by plně splňoval podmínky ideální kostní náhrady. Limitem autograftu je jeho získatelné množství a morbidita odběrového místa. Alografty nejsou osteogenní a osteoinduktivní a existuje u nich riziko přenosu infekčních nemocí. Metalické implantáty jsou pevné v tenzi i kompresi, ale nejsou dobrým substrátem pro buněčnou adhezi a mohou indukovat nespecifickou imunitní odpověď. Keramické skafoldy včetně bioaktivního skla mají dobrou osteokonduktivitu, avšak jsou limitovány minimální osteoinduktivitou a malou mechanickou pevností. Přírodně derivované polymery (kolagen, chitosan) mají schopnost resorpce, podporují buněčnou migraci, ale chybí jim pevnost kosti. Naopak syntetické polymery z polyméčné, nebo polyglykolové kyseliny mají dostatečnou mechanickou stabilitu, avšak na úkor chybějící osteokonduktivity. Další možností a nadějí do budoucna představují pepitové hydrogely, které po namodelování do nanovláknitých struktur připomínajících extracelulární matrix tkání a dají se kombinovat s osteogenními buňkami či růstovými faktory.¹⁵¹ Metodami tkáňového

inženýrství lze spojit jednotlivé materiály a obohacovat je o růstové faktory či osteoprogenitorové buňky. Skafoldy třetí generace jsou biokompozity, které se snaží maximalizovat svoje biologické, mechanické a chemické vlastnosti k přípravě biologicky ekvivalentních náhrad tkání. Biokompozitní skafoldy s přidanými exogenními růstovými faktory s ohledem na výše uvedené nabízejí slibnou cestou ke zlepšení kostěné regenerace.

Ve své habilitační práci popisují vývoj biodegradabilního nanokompozitního hybridního implantátu (Biodegradable nanocomposite hybridimplant – HBNI), na kterém jsem pracoval spolu se svými kolegy z mého vědeckého týmu. Tento nový implantát by měl co nejvíce eliminovat nedostatky a nevýhody současných generací skafoldů, kterými jsou nedostatečně vyvinutá vaskularizace implantátu v průběhu kostní fúze a také jejich nedostatečná resorbabilita. Námi navržený HBNI se skládá z keramického kompozitu, který je složen z hydroxyapatitu (26%), β -TCP (62%), a α -TCP (12%).¹⁵² Současně je impregnován biopolymerovými vlákny bovinního kolagenu a oxycelulozy a na závěr je obohacen buď stabilizovaným (FGF2-stab.) nebo biogenním polyfosfátem (bio-PolyP). Jedná se tedy o 2 testované scaffoldy 3. generace, které jsou buď obohaceny o růstový faktor organické povahy (FGF2-stab.), který má osteo a angio-induktivní vlastnosti nebo o anorganické stimulační agens mineralizačního procesu kostní tkáně, které také podporuje expresi BMP-2 a indukuje alkalickou fosfatázu, enzym, který je potřebný pro syntézu hydroxyapatitu (bio-PolyP).¹⁵³⁻¹⁵⁵ Kompozitní struktura HBNI, která je shodná u obou testovaných implantátů byla konstruována tak, aby umožňovala postupnou degradaci a tím i lepší růst a formaci extracelulární matrix. Měkká kolagenová síť implantátu pak má poskytovat vhodné nanostrukturální prostředí ke kostní přestavbě. Zároveň během týdnů až měsíců dojde k jejímu vstřebání a tím se otevírá prostor k vaskularizaci a dalšímu růstu kostních buněk. Naopak porézní keramický HA/TCA skeleton s kontrolovanou degradací zajišťuje dostatečnou mechanickou podporu do doby, než je vytvořena nová kost. HA i kolagen mají výbornou biokompatibilitu, vysokou osteokonduktivitu a bioaktivitu bez jakékoli cytotoxicity nebo antigenicity.¹⁵⁶ Použitím nanočástic HA v jádře skafoldu je zajištěno jeho rychlejší uvolňování i následný kostní přerůst.¹⁵⁷

Námi nově vyvinuté 2 typy HBNI simulují 2 různé směry, kterými předpokládáme, že je možné ovlivnit intervertebrální fúzi, ať cestou organickou, nebo plně anorganickou. Výše popsané implantáty splňují biologické i biomechanické vlastnosti třetí generace skafoldů a v následující části práce bude ověřena jejich cytotoxicita, biokompatibilita, osteokonduktivita a osteoinduktivita. Následně po jejich implantaci na modelu experimentálního prasete budou podrobeny in vivo testování ve schopnosti vytvořit meziobratlovou fúzi, a to jak z pohledu makro i mikroskopického, tak optikou mikro-CT a biomechaniky.

2 CÍLE PRÁCE

1. Vyloučit potenciální toxicitu nově vyvinutého HBNI.
2. Ověřit osteokonduktivní a osteoinduktivní vlastnosti nově vyvinutého HBNI.
3. Porovnat rychlost a kvalitu lumbální intervertebrální fúze v závislosti na použití kostního štěpu a nově vyvinutého HBNI.
4. Objektivizovat potenciálně synergistický efekt tvorby lumbální intervertebrální fúze v závislosti na použití nově vyvinutého bioimplantátu v kombinaci s termostabilním růstovým faktorem pro fibroblasty 2 (FGF2-stab.) nebo biogenním polyfosfátem (bio-PolyP).
5. Připravit hotový produkt do další fáze klinického hodnocení

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Struktura hybridního biodegradabilního nanokompozitního implantátu (HBNI)

3.1.1 Příprava a struktura HBNI s FGF2-stab.

Text podkapitoly byl dočasně skryt vzhledem k probíhajícímu patentovému řízení HBNI.

3. 1. 2 Příprava a struktura implantátu s biogenním polyfosfátem

Text podkapitoly byl dočasně skryt vzhledem k probíhajícímu patentovému řízení HBNI.

3. 2 In vitro testování cytotoxicity keramického bioimplantátu

K testování byly dodány 5 druhů keramických nosičů sterilizovaných ethylénoxidem:

- a) **HA/TCP + bioPolyP** – fázová směs hydroxyapatitu a fosforečnanu vápenatého, vzorky povlakovány biogenním pol
- b) **HA/TCP + kolagen** – fázová směs hydroxyapatitu a fosforečnanu vápenatého + kolagenová výplň
- c) **HA/TCP + bioPolyP + kolagen** – fázová směs hydroxyapatitu a fosforečnanu vápenatého + kolagenová výplň + povlak polyfosforečnanu vápenatého
- d) **HA/TCP + kolagen + FGF2-stab** – fázová směs hydroxyapatitu a fosforečnanu vápenatého + kolagenová výplň + FGF2
- e) **HA/TCP** – fázová směs hydroxyapatitu a fosforečnanu vápenatého

Vzorky byly testovány v 96 jamkových destičkách.

3. 2. 1 Osazování bioimplantátů mesenchymálními kmenovými buňkami

K testování bioimplantátů byly použity lidské mezenchymální kmenové buňky (hMSC; Sciencell, San Diego, California, USA). Bioimplantáty byly nejprve ponořeny do 150 μ l diferenciačního média: α -MEM (Lonza, Switzerland), 10% fetální bovinní sérum (FBS, Gibco, Velká Británie), 1% Penicilin/Streptomycin (100 IU/mL and 100 μ g/mL, Sigma Aldrich, USA), 100nM dexamethasone (Sigma Aldrich, USA), 10mM β -gcyrerolfosfát (Sigma Aldrich, USA), 50 μ g/ml askorbát-2-fosfát (Sigma Aldrich, USA), nejméně na 1 hod při 37°C. Následně byly na bioimplantáty nasazeny buňky v koncentraci 85 tis buněk /bioimplantát v 50 μ l média. Buňky byly ponechány adherovat dvě hodiny v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂ atmosféře. Po dvou hodinách bylo k buňkám přidáno 150 μ l diferenciačního média. Vzhledem ke sníženému pH, které bylo indikováno zežloutnutím média, byla polovina média vyměněna druhý den. Polovina média byla pak měněna 7. a 14. den.

3. 2. 2 Test metabolické aktivity

Testování metabolické aktivity buněk bylo prováděno pomocí MTS testu (CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, WI, USA), a to 1., 4., 7., 14. a 21. den experimentu. V příslušný den byly buněčné bioimplantáty přesunuty do nových jamek a bylo k nim přidáno 150 μ l diferenciačního média a 30 μ l MTS substrátu (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Poté probíhala dvě hodiny inkubace buněk s MTS substrátem v inkubátoru. Během této doby byl substrát metabolizován pomocí mitochondriálních enzymů na rozpustný formazan, který má absorpenci při vlnové délce 490 nm. Vzniklý formazan byl spektrofotometricky

měření u 100 µl odběrů pomocí readeru Infinite® M200 PRO (Tecan, Switzerland). Měření se provádělo při vlnových délkách 490 nm a 690 nm. Měření při 690 nm je referenční hodnota odečítaná od hodnot absorbance. Dále byla od hodnot odečítána absorbance MTS substrátu s buněčným nosičem bez buněk.

3. 2. 3 Kvantifikace obsahu buněčné DNA

Ve stanovené dny 1., 4., 7., 14. a 21. den byla prováděna kvantifikace DNA. Buněčné nosiče byly po provedeném MTS testu do 400 µl lyzačního pufru, který se skládal z 10mM tris(hydroxymethyl)aminometanu (Tris) (pH 7.0), 1mM EDTA, 0,2% Triton-X-100 (Sigma Aldrich, USA) a destilované vody. Takto připravené vzorky byly ve třech cyklech zamrazeny a rozmrazeny při RT. Při každém rozmražení byly vzorky důkladně vortexovány. Do černé devadesáti šesti jamkové destičky bylo nanášeno 200 µl pracovního roztoku Quant-iT™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), který po vazbě na dvouřetězcovou DNA emituje fluorescenční signál. Z jednotlivých vzorků pak bylo k reagentu přidáváno 20µl buněčného lyzátu. Součástí eseje jsou i DNA standardy bakteriofágu lambda, které byly přidávány po 20µl k reagentu. Fluorescence reagentu byla měřena pomocí fluorescenčního readeru Infinite® M200 PRO (Tecan, Switzerland) při hodnotách excitace 485nm a emise 528nm.

3. 2. 4 Barvení osteokalcinu

Barvení osteokalcinu probíhalo 14. a 21. den. Vzorky byly propláchnuty ve fosfátovém pufru (PBS; pH 7.4, Sigma Aldrich, USA) a následně fixovány 5% roztokem paraformaldehydu po dobu deseti minut při 20°C. Následně byly vzorky propláchnuty v PBS a v něm uchovány po dobu jednoho týdne. Poté byly vzorky inkubovány třicet minut při pokojové teplotě s roztokem 0,1 % Triton-X-100 + 1 % hovězí sérový albumin (BSA, Sigma Aldrich, USA) v PBS. Poté byly vzorky třikrát opláchnuty v PBS a následně se nechaly inkubovat 20 min v 1 % Tween-20 (Thermo Fischer Scientific, USA) v PBS, poté byly vzorky třikrát opláchnuty v PBS. Následně se nechaly inkubovat s primární králičí neznačenou protilátkou, která se specificky váže na osteokalcin. Inkubace probíhala přes noc při 4 °C. Následně byly vzorky oplachovány 5, 10 a 15 minut roztokem PBS s 0,05 % Tween-20. Následoval oplach v PBS a k vzorkům byla přidána sekundární protilátka proti králíkovi s fluoroforem, Alexa Fluor 633 (Thermo Fischer Scientific, USA), která se váže na primární protilátku. Inkubace trvala sedmdesát pět minut a probíhala ve tmě, při pokojové teplotě, za třepání na třepačce. Následně se vzorky proplachovaly po dobu 5, 10 a 15 minut roztokem PBS s 0,05 % Tween-20. Poté se vzorky propláchly PBS a nechaly se po dobu 5 minut inkubovat s Hoechstem 34580 (Thermo Fischer Scientific, USA),

5000x ředěný. Nakonec se vzorky ještě třikrát propláchly roztokem PBS. Vzorky byly analyzovány konfokálním mikroskopem Zeiss LSM 5 DUO (Zeiss, Německo). Hoechst excituje při 392 nm a emituje při 440 nm. Alexa Fluor 633 má hodnotu excitace 632 nm a emise 647 nm.

3. 2. 5 RT-PCR (*Reverse Transcriptase*) PCR

RNA byla 1., 7., 14., 21., 28. a 35. den izolována za použití kitu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Německo). Vzorky byly v den izolace opláchnuty PBS, poté v dupletu rozdrceny pinzetou v jamce a následně seškrábnuty a přeneseny do eppendorfky s RLT pufrem (Qiagen, Německo). Následně byly vzorky po dobu 1 minut vortexovány. Dále se postupovalo podle manuálu. Koncentrace RNA ve vzorcích byla měřena na readeru Infinite® M200 PRO (Tecan, Switzerland). Při této metodě je spektrofotometricky měřena absorbance při 260/280 nm a dochází tak ke kvantifikaci množství RNA ve vzorku. Čistota RNA byla ověřena pomocí RNA elektroforézy a vizualizace UV lampou. Pro syntézu cDNA byl využit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFischer Scientific, USA) podle manuálu. Analyzovány byly geny pro osteogenní markery RunX2 a kolagen typu I, osteokalin a kostní sialoprotein a jako „housekeepingový“ neboli referenční byl použit gen EEF-1 (eukaryotický elongační faktor). Referenční gen byl použit k normalizaci hodnot pro geny spřažené s osteogenezí.

Získaná cDNA byla využita k provedení polymerázové řetězové reakce RT-PCR. V procesu detekce množství kopií dané sekvence byly využívány sondy TaqMan (Roche Molecular Systems, USA). Množství mRNA pro jednotlivé geny bylo relativně kvantifikováno s využitím tzv. housekeeping genů (referenční geny). Pro gen zájmu i pro referenční gen je sledována hodnota Cp. Grafy byly vytvořeny z hodnot získaných výpočtem podle vzorce $2^{-\Delta C_p}$. měření intenzity fluorescence byl využíván Light Cycler 480 (Roche, Švýcarsko).

3. 2. 6 Vizualizace buněk

Pro vizualizaci adheze buněk na nosičích byly buňky barveny pomocí 3,3'-dietyloxakarbokyanin jodidu (DiOC6), který barví membránové struktury a propidium jodidu, který se váže na buněčnou DNA. Buňky byly opláchnuty v PBS a následně fixovány po dobu deseti min chlazeným metanolem, -20 °C. Následovalo další propláchnutí v PBS a poté se přidal DiOC6 v koncentraci 1 µg/ml PBS. Inkubace probíhala za tmy, při pokojové teplotě, čtyřicet pět minut. Následně byly vzorky propláchnuty v PBS a byl k nim přidán propidium jodid v koncentraci 5 µg/ml PBS, inkubace probíhala 5 minut za tmy, při pokojové teplotě. Následně se vzorky třikrát propláchly v PBS. Nabarvené buňky byly pozorovány

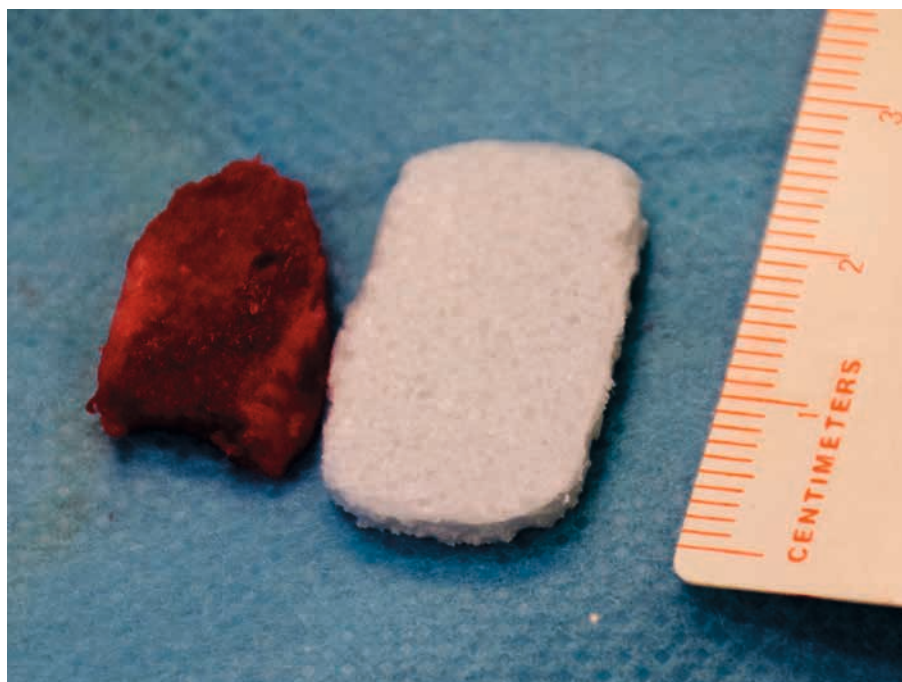
konfokálním mikroskopem Zeiss LSM 5 DUO. DiOC6 má hodnotu excitace 488 nm a emise 520 nm, propidium jodid excituje při 560 nm a emituje při 580 nm.

3. 2. 7 Statistika

Získaná data z MTS testu a kvantifikace buněčné DNA byla statisticky vyhodnocena v programu SigmaStat metodou One Way Analysis of Variance (ANOVA) a Tukey testem s hodnotou signifikance nižší než 0,001 (**), anebo nižší než 0,05 (*).

3. 3 Zvířecí model a návrh studie

Do studie bylo zahrnuto celkem třicet šest kastrovaných klinicky zdravých experimentálních zvířat samčího pohlaví. Jednalo se o komerční hybrid bílého ušlechtilého prasete a landrase ve věku 4 měsíců o hmotnosti přibližně 40 kg. Tato experimentální prasata byla rozdělena do tří studijních skupin v závislosti na metodě fúze. Všechna zvířata zařazená do studie podstoupila operační zákrok v celkové anestezii. Operace byly prováděny shodně v pozici na pravém boku, z levého lumbotomického extraperitoneálního přístupu v obl. bederní páteře. Po RTG objektivizaci pateřního segmentu L2/3 byla provedena LLIF. Ve skupině A ($n=12$) byl jako fusion promoting agens použit autologní kostního štěp odebraný z levé lopaty kosti kyčelní operovaného prasete, ve skupině B ($n=12$) pak byl použit HBNI obohacený o FGF2-stab. a ve skupině C ($n=12$) byl použit HBNI obohacený o bio-polyP. Obr. 9 zobrazuje srovnání HBNI s trikortikální kostním štěpem.



Obr. 9 – Srovnání trikortikálního štěpu odebraného z lopaty kosti kyčelní prasete a nově vyvinutého HBNI obohaceného o FGF2-stab. Zdroj: archiv autora.

Šest zvířat z každé skupiny bylo utraceno po ukončeném 8 týdnu experimentu (podskupina A1, $n=6$; B1, $n=6$ a C1, $n=6$), zatímco zbývajících 6 prasat z každé skupiny bylo utraceno po 16 týdnech (podskupina A2, $n=6$; B2, $n=6$ a C2, $n=6$). Pooperačně byly provedeny kontrolní RTG snímky bederní páteře. RTG kontroly bederní páteře pak v podskupinách A1, B1, C1 probíhaly v intervalu 2, 4 a 8 týdnů, v podskupinách A2, B2, C2 pak v intervalu 2, 4, 8, 12 a 16 týdnů. Po utracení prasat byl následně vy-preparován a en-bloc resekován segment páteře v rozsahu od obratle Th15 do obratle L6. Získaný vzorek páteře byl následně anatomickou preparací oddělen od okolních měkkých tkání při zachování ligamentózních stabilizátorů (dlouhé a krátké vazy páteře). Následně byly vzorky podrobeny mikroCT vyšetření, biomechanickým zkouškám a histomorfologické analýze. Pro kontrolní skupinu celého experimentu bylo použito 7 zdravých neporušených prasečích páteří (vy-preparovaný segment od Th15–L6) získaných z kadaverosních prasat stejného stáří a hmotnosti jako ve výše popsáných skupinách (skupina N, $n=7$).

3. 3. 1 Chirurgická část

Před úvodem do anestezie byla zvířata zpremedikována intramuskulárně podaným tiletaminem 2 mg/kg + zolazepamem 2 mg/kg (Zoletil, Virbac, Česká republika). Na úvod do anestezie byl následně intramuskulárně pokusným zvířatům aplikován ketaminem 2 mg/kg (Narketan, Vetoquinol, Francie) a xylazinem 2 mg/kg (Sedazin, Fort Dodge, USA). Po nástupu účinku léků byla provedena endotracheální intubace a zahájena umělá plicní ventilace směsí vzduch-kyslík (60/40) za kontinuální celkové intravenózní anestézie. Intravenózní anestézie byla udržována infuzí propofolu – 10 ml/h (Propofol 1 %, Fresenius Kabi, Německo). Před samotným operačním zákrokem bylo jednorázově profylakticky podáno antibiotikum Amoxicilin/kyselina klavulanová 15 mg/kg (Amoksiklav, Lek Pharmaceuticals, Slovinsko). Po uvedení do celkové anestezie bylo experimentální prase uloženo na pravý bok a zahájena rutinní příprava operační pole s jeho zarouškovaním (Obr. 10).



Obr. 10 – Na obrázku je zachycena operační skupina 2 chirurgů, v pozadí je zobrazen instrumentující chirurg. Operační pole je sterilně zarouškováno jednorázovým sterilním rouškovaním. Zdroj: archiv autora.

Za sterilních kautel, za průběžné rentgenologické kontroly byl nejprve identifikován prostor v oblasti bederní páteře v rozsahu L2–3, následně v dané lokalitě byla provedena minilumbotomie (Obr. 11) a z retroperitoneálního transpsoatického přístupu po přerušení segmentální arterie byly objektivizovány obratlová těla a intervertebrální prostor L2–3. Během preparace byly použity standardní chirurgické postupy a krvácení stavěno elektrokoagulací. Před samotnou disektomií úseku L2–3 byly pod kontrolou fluoroskopie implantovány dvě destičky (Anterior Spinal Srew-rod System, Beijing Fule Science and Technology Development, Čína) z boční strany do obratlových těl L2 a L3. Každá destička byla upevněna dvěma monoaxiálními šrouby – 5 x 30 mm a 5 x 45 mm (Anterior Spinal Srew-rod System, Beijing Fule Science and Technology Development, Čína).



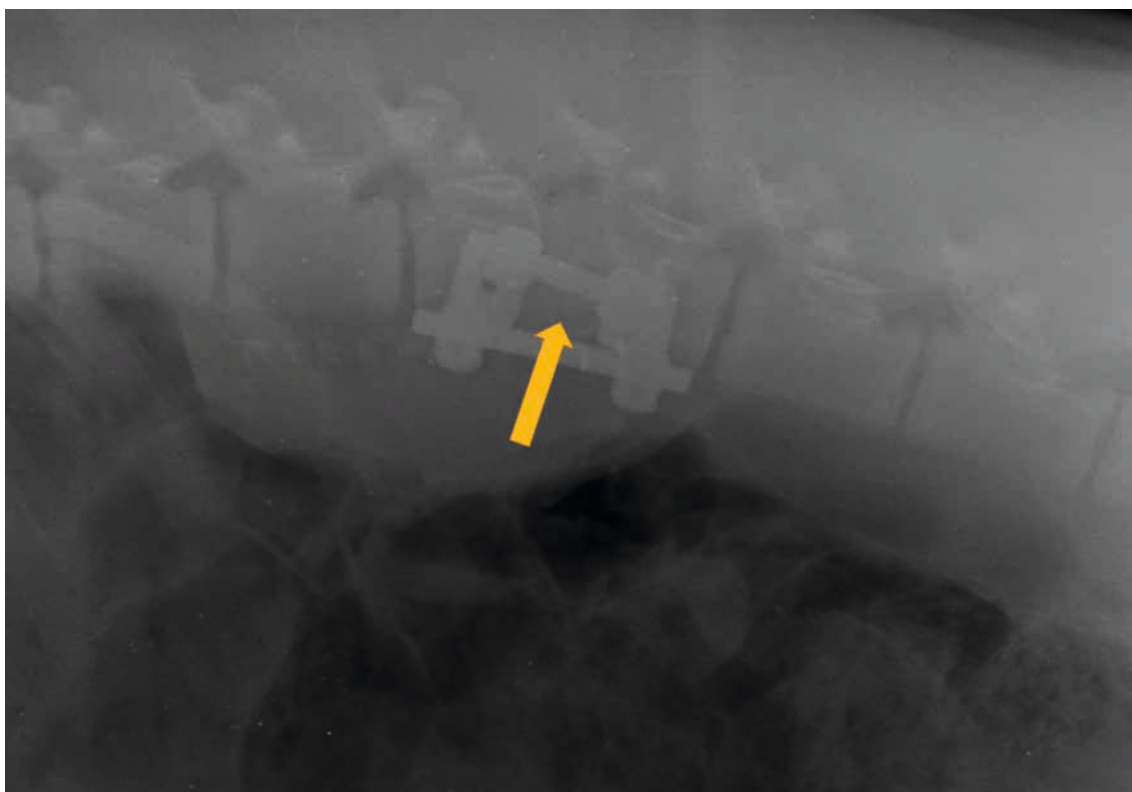
Obr. 11 – Levostranný minilumbotomický přístup k operovanému segmentu L2–3 páteře experimentálního prasete. Zdroj: archiv autora.

Následně byla provedena discectomie L2–3. Přilehlé obratlové plotny byly opracovány pomocí kyrety až do krvácení z kosti. Kostní štěp byl odebrán z hřebene levé lopaty kosti kyčelní. Takto získaný trikortikální kostní štěp byl následně opracován na požadovaný rozměr a následně byl vložen metodou pressfit (pomocí instrumentária byl dilatován prostor L2/3, po vložení štěpu a uvolnění instrumentária dochází ke kompresi štěpu v meziobratlovém prostoru) do meziobratlového prostoru L2/3 (skupina **A**, $n = 12$). U ostatních skupin (B, C) byl chirurgický přístup totožný jako ve skupině A, jen neproběhl odběr kostního štěpu a po změření velikosti intervertebrálního prostoru byla zvolena optimální velikost HBNI s FGF2-stab (skupina **B**, $n = 12$) nebo bio-Poly P (skupina **C**, $n = 12$), který byl do prostoru L2–3 také press fitově vložen pomocí, pro daný účel, speciálně vyrobeného instrumentária (viz Obr. 12).



Obr. 12 – HBNI je uložen ve speciálním instrumentáriu, a tak je připravený k implantaci do meziobratlového prostoru L2–3. Zdroj: archiv autora.

Po vložení kostního štěpu nebo bioimplantátu do meziobratlového prostoru byly následně pedikulární šrouby již zavedené do těla obratlů spojeny 2 titanovými tyčemi (Anterior Spinal Srew-rod System, Beijing Fule Science and Technology Development, Čína), tak aby byla zachována poloha a stabilita operovaného segmentu obratle na konci chirurgického zákroku. Každá operační rána byla vyplachována fyziologickým roztokem. Uzávěr operační rány byl prováděn po anatomických vrstvách jednotlivými resorbovatelnými (svalová fascie a podkožní tkáň) a neresorbovatelnými (kůže) stehy. Na závěr byla kůže pokryta sprejem s chlortetracyklinem (Pederipra, Hipra, Španělsko). Do doby, než se experimentální zvíře zotavilo z anestézie, byly provedeny předozadní a boční rentgenové snímky sloužící ke kontrole vyplnění meziobratlového prostoru a uložení stabilizačního implantátu (viz. Obr. 13).



Obr. 13 – Pooperační boční RTG bederní páteře prasete, šipka znázorňuje implantovaný stabilizační implantát, meziobratlová prostor L2–3 je kompletně vyplněn HBNI s FGF2-stab. Zdroj: archiv autora.

3. 3. 2 Pooperační průběh a provádění RTG kontrol

Po skončení operace byla všechna experimentální zvířata observována na operačním sále do obnovy spontánního dýchání, následně byla umístěna do pooperační kóje, kde byla sledována až do úplného zotavení z anestezie (Obr. 14). Součástí pooperační kontroly bylo také sledování doby, kdy se testovaná zvířata postaví na všechny čtyři nohy a jestli se neobjeví nějaký neurologický deficit, který by byl způsoben operačním zákrokem. V průběhu prvního pooperačního týdne byla všem zvířatům podávána antibiotická léčba amoxicilinu/kyseliny klavulanové v dávce 15 mg/kg (Amoksiklav, Lek Pharmaceuticals, Slovinsko) každých 72 hodin počínaje dnem operace. Také v prvním pooperačním týdnu byl k tlumení pooperačních bolestí intramuskulárně podáván Ketoprofen (Comforion Vet, Orion Pharma Animal Health, Finsko).



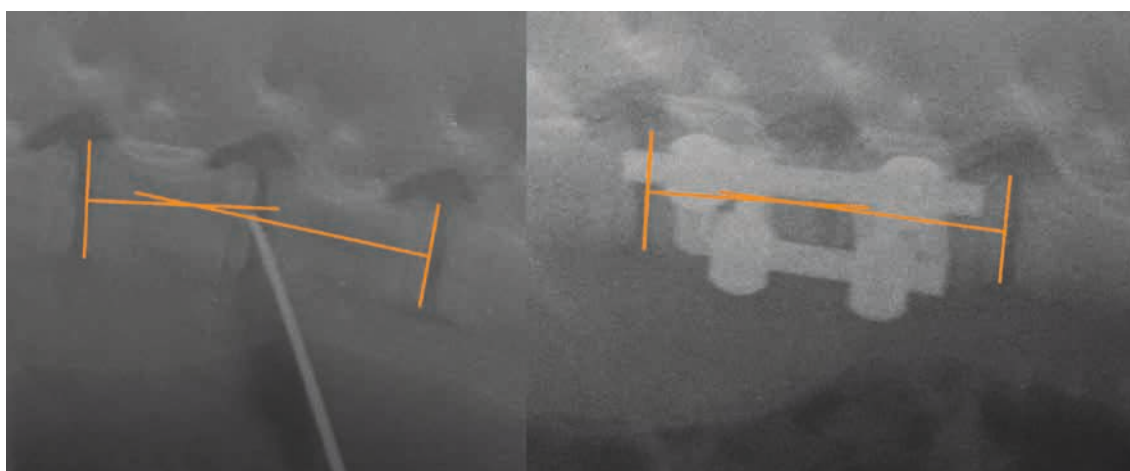
Obr. 14 – Operovaná experimentální prasata byla pooperačně observována v kóji, maximálně po 3 kusech, do úplného zotavení z operace. Zdroj: archiv autora.

Během celého experimentu byla prasata chována jednotlivě v kójích, kde byl zajištěn volný přístup k vodě. Obecná a neurologická vyšetření byla prováděna zpočátku denně během prvního pooperačního týdne a následně dvakrát týdně během následujících dvou týdnů. Prosté rentgenové snímky v předozadní a bočné projekci se pravidelně opakovaly po 2, 4 a 8 týdnech po operaci u poloviny prasat z každé podskupiny (**A1**, $n=6$; **B1**, $n=6$; **C1**, $n=6$). U zbývajících poloviny prasat (**A2**, $n=6$; **B2**, $n=6$; **C2**, $n=6$) byly ještě doplněny RTG snímky ve 12. a 16. týdnu od operace. Během samotného provádění RTG vyšetření byla prasata dočasně sedována Propofolem v dávce 1mg/kg (Propofol 1 %, Fresenius Kabi, Německo). Průběh RTG vyšetření uvádí Obr. 15.



Obr. 15 – Vyobrazení průběhu RTG vyšetření bederní páteře v bočné projekci u experimentálního zvířete před provedením operačního zákroku. Zdroj: archiv autora.

Cílem RTG kontrol bylo sledování úhlu segmentální kyfózy měřené metodou dle Cobba, viz Obr. 16. Úhel segmentální kyfózy byl měřen z RTG snímků v bočné projekci u každého operovaného zvířete před operací a při každé RTG kontrole. Dále z RTG snímků byly hodnoceny známky případného uvolnění stabilizačního implantátu a také průběh intervertebrální fúze v prostoru L2–3.



Obr. 16 – RTG bederní páteře v bočné projekci před a pooperačně, graficky je znázorněn úhel segmentální kyfózy L2, 3 měřeno dle Cobba. Zdroj: archiv autora.

3.3.3 Utracení prasat a příprava preparátů páteří

Prasata ve všech skupinách byla utracena intravenózním podáním injekčního roztoku Embutramidu, Mebezonium jodidu, injekčního roztoku hydrochloridu tetrakainu v množství 6 ml/50 kg (T61, MSD Animal Health, Kanada). První polovina prasat tvořící podskupiny A1, B1, C1 byla utracena po 8 týdnech, zbývající polovina (podskupiny A2, B2, C2) byla utracena po 16 týdnech od provedení operačního zákroku. Po utracení každého prasete byl následně vypreparován en-block úsek páteře v rozsahu obratle T15 do obratle L6, který byl následně očištěn od okolních tkání při zachování ligamentózních stabilizátorů (přední a zadní podélný vaz, intervertebrální ligamenta). Následně byl extrahován veškerý osteosyntetický materiál z obratlů a byla provedena obrazová dokumentace celého bloku páteře se zaměřením na fúzovanou část, tedy prostor L2–3. Kontrolní skupinu N ($n=7$) tvořily bloky kadaverosních fyziologických prasečích páteří vypreparovaných shodnou technikou jako ve skupinách A–C. Skupina N byla rozdělena na 2 podskupiny, podskupina N0 ($n=2$), dané preparáty sloužily jako kontrola pro mikro-CT vyšetření a skupina N1 ($n=5$), která sloužila jako kontrola pro biomechanické vyšetření. Všechny takto připravené vzorky ze skupin A ($n=12$), B ($n=12$), C ($n=12$), N2 ($n=5$) byly ponořeny do formolu a uzavřeny do plastové fólie spolu s fixačním činidlem, tak aby se zabránilo jejich autolýze a vysušení. Během transportu na následná vyšetření byly vzorky uloženy v lednici při teplotě 5 °C.

3.4 Micro-CT vyšetření vzorků páteře

Všechny resekované vzorky páteře ze skupin A ($n=12$), B ($n=12$) a C ($n=12$), byly podrobeny mikro-CT vyšetření ve stejný den, kdy byla prasata utracena. 2 vzorky z podskupiny N1, byly též vyšetřeny pomocí mikro-CT. Jeden vzorek nativní páteře byl ošetřen extirpací intervertebrálního disku L2–3 a daný prostor byl ponechán prázdný. Druhý vzorek po extirpaci L2–3 disku byl v daném prostoru vyplněn pomocí HBNI, tedy byl vytvořen obraz bezprostředního pooperačního stavu. Vzorky ze skupiny N sloužily jako referenční obraz při hodnocení testovaných skupin A, B, C.

Pro minimalizaci pohybu vzorku během mikro-CT vyšetření byl preparát ve folii vložen do papírové tuby, kde byl pevně fixován. Celý vzorek v papírové tubě byl umístěn do CT tak, že prostor L2–3 byl uprostřed zorného pole, tak aby se maximálně snížil vliv možných artefaktů během měření.

K tomografickému měření byl použit mikro-CT systém GE phoenix v | tome | x L 240 (GE Sensing & Inspection Technologies GmbH, Německo) vybavený rentgenovou trubicí Nanofocus 180 kV/ 15 W a plochým detektorem DXR 250. Rentgenová trubice

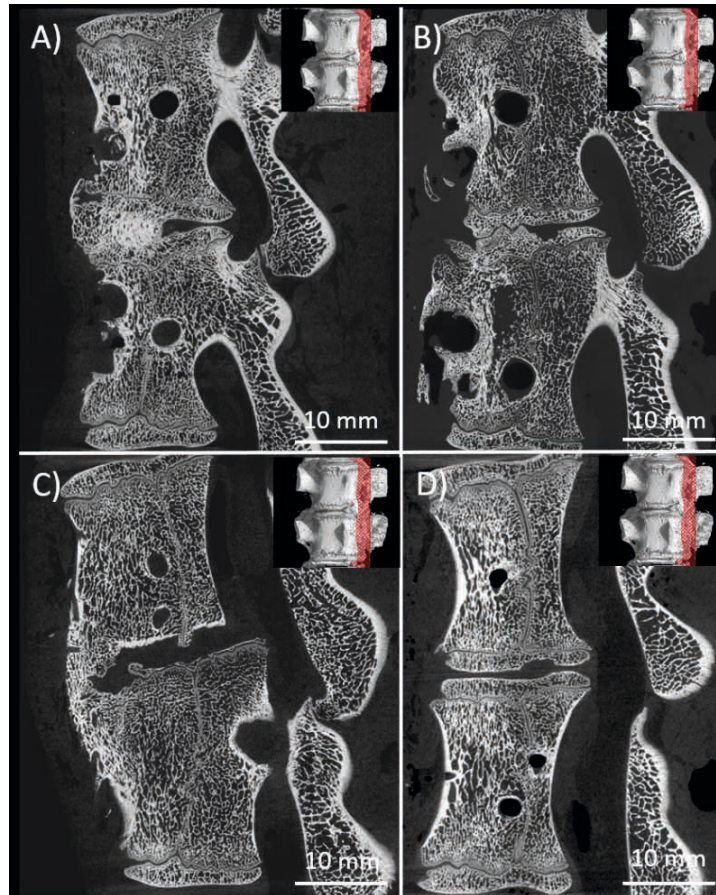
byla nastavena na zrychlující napětí 100kV a proud 300 uA. Rentgenové spektrum bylo filtrováno 1,5 mm silným hliníkovým filtrem. Doba expozice detektoru byla 400 ms v každé z 2 200 pozic. Měření bylo prováděno při konstantní teplotě 21° C. Velikost voxelů byla 40 μm.

Tomografická rekonstrukce byla realizována daty GE Phoenix x 2.0 s korekcí driftu vzorku, korekcí vytvrzení paprsku a filtrací šumu. Záznam obratlů byl proveden ve VG Studio MAX 3.1 (Volume Graphics GmbH, Německo) a probíhal podle horní-kraniální a dolní-kaudální (ventralis, dorsalis) části vzorku. Tento způsob záznamu zjednodušuje analýzu intervertebrální fúze. Kostní štěp či bioimplantát leží ve stejné rekonstruované oblasti a má stejnou orientaci.

Po provedení mikro CT vyšetření a analýze kvality proběhlé kostěné intervertebrální fúze, byly vzorky klasifikovány podle práce Tana et al. do 4 následujících stupňů kvality fúze:¹⁶³

- **Stupeň I (úplná fúze)** – znamená kostní spojení štěpu či implantátu na obou stranách lamina terminalis sousedních obratlů a je možné pozorovat kontinuitu trabekulární kosti kranio-kaudálním směrem tedy mezi obratlem a štěpem na obou přilehlých koncích.
- **Stupeň II (částečná fúze)** – znamená kostní spojení štěpu či implantátu alespoň na jednom z konců přilehlých obratlů a také částečnou nebo chybějící trabekulární kost mezi kostním štěpem či implantátem a sousedním tělem obratle na jednom nebo obou koncích.
- **Stupeň III (unipolární pakloub)** – označuje kranální nebo kaudální kostní nespojení kostního štěpu či implantátu s přidruženým obratlem formou diskontinuity trabekulární kosti. Sousední těla obratlů jsou spojena podél těla, ale bez jakékoli fúze těla s kostním štěpem či implantátem.
- **Stupeň IV (bipolární pakloub)** – označuje nespojení štěpu či implantátu k sousedním obratlům na obou stranách bez kontinuity trabekulární kosti mezi štěpem či implantátem a sousedními obratli. Do stupně IV rovněž patří úplná resorpce kostního štěpu či implantátu.

Grafické zobrazení mikro-CT klasifikace proběhlé intervertebrální fúze uvádí Obr. 17.



Obr. 17 – Mikro-CT zobrazení kvality kostěné fúze mezi obratli: A) Stupeň I, B) Stupeň II, C) Stupeň III, D) Stupeň IV. Zdroj: CEITEC VUT Brno.

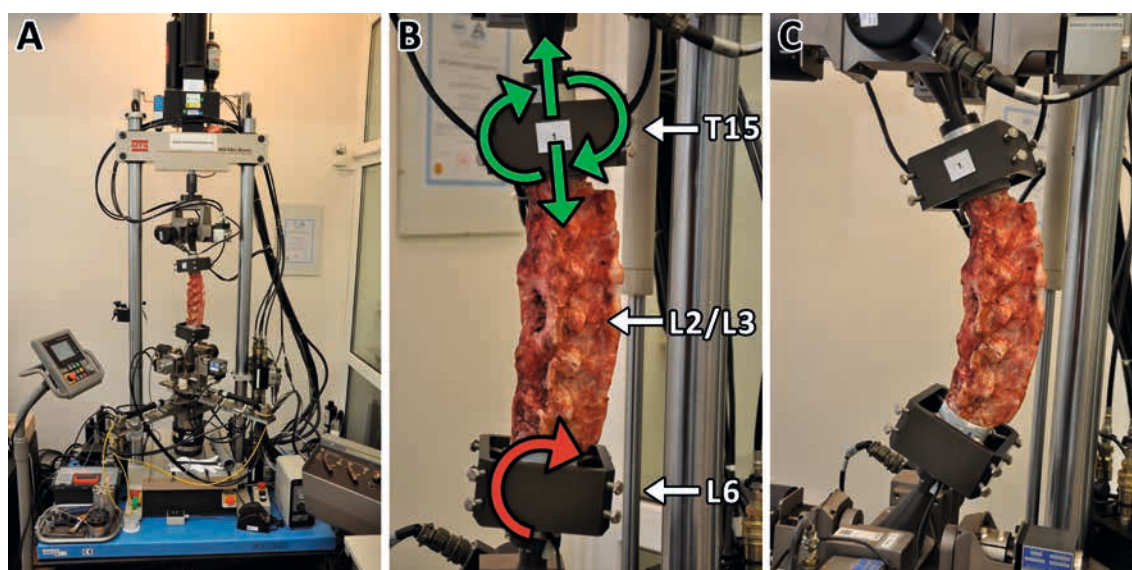
Celkem takto bylo provedeno 36 měření, dvanáct pro každou skupinu A, B a C. Všechny odebrané vzorky páteře z podskupin po 8 a 16 týdnech byly skenovány bezprostředně po utracení pasete. A všechny tyto vzorky byly klasifikovány zmíněným klasifikačním systémem.

3.5 Biomechanické vyšetření vzorků páteře

3.5.1 Postup biomechanického testování

K biomechanickému vyšetření bloku páteře byly vždy podrobeny 4 vzorky z každé testované podskupiny (A1, $n=4$; A2, $n=4$; B1, $n=4$; B2 $n=4$; C1, $n=4$; C2, $n=4$). Jako kontrolní skupina bylo testováno všech sedm vzorků zdravých kadaverózních prasečích páteří (N, $n=5$). Vzorky páteře byly testovány vždy následující den po utracení prasat (po provedení mikro-CT vyšetření a transportu na detašované pracoviště v Praze). Do doby testování byly vzorky uchovány v lednici při teplotě 5 °C, kde byly uloženy v plastové fólie spolu s fixačním roztokem formolu.

V rámci experimentu byla provedena mechanická zkouška prostého ohybu, kdy bylo po celou dobu zatěžování eliminováno osově namáhání tak, že osová síla byla řízena na nulovou hodnotu. Zatěžován byl segment prasečí páteře v rozmezí obratlů Th15 – L6. Horní část páteře byla při testování uložena tak, aby byl umožněn její volný pohyb. K upevnění vzorků páteří ve fixačních trubkách byl použit technický dentakryl. Zkouška prostého ohybu proběhla v akreditované Laboratoři mechanických zkoušek na ČVUT v Praze, na Fakultě strojní. Zde se nachází testovací systém MTS Mini Bionix 858.2 (MTS, Minnesota, USA) se speciálním spinálním simulátorem, jehož konstrukce je primárně určena k testování páteří. Páteře byly při experimentu ohýbány nejprve do extenze a následně do flexe (viz Obr. 18). Zatěžování proběhlo ve dvou režimech. Nejprve byla hodnocena tuhost testovaných páteří při extenzi bez poškození tkáně a následně byl vzorek zatěžován do limitů testovacího systému a použitého 6DOF snímače, případně do destrukce vzorku. U každého vzorku byl cyklus opakován třikrát. Po dokončení zkoušky následovalo vyjmutí vzorku ze simulátoru, umístění do igelitového obalu a uložení do mrazicího boxu.



Obr. 18 – Testovací spinální simulátor Bionix (A) s fixovanou kadaverózní prasečí páteří. Dolní konec testovaného vzorku bederní páteře (L6) byl pevně namontován na plošinu, na kterou byl aplikován pouze ohybový moment (B). Horní konec (T15) úchytu byl volná a mohle se volně pohybovat ve svislém směru a otáčet kolem své osy (B). Čistý ohybový moment byl aplikován na mez zatížení 5 Nm při rychlosti otáčení 20 ° / min v režimu flexe (+ 40 °) – extenze (-40 °) (C). Každý vzorek byl testován po dobu tří cyklů. Zdroj: ČVUT, Fakulta strojní, odbor biomechaniky.

Získaná data ze zatěžování páteří (raw data) byla převedena do připravených šablon v programu Microsoft Excel, kde byly vykresleny grafy závislosti ohybového momentu na čase, rotace na čase a ohybového momentu na rotaci. Tuhost vzorku byla určována z grafu závislosti ohybového momentu na rotaci, a to přesněji z lineární oblasti zatěžování

26 při extenzi (třetí kvadrant grafu) splňující podmínku spolehlivosti lineární regrese větší než hodnota 0,998. Tato vybraná lineární oblast byla vložena do samostatného grafu. Stanovené hodnoty tuhostí byly zaneseny do celkové tabulky a dále byly vyhodnoceny hodnoty střední tuhosti a rozptylů u každé skupiny vzorků. Poté byla tato data porovnávána a otestována statistickými testy.

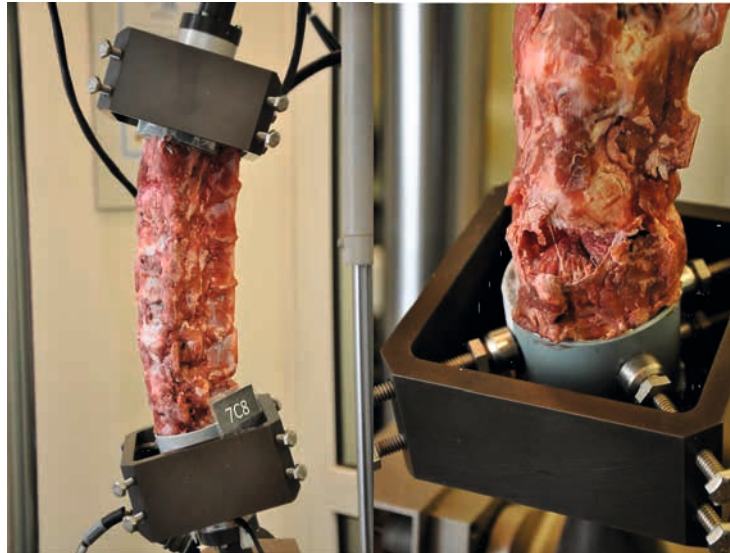
Nastavené principy zatěžování, jako je například standardní zátěž páteří prostým ohybem bez parazitních sil, jsou v souladu, s již uskutečněnými studiiemi.¹⁶⁴⁻¹⁶⁷

3. 5. 2 Princip zatěžování

Testování vzorků páteřních segmentů probíhalo v akreditované Laboratoři mechanických zkoušek v budově Fakulty strojní ČVUT na testovacím systému MTS 858.2 Mini Bionix (MTS, Minnesota, USA), jehož součástí je speciální páteřní simulátor s 8 stupni volnosti, který svojí konstrukcí umožňuje 3 kolmé posuvy a 5 nezávislých rotací a je primárně určen k testování páteří. K měření byl použit „tříosý“ silový snímač 6DOF 1160 N/580 N/ 25 Nm firmy ATI, který svou konstrukcí umožňuje detekovat síly ve třech na sobě kolmých osách a k tomu i momenty působící podél těchto os. Relativní chyba tohoto snímače zjištěná při kalibraci je 0,5 % měřené veličiny.

Celá soustava byla zpočátku uvedena do sousé polohy, posléze byly vynulovány relativní souřadnice, a nakonec byl vypnut pohon Superior Flex/Extenze tak, aby byl umožněn volný pohyb horního dílu simulátoru. Dále byl vzorek vložen do spodní části simulátoru a za použití řízeného pohonu byl vykloněn a poté sestaven s horním dílem simulátoru. Testování začalo po upnutí vzorku do svěrných šroubových spojů. Upnutý vzorek páteře v testovacím systému MTS Mini Bionix lze vidět na Obr. 19.

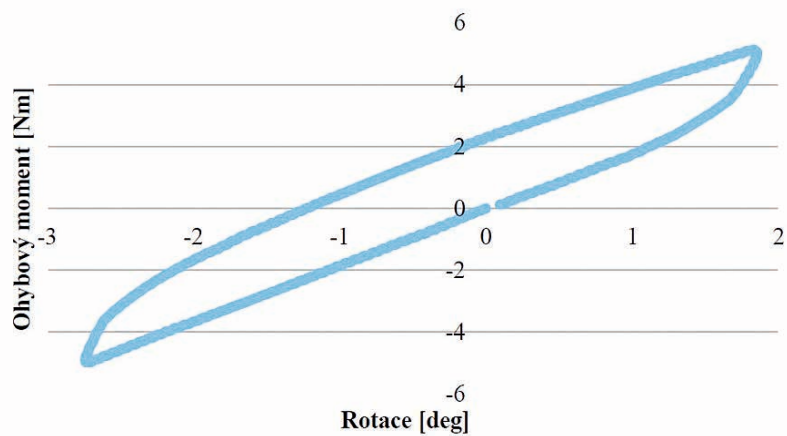
Zatěžování vzorků bylo rozděleno na dvě části. V první části zatěžování bylo cílem zjistit tuhost testovaných páteří při extenzi bez poškození tkáně. Maximální aplikovaný ohybový moment zde byl ± 5 Nm (+ flexe, – extenze). Tato zatěžovací část byla opakována třikrát. Ve druhé části byl vzorek zatěžován do limitů testovacího systému a použitého 6DOF snímače, tedy do ± 25 Nm, eventuálně do destrukce vzorku. Nedošlo-li k destrukci vzorku, pak i tato zatěžovací část byla opakována třikrát. Při obou režimech byl vzorek zatěžován konstantní rychlostí natočení 20 °/min do extenze a následně do flexe.



Obr. 19 – Detailní záběr upnutého vzorku páteře (nalevo) a vzorku páteře, u které došlo při ohybu k destrukci (napravo). Zdroj: ČVUT, Fakulta strojní, odbor biomechaniky.

3. 5. 3 Ohybová zkouška

Každý vzorek páteřního segmentu byl podroben zatěžování, jehož principy jsou popsány výše. Během zatěžování vzorků bylo systémem naměřeno množství posuvů, natočení, sil a momentů, pro vyhodnocení tohoto experimentu však byly užity pouze naměřené hodnoty v podobě natočení vrchního (superior flex/extension rotation) a spodního dílu simulátoru (inferior flex/extension rotation) a ohybového momentu (T_x). Naměřená data byla upravena a posunuta do počátečních nultých hodnot a dále importována do šablon vytvořených v programu Microsoft Excel, kde za pomoci těchto dat byly vytvořeny grafy závislosti ohybového momentu a rotace na čase a ohybového momentu na rotaci (viz Obr. 20), které byly vytvořeny pro každý cyklus měření ve všech skupinách vzorků zvlášť. U vyhodnocování zatížení potřebného k destrukci byla směrodatným údajem hodnota maximálního momentu, který vzorek vydržel.



Obr. 20 – Grafické znázornění průběhu ohybového momentu v závislosti na rotaci testovaného vzorku. Zdroj: ČVUT, Fakulta strojní, odbor biomechaniky.

3. 6 Histologické zhodnocení vzorků páteře

Pro histologické zhodnocení vzorků páteří prasat byly vybrány vždy 2 vzorky z každé podskupiny (A1, $n=2$; A2, $n=2$; B1, $n=2$; B2 $n=2$; C1, $n=2$; C2, $n=2$). Vzorky páteří byly po mikro-CT vyšetření vypreparovány pouze na zkoumanou oblast páteře v rozsahu obratlů L2–L3. Materiál byl fixován 10 % stabilizovaným formalínem (Bamed s.r.o., Česká republika). Přibližně po 24-hodinovém fixování byly vzorky shodnou technikou ve všech skupinách paralelně sériově rozřezány v místech, kde byla provedena implantace kostního štěpu nebo HBNI. Řezy byly vedeny po 2 milimetrech a k dalšímu zpracování byly určeny jejich středy. Po změření měrkou k dalšímu hodnocení byly vybrány řezy s nejširší oblastí vyplněného meziobratlového prostoru. Následně byla provedena demineralizace tkáně, pomocí dekalcificačního roztoku Decalcifier DC1 ((Bamed s.r.o., Česká republika) složeného z kyselina mravenčí a formaldehydu. Použitý Decalcifier DCI reaguje s vápníkem ve tkáni a vytvoří rozpustnou sůl, která zůstává v roztoku. Dle chemické reakce, dekalcifikant pomáhá snížit obsah vápníku obsaženého ve vzorku (demineralizace). Kalciové soli jsou přemístěny. Čas odvápnění závisí na velikosti a tloušťce vzorku, a také na obsahu vápníku. Stanovení konce odvápnění je dle úsudku uživatele a trvá řádově hodiny).

Odebrané demineralizované tkáně větší velikosti jsou patologem přikrojeny na menší reprezentativní části, které jsou následně vloženy do označených kazetek.

Další krok je odvodnění tkáně řadou roztoků o stoupající koncentraci etanolu a převedení do xylenu (organické rozpouštědlo, které se mísí s parafinem). Poté následovalo prosycení tkáně parafinem za zvýšené teploty (56–58 °C). Parafín vyplnil všechny volné mikroskopické prostory v tkáni, celý proces probíhal v autotechnikonu. Tkáň prosycená parafinem byla zalita do podoby parafinového bloku – tkáň se orientovala do středu formy o velikosti jednotek centimetrů a byla přelita roztaveným parafinem. Po zchladnutí vznikl parafinový bloček s tkání uprostřed. K tvorbě parafinových bloku byla využita manuálně ovládaná parafinová zalévací linka Medite TES 99 (Bamed, Česká republika). Následně byly parafinové bloky nakrájeny na mikrotomu, síla řezu byla 3–5 μm . Ukrojený řez se přenesl na hladinu vyhřáté vody ve vodní lázni (cca 42 °C), čímž došlo k zahřátí parafínu a k napnutí tkáně. Následně se do vodní lázně ponořilo podložní sklo, na kterém se řez zachytil a vytáhl ven z vody a vzorek se nechal zaschnout. Na řezu vždy byly zachyceny všechny vrstvy, které se ve vzorku nacházely.

Barvení vzorků bylo provedeno hematoxylin-eosinovým barvením, které přináší celkový přehled o preparátu. Samotnému barvení předcházelo odparafinování tkáňových řezů a jejich rehydratace, aby se zajistil snazší průnik barviva ke konkrétním substancím.

K odstranění parafínu byla použita trojstupňová lázeň xylenu a k hydrataci sestupná řada alkoholu, přesný postup viz Tab. 3. Výsledek barvení hematoxylin-eosin uvádí Tab 4.

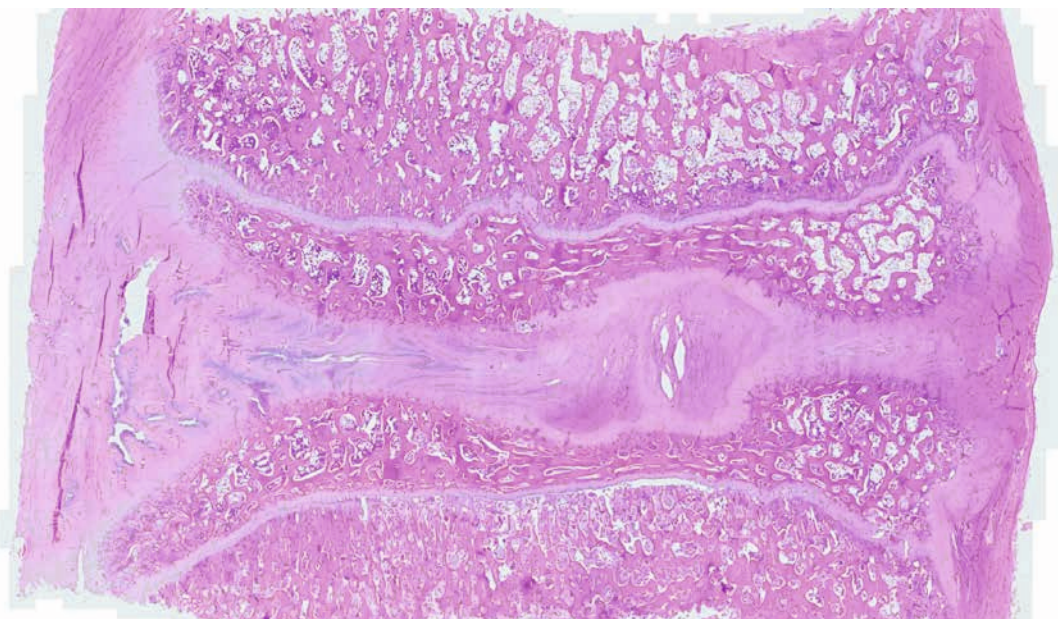
Krok č.	Úkon	Čas
1	Odparafinování	3 x 5 minut
2	Rehydratace – 3 lázně alkoholu	3 x 5 minut
3	Oplach skel vodou	30 sec
4	Mayerův hematoxylin	10 minut
5	Modrání v H ₂ O	5 min
9	Eosin	20 sec
10	Oplach skel H ₂ O	1 min
11	Odvodnění – 2 lázně alkoholu	2 x 5 minut
12	Projasnění xylem	2 x 5 minut
13	Montování	

Tab. 3 – Postup při barvení dekalcifikovaného vzorku páteře.

Struktura	Zbarvení
Jádro	modré
Cytoplazma	světle růžové
Kolagenní vazivo	růžové
Chrupavka	modré
Svalstvo	červené

Tab 4. – Výsledek barvení hematoxylin-eosin

Pro hodnocení obarvených preparátů byl patologem použit klasický světelný mikroskop. Po vyhodnocení patologem, byly skla s obarvenými tkáňovými řezy digitalizovány pomocí skeneru Axio Scan.Z1 (Carl Zeiss AG, Německo), který umožňuje skenování celých histologických preparátů ve vysokém rozlišení. Kvalita obrazu je založena na plan-apochromatických objektivěch s numerickou clonou až 0,95, a je řízena v tomto případě softwarem ZEN. Analýza obrazu pomocí ZENu umožnila výpočet plochy kostní tkáně v daných vzorcích. Preparáty byly skenovány plan-apochromátovým objektivem o zvětšení 20x/0,8 M27. Pomocí grafického vyhodnocení ZEN 2.6 byly označeny a následně byla vypočtena plocha zachycené osifikace, viz Obr. 21. Kompletní zpracování preparátu uvádí Obr. 22.



Obr. 21 – Detail naskenovaného preparátu ze skupiny C1. Zdroj: Ústav patologie, FN Brno.

The screenshot displays a digital pathology viewer interface. At the top, there are two main image windows: the left one shows a label '10C8' and the right one shows a histological section. Below the images are control buttons: 'Copy Label Image', 'Copy Preview Image', 'Rot. Left', and 'Rot. Right'. The main area contains a detailed metadata table:

File Information	
Name	10C8
File Type	Carl Zeiss Image (*.czi)
File Path	Y:\000000-My_Documents\Prezentace\Kren\Kren-veda_2020\10C8.czi
File Size	3.49 GB
Created	4/27/2020 7:20:17 PM
Modified	4/27/2020 8:46:45 PM
User	
Compression Method	JpegXr
Compression Quality	85
Image Dimensions	
→ Tiles	5026 Tiles
Scaling (per Pixel)	0.220 µm x 0.220 µm
Image Size (Pixels)	115211 x 82083
Image Size (Scaled)	25.35 mm x 18.06 mm
Bit Depth	24 Bit
Image Center Position	X: -29.43 mm, Y: 14.49 mm
Acquisition Information	
Scan Profile	Zeiss - Scan BF 20x - no unsharp - Zlack (6m_1m) + EDF.czspif
Acquisition Start	4/27/2020 7:20:16 PM
Microscope	Axio Scan.Z1
Objective	Plan-Apochromat 20x/0.8 M27
Reflector	none
Contrast Method	Brightfield
Light Source Intensity	140 %
Channel Name	TL Brightfield
Channel Description	
Channel Color	
Effective NA	0.8
Imaging Device	Hitachi HV-F203SCL
Camera Adapter	1x Camera Adapter
Exposure Time	200 µs
Depth of Focus	1.72 µm
Binning Mode	1,1

Obr. 22 – Detailní informace ke skenu histopatologicky zpravového vzorku bederní páteře. Zdroj: Ústav patologie, FN Brno.

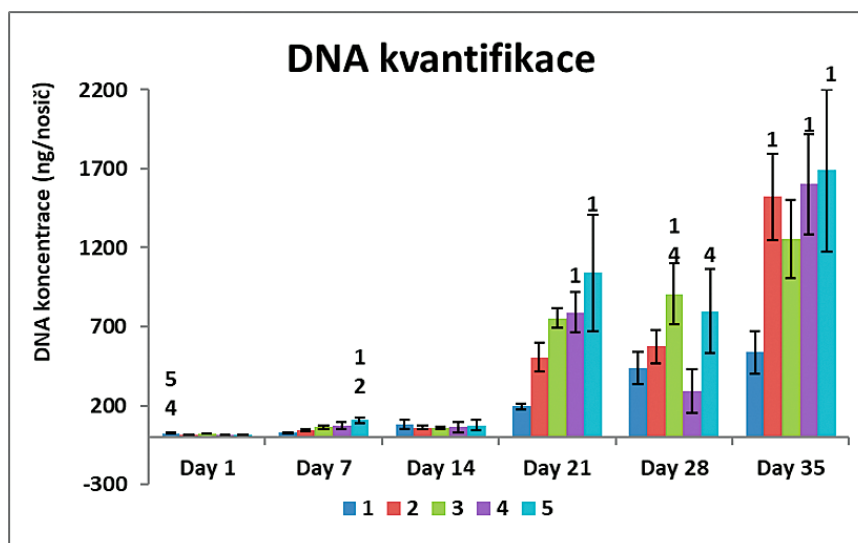
4 VÝSLEDKY

4.1 Výsledky in vitro testování cytotoxicity keramického bioimplantátu

Vzorky nebyly stejně tlusté, ani plocha, na kterou byly nasazovány buňky, nebyly vždy shodné, proto mohlo proto dojít ke zkreslení výsledků z metabolické aktivity a DNA kvantifikace. U žádné ze skupin nedošlo k okyselení média.

4.1.1 Buněčná proliferace a viabilita

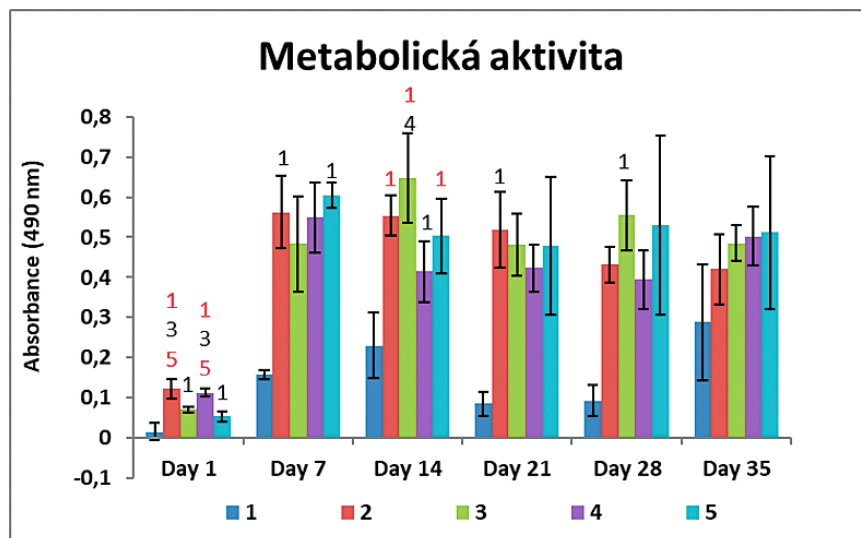
Pro zjištění buněčné proliferace byla použita kvantifikace buněčné DNA (Obr. 23). Prvních 14 dní byl detekován nízký obsah buněk ukazující na nízkou buněčnou proliferaci. V druhé fázi experimentu však došlo k buněčné proliferaci a množství detekované DNA na nosičích se zvyšovalo a mezi skupinami 2–5 bylo srovnatelné, s výjimkou 28. dne, kde byl statisticky nižší obsah buněčné DNA na nosiči č. 4 v porovnání s nosiči č. 3 a 5. Nízké množství buněčné DNA bylo naměřeno na nosiči č. 1 (HA/TCP+PolyP).



Obr. 23 – Buněčná proliferace měřená pomocí kvantifikace DNA. Označení testovaných vzorků: **1** – HA/TCP + bio-PolyP, **2** – HA/TCP + kolagen, **3** – HA/TCP + bio-PolyP + kolagen, **4** – HA/TCP + kolagen + FGF2-stab, **5** – HA/TCP. Červeně značena hladina statistické významnosti $p < 0,001$; černě značena hladina statistické významnosti $p < 0,05$.

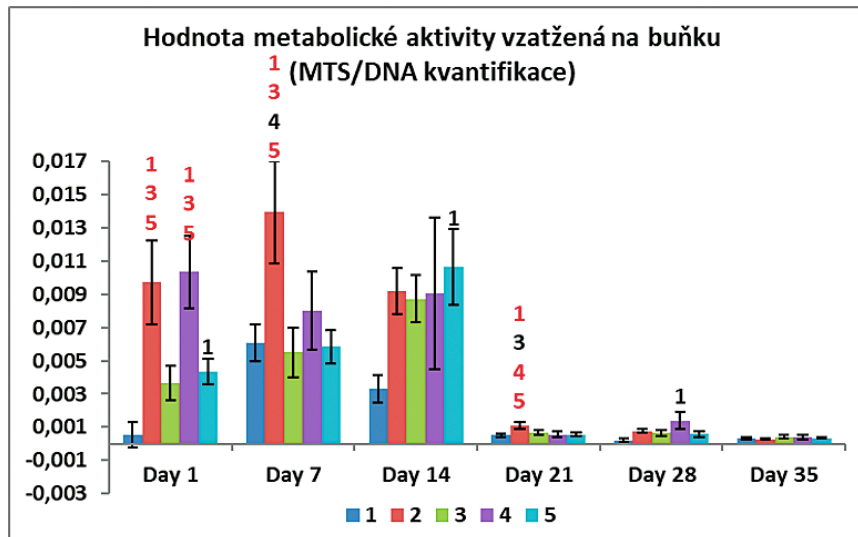
Hodnoty metabolické aktivity (Obr. 24) byly 1. den nejnižší na nosiči č. 1. K 7. dni došlo k nárůstu metabolické aktivity, avšak ode dne 7 až do konce experimentu již k nárůstu nedošlo. Toto zjištění je v rozporu s měřením obsahu buněčné DNA, kdy od 21. dne došlo k nárůstu buněčné DNA. I zde byla pozorována nejnižší naměřená hodnota metabolické aktivity na nosiči č. 1. Metabolická aktivita měřená pomocí MTS testu odráží jednak počet

buněk na nosiči (ve smyslu čím více buněk, tím více mitochondrií v nich obsažených) a jednak počet mitochondrií uvnitř buněk.



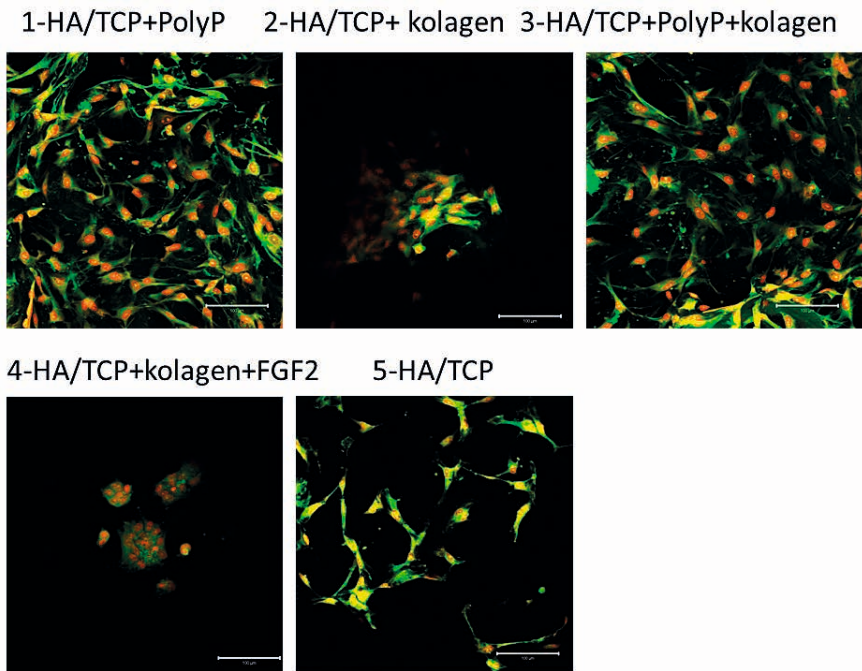
Obr. 24 – Měření metabolické aktivity buněk pomocí MTS testu. Označení testovaných vzorků: **1** – HA/TCP + bio-PolyP, **2** – HA/TCP + kolagen, **3** – HA/TCP + bio-PolyP + kolagen, **4** – HA/TCP + kolagen + FGF2-stab, **5** – HA/TCP. Červeně značena hladina statistické významnosti $p < 0,001$; černě značena hladina statistické významnosti $p < 0,05$.

Metabolická aktivita byla dále vztažena k množství DNA, které odpovídá množství buněk. To dává lepší představu o metabolické aktivitě jednotlivých buněk, není závislá na celkovém množství buněk na vzorku. Ovšem i chování buněk jako celkové populace na nosiči je pro nás velmi důležitou informací (Obr. 25). Zde se ovšem odrazil fakt, že metabolická aktivita byla na vzorcích více méně stejná, ač došlo k nárůstu počtu buněk na nosičích. Tím pádem více metabolicky aktivní buňky byly ze začátku experimentu, kdy jich bylo na nosičích celkově méně. 1. den bylo vyšších hodnot dosaženo na nosičích č. 2 a 3. 7. den byly nejvíce metabolicky aktivní buňky na nosiči č. 3. Následně byly srovnatelné nosiče č. 2–5, a pak již došlo k poklesu.

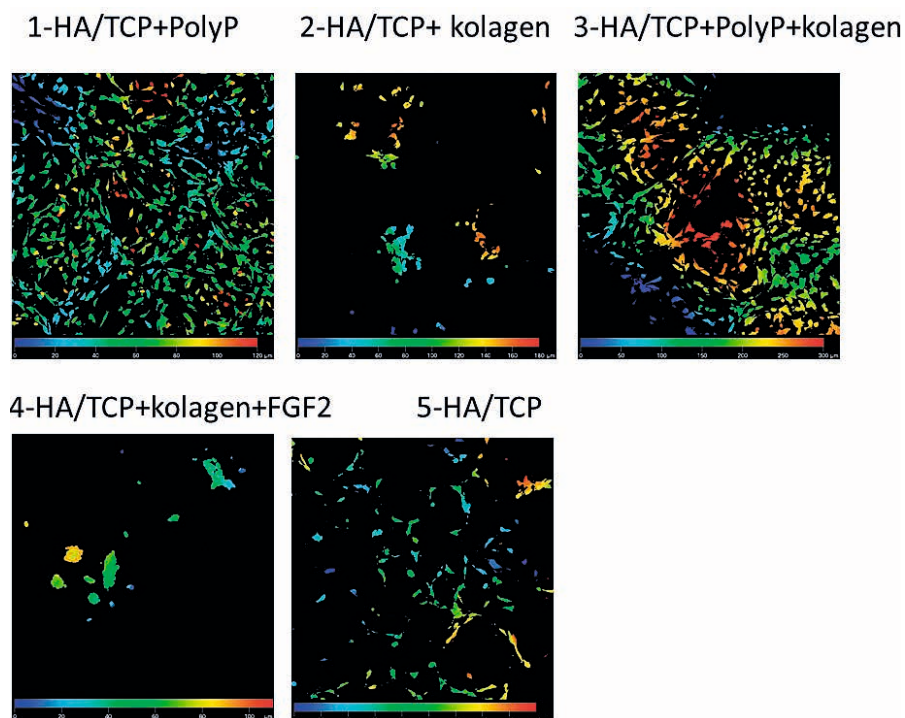


Obr. 25 – Metabolická aktivita vztažená k hmotnosti buněčné DNA. Označení testovaných vzorků: **1** – HA/TCP + bio-PolyP, **2** – HA/TCP + kolagen, **3** – HA/TCP + bio-PolyP + kolagen, **4** – HA/TCP + kolagen + FGF2-stab, **5** – HA/TCP. Červeně značena hladina statistické významnosti $p < 0,001$; černě značena hladina statistické významnosti $p < 0,05$.

Z konfokální mikroskopie je patrné (Obr. 26), že buňky na nosičích č. 1–3 a 4 dobře adherovaly, byly protáhlé. Na nosiči číslo 4 byly pozorovány shluky buněk, které nebyly rozprostřené. Množství buněk adheroovaných na nosiče č. 2, 4 a 5 bylo nižší v porovnání s nosiči č. 1, 3 a 5. Množství DNA 1. den po nasazení (Obr. 23) bylo statisticky vyšší pouze na skupině č. 1 v porovnání se skupinami č. 4 a 5. Mírný nesoulad s dosaženými výsledky mohl být způsoben rozličnou adhezí buněk na nosiče v závislosti na jejich vlastnostech, jelikož v průběhu barvení pro konfokální mikroskopii dochází k řadě promývacích kroků, buňky mohly být v průběhu postupu z nosiče odmyty, závisí také na porositě jednotlivých nosičů. Jak je patrné z Obr. 27, buňky pronikaly póry i do hloubky nosiče (okolo 100–300 μm).



Obr. 26 – Konfokální mikroskopie 1. den po nasazení buněk na nosič, barvení DiOC6(3) (intracelulární membrány, zeleně) a propidium jodid (buněčná jádra, červeně). Je patrné, že buňky tvořily téměř souvislou vrstvu již od prvního dne. 14. den došlo k zahuštění buněčné vrstvy. Zvětšení 200x, měřka 100 μm . Zdroj: Institut experimentální medicíny AVČR.

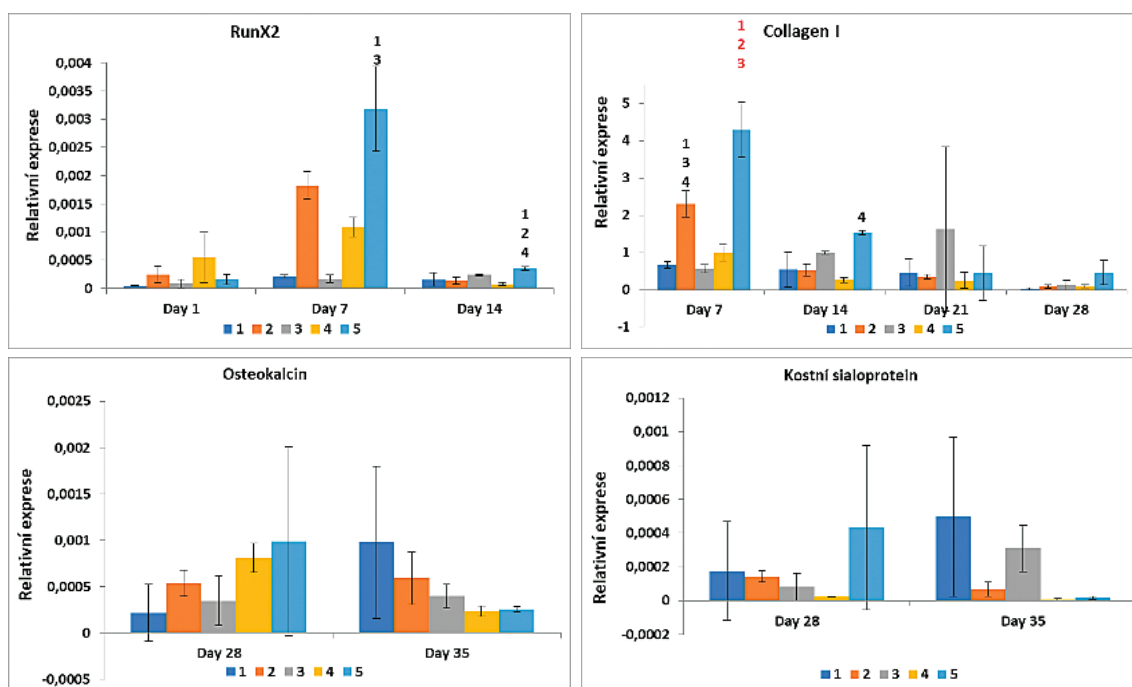


Obr. 27 – Konfokální mikroskopie, projekce penetrace buněk dovnitř nosičů. Signál z obarvených buněčných jader (barveno propidium jodidem) byl barevně označen podle hloubky, kterou zaujímaly ve vzorku. Barva jader odpovídá hloubce vyznačené na barevné škále. Zvětšení 100x. Zdroj: Institut experimentální medicíny AVČR.

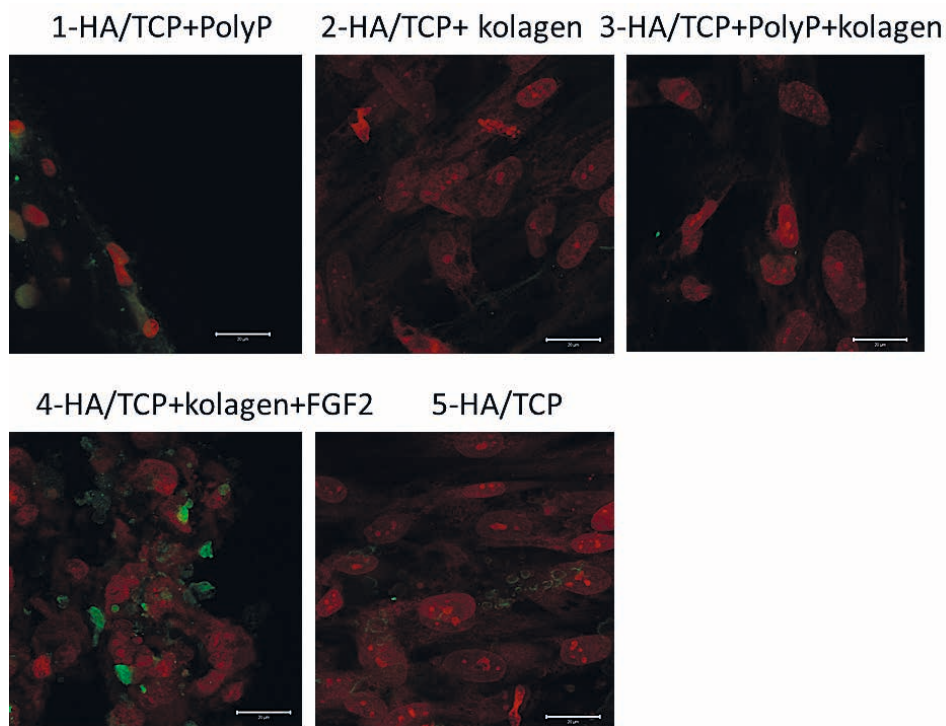
4. 1. 2 Osteogenní diferenciaci buněk na nosičích

Osteogenní diferenciaci hMSC na nosičích byla měřena pomocí real-time PCR analýzy (Obr. 28). Jako marker časně osteogenní diferenciaci byl použit RunX2 (měřeno 1., 7. a 14. den), kolagen I (7., 14., 21. a 28. den) a jako markery pozdní osteogenní diferenciaci osteokalcin a kostní sialoprotein (28. a 35. den). Osteokalcin byl vizualizován pomocí imunofluorescenčního barvení.

PCR analýza potvrdila ranou fázi osteogenní diferenciaci hMSC na nosičích. Raný marker RunX2 v hodnotách exprese stoupl k 7. dni a následně došlo k jeho poklesu. Tento typický jev byl pozorován na nosičích č. 2, 3 a 4. Pouze u nosiče 5 se jednalo o statisticky významný nárůst 7. den. Kolagen jakožto raný marker osteogenní diferenciaci byl exprimován nejvíce 7. den, méně pak 14. den. Statisticky signifikantní rozdíl byl pak zaznamenán pouze 7. den experimentu na nosičích číslo 2 (HA/TCP+kolagen) a 5 (HA/TCP). Expresí pozdních markerů, osteokalcinu a kostního sialoproteinu, byla sledována v dny 28 a 35, avšak byly zde velké odchylky bez statistické významnosti. Konfokální mikroskopie (Obr. 29) potvrdila slabě přítomný osteokalcin pouze u vzorku č. 4.



Obrázek 28 – Relativní genová exprese RunX2 – časněho markeru osteogenní diferenciaci. Označení testovaných vzorků: **1** – HA/TCP + bio-PolyP, **2** – HA/TCP + kolagen, **3** – HA/TCP + bio-PolyP + kolagen, **4** – HA/TCP + kolagen + FGF2-stab, **5** – HA/TCP.



Obrázek 29 – Imunofluorescenční barvení osteokalcinu. Buněčná jádra jsou obarvena propidium jodidem (červená), osteokalcin je obarven zeleně. Zvětšení 400×, velikost měřky 20 μm. Zdroj: Institut experimentální medicíny AVČR.

4. 1. 3 Závěr

Na základě in vitro testování po dobu 35 dní bylo prokázáno, že všechny testované nosiče jsou biokompatibilní a nevykazují známky cytotoxicity. Buněčná proliferace na nosičích vykazovala pomalejší nástup (nárůst v množství DNA byl detekován od 21. dne experimentu). Test buněčné adheze (průkaz osteokondukce) prokázal protáhlé buňky na vzorcích č. 1 (HA/TCP+bio-PolyP), č. 2 (HA/TCP+kolagen), č. 3 (HA/TCP+kolagen+bioPolyP) a č. 5 (HA/TCP). Na nosiči č. 4 (HA/TCP+kolagen+FGF2-stab) byly buňky kulovitěho charakteru ve shlucích a vykazovaly mírně horší buněčnou adhezi.

Z hlediska prokázání osteoindukce testovaných nosičů byly detekovány rané markery osteogenní diferenciace (RunX2 a kolagen I). Tyto markery byly nejvíce exprimovány na nosičích č. 5 (HA/TCP) a na nosiči č. 2 (HA/TCP+kolagen). Pozdní marker osteogenní diferenciace osteokalcin byl zaznamenán u nosiče č. 4 (HA/TCP+kolagen+FGF2-stab). Pro in vivo testy nebyl doporučen vzorek č. 1 (HA/TCP+bio-PolyP), který vykazoval nejmenší nárůst buněk na nosiči. Naopak k in vivo testům byly dle výše uvedených výsledků doporučeny vzorky č. 2 (HA/TCP+kolagen), č. 3 (HA/TCP+kolagen+bioPolyP), č. 4 (HA/TCP+kolagen+FGF2-stab) a č. 5 (HA/TCP), které nevykazovaly známky cytotoxicity,

naopak u nich byla prokázána biokompatibilita a osteokonduktivita. Navíc u vzorků č. 2 (HA/TCP+kolagen) a č. 5 (HA/TCP) byla zaznamenána raná fáze osteogenní diferenciaci a u vzorku č. 4 (HA/TCP+kolagen+FGF2-stab) pak byly přítomné známky pozdní osteogenní diferenciaci.

4. 2 Chirurgická část

Operace u všech 36 experimentálních zvířat probíhaly v celkové anestezii, striktně za aseptických kautel. Popis průběhu anestezie i operačního přístupu viz kapitola materiál a metodika. Chirurgický tým byl složen celkem ze 6 lékařů, úrazových chirurgů, kteří se na experimentu podíleli. Operační skupina pro jednotlivé operace pak byla tvořena 3 chirurgy, jeden z nich působil v pozici instrumentáře. Operaci vždy vedl 1 ze 2 chirurgů, kteří mají letitou praxi se spinální operativou a rutinně provádějí operační výkony typu laterální lumbální intervertebrální fúze v humánní medicíně.

4. 2. 1 Per a pooperační průběh včetně komplikací

Všechna experimentální zvířata absolvovala operační výkon bez zásadních komplikací. Průměrný operační čas operovaných zvířat ($n=36$) činil 57 minut. Významně delší operační čas byl zaznamenán ve skupině A (průměrný operační čas=77 minut), oproti skupině B (45 minut) a C (46 minut). Taktéž měřená krevní ztráta během operace ve skupině A (52 ml) byla výrazně vyšší než ve skupině B (32 ml) a C (27 ml). Vyšší krevní ztráty i delší operační čas ve skupině A souvisely s odběrem kostního štěpu z lopaty kosti kyčelní. Podrobné výsledky operačního času uvádí Tab. 4.

Všechna operovaná zvířata se z operace zotavila bez komplikací. Pooperačně byly zaznamenány infekční komplikace v ráně u 1 prasete ze skupiny A. Abscesová kolekce byla ošetřena chirurgicky v kombinaci s podáním celkové antibiotické léčby, které vedly ke kompletnímu zhojení operační rány. Pooperačně se u žádného zvířete nerozvinul neurologický deficit. Měřený čas do obnovení chůze byl významně rozdílný mezi skupinou A a skupinami B, C. Ve skupině A zvířata obnovila chůzi po operačním zákroku v průměru za 648 minut, u skupin B a C byl tento čas v průměru 72 min., podrobné výsledky uvádí Tab. 5.

Pooperační výsledky			
Měřené veličiny	Skupina A	Skupina B	Skupina C
Průměrná délka operace	77 min. (60–102 min.)	49 min. (33–70 min.)	47 min. (37–65 min.)
Průměrná peroperační krevní ztráta	52 ml (20–100 ml)	32 ml (5–70 ml)	27 ml (10–45 ml)
Průměrná doba do obnovení chůze	696 min. (420–1200 min.)	80 min. (10–105 min.)	65 min. (30–85 min.)

Tab. 5 – Shrnutí naměřených per a pooperačních hodnot délky operace, peroperačních krevních ztrát a doby do obnovení chůze.

4. 2. 2 Rentgenové kontroly

Rentgenové snímky byly prováděny v AP a boční projekci (Obr. 15) před i bezprostředně pooperačně a následně v intervalu 2, 4, 8 týdnů pooperačně u všech sledovaných podskupin A1, A2, B1, B2, C1, C2. U podskupiny A2, B2, C2 pak ještě ve 12. a 16. týdnu po operaci. Na každém RTG snímku byl změřen úhel segmentální kyfózy metodou dle Cobba (viz Obr. 16). Dosažené úhly pro jednotlivé skupiny se v čase neměnily, podrobně jsou uvedeny v Tab. 6.

Průměrný úhel segmentální kyfózy						
Doba měření	Podskupiny					
	A1	A2	B1	B2	C1	C2
Před operací	12°	12°	13°	13°	12°	12°
Po operaci	9°	12°	12°	10°	10°	13°
Po 8 resp. 16 týdnech	10°	11°	12°	11°	11°	13°

Tab. 6 – Naměřené hodnoty úhlu segmentální kyfózy operovaného úseku páteře v rozsahu L2–3 na bočním RTG snímku bederní páteře.

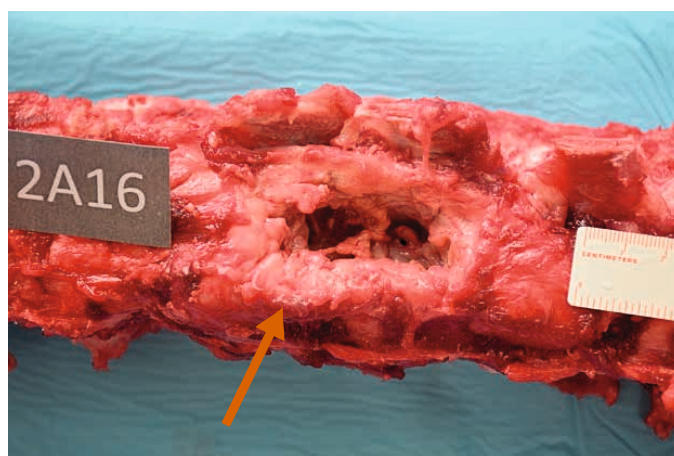
Dále na hodnocených RTG snímcích bylo po 4 týdnech od operace pozorováno kompletní uvolnění implantované osteosyntetické montáže s migrací fixačních šroubů u jednoho prasete ze skupiny A2, viz Obr. 33. U tohoto zvířete nebyl zaznamenán jakýkoliv klinický projev, který by odrazil dané uvolnění. Jinak při pravidelných rentgenových kontrolách nebyly v RTG obraze zjištěny jiné známky uvolňování osteosyntetického materiálu, či patologické reakce v jeho okolí.

4. 2. 3 Autoptické nálezy

Po eutanazii experimentálních zvířat byla hodnocena přítomnost kompenzační fibrózní reakce v operovaném úseku páteře, která je nepřímou známkou nestability v dané oblasti. Dále byla hodnocena pevnost a retence implantovaného osteosyntetického materiálu a také makroskopická přítomnost zánětlivé reakce v místě implantovaného osteosyntetického materiálu, stejně tak štěpu nebo HBNI samotného.

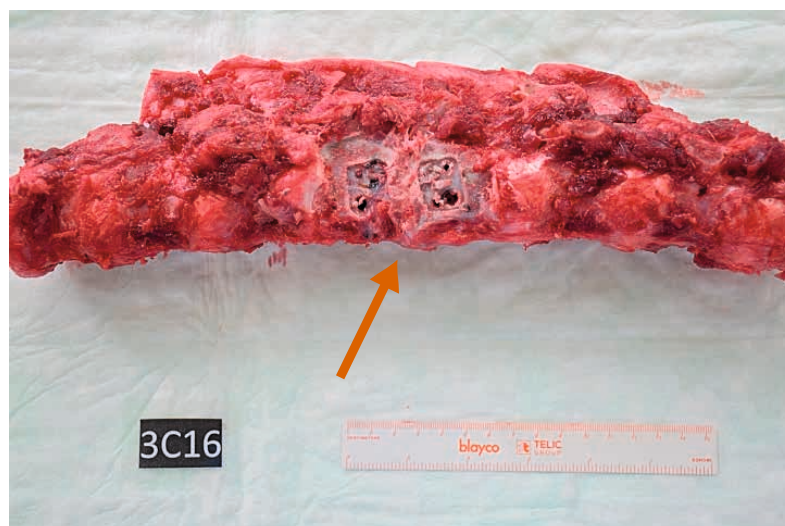
U žádného odebraného vzorku páteře nebyla pozorována makroskopická odchylka osy páteře ve smyslu hyperkyfózy nebo skoliózy.

Kompenzační fibrózní reakce v místě osteosyntetického materiálu byla pozorována u všech 12 zvířat ze skupiny A, v podskupině A1 ($n=6$) fibrózní tkáň zasahovala do oblasti hlaviček fixačních šroubů a osteosyntetický materiál byl vizuálně patrný, ve skupině A2 ($n=6$) pak byl osteosyntetický materiál celý pokryt fibrózní tkání, a tedy po vyjmutí bloku páteře z těla prasete nebylo možné imlantát vizuálně nalézt a bylo nutné tuto fibrózní tkáň z části odstranit. Fibrózní tkáň nebyla lokalizována jen do oblasti osteosyntetického materiálu, ale zaujímala celý segment L2–3 páteře, viz Obr. 30.



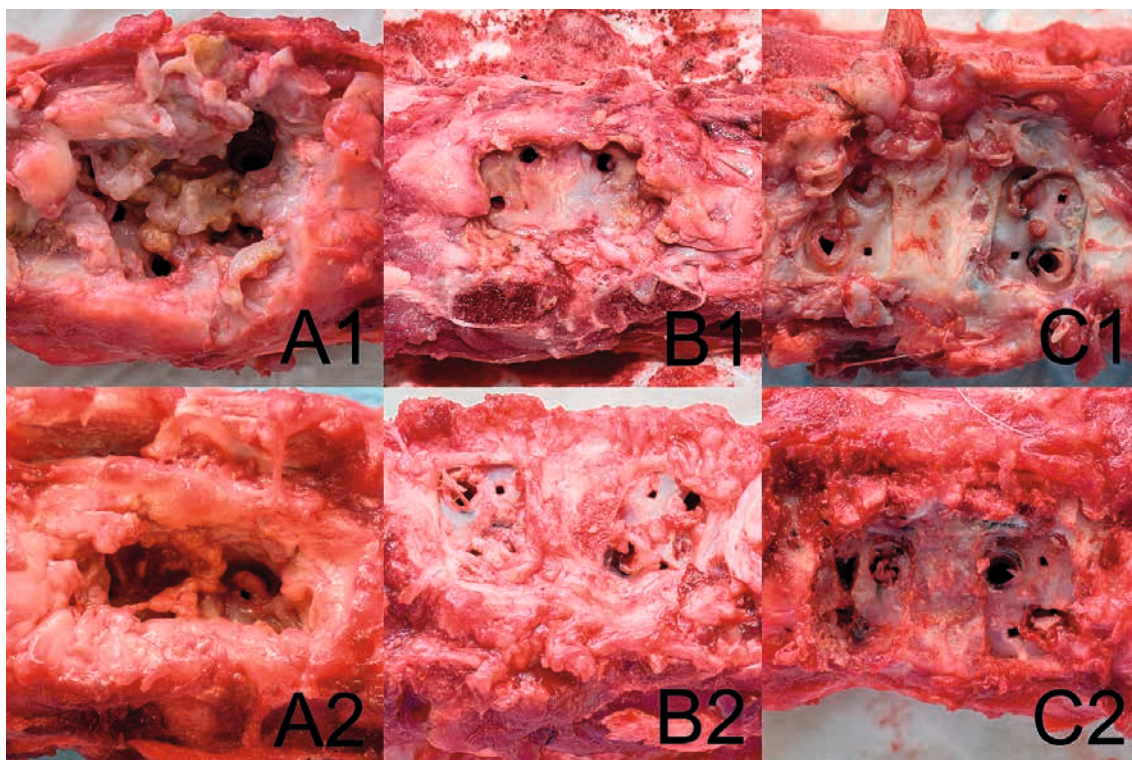
Obr. 30 – Autoptická fotografie znázorňuje detail L2–3 segmentu páteře zvířete ze skupiny A2 po 16 týdnech experimentu. Šipkou je naznačeno místo po explantaci osteosyntetického materiálu s přítomností fibrózní reakce, která je nepřímou známkou nestability v místě provedené intervetebrální fúze. Zdroj: Archiv autora.

Ve skupině B a C se výše popisovaná kompenzační fibrózní reakce nevyskytovala u žádného autoptického vzorku páteře, implantát byl na první pohled patrný nad niveau páteře. Ve skupině B1 a C1 byly i fixační desky vizuelně patrné. Ve skupině B2 pak byl patrný jejich kostěnný přerůst a bylo nutné je uvolnit vysekáním dlátem, ve skupině C2 tento kostěnný přerůst byl v obl. fixačních desek přítomen jen částečně (viz Obr. 31).



Obr. 31 – Autoptická fotografie znázorňuje vytnutý segment páteře zvířete ze skupiny C2 v rozsahu Th15-L6. Ve střední části je šipkou označen segment L2–3 a místo po explantaci osteosyntetického materiálu, fibrózní reakce není přítomna, naopak je vyjádřen částečný kostěný přerůst v místě po odstranění fixačních destiček implantátu U-Smart anterior. Zdroj: Archiv autora.

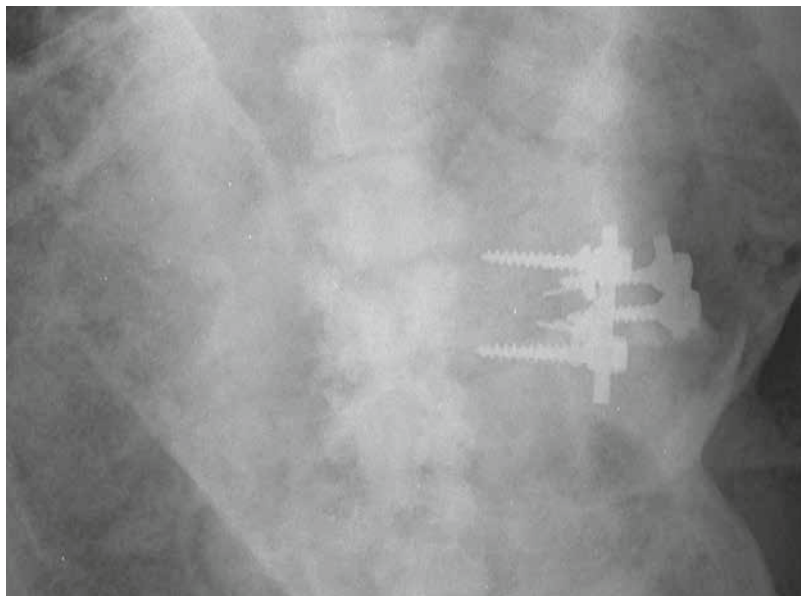
Přehledné zobrazení detailu vyřátého segmentu páteře po explantaci osteosyntetického materiálu, řazeno dle podskupin uvádí Obr. 32.



Obr. 32 – Detail autoptických vzorků páteří vybraných zástupců jednotlivých podskupin. Fotografie byly provedena z levé strany páteře, kde byla provedena explantace osteosyntetického materiálu. Ve skupině A1 a A2 je patrný fibrózní přerůst osteosyntetického materiálu, ve vzorcích skupiny B i C nebyla tato fibrózní reakce přítomná. Zdroj: Archiv autora.

Dále jsme v podskupině A1 u pěti ze šesti získaných preparátů u ve skupině A2 u čtyř ze šesti preparátů pozorovali nahromadění lehce zkalené tekutiny s tkáňovým detritem v okolí šroubů. Klinicky daná tekutina nejevila známky typické abscesové kolekce. Z odebraného vzorku, který byl odeslán na kultivaci, nebyla prokázána přítomnost bakterií – nález byl sterilní. Při mikroskopickém vyšetření odebraného vzorku tekutiny zde byla prokázána přítomnost leukocytů a amorfni tkáň. Ve skupině B a C nebyl podobný makroskopický nález tekutiny či tkáňového detritu v okolí šroubů pozorován.

Případné uvolnění osteosyntetického materiálu bylo hodnoceno na základě retence fixačních šroubů v místě jejich zavedení do obratlových těl. Ve skupině A bylo pozorováno uvolnění všech fixačních šroubů jak v podskupině A1, tak i A2. V podskupině A1 k extrakci šroubů bylo pohmatem patrné uvolnění, ale k jejich extrakci bylo nutné užít šroubováku, zatímco ve skupině A2 bylo možné všechny šrouby po odstranění fibrozního přerůstu volně vyndat rukou bez použití šroubováku. Dokonce u 1 zvířete v podskupině A2 byly šrouby kompletně uvolněné a dislokované mimo obratlová těla. RTG obraz uvolněného implantátu viz Obr 33.



Obr. 33 RTG bederní páteře v předozadní projekci, kde je patrné kompletní uvolnění a dislokace implantátu z obratlových těl L2 a L3. Zdroj: Archiv autora.

Ve skupině B pak bylo částečné uvolnění šroubů pozorováno pouze v podskupině B1, kdy k jejich extrakci bylo nutné použít šroubováku, přičemž šrouby nekladly standardní odpor. Naopak ve skupině B2 ani jeden ze šroubů nejevila známky uvolnění a při explantaci materiálu bylo nutné užít výrazně větší síly, než kterou operátor vyvíjel při implantaci osteosyntetického materiálu. Ve skupině C podobně jako ve skupině B bylo pozorováno částečné uvolnění v podskupině C1, kdy šrouby byly extrahovány šroubovákem, ale bez

většího odporu. Ve skupině C2 šrouby nejevily známky uvolnění, jejich extrakce probíhala šroubovákem obdobnou silou, která odpovídala síle, kterou vyvíjel operatér při implantaci šroubů.

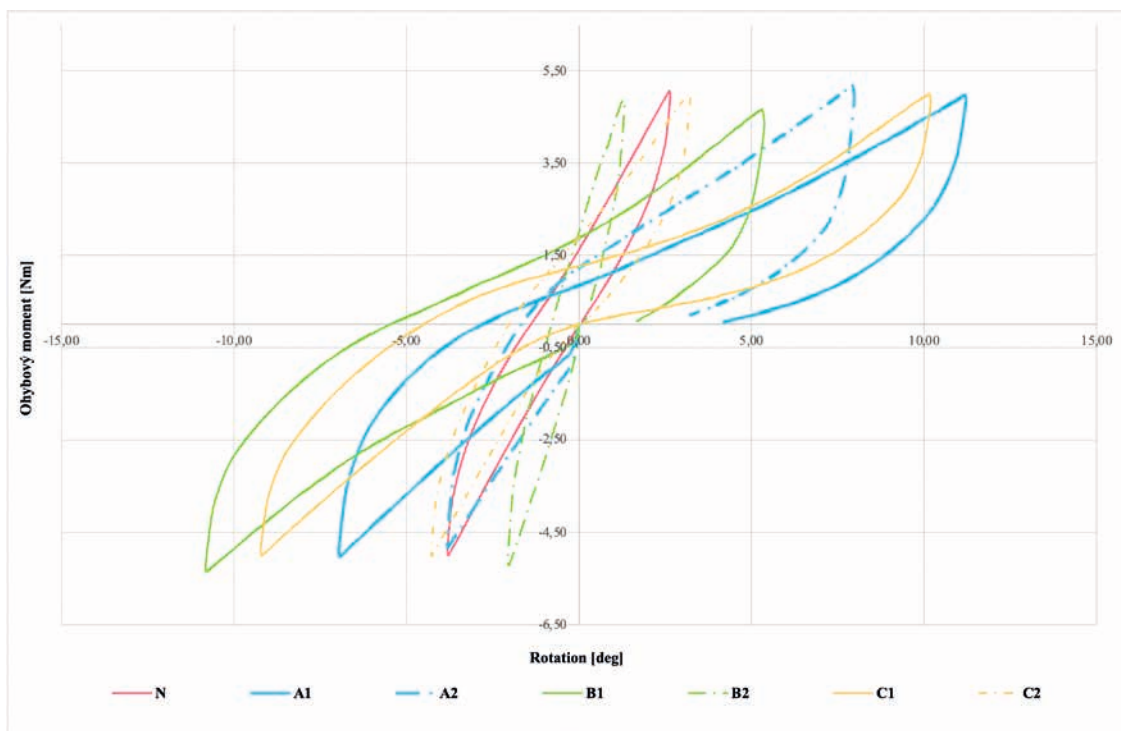
4. 2. 4 Závěr

Na základě zhodnocení autoptických vzorků páteře je možné konstatovat, že ve skupině A byla nepřímo prokázána nestabilita operovaného segmentu L2–3 páteře, která se projevila uvolněním osteosyntetického materiálu, tvorbou perivertebálního fibrózního infiltrátu a reakce v okolí uvolněných šroubů odpovídajícímu aseptickému zánětu. Naopak ve skupině B a C po 16 týdnech byl makroskopicky přítomen kostěnný přerůst operovaného segmentu a nebyly přítomné známky nestability operovaného segmentu páteře.

4. 3 Biomechanika

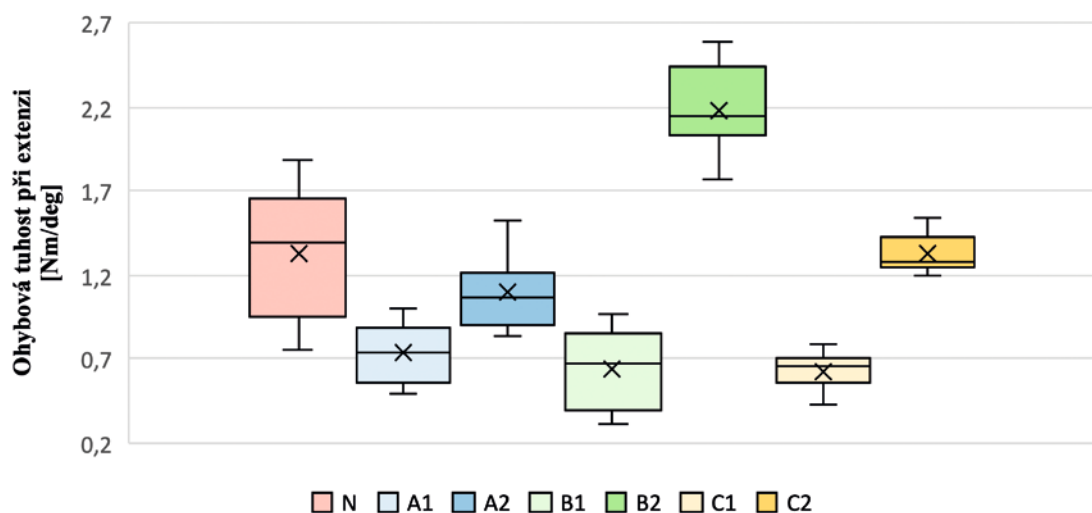
4. 3. 1 Měření tuhosti

Ve skupině N bylo testováno 5 nativních vzorků páteří. V každé z ostatních testovaných skupin (**A1**, $n=4$; **A2**, $n=4$; **B1**, $n=4$; **B2**, $n=4$, **C1**, $n=4$, **C2**; $n=4$) byly testovány vzorky čtyři. Celý experiment biomechanického testování páteře vznikl na základě námi řešeného výzkumu intervertebrální dýzy, dosažené výsledky biomechanických testů byly propůjčeny a podrobně zpracovány v rámci diplomové práce kolegyně Laxové z ČVUT. V dalším textu biomechanických výsledků tak uvádím výsledky, které již v dané práci byly dříve publikovány.¹⁶⁸ Každý vzorek páteře byl podroben 3 cyklům zátěže, kdy byla sledována závislost ohybového momentu na rotaci a čase. Celkem bylo zpracováno a následně vyhodnoceno 87 záznamů zatěžování. Ze získaných grafů jednotlivých skupin vzorků byl vždy vybrán jeden vzorek, který byl vybrán tak, aby hodnota jeho tuhosti se co nejvíce blížila hodnotě průměrné tuhosti skupiny. Takto vybrané grafické křivky byly následně zobrazeny na Obr. 34. Ze zmíněného grafu jsou patrné rozdíly sklonu křivek v oblasti extenze. Při porovnání jednotlivých křivek podskupin A1, B1, C1 a A2, B2, C2 lze říci, že sklon křivky v oblasti extenze je po 16 týdnech více strmější než u výsledků po 8 týdnech, jedná se o nepřímý důkaz, že zanechané k hojení v podobě 16 týdnů docílíme lepšího srůstu spojovaných částí páteře a tím i větší tuhosti. Po 16 týdnech lze zároveň konstatovat, že křivky v extenzivní části průběhu se začínají svým tvarem přibližovat křivkám zaznamenaných u skupiny N.



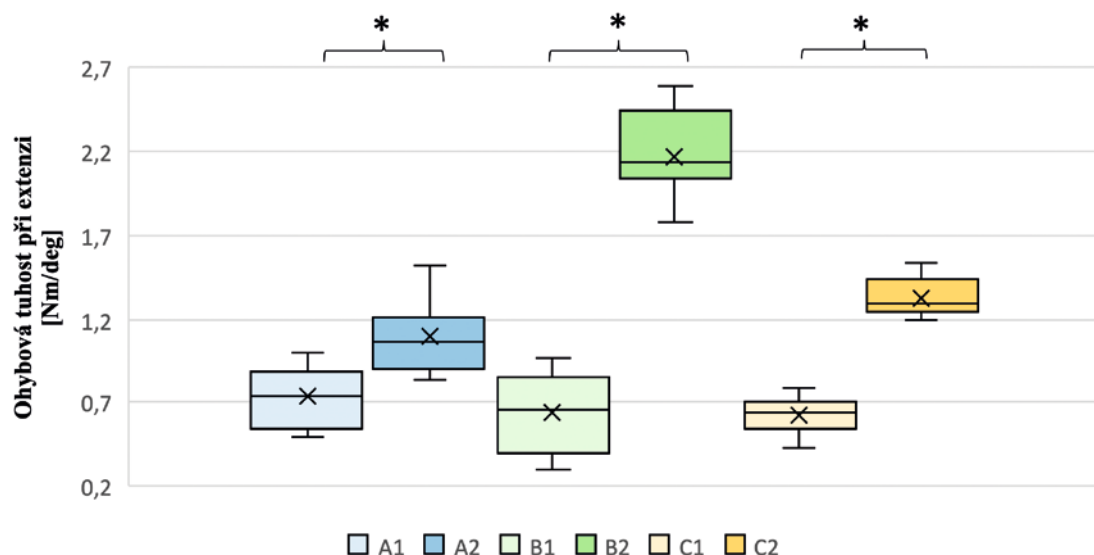
Obr. 34 Závislost ohybového momentu na rotaci dle skupin. Vyrobeny jsou křivky, které se nejvíce blížily průměrné hodnotě ve vyšetřované podskupině. Zdroj: ČVUT, Fakulta strojní, odbor biomechaniky.

Dále byly měřeny hodnoty ohybové tuhosti, které jsou zaznamenány na Obr. 35. Z grafu je patrné, že nejvyšší hodnoty tuhosti je dosaženo u vzorku B16, kdy průměrná hodnota tuhosti dosáhla hodnoty 2,17 Nm/deg. Naopak nejmenší hodnoty tuhosti jsou v podskupině skupině B1 a C1 a dosahují hodnoty kolem 0,62 Nm/deg.



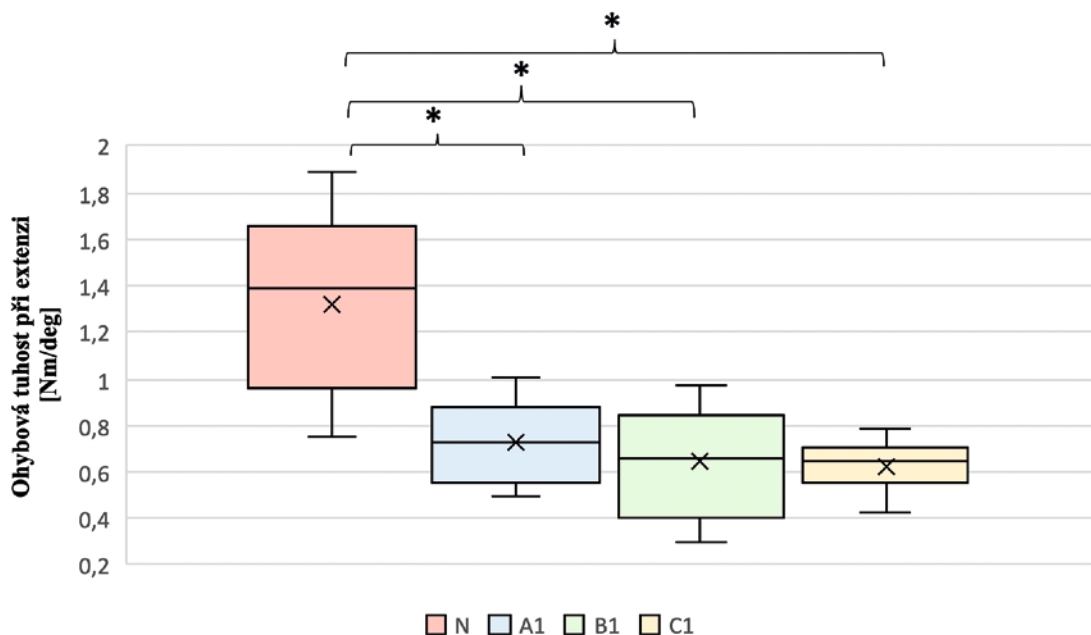
Obr. 35 – Grafické znázornění naměřených hodnot ohybových tuhostí pro jednotlivé podskupiny, včetně skupiny N. Hodnota ohybové tuhosti je udávána v Nm/deg. Zdroj: ČVUT, Fakulta strojní, odbor biomechaniky.

Při porovnání ohybové tuhosti jednotlivých podskupin mezi sebou, tedy A1 versus A2, B1 versus B2, C1 versus C2 vyšel statisticky významný rozdíl mezi podskupinami, a tedy bylo prokázáno, že v čase dochází k progresi intervertebrální fúze v pohybového segmentu L2–3, viz Obr. 36.



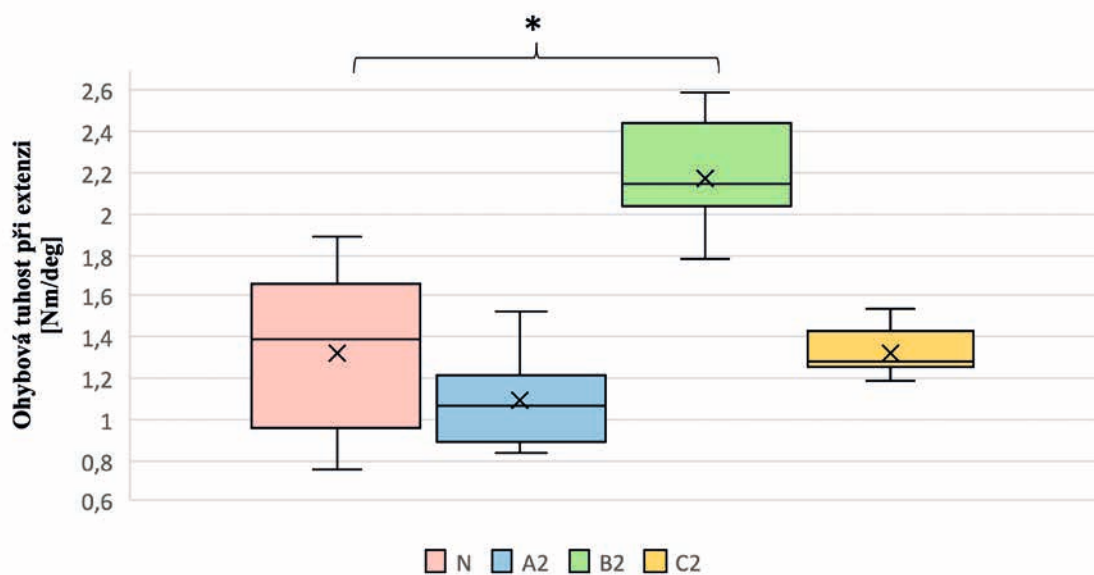
Obr. 36 – Porovnání ohybové tuhosti páteřních segmentů mezi podskupinami A1, A2; B1, B2; C1, C2; * značí statisticky významné rozdíly mezi 8 a 16 týdnem v jednotlivých skupinách páteří při 95 % hladině spolehlivosti. Zdroj: ČVUT, Fakulta strojní, odbor biomechaniky.

Je-li provedeno takovéto porovnání ohybové tuhosti podrobněji mezi skupinou N a podskupinami A1, B1 a C1 pak nacházíme shodně ve všech 3 testovaných podskupinách, že dochází k snížení ohybové tuhosti, nejvíce pak ve skupině C. Při statistickém zhodnocení nalézáme významný rozdíl mezi skupinou N a jednotlivými podskupinami ($p=0,05$). Jedná se o nepřímý důkaz, že průběh intervertebrální dězy v 8 týdnech je v počátečních stádiích a stabilita operovaného segmentu je snížena bez ohledu na použítou metodu provedené intervertebrální fúze. Podrobné zobrazení udává Obr. 37.



Obr. 37 – Porovnání ohybové tuhosti páteřních segmentů mezi podskupinami N, A1, B1, C1; * značí statisticky významné rozdíly mezi skupinou N a podskupinami A1, B1, C1 8 při 95 % hladině spolehlivosti. Zdroj: ČVUT, Fakulta strojní, odbor biomechaniky.

Při porovnání skupiny N s podskupinami A2, B2, C2, tedy po uběhnutí 16 týdnů od provedení meziobratlové fúze pak byl prokázán statisticky významný rozdíl pouze mezi skupinou N a B2 ($p < 0,05$). Zbylé podskupiny se statisticky významně nelišily v hodnotě ohybové tuhosti oproti skupině nativních vzorků. Nepřímo můžeme konstatovat, že průběh intervertebrální fúze byl nejkvalitnější ve skupině B, kdy se ohybová tuhost páteře v segmentu L2–3 významně zvýšila. Daný jev dokumentuje Obr. 38.



Obr. 38 – Porovnání ohybové tuhosti páteřních segmentů mezi podskupinami N, A2, B2, C2; * značí statisticky významné rozdíly mezi skupinou N a podskupinou B2, při 95 % hladině spolehlivosti. Zdroj: ČVUT, Fakulta strojní, odbor biomechaniky.

4. 3. 2 Zatěžování do destrukce

V druhém režimu zatěžování byl hodnocen maximální ohybový moment M_{Omax} potřebný k destrukci páteří. Jak je možno vidět v Tab. 7, u většiny vzorků nebylo destrukčního stavu dosaženo. Je tedy možné konstatovat, že pevnost těchto vzorků reálně dosahovala hodnot větších, než byl limit použitého snímače ± 25 Nm. Vzorky, u kterých k poškození došlo, byly celkem tři a zároveň je třeba zdůraznit, že u žádného ze vzorků, u kterého k poškození došlo, nebylo místo implantace nejslabším článkem, jelikož páteř praskla vždy v jiném místě.

Vzorek č.	M_{Omax} (NM)	Skupina
N1, N2, N3, N4, N5	*	N
1A1, 2A1, 3A1	*	A1
4A1	23,3	
1A2, 2A2, 3A2, 4A2	*	A2
1B1	24,2	B1
2B1, 3B1, 4B1	*	
1B2, 2B2, 3B2, 4B2	*	B2
1C1, 2C1, 3C1, 4C1	*	C1
1C2, 2C2, 3C2, 4C2	*	C2

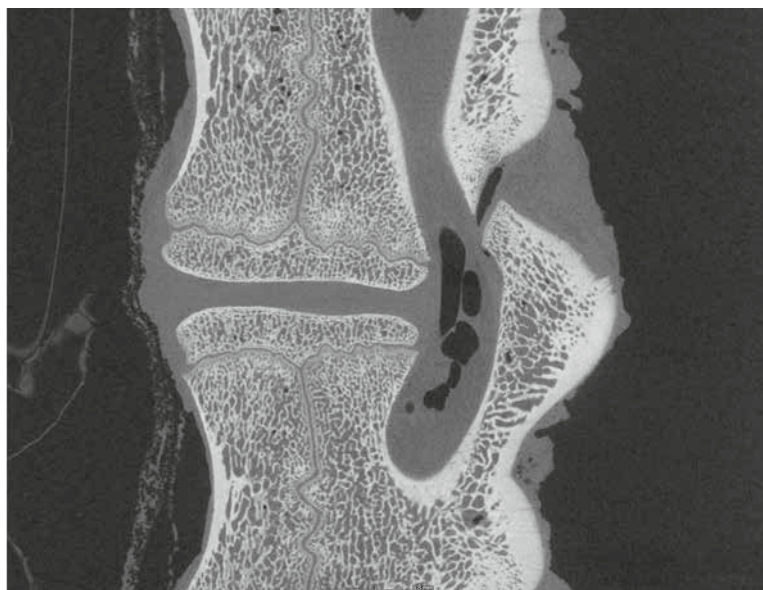
Tab. 7 – Vyjádření maximálního ohybového momentu testovaných páteří. * značí, že během testu nedošlo k destrukci, protože byl dosažen limit snímače. Je-li hodnota uvedena, pak při její výši došlo k destrukci testovaného vzorku.

4. 3. 3 Závěr

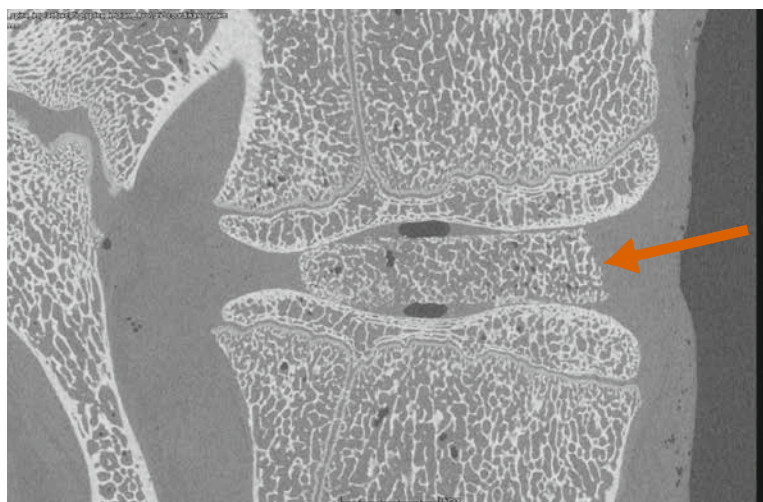
Na základě provedeného biomechanického experimentu je možné nepřímo dokázat navyšující se pevnost fúzovaného segmentu L2–3 ve skupině A, B i C. Statisticky významně došlo k nejvyššímu nárůstu ohybové tuhosti u podskupiny B2, která převýšila nativní vzorky páteře, zde je pak nutné poznamenat, že daný nález koresponduje i s mikro-CT vyšetřením. Naopak skupina C2 se hodnotou ohybové tuhosti nejvýše přiblížila ohybové tuhosti nativní páteře, což nepřímo svědčí pro nižší kvalitu proběhlé intervertebrální fúze oproti skupině HBNI s FGF2-stab. V případě skupiny A byl také prokázán nárůst ohybové tuhosti páteře, která nebyla spíše dána kvalitou proběhlé fúze ale spíše tvorbou perivertebrálního kalcifikujícího fibrosního infiltrátu, který byl i prokázán na Mikro-Ct vyšetření.

4. 4 Mikro – CT

Mikro-CT vyšetření bylo provedeno u všech testovaných podskupin (**A1**, $n=6$; **A2**, $n=6$; **B1**, $n=6$; **B2**, $n=6$, **C1**, $n=6$, **C2**; $n=6$), ze skupiny N bylo mikro-CT provedeno u 2 vzorků páteří, kdy jeden ze vzorků byl v nativním stavu (Obr. 39) a druhý vzorek byl po excizi meziobratlové ploténky a intervertebrální prostor byl vyplněn HBNI (Obr. 40). Testované páteře ze skupiny N sloužili jako referenční vzorky ke skupinám A, B a C.



Obr. 39 – Mikro-CT zobrazení nativní páteře v segmentu L2–3 (sagitální řez ve střední části páteře). Intervertebrální prostor je vyplněn fyziologickou meziobratlovou ploténkou, která není RTG kontrastní, tento prostor imponuje „jako prázdný“. Zdroj: CEITEC VUT Brno.



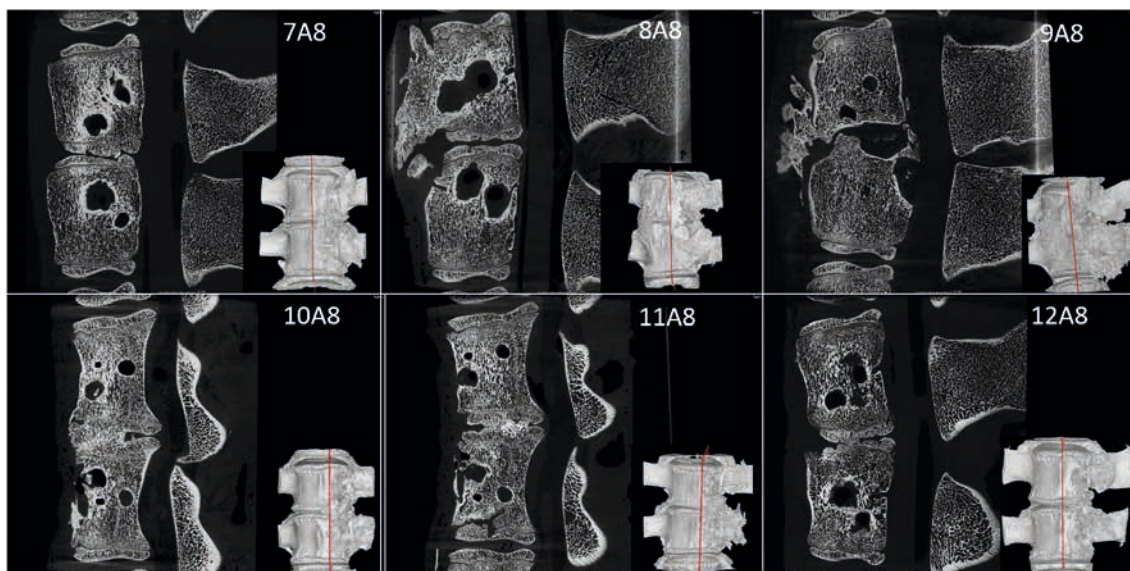
Obr. 40 – Mikro-CT zobrazení segmentu L2–3 nativní páteře (sagitální řez ve střední části páteře). Intervertebrální prostor je po excizi intervertebrálního disku vyplněn testovaným HBNI (označen šipkou), Je zachována pevná hranice mezi HBNI a přilehlými krycími plotnami obratlů. Daný obraz simuluje bezprostřední pooperační stav ve skupině B a C. Zdroj: CEITEC VUT Brno.

Mikro-CT probíhala u všech testovaných podskupin shodně dle protokolu popsáno v kapitole materiál a metodika. Vyhodnocení CT obrazů pak probíhalo u všech vzorků v sagitální rovině, na základě řezu, který probíhal ve střední části obratlového těla a spinosního procesu.¹⁶³

4. 4. 1 Vyhodnocení skupiny A

Podskupina A1

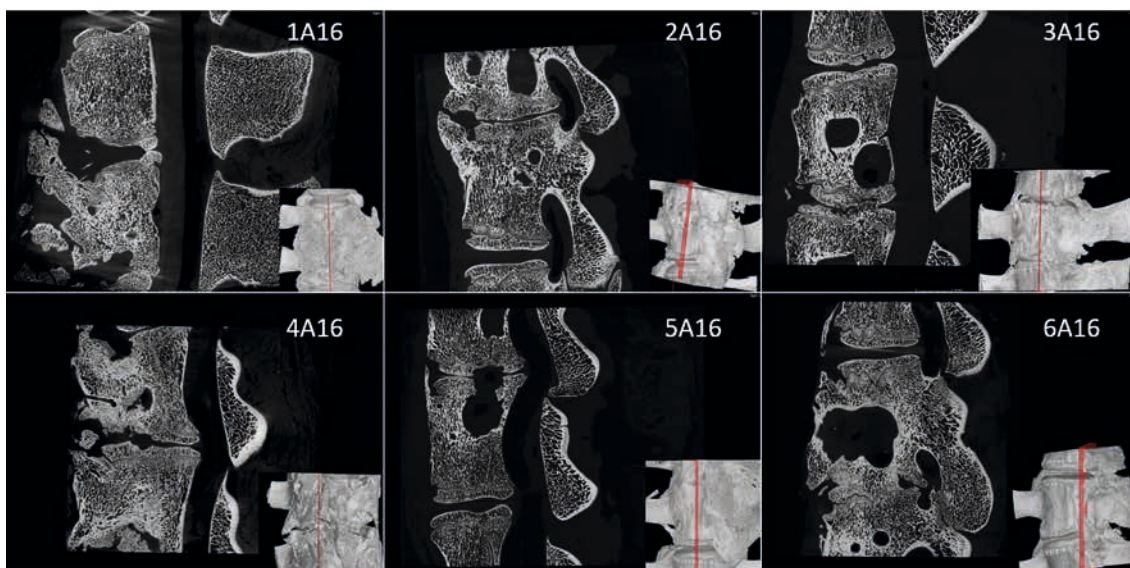
Na základě získaných mikro-CT vyobrazení po 8 týdnech od implantace kortikospongiosního štěpu byla úplná fúze (stupeň 1) zaznamenána ve 3 případech. V jednom případě bylo dosaženo částečné fúze (stupeň 2), v 1 případě byl zaznamenán unipolární pakloub a v 1 případě pak bipolární pakloub, viz Obr. 41. U všech zkoumaných vorků byl v CT obraze přítomná rentgenkontrastní rezistence v oblasti L2–3 páteře, který odpovídala makroskopicky objektivizované fibrózní reakci.



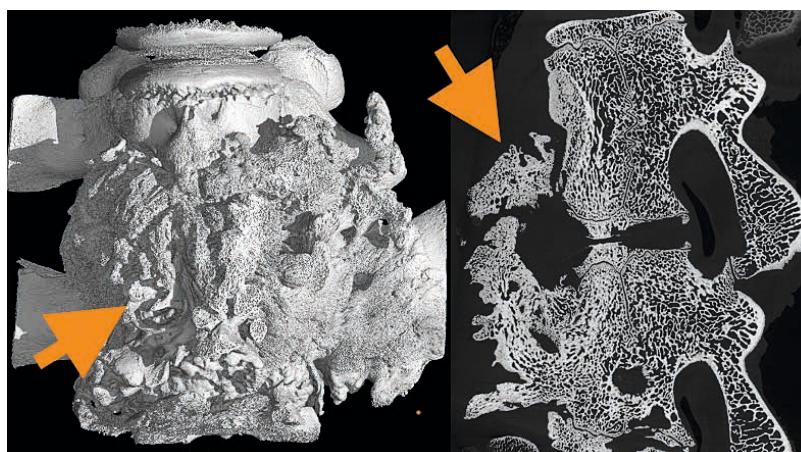
Obr. 41 – Skupina A1 (n=6), sagitální mikro-CT řezy střední části 6 vzorků úseku L2–3 prasečích páteří (rovina řezu je zaznamenána červenou linkou na 3D rekonstrukci modelu páteře a je vedena její střední částí). Zdroj: CEITEC VUT Brno.

Podskupina A2

Po 16 týdnech od implantace kortikospongiosního štěpu byla nalezena úplná fúze (stupeň 1) v 1 případě. Ve třech případech bylo dosaženo částečné fúze (stupeň 2), ve 2 případech byl zaznamenán unipolární pakloub, viz Obr. 42. U všech zkoumaných vzorků byla v CT obraze přítomná rentgen kontrastní rezistence odpovídající makroskopicky popisované fibrosní reakci (Obr. 43), ta byla výrazněji vyjádřená než v podskupině A1.



Obr. 42 – Skupina A2 (n=6), sagitální mikro-CT řezy střední části 6 vzorků úseku L2–3 prasečích páteří (rovina řezu je zaznamenána červenou linkou na 3D rekonstrukci modelu páteře a je vedena její střední částí). Zdroj: CEITEC VUT Brno.

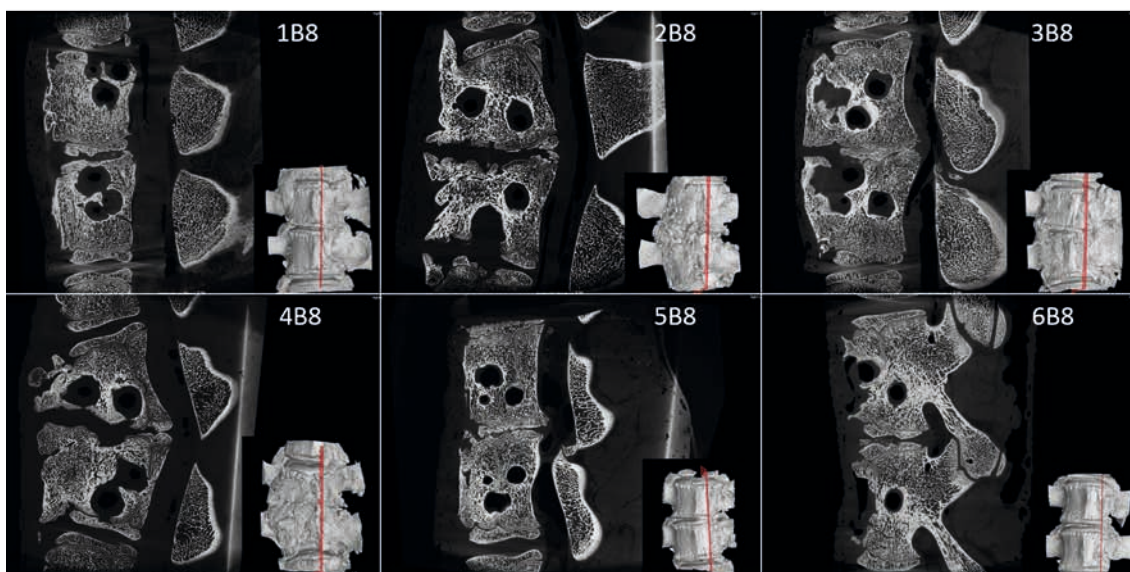


Obr. 43 – Mikro-CT obraz RTG kontrastní rezistence přítomné perivertebrálně v obl. operovaného L2–3 segmentu páteře (označeno šipkou), odpovídající makroskopicky popisované fibrózní reakci. Zdroj: CEITEC VUT Brno.

4. 4. 2 Vyhodnocení skupiny B

Podskupina B1

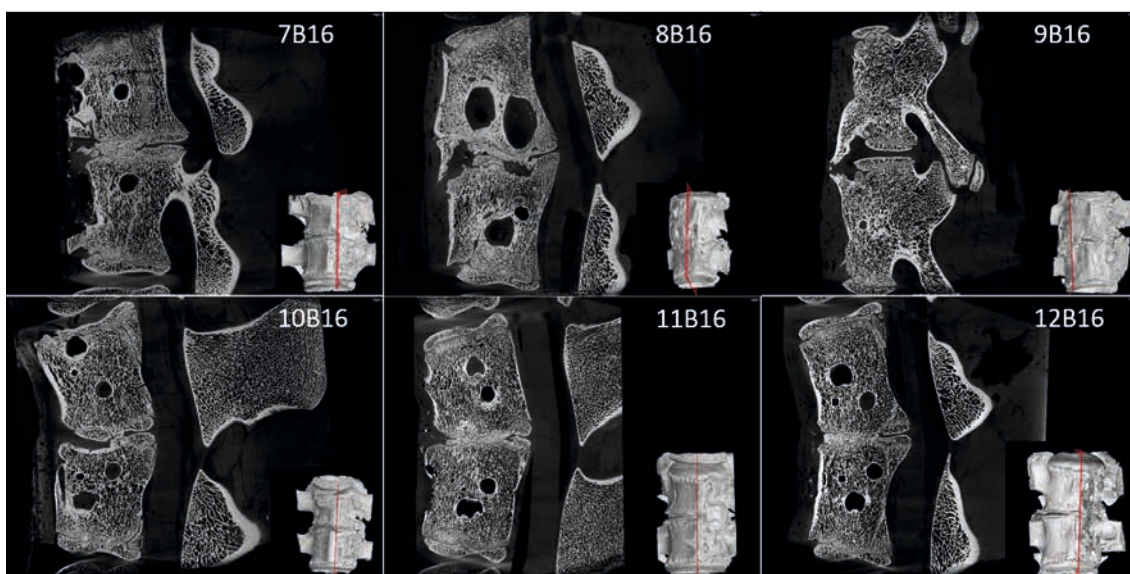
Po 8 týdnech od implantace HBNI s FGF2-stab je patrný horší souhrně výsledek než ve skupině A1. Kompletní fúze proběhla ve 2 případech, inkompletní fúze také ve 2 vzorcích, bipolární a unipolární pakloby pak byl přítomen ve dvou dalších preparátech. Podrobné zobrazení uvádí Obr. 44.



Obr. 44 – Skupina B1 ($n=6$), sagitální mikro-CT řezy střední části 6 vzorků úseku L2–3 prasečích páteří (rovina řezu je zaznamenána červenou linkou na 3D rekonstrukci modelu páteře a je vedena její střední částí). Zdroj: CEITEC VUT Brno.

Podskupina B2

Po 16 týdnech od implantace HBNI s FGF2-stab. byla nalezena úplná fúze (stupeň 1) v 5 případech. V jednom případě bylo dosaženo částečné fúze (stupeň 2), viz Obr. 45. U žádného ze zkoumaných vzorků nebyla v CT obraze přítomná rentgenkontrastní rezistence perivertebrálně, která byla zaznamenána ve skupině A. Podle nálezu na mikro-CT je možné konstatovat, že HBNI s FGF2-stab oproti skupině A2 navodil intervertebrální fúzi požadovaným způsobem. Rozdíl mezi skupinami A2 a B2 byl staticky významný ($p<0,05$).

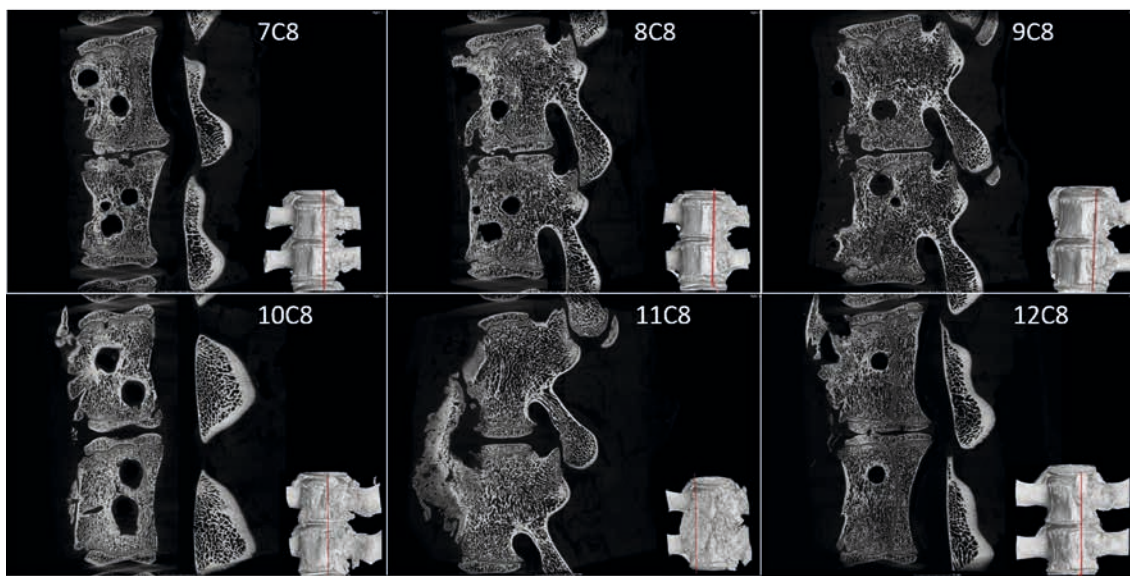


Obr. 45 – Skupina B2 ($n=6$), sagitální mikro-CT řezy střední části 6 vzorků úseku L2–3 prasečích páteří (rovina řezu je zaznamenána červenou linkou na 3D rekonstrukci modelu páteře a je vedena její střední částí). Zdroj: CEITEC VUT Brno.

4. 4. 3 Vyhodnocení skupiny C

Podskupina C1

Na základě vyhodnocení mikro-CT nálezů po 8 týdnech od implantace HBNI s bio-PolyP byla zjištěna úplná fúze pouze v 1 případě. Inkompletní fúze pak byla prokázána v případech dvou, stejně tak unipolární pakloub byl prokázán ve 2 vzorcích a bipolární pakloub v 1 případě. CT scan uvádí Obr. 46. Perispinální kalcifikace nebyly na mikro-CT prokázány.

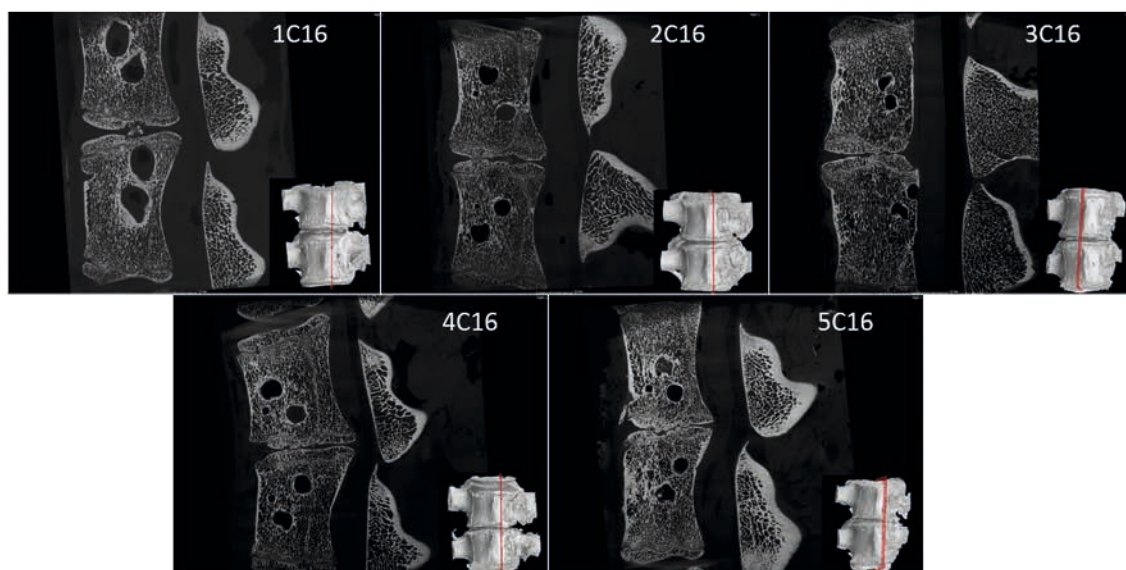


Obr. 46 – Skupina C1 (n=6), sagitální mikro-CT řezy střední části 6 vzorků úseku L2–3 prasečích páteří (rovina řezu je zaznamenána červenou linkou na 3D rekonstrukci modelu páteře a je vedena její střední částí). Zdroj: CEITEC VUT Brno.

Podskupina C2

V podskupině C2 bylo fakticky provedeno vyšetření celkem 6 vzorků páteří, na Obr. 47 jich je zobrazeno pouze 5, na konci experimentu došlo k poruše datového úložiště a data vzorku 6C16 byla nenávratně zničena. Vyhodnocení proběhlo dříve a tedy nález na vzorku 6C16 byl hodnocen jako inkompletní fúze, ta byla ve skupině C2 pozorována celkem u 2 vzorků. U zbylých 4 páteří pak byla zaznamenána kompletní fúze v CT obraze. Ve skupině C byla prokázána progresa intervertebrální fúze po 16 týdnech a nastala plně nebo z části. Opět nebyla na mikro-CT patrná perivertebrální kalcifikace, které byla pozorována u skupiny A.

Přehledné srovnání nálezů na mikro-CT mezi jednotlivými skupinami uvádí Tab. 8.



Obr. 47- Skupina C2 (n=6), na obr. vyobrazeno pouze 5 vzorků, ale fakticky hodnoceno vzorků 6. Jsou zobrazeny mikro-CT řezy střední části 5 vzorků úseku L2–3 prasečích páteří (rovina řezu je zaznamenána červenou linkou na 3D rekonstrukci modelu páteře a je vedena její střední částí). Zdroj: CEITEC VUT Brno.

Stupeň fúze	Srovnání po 8 týdnech Podskupiny				Srovnání po 16 týdnech Podskupiny			
	A1 (n=6)	B1 (n=6)	C1 (n=6)	p1	A2 (n=6)	B2 (n=6)	C2 (n=6)	p1
I	3	2	1	0,737	1	5	4	0,023*
II	1	2	2		3	1	2	
III	1	1	2		2	0	0	
IV	1	1	1		0	0	0	

Tab. 8 – Shrnutí dosaženého stupně intervertebrální fúze po 8 a 16 týdnech, dle jednotlivých podskupin. Výsledky fúze mezi podskupinami A1, B1, C1 se statisticky významně nelišily ($p=0,737$), zatímco rozdíl dosažené meziobratlové fúze v podskupině A a podskupinách B a C byly statisticky významné ($p=0,023$). Statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami byl testován Mann-Whitney U-testem.

4. 4. 4 Závěr

Nálezy na mikro-CT potvrdily autoptický nález perispinálního fibrokalcinosního infiltrátu, který korespondoval s nedostatečnou progresí intervertebrální fúze ve skupině s použitým trikortikálním štěpem. Použití štěpu v čase vedlo spíše k rozvoji inkompletní fúze nebo tvorbě unipolárního pakloubu. Naopak ve skupině B a shodně i skupině C byla potvrzena absence perivertebrální reakce s kalcifikací, což je nepřímým důkazem absence nestability, včetně progresie intervertebrální fúze po 16 týdnech, kdy statisticky významně bylo ve skupině B dosaženo kompletní fúze v 5 z 6 případů a ve skupině C ve 4 z 6 případů

s nulovým výskytem tvorby pakloubu. Jedná se o další z nepřímých důkazů, že nově vyvinutý HBNI je schopen tvorby intervertebrální fúze.

4.5 Histologie

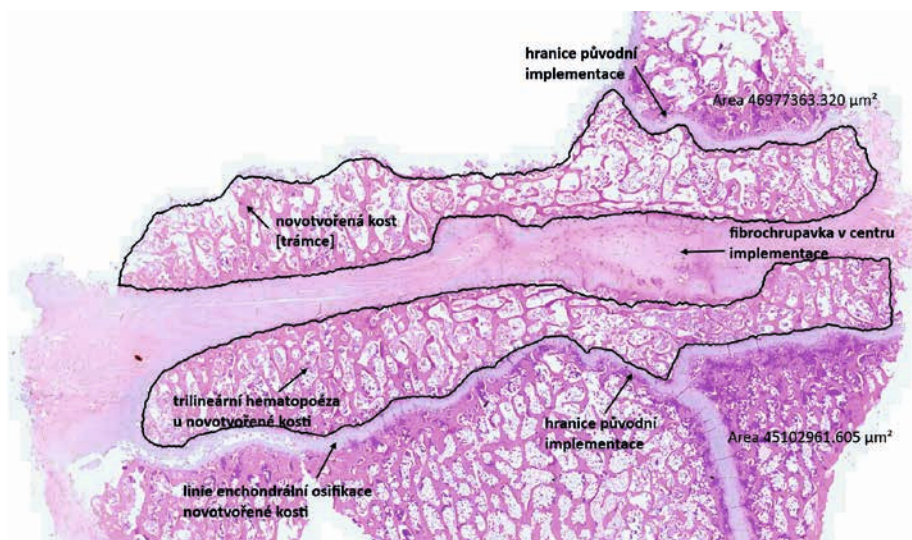
Histologické vyšetření bylo provedeno u všech testovaných podskupin (**A1**, $n=2$; **A2**, $n=2$; **B1**, $n=2$; **B2**, $n=2$; **C1**, $n=2$, **C2**; $n=2$), ze skupiny N nebyl žádný vzorek mikroskopicky hodnocen, protože histologický obraz meziobratlového prostoru, respektive struktury intervertebrálního disku je znám a nebylo nutné jej získat.

Všechny vzorky byly nejprve vyšetřeny mikroskopicky na světelném mikroskopu Olympus BX45 při nejmenším lupovém zvětšení 20x (okulár 10x, objektiv PlanApo 2x/0,08) a následně byly skenovány plan-apochromátovým objektivem o zvětšení 20x/0,8 M27.

4.5.1 Mikroskopické zhodnocení

Skupina A

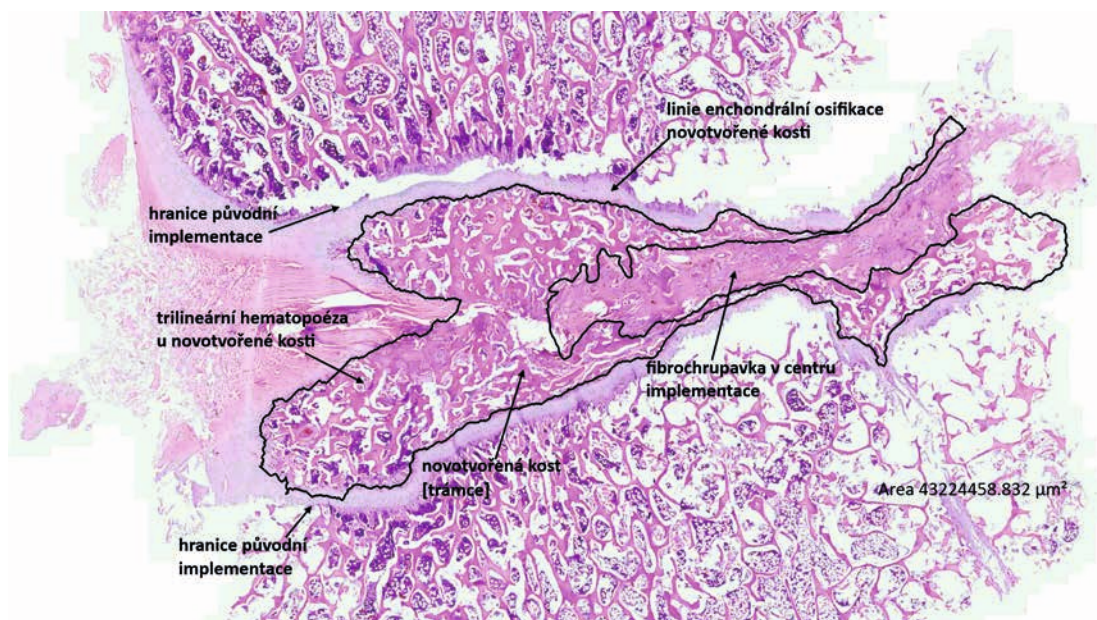
V mikroskopickém obraze v podskupině A1 byly v místě defektu přítomny kostní trámce a Haversovy systémy, které odpovídaly implantovanému kostnímu štěpu, který v centrální části podléhal fibrózní přestavbě. Hojivý proces byl tvořen z periferních oblastí osifikace. V podskupině A2 pak byl přítomný obdobný hojivý proces, který byl tvořen z periferních oblastí osifikace, avšak centrálně byla přítomná výrazná fibrózní přestavba kostního štěpu, která jej zaujímal minimálně z poloviny jeho šíře a plocha kostní novotvorby ve skupině A2 byla o 50% menší než ve skupině A1, viz Obr 48.



Obr. 48 – Histologický řez vzorkem A1 v místě implantovaného kostního štěpu. Kranálně je zobrazen zbytek struktury obratle L2, kaudálně pak struktura obratle L3 (v obrázku je hranice kranálně i kaudálně vyznačena šipkou, mezi nimi je místo původní implantace). V prostoru mezi místy původní implantace je zobrazena novotvořená kostní hmota s centrálně uloženou fibrochrupavkou, implantovaný kostní štěp není zachycen. Zdroj: Ústav patologie, FN Brno.

Skupina B

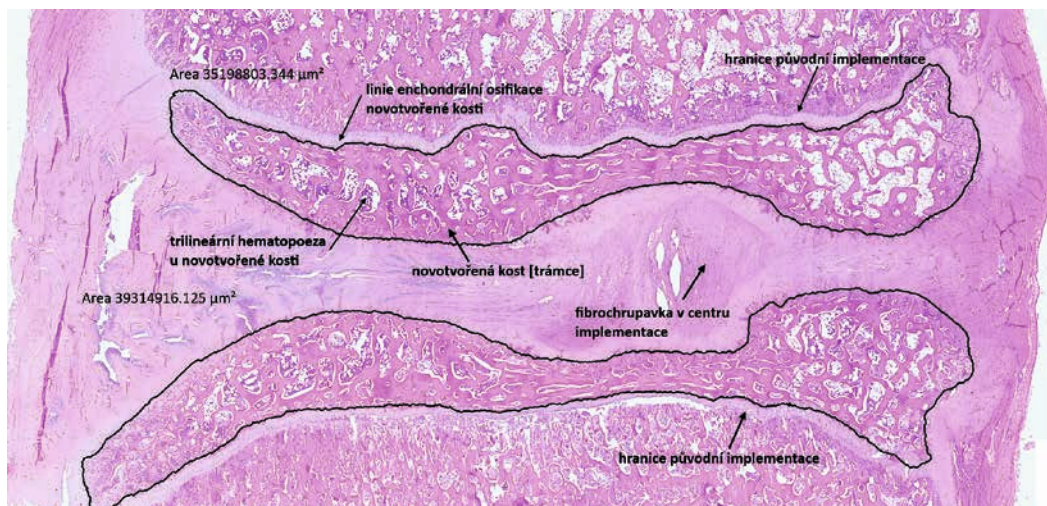
Ve skupině B1 i B2 byl v hodnocených preparátech objektivizován hojivý proces, který se stával z periferních oblastí osifikace a centrální oblasti fibrochrupavky. Implantovaný HBNI nebyl v žádném hodnoceném vzorku zachycen. V místě jeho implantace byla centrálně zachycena fibrochrupavka, která byla obklopena novotvořenou kostí. Osteogeneze vznikala osifikací enchondrálního typu, novotvořená kost měla podobu dobře vyvinutých trámců s Haversovými systémy a blandními monojadernými osteocyty. V některých trámcích byly přítomny naznačené cementové linie (známky remodelace). Trámce byly parciálně lemovány vrstvami dobře vyvinutých monojaderných osteoblastů, mnohojaderné osteoklasty nebyly přítomny env signifikantním počtu. Mezi trámci byla ve všech hodnocených případech přítomna normocelulární trilineární hematopoéza s přiměřenými erytrocytárními, granulocytárními i megakaryocytárními liniemi v obvyklém poměru a obvyklých topických lokalizacích (tedy s myeloblasty při povrchu trámců a vyzrávajícimi směrem centrálně intertrabekulárně, naopak s erythrony a megakaryocyty disperzně intertrabekulárně). V centrálních oblastech implementací byla přítomna ložiska fibrochupavky, tedy tkáň s variabilním poměrem vazivové a chrupavčité komponenty. Buňky obou komponent byly morfologicky blandního vzhledu včetně monojaderných lakun chrupavek. Histologický řez je zachycen na Obr. 49. Ve skupině B2 oproti skupině B1 byl patrný nárůst oblasti novotvořené kosti s redukcí oblasti fibrochrupavky.



Obr. 49 – Histologický řez vzorkem B1 v místě implantovaného HBNI. Kraniálně je zobrazen zbytek struktury obratle L2, kaudálně pak struktura obratle L3 (místo původní implementace je na obrázku zachyceno v prostoru mezi kraniálně i kaudálně vyznačenou šipkou). V místě původní implementace je zobrazena novotvořená kostní hmota s přítomnou fibrochrupavkou v centrální části a zaujímá menší plochu než novotvořená kost. Implantovaný HBNI nebyl ve vzorku objektivizován. Zdroj: Ústav patologie, FN Brno.

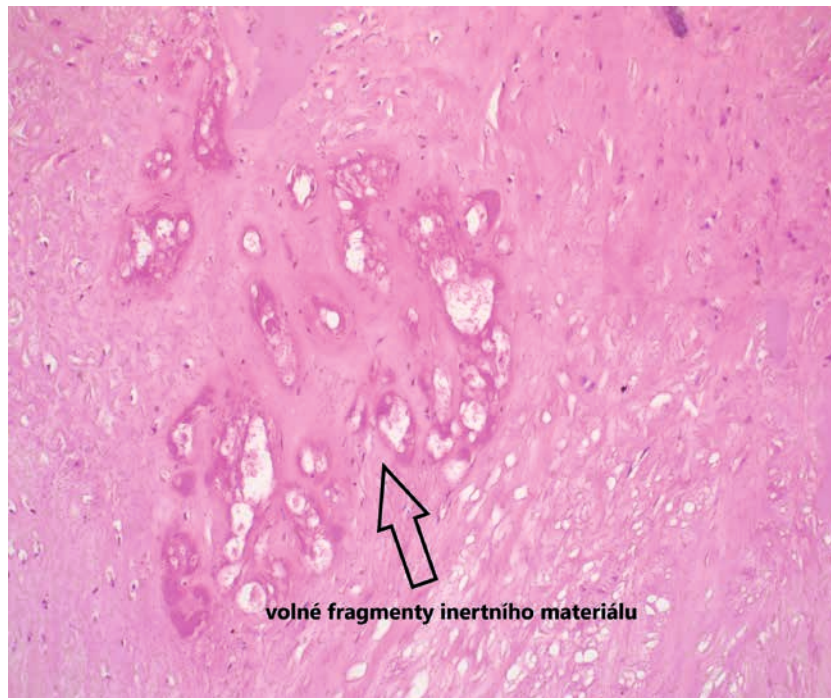
Skupina C

Předpokládané centrum implantovaného HBNI tvořil okrsek fibrochrupky, v jejímž okolí byla zachycená novotvořená kost, která v čase zvyšovala svoji plochu. Osteogeneze vznikala shodně jako ve skupině B osifikací enchondrálního typu. Novotvořená kost měla podobu dobře vyvinutých trámců s Haversovými systémy a blandními monojadernými osteocyty. Histologický řez je zachycen na Obr. 50.

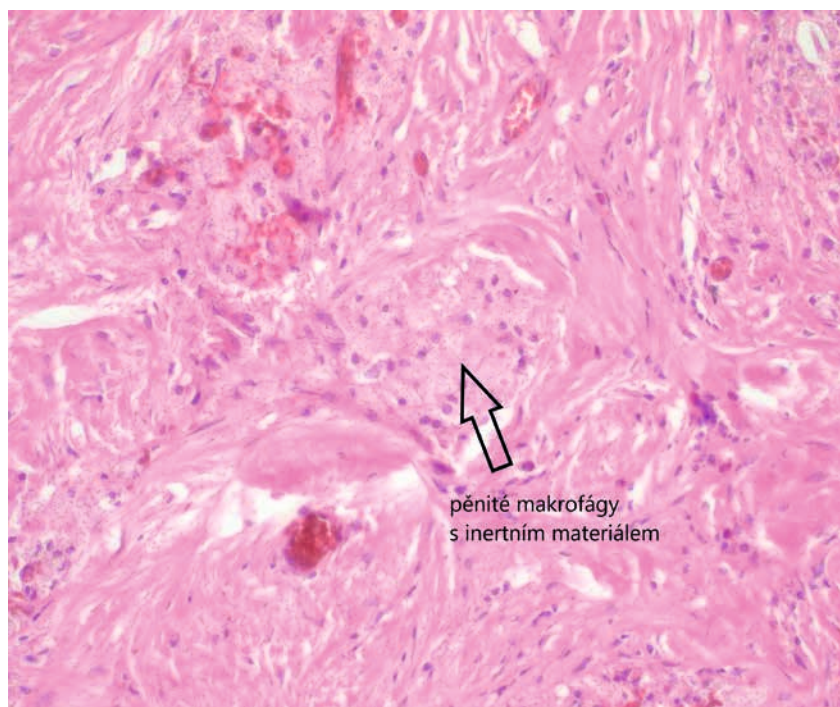


Obr. 50 – Histologický řez vzorkem C1 v místě implantovaného HBNI. Kraniálně je zobrazena struktura obratle L2, kaudálně pak struktura obratle L3 (v obrázku je hranice vyznačena šipkou = místo původní implantace). V prostoru mezi místy původní implantace je zobrazena novotvořená kostní hmota s centrálně uloženou fibrochrupavkou. Zdroj: Ústav patologie, FN Brno.

Histologický obraz skupiny C byl totožný se skupinou B. V místě implantovaného HBNI bylo patrné reziduum implantátu na 1 vzorku ze skupiny C1 v podobě volných intersticiálních elementů amorfního materiálu (Obr. 51), dále v obl. 1 vzorku ze skupiny C2 bylo toto reziduum patrné v podobě pěnících makrofágů s amorfním materiálem fagocytovaným v cytoplasmě (Obr. 52).



Obr. 51 – Histologický vzorek ze skupiny C1. Na snímku je zobrazen detail výřezu centrální části původně implantovaného HBNI, kde jsou zachyceny volné fragmenty inertního materiálu. Zdroj: Ústav patologie, FN Brno.

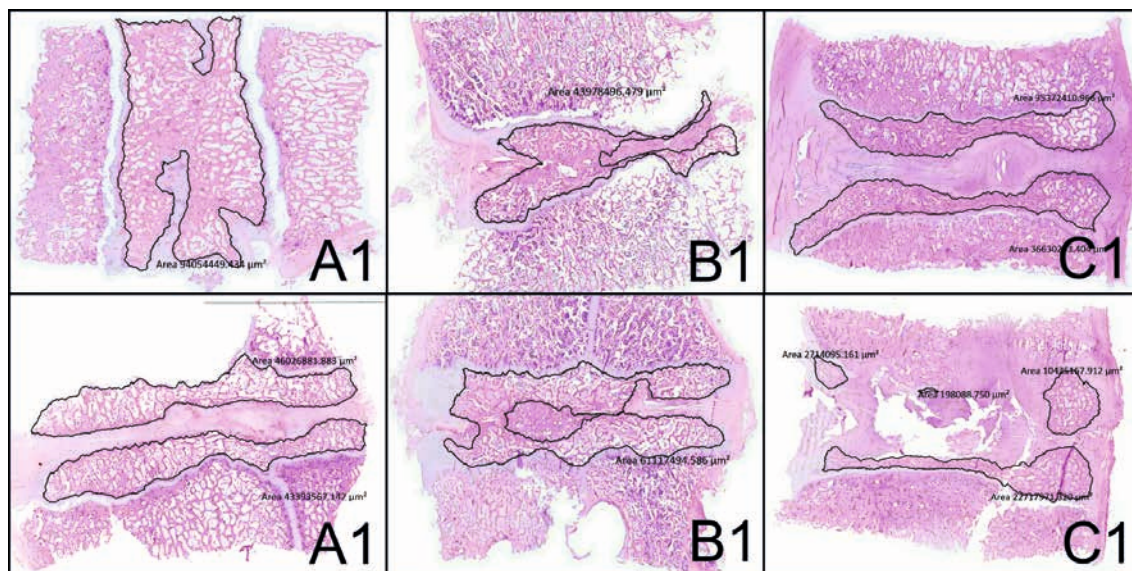


Obr. 52 – Histologický vzorek ze skupiny C2. Na snímku je zobrazen detail výřezu centrální části původně implantovaného HBNI, který je ještě patrný v podobě pěnitých makrofágů s inertním materiálem. Zdroj: Ústav patologie, FN Brno.

4. 5. 2 Vyhodnocení plochy novotvořené kosti

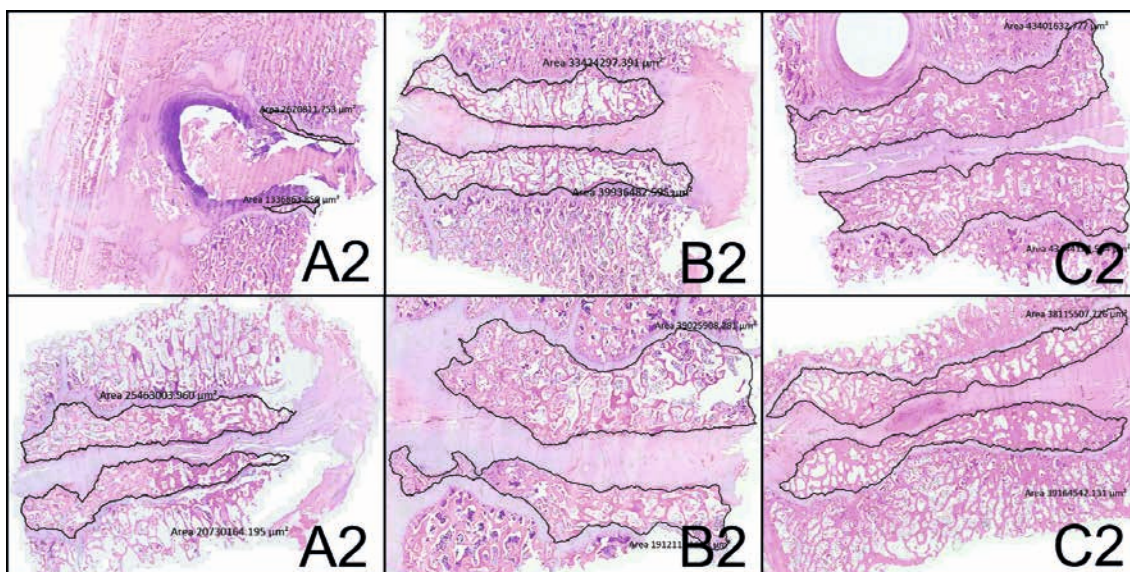
Po vyhodnocení patologem, byla skla s obarvenými tkáňovými řezy digitalizována pomocí skeneru Axio Scan.Z1. Preparáty byly skenovány plan-apochromátovým objektivem o zvětšení 20x/0,8 M27. Pomocí grafického vyhodnocení, které nám umožňuje software ZEN 2.6 byla označena a vypočtena plocha novotvořené kosti v μm^2 , které pro přehlednost byly následně převedeny na mm^2 . Scany jednotlivých podskupin se zobrazením plochy novotvořené kosti pro jednotlivé skupiny A, B i C uvádí Obr. 53 a 54.

Vypočtená plocha novotvořené kosti je ve skupině hodnocených vzorků po 8 týdnech nejvyšší ve skupině A1 (průměrná hodnota $94,2 \text{ mm}^2$), což může i odpovídat implantovanému kostnímu štěpu, ve skupině B1 (průměrná hodnota $52,5 \text{ mm}^2$) a C1 (průměrná hodnota $53,9 \text{ mm}^2$) je tato naměřená plocha menší, avšak odpovídá pouze novotvořené kosti neb intervertebrální prostor byl vyplněn pouze HBNI, tím je nepřímo prokázána i osteokonduktivní a osteoinduktivní schopnost těchto implantátů. Naopak ve skupině vzorků hodnocených po 16 týdnech je nejmenší průměrná hodnota novotvořené kosti zaznamenána ve skupině A2 ($46,2 \text{ mm}^2$), kdy i na základě mikroskopického zhodnocení byla prokázána fibrózní přestavba kostního štěpu. Ve skupině B2 průměrná plocha novotvořené kosti tvořila $65,4 \text{ mm}^2$, a ve skupině C2 pak $82,4 \text{ mm}^2$. Podrobné výsledky pro jednotlivé vzorky uvádí Tab. 9.



Obr. 53 – Histologické obrazy zástupců z jednotlivých podskupin A1–C1 s označenou a změřenou plochou novotvorby kostěnné tkáně. Plocha novotvorby kosti je vždy uvedena celkově pro daný preparát v μm^2 .

Zdroj: Ústav patologie, FN Brno.



Obr. 54 Histologické obrazy zástupců z jednotlivých podskupin A2-C2 s označenou a změřenou plochou novotvorby kostěnné tkáně. Plocha novotvorby kosti je vždy uvedena celkově pro daný preparát v μm^2 .
Zdroj: Ústav patologie, FN Brno.

Na základě histologického vyšetření je možné konstatovat, že v časovém průběhu implantovaný HBNI s FGF2-stab i bio-PolyP indukují kostní novotvorbu a tím podporují progresi intervertebrální fúze a oproti kostnímu štěpu vykazují v mikroskopickém obraze schopnosti pozitivního ovlivnění a progresu intervertebrální fúze.

	Srovnání po 8 týdnech Podskupiny			Srovnání po 16 týdnech Podskupiny		
	A1 (n=2)	B1 (n=2)	C1 (n=2)	A2 (n=6)	B2 (n=6)	C2 (n=6)
Plocha novotvořené kosti (mm^2)	97,4	43,5	72,1	44,1	58,3	87,0
	91,0	61,4	35,6	48,1	72,5	77,8

Tab. 9 – Výsledky histomorfologické analýzy. Plocha novotvořené kosti v intervertebrálním prostoru v místě implantovaného kostního štěpu nebo HBNI (Hybridní Biodegradabilní, Nanokompozitní Bioimplantát) byla měřena na 2 vzorcích z každé podskupiny.

4. 5. 3 Závěr

Dle provedeného histologického vyšetření vzorků páteře ve skupině A, B i C byla prokázána novotvorba kosti a enchondrální osifikace. Ve skupině A kostní štěp podléhal resorbci a fibrózní přestavbě, stejně tak novotvorba kostní tkáně se zmenšovala (plocha novotvořené kosti po 16 týdnech experimentu tvořila pouze 50 % naměřené plochy novotvořené kosti po 8 týdnech). Ve skupině B pak HBNI obohacený o FGF2-stab prokázal v histologickém obraze schopnost novotvorby kostní hmoty obdobně jako kostní štěp. Struktura

HBNI byla již po 8 týdnech kompletně resorbována, a tedy nebyla v mikroskopickém obraze přítomna, stejný obraz panoval i ve skupině hodnocené po 16 týdnech. Plocha novotvorby kosti jevila v čase progresivní nárůst. Hodnocená skupina C (HBNI obohacený o bio-PolyP) obdobně jako skupina B jevila známky novotvorby kosti v místě implantovaného HBNI. Zbytky jeho struktury byly zaznamenány v mikroskopickém obraze jak po 8, tak po 16 týdnech experimentu. Zaznamenaná plocha vytvořené kosti po 16 týdnech experimentu byla celkově největší ve srovnání se skupinou A a B, a také svou plochou vytvořené kosti se v 16 týdnech experimentu oproti výsledku v 8 týdnech prakticky zdvojnásobila.

5 DISKUSE

Metoda lumbální intervertebrální dýzy je v humánní medicíně využívána k léčbě spinálních patologií vznikajících na podkladě degenerativních onemocnění páteře, úrazů, infekcí, neoplastických procesů a dalších.⁵² Jako první byl v oborové literatuře tento způsob léčby publikován Clowardem v roce 1953 a v současné době je tato metoda označována jako PLIF.²⁴ Jím popsána metoda posterolaterální intervertebrální dýzy představovala alternativu k technice prosté posterolaterální dýzy v oblasti bederní páteře. Od té byla metoda PLIF modifikována v podobě různých přístupů k lumbálnímu meziobratlovému prostoru v podobě TLIF, ALIF, OLIF, XLIF nebo LLIF.⁵² Společným jmenovatelem všech výše uvedených metod je užití agens, které je induktorem a nositelem spinální fúze. Za zlatý standard užívaný pro meziobratlovou fúzi je považován autologní kostní štěp. Jeho odběr je zatížen vysokou morbiditou v místě odběru a možnostmi popisovaných paklobů po jeho užití se pohybuje mezi 5–43 %.¹⁶⁹ Výše uvedený fakt vedl spinální chirurgy k rozvoji lepších instrumentárií pro meziobratlovou fixaci, stejně tak došlo k vývoji titanových, PEEKových nebo kombinovaných intervertebrálních klecí. Navzdory výše popsaným moderním technikám jsou v operované populaci pacientů s intervertebrální fúzí zastoupeny symptomatické pakloby v 10–15 %.^{101, 170, 171} Na základě výše uvedeného faktu dochází v operované populaci k nedobrym klinickým výsledkům v podobě chronických bolestí a další progrese degenerativních změn v místě provedené operace s následnými ekonomickými dopady na zdravotní systém.¹⁷² Tento problém vedl řadu vědeckých skupin k vývoji alternativ, které by měly stimulovat proces intervertebrální fúze. Námí popsaný přístup navrhuje jednu z takových možných alternativ. Navržený HBNI má třídimenzionální strukturu, jejíž kostru tvoří biokeramický materiál složený z hydroxyapatitu a trikalciumfosfátu, kterým je tvořena jeho pevná konstrukce. Ta má krom nosné funkce i schopnost osteokondukce, podporuje migraci a proliferaci osteoblastů.¹⁷³ Použitá biokeramika prokázala svoji ideální porozitu, která byla zachycena a prokázána pomocí SEM a v práci je uvedena na Obr. 8 a 9. Velikost naměřených pórů se pohybovala v rozmezí mezi 200–1200 μm , která je optimální pro vcestování progenitorových a mesenchymálních buněk, u kterých v případě přítomnosti indukčních faktorů dochází k jejich osteogenní diferenciaci.¹⁷⁴ Nejen z pohledu spektrální mikroskopie ale i v histologickém obraze bylo potvrzeno, že použitý materiál je porézní a bioabsorbabilní. V případě skupiny B (HBNI + FGF2-stab) došlo k resobci implantátu již po 8 týdnech experimentu, neboť struktura HBNI nebyla zaznamenána v mikro-CT obraze, ani histologicky. U skupiny C (HBNI + bioPolyP) se na porozitě implantátu po navázání polyfosfátu nic nezměnilo, ale

došlo k jeho zpomalené resorbci oproti skupině B, neboť v mikroskopickém obraze ještě přetrvávaly zbytky bioimplantátu po 8 týdnech experimentu a po 16 týdnech byly přítomné pěníte makrofágy, ve kterých byla patrná přítomnost zbytků bioimplantátu. U směsi HA/TCP je literaturou udávaná histologicky dokumentovaná resorbce implantátu po 8 týdnech od implantace.^{175, 176} Naopak obohacení biokeramiky o bioPolyP vede ke změně metabolismu kostní tkáně ve prospěch osteoindukce a tím došlo ke zpomalení aktivity makrofágů, které se podílejí na resorbci použité biokeramiky.¹⁷⁷ Výše uvedený efekt bioPolyP byl v naší práci nepřímo také potvrzen.

Obohacení HBNI o oxycelulózu a kolagen typu 1 podporuje biomimetický proces, který imituje biochemické a biofyzikální vlastnosti kostní matrix, která tak vykazuje osteokonduktivní vlastnosti.¹⁷⁸ Takto připravený kombinovaný biokeramický nosič díky obohacení o FGF2-stab (skupina B) všeobecně stimuluje buněčnou proliferaci, migraci a diferenciaci.¹⁷⁹ Dále vykazuje regulativní schopnosti proliferace osteogenních buněk, kterými jsou osteoblasty a stromální dřevňové buňky, které se podílejí na vyzrávání kostní tkáně a také podporují angiogenezi.^{180, 181} Jako druhý námi zkoušený, v základu totožný biokeramický nosič, byl obohacen o biogenní polyfosfát, který působí jako stimulační agens mineralizace kostní tkáně díky zvýšené genové expresi pro osteokalcin, kostní sialoprotein a tkáňově nespécifickou alkalickou fosfatázu, které hrají kruciální roli při novotvorbě kostěnné tkáně.¹⁸²⁻¹⁸⁴ Takto připravený bioimplantát ve dvou popsáných modifikacích byl v našem experimentu nejprve testován na potenciální toxicitu. K danému testu byly standardně využity in vitro testy, které probíhaly 35 dní. Biokeramika (HA/TCP) prokázala velmi dobrou buněčnou adhezi, taktéž byla-li obohacena o kolagen a oxycelulózu nebo bioPolyP se buněčná adheze nezměnila. V případě modifikace o FGF2-stab došlo ke shlukování buněk, což je průkaz schopnosti horší buněčné adheze než u výše uvedených skupin. Vliv FGF2-stab na horší buněčnou adhezi na keramický nosič in vitro popsal Yun et al. a shodně s naší zkušeností potvrdil, že efekt FGF2 in vitro neodpovídá jeho schopnosti osteokonduce in vivo.¹⁷⁹ Na základě daného faktu navzdory mírně horší buněčné adhezi navrženého HBNI obohaceného o FGF2-stab jsme jej vybrali do in vivo experimentu, ve kterém se podařilo prokázat jeho synergistický efekt na novotvorbu kostěnné tkáně jak na mikro-CT tak v histologickém obraze v porovnání s kostním štěpem nebo bioPolyP. Nepřímou in vitro známkou schopnosti osteoindukce FGF-2 stab byla pozdní osteogenní diferenciace, která u bioPolyP nebyla prokázána. Podobné výsledky reportoval i ve své dentální studii Wu et al.¹⁸⁵ Na základě výše uvedeného je možné konstatovat, že náš nově vyvinutý HBNI reprezentuje scaffold 3. generace a jedná se o bioimplantát, který svým chemickým složením

imituje extracelulární kostní matrix, která v sobě nese nesporné osteokonduktivní vlastnosti, podobně jako kostní štěp.¹⁸⁶ Po ukončení vývoje a in vitro testování HBNI ve 2 modifikacích bylo přistoupeno k ověření jeho potenciálu provedení intervertebrální fúze v in vivo testech. Model experimentálního zvířete prezentovaného hybridem bílého ušlechtilého prasete a landrase byl vybrán na základě faktu, že dané plemeno není zatíženo zvýšenou nemocností a není finančně náročné z pohledu zajištění pooperační péče a jeho reprodukční cyklus je krátký. Taktéž velikost páteře dospělého prasete odpovídá velikosti páteře dospělého člověka.¹⁸⁷ Díky tomu zvolený zvířecí model umožnil provedení obdobného operačního zákroku LLIF, tak jak je v humánní medicíně obvyklé.¹⁸⁸ Místo pro provedení intervertebrální fúze v segmentu L2/3 bylo zvoleno na základě dobré chirurgické dostupnosti, a také kvůli minimálnímu riziku vzniku komplikací, které by hrozily v případě ošetření krční nebo bederní páteře. Taktéž velikost intervertebrálního disku u 40–50 kg zvířete odpovídala velikosti meziobratlové ploténky dospělého člověka.¹⁸⁹ Nově vyvinutý HBNI v porovnání s kostním štěpem vykazoval mírně gracilnější strukturu, která by se dala zvýšit úpravou biokeramické části, avšak za zhoršení osteokonduktivních vlastností implantátu. Podobně jako u kostního štěpu bylo nutné HBNI pomocně fixovat celý segment páteře přídatným osteosyntetickým materiálem. Daný fakt v našem případě HBNI penalizuje oproti tzv. „stand alone“ klecím, u kterých není nutné aplikovanou klec doplnit o přídatnou osteosyntetickou montáž.¹⁹⁰ Ve skupině A, kde byl použit kostní štěp jako fúzovací agens, bylo makroskopicky, mikro-CT prokázáno, že struktura štěpu v čase podléhá degradaci s neadekvátní kostěnou fúzí. Daný fakt byl i v naší studii histologicky prokázán, kdy ve skupině A2 oproti A1 došlo k úbytku novotvořené kosti a nárůstu vazivové tkáně. K podobným výsledkům dospěl i Boden et al., který histologicky hodnotil efekt autologního kostního štěpu u intertransversární lumbální fúze, kde byla patrná degradace kostního štěpu s náhradou vazivovou chrupavkou a enchondrální osifikací.¹⁹¹ Vzhledem k resorbci a fibrózní degeneraci kostního štěpu vznikala v operovaném segmentu nestabilita, která byla kompenzována fibrózní perivertebrální reakcí, jež vedla k nepřímému znehybnění operovaného segmentu po 16 týdnech experimentu, kdy biomechanicky vykazoval operovaný segment páteře lehce nižší hodnoty ohybové tuhosti v extenzi než nativní páteř. Naopak použitý HBNI s FGF2-stab makroskopicky oproti kostnímu štěpu jevil známky probíhající kostní fúze, která se projevila absencí perivertebrální fibrózní reakce a byl zároveň přítomen lokalizovaný kostěný přerůst okolo implantovaného osteosyntetického materiálu. Dle mikro-CT byl HBNI s FGF2-stab kompletně resorbovaný po 8 týdnech, histologicky pak v místě, kde byl implantován HBNI, byla po 8 i 16 týdnech experimentu potvrzená narůstající kostní novotvorba s enchondrální

osifikací a snižujícím se podílem fibrochrupavky. Jednalo se nejspíše o synergistický efekt HBNI a FGF2-stab. Bioimplantát je dominantně tvořen β -TCP, který je v řádu týdnů biodegradabilní, a při jeho odbourání dochází k uvolnění kalciových iontů a zvýšení aktivity alkalické fosfatázy osteoblastů a tím nepřímo podporuje novotvorbu kostěnné tkáně,^{192, 193} v kombinaci s FGF-2 stab je podpořena angiogeneze a angioinvasze společně s regulací nárůstu populace osteoblastů.^{180, 181} Obohacení HBNI o FGF2-stab oproti bioPolyP nezpomalovalo odbourávání biokeramiky a zároveň novotvořená kost v místě provedené intervertebrální fúze vytvořila natolik pevné spojení obratlů L2–3, které převýšilo nativní vzorek páteře a dokonce i skupinu s použitým kostním štěpem i bioPolyP. Na základě výše uvedených faktů si dovoluujeme konstatovat, že byl prokázán synergistický efekt FGF2 na tvorbu intervertebrální fúze. U HBNI s bioPolyP byla zpomalená resorbce biokeramiky, ovšem přítomný bioPolyP prokázal větší efekt na novotvorbu kostní tkáně v místě implantace, která byla potvrzena histologicky (největší plocha novotvořené kosti v mikroskopickém obraze), avšak při biomechanickém testování vzorky páteří vykazovaly obdobnou ohybovou tuhost v extenzi, jako nativní páteř. Dle mikro-CT pak došlo ke kompletní fúzi ve 4 z 6 případů a inkompletní fúzi ve zbylých dvou případech. Oproti kostnímu štěpu (skupina A) se jedná o statisticky významný rozdíl, a tedy i lepší výsledek. Oproti HBNI s FGF-2 pak tento rozdíl statisticky významný z pohledu mikro CT nebyl. Tento fakt je odrazem působení bioPolyP na osteogenezi jako takovou, avšak zřejmě v důsledku absence podpory angiogeneze se jedná o nižší efekt prohojení sousedících obratlů. Z výše uvedeného vyplývá, že kombinace biokeramiky s oběma výše uvedenými biogenními činiteli je účinná a lze předpokládat, že jejich kombinací by mohl vzniknout ideální produkt a měl by být předmětem dalšího výzkumu, neboť do dnešní doby tato kombinace nebyla v literatuře popsána.

Porovnáme-li naše dosažené výsledky se studii s jinými bioabsorbabilními implantáty, nacházíme následující zjištění. Ve studii prezentované Xu et al., kde zkoumali porézní bioabsorbabilní Mg-Zn klec bez jakýchkoliv aditiv, bylo dosaženo neakceptovatelných výsledků meziobratlové fúze jak na mikro-CT, tak při biomechanickém testování a tento implantát nebyl doporučen k dalšímu testování v humánní medicíně.¹⁹⁴ Obdobně jako v naší studii Abbah et al. prezentoval neuspokojivé výsledky u lumbální intervertebrální fúze při použití kostního štěpu v porovnání BMP-free polycaprolactone/trikalcium fosfátového nosiče, který byl ale schopen vytvořit kostěnou fúzi až po 9 měsících od aplikace. V případě, že porovnáme námi dosažené výsledky HBNI s výše prezentovanou studií, tak u HBNI jsme dosáhli obdobných výsledků jen ve výrazně kratším časovém úseku (za 4 měsíce).¹⁹⁵ Sandhu et al. dosáhli obdobných výsledků v případě, že využili titanový meziobratlový implantát, který

byl vyplněn rhBMP-2 kolagenním kompozitem.¹⁹⁶ Yong et al. publikovali práci, kde byl užit polycaprolactonový nosič obohacený o rhBMP2, na základě kterého došlo ke zvýšení ohybové tuhosti páteře dvojnásobně oproti skupině kostního štěpu nebo scaffoldu bez jeho obohacení o růstový faktor.¹⁹⁷ Jak bylo ale v úvodu zmíněno, užití BMP2 je zatíženo komplikacemi, kterými jsou potenciálně vyšší riziko vzniku nádorového onemocnění, retrogradní ejakulace, osteolýza, vznik seromové formace, radikulitidy, cystické formace nebo ektopická novotvorba kosti.^{128, 129} S ohledem na výše uvedené lze konstatovat, že užití FGF2-stab nebo bioPolyP se z daného úhlu pohledu zdá být bezpečnější, protože u těchto látek nejsou výše uvedené komplikace popisovány.^{138, 139} Přehled dalších experimentálních studií a jejich výsledků, u kterých byla prováděna lumbální meziobratlová fúze na zvířecích modelech pomocí různých biomeatriálů, je zobrazen v Tab. 10.^{43, 121, 189, 198-203}

Tab. 10 – Přehled výsledků vybraných publikací, u kterých byla provedena bederní meziobratlová fúze pomocí různých biomateriálů na zvířecích modelech.

Studie	Zvířecí model (Počet zvířat)	Segment fúze	Implantát	Fixace	Technika fúze	Follow-up	Úspěšnost fúze (CT analýza)
Li et al. 2002	Prase (10)	L3/4, L5/6	Brantigan klec Autogenní BG	Svorky	ALIF	12 týdnů	70%
Li et al. 2004	Prase (10)	L2/3, L4/5, L6/7	Klec – karbonové vlákna β-TCP+PRP	Svorky	ALIF	3 měsíce	100 % – jen paciální fúze
Abbah et al. 2009	Prase (6)	L3/4, L5/6	mPCL–TCP rhBMP-2	Šrouby a tyče	ALIF	3 měsíce 6 měsíců	100 % 100 %
Abbah et al. 2009	Prase (4)	L3/4, L5/6	Autogenní BG	Šrouby a tyče	ALIF	3 měsíce 6 měsíců	Parciální přemostění 50 %
Sherman et al. 2010	Ovce (6)	L3/L4, L4/L5	PEEK klec Autogenní BG	Žádná	ALIF	6 měsíců	87.5%
Sherman et al. 2010	Ovce (6)	L3/L4, L4/L5	PEEK klec ABM/P-15	Žádná	ALIF	6 měsíců	100 %
Abbah et al. 2011	Prase (8)	L2/3, L4/5	mPCL/TCP BMSCs	Šrouby a tyče	ALIF	3 měsíce 6 měsíců	Partial bridging 63%
Tang et al. 2015	Králík (18)	L4/5	POC-M- click-HA	Šrouby a dlahy	ALIF	4 týdny 8 týdnů 12 týdnů	11% 80% 100%
Tang et al. 2015	Králík (18)	L4/5	PLLA-HA	Šrouby a dlahy	ALIF	4 týdny 8 týdnů 12 týdnů	9% 70% 100%
Gu et al. 2011	Ovce (24)	L1/2, L3/4, L5/6	CPC/SF/ rhBMP-2	Žádná	ALIF	6 měsíců 12 měsíců	56% 78%
Gu et al. 2011	Ovce (24)	L1/2, L3/4, L5/6	Autogenní BG	Žádná	ALIF	6 měsíců 12 měsíců	78% 78

Studie	Zvířecí model (Počet zvířat)	Segment fúze	Implantát	Fixace	Technika fúze	Follow-up	Úspěšnost fúze (CT analýza)
McGilvray et al. 2017	Ovce (24)	L2/L3, L4/L5	PTC klec Autogenní BG	Šrouby a tyče	LLIF	8 týdnů 12 týdnů 18 týdnů	BV/TV 74% BV/TV 80% BV/TV 80%
McGilvray et al. 2017	Ovce (24)	L2/L3, L4/L5	PEEK klec Autogenní BG	Šrouby a tyče	LLIF	8 týdnů 12 týdnů 18 týdnů	BV/TV 48% BV/TV 64% BV/TV 80%
McGilvray et al. 2018	Ovce (27)	L2/L3, L4/L5	PSP klec Autogenní BG	Šrouby a tyče	LLIF	8 týdnů 12 týdnů	BV/TV 58% BV/TV 70%
McGilvray et al. 2018	Ovce (27)	L2/L3, L4/L5	PTA klec Autogenní BG	Šrouby a tyče	LLIF	8 týdnů 12 týdnů	BV/TV 90% BV/TV 95%

ALIF – Anterior lumbar interbody fusion (přední bederní meziobratlová fúze)
 β -TCP – Beta-tricalcium fosfát
 BG – Bone graft (kostní štěp)
 BMSCs – Bone marrow stromal cells (Mezenchymální buňky kostní dřene)
 BV/TV – Bone Volume/Total Volume (Objem kosti/Celkový objem)
 CPC/SF/rhBMP-2 – Calcium phosphate cement/silk fibroin/human recombinant bone morphogenetic protein-2 kompozit
 LLIF – Lateral lumbar interbody fusion (laterální bederní meziobratlová fúze)
 mPCL- TCP – Medial grade poly (epsilon-caprolactone) and beta-tricalcium phosphate
 PEEK – Polyetheretherketón
 PLLA-HA poly (L-lactic acid) – Hydroxapatite (kyselina L-polymlečná- hydroxyapatite)
 POC-M-click-HA – Clickable poly (1, 8-octanediol citrates- N-methyl-diethanolamine- hydroxyapatit
 PRP – Platelet-rich plasma (Obohacená krevní plazma)
 PTA – 3D printed porous titanium alloy (Třídídimenzionální vytištěná porézní slitina)
 PTC – PEEK Titanium Composite (kompozit polyetereterketón- titan)
 PSP – Plasma sprayed porous titanium-coated PEEK (polyetereterketon opláštěn titanem a plazmou)
 rhBMP-2 – Recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rekombinantní humání morfogenní protein)

V závěru je nutné vyzdvihnout, že použitý HBNI v modifikaci s FGF2-stab i bioPolyP ve shodě s histologickým nálezem, mikro-CT i biomechanickými testy prokázal schopnost tvorby nové kosti, stejně tak akcelerace intervertebrální dýzy ve srovnání s kostním štěpem. V *in vitro* a následně i v *in vivo* testech HBNI prokázal svoji biokompatibilitu a nevykázal známky cytotoxicity. Resorbabilita byla také potvrzena, jen ve skupině s bioPolyP probíhala pomaleji. Jako nevýhodu implantátu ve srovnání s komerčně užívanými titanovými nebo PEEKovými klecemi považujeme jeho nižší mechanickou pevnost a tedy i nemožnost jeho aplikace ve stand alone módu.

6 SOUPIS LITERATURY A PRAMENŮ

1. Collaborators GBoDS. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. Aug 2015;386(9995):743-800. doi:10.1016/S0140-6736(15)60692-4
2. Buser Z, Jakoi A, Katbamna B, Basho R, Wang JC. Bone Grafting and Spinal Fusion Options. In: Holly LT, Anderson PA, eds. *Essentials of Spinal Stabilization*. Springer International Publishing; 2017:453-470.
3. Rajae SS, Bae HW, Kanim LE, Delamarter RB. Spinal fusion in the United States: analysis of trends from 1998 to 2008. *Spine (Phila Pa 1976)*. Jan 2012;37(1):67-76. doi:10.1097/BRS.0b013e31820cccfb
4. Nasser R, Yadla S, Maltenfort MG, et al. Complications in spine surgery. *J Neurosurg Spine*. Aug 2010;13(2):144-57. doi:10.3171/2010.3.SPINE09369
5. Chun DS, Baker KC, Hsu WK. Lumbar pseudarthrosis: a review of current diagnosis and treatment. *Neurosurg Focus*. Oct 2015;39(4):E10. doi:10.3171/2015.7.FOCUS15292
6. McAnany SJ, Baird EO, Overley SC, Kim JS, Qureshi SA, Anderson PA. A Meta-Analysis of the Clinical and Fusion Results following Treatment of Symptomatic Cervical Pseudarthrosis. *Global Spine J*. Apr 2015;5(2):148-55. doi:10.1055/s-0035-1544176
7. Raizman NM, O'Brien JR, Poehling-Monaghan KL, Yu WD. Pseudarthrosis of the spine. *J Am Acad Orthop Surg*. Aug 2009;17(8):494-503. doi:10.5435/00124635-200908000-00003
8. Keller T, Holland MC. Some notable American spine surgeons of the 19th century. *Spine (Phila Pa 1976)*. Jun 1997;22(12):1413-7. doi:10.1097/00007632-199706150-00022
9. Tuli SM. Historical aspects of Pott's disease (spinal tuberculosis) management. *Eur Spine J*. Jun 2013;22 Suppl 4:529-38. doi:10.1007/s00586-012-2388-7
10. Lister J. On the Antiseptic Principle in the Practice of Surgery. *Br Med J*. Sep 1867;2(351):246-8. doi:10.1136/bmj.2.351.246

11. Weiner BK. Historical perspective: the development and use of spinal disease categories. *Spine (Phila Pa 1976)*. Apr 2008;33(8):925-30. doi:10.1097/BRS.0b013e31816b4738
12. Hadra BE. Wiring of the vertebrae as a means of immobilization in fracture and Potts' disease. 1891. *Clin Orthop Relat Res*. Jul 2007;460:11-3. doi:10.1097/BLO.0b013e318068692a
13. Fritz L. The classic. Support for the spondylitic spine by means of buried steel bars, attached to the vertebrae. By Fritz Lange. 1910. *Clin Orthop Relat Res*. Feb 1986;(203):3-6.
14. Albee FH. Transplantation of a portion of the tibia into the spine for Pott's disease: a preliminary report 1911. *Clin Orthop Relat Res*. Jul 2007;460:14-6. doi:10.1097/BLO.0b013e3180686a0f
15. Hibbs RA. An operation for progressive spinal deformities: a preliminary report of three cases from the service of the orthopaedic hospital. 1911. *Clin Orthop Relat Res*. Jul 2007;460:17-20. doi:10.1097/BLO.0b013e3180686b30
16. Tarpada SP, Morris MT, Burton DA. Spinal fusion surgery: A historical perspective. *J Orthop*. Mar 2017;14(1):134-136. doi:10.1016/j.jor.2016.10.029
17. WATKINS MB. Posterolateral fusion of the lumbar and lumbosacral spine. *J Bone Joint Surg Am*. Oct 1953;35-A(4):1014-8.
18. Thompson WA, Gristina AG, Healy WA. Lumbosacral spine fusion. A method of bilateral posterolateral fusion combined with a Hibbs fusion. *J Bone Joint Surg Am*. Dec 1974;56(8):1643-7.
19. Guiroy A, Sícoli A, Masanés NG, Ciancio AM, Gagliardi M, Falavigna A. How to perform the Wiltse posterolateral spinal approach: Technical note. *Surg Neurol Int*. 2018;9:38. doi:10.4103/sni.sni_344_17
20. Capener N. Spondylolisthesis. *Br J Surg*; 1932. p. 374–386.
21. de Kunder SL, Rijkers K, Caelers IJM, de Bie RA, Koehler PJ, van Santbrink H. Lumbar Interbody Fusion: A Historical Overview and a Future Perspective. *Spine (Phila Pa 1976)*. 08 2018;43(16):1161-1168. doi:10.1097/BRS.0000000000002534
22. B.H. B. An operation for spondylolisthesis. *Lancet*; 1933. p. 1233.

23. Briggs H, Milligan PR. Chip fusion of the low back following exploration of the spinal canal. *JBJS*. 1944;26(1):125-130.
24. Cloward RB. The treatment of ruptured lumbar intervertebral discs by vertebral body fusion. I. Indications, operative technique, after care. *J Neurosurg*. Mar 1953;10(2):154-68. doi:10.3171/jns.1953.10.2.0154
25. Cloward RB. The anterior approach for removal of ruptured cervical disks. *J Neurosurg*. Nov 1958;15(6):602-17. doi:10.3171/jns.1958.15.6.0602
26. Blume HG. Unilateral posterior lumbar interbody fusion: simplified dowel technique. *Clin Orthop Relat Res*. Mar 1985;(193):75-84.
27. Harms J, Rolinger H. A one-stager procedure in operative treatment of spondylolistheses: dorsal traction-reposition and anterior fusion. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*. 1982 May-Jun 1982;120(3):343-7. doi:10.1055/s-2008-1051624
28. Harrington PR, Dickson JH. Spinal instrumentation in the treatment of severe progressive spondylolisthesis. *Clin Orthop Relat Res*. Jun 1976;(117):157-63.
29. Kabins MB, Weinstein JN. The History of Vertebral Screw and Pedicle Screw Fixation. *Iowa Orthop J*. 1991;11:127-36.
30. Roy-Camille R, Saillant G, Mazel C. Internal fixation of the lumbar spine with pedicle screw plating. *Clin Orthop Relat Res*. Feb 1986;(203):7-17.
31. Malhotra D, Kalb S, Rodriguez-Martinez N, et al. Instrumentation of the posterior thoracolumbar spine: from wires to pedicle screws. *Neurosurgery*. Dec 2014;10 Suppl 4:497-504; discussion 505. doi:10.1227/NEU.0000000000000489
32. Magerl FP. Stabilization of the lower thoracic and lumbar spine with external skeletal fixation. *Clin Orthop Relat Res*. Oct 1984;(189):125-41.
33. RA R, GW S. Anterolateral cervical disc removal and interbody fusion for cervical disc syndrome. *Bull John Hopkins Hosp*. 1955;96:223-224
34. Boni M, Cherubino P, Denaro V, Benazzo F. Multiple subtotal somatectomy. Technique and evaluation of a series of 39 cases. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1984 May-Jun 1984;9(4):358-62.

35. Li Z, Zhao Y, Tang J, et al. A comparison of a new zero-profile, stand-alone Fidji cervical cage and anterior cervical plate for single and multilevel ACDF: a minimum 2-year follow-up study. *Eur Spine J.* 04 2017;26(4):1129-1139. doi:10.1007/s00586-016-4739-2
36. Moftakhar R, Trost GR. Anterior cervical plates: a historical perspective. *Neurosurg Focus.* Jan 2004;16(1):E8. doi:10.3171/foc.2004.16.1.9
37. Omeis I, DeMattia JA, Hillard VH, Murali R, Das K. History of instrumentation for stabilization of the subaxial cervical spine. *Neurosurg Focus.* Jan 2004;16(1):E10. doi:10.3171/foc.2004.16.1.11
38. Wagner PC, Grant BD, Bagby GW, Gallina AM, Sande RD, Ratzlaff M. Evaluation of Cervical Spinal Fusion as a Treatment in the Equine “Wobbler” Syndrome. *Veterinary Surgery.* 1979;8(3):84-88. doi:https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.1979.tb00614.x
39. Kuslich SD, Ulstrom CL, Griffith SL, Ahern JW, Dowdle JD. The Bagby and Kuslich method of lumbar interbody fusion. History, techniques, and 2-year follow-up results of a United States prospective, multicenter trial. *Spine (Phila Pa 1976).* Jun 1998;23(11):1267-78; discussion 1279. doi:10.1097/00007632-199806010-00019
40. Harms JG, Jeszenszky D. The unilateral, transforaminal approach for posterior lumbar interbody fusion. *Oper Orthop Traumatol.* Jun 1998;10(2):90-102. doi:10.1007/s00064-006-0112-7
41. Weiner BK, Fraser RD. Spine update lumbar interbody cages. *Spine (Phila Pa 1976).* Mar 1998;23(5):634-40. doi:10.1097/00007632-199803010-00020
42. Hrabálek, L, I R, J B, M V, M H. Použití titanových a PEEKových implantátů při ALIF stand alone u degenerativního onemocnění lumbosakrální páteře – prospektivní studie. 2009;72(1)(105):38–44.
43. McGilvray KC, Waldorff EI, Easley J, et al. Evaluation of a polyetheretherketone (PEEK) titanium composite interbody spacer in an ovine lumbar interbody fusion model: biomechanical, microcomputed tomographic, and histologic analyses. *Spine J.* 12 2017;17(12):1907-1916. doi:10.1016/j.spinee.2017.06.034
44. Tapia JL, Suresh L, Plata M, Aguirre A. Ancient esthetic dentistry in Mesoamerica. *Alpha Omegan.* Dec 2002;95(4):21-4.

45. Donaldson JA. The use of gold in dentistry: an historical overview. *Gold Bull.* 1980;13(3):117-24; (4),160-5. doi:10.1007/BF03216551
46. W. M. Observations concerning transplantation of bone. Illustrated by a case of inter-human osseous transplantation, whereby over two-thirds of the shaft of a humerus was restored.: *Proc Royal Soc London*; 1881. p. 232–247.
47. Khan SN, Cammisa FP, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg.* 2005 Jan-Feb 2005;13(1):77-86.
48. Chubb G. Demonstration of Cases and Radiographs illustrating the Technique employed and Results obtained in the Repair of Fractured Mandible by means of the Free Autogenous Bone-graft. *Proc R Soc Med.* 1921;14(Surg Sect):81-3.
49. Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine (Phila Pa 1976).* Aug 2002;27(16 Suppl 1):S2-8. doi:10.1097/00007632-200208151-00002
50. Virk S, Qureshi S, Sandhu H. History of Spinal Fusion: Where We Came from and Where We Are Going. *HSS J.* Jul 2020;16(2):137-142. doi:10.1007/s11420-020-09747-7
51. Resnick DK, Choudhri TF, Dailey AT, et al. Guidelines for the performance of fusion procedures for degenerative disease of the lumbar spine. Part 7: intractable low-back pain without stenosis or spondylolisthesis. *J Neurosurg Spine.* Jun 2005;2(6):670-2. doi:10.3171/spi.2005.2.6.0670
52. Verma R, Virk S, Qureshi S. Interbody Fusions in the Lumbar Spine: A Review. *HSS J.* Jul 2020;16(2):162-167. doi:10.1007/s11420-019-09737-4
53. Mobbs RJ, Phan K, Malham G, Seex K, Rao PJ. Lumbar interbody fusion: techniques, indications and comparison of interbody fusion options including PLIF, TLIF, MI-TLIF, OLIF/ATP, LLIF and ALIF. *J Spine Surg.* Dec 2015;1(1):2-18. doi:10.3978/j.issn.2414-469X.2015.10.05
54. Ge DH, Stekas ND, Varlotta CG, et al. Comparative Analysis of Two Transforaminal Lumbar Interbody Fusion Techniques: Open TLIF Versus Wiltse MIS TLIF. *Spine (Phila Pa 1976).* May 2019;44(9):E555-E560. doi:10.1097/BRS.0000000000002903
55. Lestini WF, Fulghum JS, Whitehurst LA. Lumbar spinal fusion: advantages of posterior lumbar interbody fusion. *Surg Technol Int.* 1994;3:577-90.

56. Fan SW, Hu ZJ, Fang XQ, Zhao FD, Huang Y, Yu HJ. Comparison of paraspinal muscle injury in one-level lumbar posterior inter-body fusion: modified minimally invasive and traditional open approaches. *Orthop Surg*. Aug 2010;2(3):194-200. doi:10.1111/j.1757-7861.2010.00086.x
57. Humphreys SC, Hodges SD, Patwardhan AG, Eck JC, Murphy RB, Covington LA. Comparison of posterior and transforaminal approaches to lumbar interbody fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. Mar 2001;26(5):567-71. doi:10.1097/00007632-200103010-00023
58. K K. TLIF – transforaminal lumbar interbody fusion. In: R H, ed. *Degenerativní onemocnění páteře*. Galén; 2014:237-241.
59. Phan K, Thayaparan GK, Mobbs RJ. Anterior lumbar interbody fusion versus transforaminal lumbar interbody fusion--systematic review and meta-analysis. *Br J Neurosurg*. 2015;29(5):705-11. doi:10.3109/02688697.2015.1036838
60. J P, Y K, H H, S H. Comparison between posterior and transforaminal approaches for lumbar interbody fusion. *J Korean Neurosurg Soc*. 2005;37:340-344.
61. Rao PJ, Loganathan A, Yeung V, Mobbs RJ. Outcomes of anterior lumbar interbody fusion surgery based on indication: a prospective study. *Neurosurgery*. Jan 2015;76(1):7-23; discussion 23-4. doi:10.1227/NEU.0000000000000561
62. Phan K, Mobbs RJ. Sacrum fracture following L5-S1 stand-alone interbody fusion for isthmic spondylolisthesis. *J Clin Neurosci*. Nov 2015;22(11):1837-9. doi:10.1016/j.jocn.2015.03.055
63. Hsieh PC, Koski TR, O'Shaughnessy BA, et al. Anterior lumbar interbody fusion in comparison with transforaminal lumbar interbody fusion: implications for the restoration of foraminal height, local disc angle, lumbar lordosis, and sagittal balance. *J Neurosurg Spine*. Oct 2007;7(4):379-86. doi:10.3171/SPI-07/10/379
64. Rao PJ, Maharaj MM, Phan K, Lakshan Abeygunasekara M, Mobbs RJ. Indirect foraminal decompression after anterior lumbar interbody fusion: a prospective radiographic study using a new pedicle-to-pedicle technique. *Spine J*. May 2015;15(5):817-24. doi:10.1016/j.spinee.2014.12.019

65. Mobbs RJ, Phan K, Daly D, Rao PJ, Lennox A. Approach-Related Complications of Anterior Lumbar Interbody Fusion: Results of a Combined Spine and Vascular Surgical Team. *Global Spine J.* Mar 2016;6(2):147-54. doi:10.1055/s-0035-1557141
66. Ozgur BM, Aryan HE, Pimenta L, Taylor WR. Extreme Lateral Interbody Fusion (XLIF): a novel surgical technique for anterior lumbar interbody fusion. *Spine J.* 2006 Jul-Aug 2006;6(4):435-43. doi:10.1016/j.spinee.2005.08.012
67. Arnold PM, Anderson KK, McGuire RA. The lateral transpoas approach to the lumbar and thoracic spine: A review. *Surg Neurol Int.* 2012;3(Suppl 3):S198-215. doi:10.4103/2152-7806.98583
68. Malham GM, Ellis NJ, Parker RM, Seex KA. Clinical outcome and fusion rates after the first 30 extreme lateral interbody fusions. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:246989. doi:10.1100/2012/246989
69. Silvestre C, Mac-Thiong JM, Hilmi R, Roussouly P. Complications and Morbidities of Mini-open Anterior Retroperitoneal Lumbar Interbody Fusion: Oblique Lumbar Interbody Fusion in 179 Patients. *Asian Spine J.* Jun 2012;6(2):89-97. doi:10.4184/asj.2012.6.2.89
70. Li JX, Phan K, Mobbs R. Oblique Lumbar Interbody Fusion: Technical Aspects, Operative Outcomes, and Complications. *World Neurosurg.* Feb 2017;98:113-123. doi:10.1016/j.wneu.2016.10.074
71. Mehren C, Mayer HM, Zandanell C, Siepe CJ, Korge A. The Oblique Anterolateral Approach to the Lumbar Spine Provides Access to the Lumbar Spine With Few Early Complications. *Clin Orthop Relat Res.* Sep 2016;474(9):2020-7. doi:10.1007/s11999-016-4883-3
72. Phan K, Mobbs RJ. Oblique Lumbar Interbody Fusion for Revision of Non-union Following Prior Posterior Surgery: A Case Report. *Orthop Surg.* Nov 2015;7(4):364-7. doi:10.1111/os.12204
73. Schlickewei W, Schlickewei C. The Use of Bone Substitutes in the Treatment of Bone Defects – the Clinical View and History. *Macromolecular Symposia.* 2007;253(1):10-23. doi:https://doi.org/10.1002/masy.200750702

74. Kolk A, Handschel J, Drescher W, et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials – from space holders to innovative biomaterials. *J Craniomaxillofac Surg*. Dec 2012;40(8):706-18. doi:10.1016/j.jcms.2012.01.002
75. Giannoudis PV, Einhorn TA, Schmidmaier G, Marsh D. The diamond concept--open questions. *Injury*. Sep 2008;39 Suppl 2:S5-8. doi:10.1016/S0020-1383(08)70010-X
76. Woodruff MA, Lange C, Reichert J, et al. Bone tissue engineering: from bench to bedside. *Materials Today*. 2012/10/01/ 2012;15(10):430-435. doi:https://doi.org/10.1016/S1369-7021(12)70194-3
77. Roberts TT, Rosenbaum AJ. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis*. 2012 Oct-Dec 2012;8(4):114-24. doi:10.4161/org.23306
78. Samartzis D, Shen FH, Matthews DK, Yoon ST, Goldberg EJ, An HS. Comparison of allograft to autograft in multilevel anterior cervical discectomy and fusion with rigid plate fixation. *Spine J*. 2003 Nov-Dec 2003;3(6):451-9. doi:10.1016/s1529-9430(03)00173-6
79. Sandhu HS, Grewal HS, Parvataneni H. Bone grafting for spinal fusion. *Orthop Clin North Am*. Oct 1999;30(4):685-98. doi:10.1016/s0030-5898(05)70120-6
80. Zermatten P, Wettstein M. Iliac wing fracture following graft harvesting from the anterior iliac crest: literature review based on a case report. *Orthop Traumatol Surg Res*. Feb 2012;98(1):114-7. doi:10.1016/j.otsr.2011.03.026
81. Myeroff C, Archdeacon M. Autogenous bone graft: donor sites and techniques. *J Bone Joint Surg Am*. Dec 2011;93(23):2227-36. doi:10.2106/JBJS.J.01513
82. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res*. Aug 1996;(329):300-9. doi:10.1097/00003086-199608000-00037
83. Goulet JA, Senunas LE, DeSilva GL, Greenfield ML. Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment. *Clin Orthop Relat Res*. Jun 1997;(339):76-81. doi:10.1097/00003086-199706000-00011

84. Buser Z, Brodke DS, Youssef JA, et al. Allograft Versus Demineralized Bone Matrix in Instrumented and Noninstrumented Lumbar Fusion: A Systematic Review. *Global Spine J*. Jun 2018;8(4):396-412. doi:10.1177/2192568217735342
85. Grabowski G, Cornett CA. Bone graft and bone graft substitutes in spine surgery: current concepts and controversies. *J Am Acad Orthop Surg*. Jan 2013;21(1):51-60. doi:10.5435/JAAOS-21-01-51
86. Stevenson S, Horowitz M. The response to bone allografts. *J Bone Joint Surg Am*. Jul 1992;74(6):939-50.
87. Miller LE, Block JE. Safety and effectiveness of bone allografts in anterior cervical discectomy and fusion surgery. *Spine (Phila Pa 1976)*. Nov 2011;36(24):2045-50. doi:10.1097/BRS.0b013e3181ff37eb
88. Bae HW, Zhao L, Kanim LE, Wong P, Delamarter RB, Dawson EG. Intervariability and intravariability of bone morphogenetic proteins in commercially available demineralized bone matrix products. *Spine (Phila Pa 1976)*. May 2006;31(12):1299-306; discussion 1307-8. doi:10.1097/01.brs.0000218581.92992.b7
89. Vaccaro AR, Stubbs HA, Block JE. Demineralized bone matrix composite grafting for posterolateral spinal fusion. *Orthopedics*. 07 2007;30(7):567-70. doi:10.3928/01477447-20070701-06
90. Dorozhkin SV. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*. Mar 2010;31(7):1465-85. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.050
91. Khan SN, Fraser JF, Sandhu HS, Cammisa FP, Girardi FP, Lane JM. Use of osteopromotive growth factors, demineralized bone matrix, and ceramics to enhance spinal fusion. *J Am Acad Orthop Surg*. 2005 Mar-Apr 2005;13(2):129-37. doi:10.5435/00124635-200503000-00006
92. Korovessis P, Koureas G, Zacharatos S, Papazisis Z, Lambiris E. Correlative radiological, self-assessment and clinical analysis of evolution in instrumented dorsal and lateral fusion for degenerative lumbar spine disease. Autograft versus coralline hydroxyapatite. *Eur Spine J*. Sep 2005;14(7):630-8. doi:10.1007/s00586-004-0855-5

93. Friesenbichler J, Maurer-Ertl W, Sadoghi P, Pirker-Fruehauf U, Bodo K, Leithner A. Adverse reactions of artificial bone graft substitutes: lessons learned from using tricalcium phosphate geneX®. *Clin Orthop Relat Res*. Mar 2014;472(3):976-82. doi:10.1007/s11999-013-3305-z
94. Kaito T, Mukai Y, Nishikawa M, Ando W, Yoshikawa H, Myoui A. Dual hydroxyapatite composite with porous and solid parts: experimental study using canine lumbar interbody fusion model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. Aug 2006;78(2):378-84. doi:10.1002/jbm.b.30498
95. Motomiya M, Ito M, Takahata M, et al. Effect of Hydroxyapatite porous characteristics on healing outcomes in rabbit posterolateral spinal fusion model. *Eur Spine J*. Dec 2007;16(12):2215-24. doi:10.1007/s00586-007-0501-0
96. Chong E, Pelletier MH, Mobbs RJ, Walsh WR. The design evolution of interbody cages in anterior cervical discectomy and fusion: a systematic review. *BMC Musculoskelet Disord*. Apr 2015;16:99. doi:10.1186/s12891-015-0546-x
97. Rao PJ, Pelletier MH, Walsh WR, Mobbs RJ. Spine interbody implants: material selection and modification, functionalization and bioactivation of surfaces to improve osseointegration. *Orthop Surg*. May 2014;6(2):81-9. doi:10.1111/os.12098
98. Chen Y, Wang X, Lu X, et al. Comparison of titanium and polyetheretherketone (PEEK) cages in the surgical treatment of multilevel cervical spondylotic myelopathy: a prospective, randomized, control study with over 7-year follow-up. *Eur Spine J*. Jul 2013;22(7):1539-46. doi:10.1007/s00586-013-2772-y
99. Chou YC, Chen DC, Hsieh WA, et al. Efficacy of anterior cervical fusion: comparison of titanium cages, polyetheretherketone (PEEK) cages and autogenous bone grafts. *J Clin Neurosci*. Nov 2008;15(11):1240-5. doi:10.1016/j.jocn.2007.05.016
100. Karikari IO, Jain D, Owens TR, et al. Impact of subsidence on clinical outcomes and radiographic fusion rates in anterior cervical discectomy and fusion: a systematic review. *J Spinal Disord Tech*. Feb 2014;27(1):1-10. doi:10.1097/BSD.0b013e31825bd26d

101. Noordhoek I, Koning MT, Jacobs WCH, Vleggeert-Lankamp CLA. Incidence and clinical relevance of cage subsidence in anterior cervical discectomy and fusion: a systematic review. *Acta Neurochir (Wien)*. 04 2018;160(4):873-880. doi:10.1007/s00701-018-3490-3
102. Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Slosar PJ, Schneider JM, Schwartz Z, Boyan BD. Implant materials generate different peri-implant inflammatory factors: poly-ether-ether-ketone promotes fibrosis and microtextured titanium promotes osteogenic factors. *Spine (Phila Pa 1976)*. Mar 2015;40(6):399-404. doi:10.1097/BRS.0000000000000778
103. Seaman S, Kerezoudis P, Bydon M, Torner JC, Hitchon PW. Titanium vs. polyetheretherketone (PEEK) interbody fusion: Meta-analysis and review of the literature. *J Clin Neurosci*. Oct 2017;44:23-29. doi:10.1016/j.jocn.2017.06.062
104. Mobbs RJ, Phan K, Assem Y, Pelletier M, Walsh WR. Combination Ti/PEEK ALIF cage for anterior lumbar interbody fusion: Early clinical and radiological results. *J Clin Neurosci*. Dec 2016;34:94-99. doi:10.1016/j.jocn.2016.05.028
105. Rickert M, Fleege C, Tarhan T, et al. Transforaminal lumbar interbody fusion using polyetheretherketone oblique cages with and without a titanium coating: a randomised clinical pilot study. *Bone Joint J*. Oct 2017;99-B(10):1366-1372. doi:10.1302/0301-620X.99B10.BJJ-2016-1292.R2
106. Olivares-Navarrete R, Gittens RA, Schneider JM, et al. Osteoblasts exhibit a more differentiated phenotype and increased bone morphogenetic protein production on titanium alloy substrates than on poly-ether-ether-ketone. *Spine J*. Mar 2012;12(3):265-72. doi:10.1016/j.spinee.2012.02.002
107. Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Gittens RA, et al. Rough titanium alloys regulate osteoblast production of angiogenic factors. *Spine J*. Nov 2013;13(11):1563-70. doi:10.1016/j.spinee.2013.03.047
108. Katsuura Y, Wright-Chisem J, Wright-Chisem A, Virk S, McAnany S. The Importance of Surface Technology in Spinal Fusion. *HSS J*. Jul 2020;16(2):113-116. doi:10.1007/s11420-020-09752-w

109. Vyatskikh A, Delalande S, Kudo A, Zhang X, Portela CM, Greer JR. Additive manufacturing of 3D nano-architected metals. *Nat Commun.* 02 2018;9(1):593. doi:10.1038/s41467-018-03071-9
110. Todd I. Metallurgy: No more tears for metal 3D printing. *Nature.* 09 2017;549(7672):342-343. doi:10.1038/549342a
111. Hwang HH, Zhu W, Victorine G, Lawrence N, Chen S. 3D-Printing of Functional Biomedical Microdevices via Light- and Extrusion-Based Approaches. *Small Methods.* Feb 2018;2(2)doi:10.1002/smt.201700277
112. Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Hutton DL, et al. Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblast lineage. *Biomaterials.* Apr 2010;31(10):2728-35. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.12.029
113. Puckett SD, Taylor E, Raimondo T, Webster TJ. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials.* Feb 2010;31(4):706-13. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.081
114. Qin H, Cao H, Zhao Y, et al. In vitro and in vivo anti-biofilm effects of silver nanoparticles immobilized on titanium. *Biomaterials.* Nov 2014;35(33):9114-25. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.07.040
115. Li W, Xu D, Hu Y, Cai K, Lin Y. Surface modification of titanium substrates with silver nanoparticles embedded sulfhydrylated chitosan/gelatin polyelectrolyte multilayer films for antibacterial application. *J Mater Sci Mater Med.* Jun 2014;25(6):1435-48. doi:10.1007/s10856-014-5190-8
116. Donnalaja F, Jacchetti E, Soncini M, Raimondi MT. Natural and Synthetic Polymers for Bone Scaffolds Optimization. *Polymers (Basel).* Apr 2020;12(4)doi:10.3390/polym12040905
117. Mizuno M, Shindo M, Kobayashi D, Tsuruga E, Amemiya A, Kuboki Y. Osteogenesis by bone marrow stromal cells maintained on type I collagen matrix gels in vivo. *Bone.* Feb 1997;20(2):101-7. doi:10.1016/s8756-3282(96)00349-3
118. Chen P, Tao J, Zhu S, et al. Radially oriented collagen scaffold with SDF-1 promotes osteochondral repair by facilitating cell homing. *Biomaterials.* Jan 2015;39:114-23. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.10.049

119. H L, J L, F Z. Advances in Hard Tissue Engineering Materials—Nanocellulose-based Composites. *PBM: Nanocellulose Based Compos.* 2018;3(4):62-76.
120. Cao L, Duan PG, Li XL, et al. Biomechanical stability of a bioabsorbable self-retaining polylactic acid/nano-sized β -tricalcium phosphate cervical spine interbody fusion device in single-level anterior cervical discectomy and fusion sheep models. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:5875-80. doi:10.2147/IJN.S38288
121. Tang J, Guo J, Li Z, et al. Fast degradable citrate-based bone scaffold promotes spinal fusion. *J Mater Chem B.* Jul 2015;3(27):5569-5576. doi:10.1039/C5TB00607D
122. Wagner Q, Offner D, Idoux-Gillet Y, et al. Advanced nanostructured medical device combining mesenchymal cells and VEGF nanoparticles for enhanced engineered tissue vascularization. *Nanomedicine (Lond).* Sep 2016;11(18):2419-30. doi:10.2217/nmm-2016-0189
123. Ferrand A, Eap S, Richert L, et al. Osteogenetic properties of electrospun nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors. *Macromol Biosci.* Jan 2014;14(1):45-55. doi:10.1002/mabi.201300283
124. Boden SD, Zdeblick TA, Sandhu HS, Heim SE. The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: a preliminary report. *Spine (Phila Pa 1976).* Feb 2000;25(3):376-81. doi:10.1097/00007632-200002010-00020
125. Helm G, Anderson D, Andersson G, et al. Summary Statement: Bone Morphogenetic Proteins: Basic Science. *Spine.* 08/15 2002;27:S9. doi:10.1097/00007632-200208151-00003
126. Seeherman HJ, Li XJ, Boussein ML, Wozney JM. rhBMP-2 induces transient bone resorption followed by bone formation in a nonhuman primate core-defect model. *J Bone Joint Surg Am.* Feb 2010;92(2):411-26. doi:10.2106/JBJS.H.01732
127. Simmonds MC, Brown JV, Heirs MK, et al. Safety and effectiveness of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for spinal fusion: a meta-analysis of individual-participant data. *Ann Intern Med.* Jun 2013;158(12):877-89. doi:10.7326/0003-4819-158-12-201306180-00005

128. Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J.* Jun 2011;11(6):471-91. doi:10.1016/j.spinee.2011.04.023
129. Poynton AR, Lane JM. Safety profile for the clinical use of bone morphogenetic proteins in the spine. *Spine (Phila Pa 1976).* Aug 2002;27(16 Suppl 1):S40-8. doi:10.1097/00007632-200208151-00010
130. Vaidya R, Carp J, Sethi A, Bartol S, Craig J, Les CM. Complications of anterior cervical discectomy and fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Eur Spine J.* Aug 2007;16(8):1257-65. doi:10.1007/s00586-007-0351-9
131. Virk SS, Phillips FM, Khan SN. The Influence of Geography, Time, and Payer Type on the Utilization of Bone Morphogenetic Protein (BMP) Between 2005 and 2015. *Clin Spine Surg.* 05 2018;31(4):174-179. doi:10.1097/BSD.0000000000000585
132. Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE. Scaffold design for bone regeneration. *J Nanosci Nanotechnol.* Jan 2014;14(1):15-56. doi:10.1166/jnn.2014.9127
133. Teven CM, Farina EM, Rivas J, Reid RR. Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases. *Genes Dis.* Dec 2014;1(2):199-213. doi:10.1016/j.gendis.2014.09.005
134. Marie PJ, Miraoui H, Sévère N. FGF/FGFR signaling in bone formation: progress and perspectives. *Growth Factors.* Apr 2012;30(2):117-23. doi:10.3109/08977194.2012.656761
135. Arakawa T, Prestrelski SJ, Kenney WC, Carpenter JF. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Adv Drug Deliv Rev.* Mar 2001;46(1-3):307-26. doi:10.1016/s0169-409x(00)00144-7
136. Mitchell AC, Briquez PS, Hubbell JA, Cochran JR. Engineering growth factors for regenerative medicine applications. *Acta Biomater.* Jan 2016;30:1-12. doi:10.1016/j.actbio.2015.11.007
137. Kawaguchi H, Jingushi S, Izumi T, et al. Local application of recombinant human fibroblast growth factor-2 on bone repair: a dose-escalation prospective trial on patients with osteotomy. *J Orthop Res.* Apr 2007;25(4):480-7. doi:10.1002/jor.20315

138. Kawaguchi H, Oka H, Jingushi S, et al. A local application of recombinant human fibroblast growth factor 2 for tibial shaft fractures: A randomized, placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res*. Dec 2010;25(12):2735-43. doi:10.1002/jbmr.146
139. Kuroda Y, Matsuda S, Akiyama H. Joint-preserving regenerative therapy for patients with early-stage osteonecrosis of the femoral head. *Inflamm Regen*. 2016;36:4. doi:10.1186/s41232-016-0002-9
140. Henkel J, Woodruff MA, Epari DR, et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions – A 21st Century Perspective. *Bone Res*. Sep 2013;1(3):216-48. doi:10.4248/BR201303002
141. Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg*. Jan 1999;65(1):22-6.
142. Barba M, Cicione C, Bernardini C, et al. Spinal fusion in the next generation: gene and cell therapy approaches. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:406159. doi:10.1155/2014/406159
143. Wang T, Dang G, Guo Z, Yang M. Evaluation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell-calcium phosphate ceramic composite for lumbar fusion in rhesus monkey interbody fusion model. *Tissue Eng*. 2005 Jul-Aug 2005;11(7-8):1159-67. doi:10.1089/ten.2005.11.1159
144. Gan Y, Dai K, Zhang P, Tang T, Zhu Z, Lu J. The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion. *Biomaterials*. Oct 2008;29(29):3973-82. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.06.026
145. Lopez MJ, McIntosh KR, Spencer ND, et al. Acceleration of spinal fusion using syngeneic and allogeneic adult adipose derived stem cells in a rat model. *J Orthop Res*. Mar 2009;27(3):366-73. doi:10.1002/jor.20735
146. Musgrave DS, Bosch P, Lee JY, et al. Ex vivo gene therapy to produce bone using different cell types. *Clin Orthop Relat Res*. Sep 2000;(378):290-305. doi:10.1097/00003086-200009000-00040

147. Musgrave DS, Bosch P, Ghivizzani S, Robbins PD, Evans CH, Huard J. Adenovirus-mediated direct gene therapy with bone morphogenetic protein-2 produces bone. *Bone*. Jun 1999;24(6):541-7. doi:10.1016/s8756-3282(99)00086-1
148. Riew KD, Wright NM, Cheng S, Avioli LV, Lou J. Induction of bone formation using a recombinant adenoviral vector carrying the human BMP-2 gene in a rabbit spinal fusion model. *Calcif Tissue Int*. Oct 1998;63(4):357-60. doi:10.1007/s002239900540
149. Katsuura Y, Shafi K, Jacques C, Virk S, Iyer S, Cunningham M. New Strategies in Enhancing Spinal Fusion. *HSS J*. Jul 2020;16(2):177-182. doi:10.1007/s11420-020-09749-5
150. O'Loughlin PF, Morr S, Bogunovic L, Kim AD, Park B, Lane JM. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg Am*. Feb 2008;90 Suppl 1:79-84. doi:10.2106/JBJS.G.01585
151. Vo TN, Shah SR, Lu S, et al. Injectable dual-gelling cell-laden composite hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials*. Mar 2016;83:1-11. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.12.026
152. Stastny P, Sedlacek R, Suchy T, Lukasova V, Rampichova M, Trunec M. Structure degradation and strength changes of sintered calcium phosphate bone scaffolds with different phase structures during simulated biodegradation in vitro. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. Jul 2019;100:544-553. doi:10.1016/j.msec.2019.03.027
153. Leyhausen G, Lorenz B, Zhu H, et al. Inorganic polyphosphate in human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res*. May 1998;13(5):803-12. doi:10.1359/jbmr.1998.13.5.803
154. Müller WE, Wang X, Diehl-Seifert B, et al. Inorganic polymeric phosphate/polyphosphate as an inducer of alkaline phosphatase and a modulator of intracellular Ca²⁺ level in osteoblasts (SaOS-2 cells) in vitro. *Acta Biomater*. Jun 2011;7(6):2661-71. doi:10.1016/j.actbio.2011.03.007
155. Wang X, Schröder HC, Grebenjuk V, et al. The marine sponge-derived inorganic polymers, biosilica and polyphosphate, as morphogenetically active matrices/scaffolds for the differentiation of human multipotent stromal cells: potential application in 3D printing and distraction osteogenesis. *Mar Drugs*. Feb 2014;12(2):1131-47. doi:10.3390/md12021131

156. Sukhodub LF, Moseke C, Sukhodub LB, et al. Collagen–hydroxyapatite–water interactions investigated by XRD, piezogravimetry, infrared and Raman spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*. 2004/10/18/ 2004;704(1):53-58. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2003.12.061>
157. Doi K, Kubo T, Takeshita R, et al. Inorganic polyphosphate adsorbed onto hydroxyapatite for guided bone regeneration: an animal study. *Dent Mater J*. 2014;33(2):179-86. doi:10.4012/dmj.2013-275
158. Stastny P, Chlup Z, Kalasova D, Zikmund T, Kaiser J, Trunec M. Epoxy-based gel-casting of machinable hydroxyapatite foams for medical applications. *Journal of the American Ceramic Society*. 2018;101(8):3317-3327. doi:<https://doi.org/10.1111/jace.15523>
159. Babrnáková J, Pavliňáková V, Brtníková J, et al. Synergistic effect of bovine platelet lysate and various polysaccharides on the biological properties of collagen-based scaffolds for tissue engineering: Scaffold preparation, chemo-physical characterization, in vitro and ex ovo evaluation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. Jul 2019;100:236-246. doi:10.1016/j.msec.2019.02.092
160. Sloviková A, Vojtová L, Jančař J. Preparation and modification of collagen-based porous scaffold for tissue engineering. *Chemical Papers*. 2008/08/01 2008;62(4):417-422. doi:10.2478/s11696-008-0045-8
161. Dvorak P, Bednar D, Vanacek P, et al. Computer-assisted engineering of hyperstable fibroblast growth factor 2. *Biotechnol Bioeng*. 04 2018;115(4):850-862. doi:10.1002/bit.26531
162. Müller WEG, Tolba E, Schröder HC, et al. A new polyphosphate calcium material with morphogenetic activity. *Materials Letters*. 2015/06/01/ 2015;148:163-166. doi:<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2015.02.070>
163. Tan GH, Goss BG, Thorpe PJ, Williams RP. CT-based classification of long spinal allograft fusion. *Eur Spine J*. Nov 2007;16(11):1875-81. doi:10.1007/s00586-007-0376-0
164. Mannen EM, Anderson JT, Arnold PM, Friis EA. Mechanical analysis of the human cadaveric thoracic spine with intact rib cage. *J Biomech*. Jul 2015;48(10):2060-6. doi:10.1016/j.jbiomech.2015.03.021

165. Healy AT, Lubelski D, Mageswaran P, et al. Biomechanical analysis of the upper thoracic spine after decompressive procedures. *Spine J.* Jun 2014;14(6):1010-6. doi:10.1016/j.spinee.2013.11.035
166. Fraysur KD, Kelly BP, DiAngelo DJ. Use of a Spine Robot to Simulate Pure Moment Testing for Spine Biomechanics. Springer Berlin Heidelberg; 2009:207-210.
167. Lubelski D, Healy AT, Mageswaran P, Benzel EC, Mroz TE. Biomechanics of the lower thoracic spine after decompression and fusion: a cadaveric analysis. *Spine J.* Sep 2014;14(9):2216-23. doi:10.1016/j.spinee.2014.03.026
168. Šárka L. *Analýza ohybové tuhosti páteře po provedení lumbální intervertebrální fúze.* ČVUT; 2020.
169. Dodd CA, Fergusson CM, Freedman L, Houghton GR, Thomas D. Allograft versus autograft bone in scoliosis surgery. *J Bone Joint Surg Br.* May 1988;70(3):431-4. doi:10.1302/0301-620X.70B3.3286656
170. Bridwell KH, Sedgewick TA, O'Brien MF, Lenke LG, Baldus C. The role of fusion and instrumentation in the treatment of degenerative spondylolisthesis with spinal stenosis. *J Spinal Disord.* Dec 1993;6(6):461-72. doi:10.1097/00002517-199306060-00001
171. Behrbalk E, Uri O, Parks RM, Musson R, Soh RC, Boszczyk BM. Fusion and subsidence rate of stand alone anterior lumbar interbody fusion using PEEK cage with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Eur Spine J.* Dec 2013;22(12):2869-75. doi:10.1007/s00586-013-2948-5
172. Sherman J, Cauthen J, Schoenberg D, Burns M, Reaven NL, Griffith SL. Economic impact of improving outcomes of lumbar discectomy. *Spine J.* Feb 2010;10(2):108-16. doi:10.1016/j.spinee.2009.08.453
173. Woodard JR, Hilldore AJ, Lan SK, et al. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials.* Jan 2007;28(1):45-54. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.08.021
174. Oh SH, Park IK, Kim JM, Lee JH. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials.* Mar 2007;28(9):1664-71. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.024

175. Akazawa T, Murata M, Tazaki J, et al. Surface Structure Design and Characterization of Bioabsorbable and Functionally Graded Apatites Originated from Bovine Bone. *Key Engineering Materials*. 2006;309-311:1051-1054. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.309-311.1051
176. Akazawa T, Murata M, Tazaki J. Biomimetic microstructure and biocompatibility of functionally graded hydroxyapatite derived from animal bone by a supersonic dissolution. precipitated method. *Bioceramics*. 2009;22:155-158.
177. Kulaev I, Vagabov V, Kulakovskaya T. New aspects of inorganic polyphosphate metabolism and function. *J Biosci Bioeng*. 1999;88(2):111-29. doi:10.1016/s1389-1723(99)80189-3
178. Shen X, Chen L, Cai X, Tong T, Tong H, Hu J. A novel method for the fabrication of homogeneous hydroxyapatite/collagen nanocomposite and nanocomposite scaffold with hierarchical porosity. *J Mater Sci Mater Med*. Feb 2011;22(2):299-305. doi:10.1007/s10856-010-4199-x
179. Yun YR, Won JE, Jeon E, et al. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *J Tissue Eng*. Nov 2010;2010:218142. doi:10.4061/2010/218142
180. Tabata Y, Yamada K, Hong L, Miyamoto S, Hashimoto N, Ikada Y. Skull bone regeneration in primates in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosurg*. Nov 1999;91(5):851-6. doi:10.3171/jns.1999.91.5.0851
181. Kobayashi N, Miyaji H, Sugaya T, Kawanami M. Bone Augmentation by Implantation of an FGF2-loaded Collagen Gel-sponge Composite Scaffold. *Journal of Oral Tissue Engineering*. 2010;8(2):91-101. doi:10.11223/jarde.8.91
182. Sinha KM, Yasuda H, Coombes MM, Dent SY, de Crombrughe B. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor Osterix by NO66, a Jumonji family histone demethylase. *EMBO J*. Jan 2010;29(1):68-79. doi:10.1038/emboj.2009.332
183. Sun L, Blair HC, Peng Y, et al. Calcineurin regulates bone formation by the osteoblast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 2005;102(47):17130-5. doi:10.1073/pnas.0508480102

184. Hacchou Y, Uematsu T, Ueda O, et al. Inorganic polyphosphate: a possible stimulant of bone formation. *J Dent Res*. Sep 2007;86(9):893-7. doi:10.1177/154405910708600917
185. Wu B-C, Youn S-C, Kao C-T, et al. The effects of calcium silicate cement/fibroblast growth factor-2 composite on osteogenesis accelerator in human dental pulp cells. *Journal of Dental Sciences*. 2015/06/01/ 2015;10(2):145-153. doi:https://doi.org/10.1016/j.jds.2013.12.003
186. Scholz M, Schleicher P, Eindorf T, et al. Cages augmented with mineralized collagen and platelet-rich plasma as an osteoconductive/inductive combination for interbody fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. Apr 2010;35(7):740-6. doi:10.1097/BRS.0b013e3181bdc6cc
187. Khan SN, Lane JM. Spinal fusion surgery: animal models for tissue-engineered bone constructs. *Biomaterials*. Apr 2004;25(9):1475-85. doi:10.1016/s0142-9612(03)00491-5
188. Lee JH, Nam Y, Lee J-H. Animal Models of Orthopedic Research: A Spinal Fusion Model. *jkoa*. 08 2017;52(4):344-349. doi:10.4055/jkoa.2017.52.4.344
189. Li H, Zou X, Laursen M, Egund N, Lind M, Bünger C. The influence of intervertebral disc tissue on anterior spinal interbody fusion: an experimental study on pigs. *Eur Spine J*. Oct 2002;11(5):476-81. doi:10.1007/s00586-002-0455-1
190. Zhang JD, Poffyn B, Sys G, Uyttendaele D. Are stand-alone cages sufficient for anterior lumbar interbody fusion? *Orthop Surg*. Feb 2012;4(1):11-4. doi:10.1111/j.1757-7861.2011.00164.x
191. Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC. An experimental lumbar intertransverse process spinal fusion model. Radiographic, histologic, and biomechanical healing characteristics. *Spine (Phila Pa 1976)*. Feb 1995;20(4):412-20. doi:10.1097/00007632-199502001-00003
192. Xia L, Zhang Z, Chen L, et al. Proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells on akermanite and β -TCP bioceramics. *Eur Cell Mater*. Jul 2011;22:68-82; discussion 83. doi:10.22203/ecm.v022a06
193. Detsch R, Mayr H, Ziegler G. Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics. *Acta Biomater*. Jan 2008;4(1):139-48. doi:10.1016/j.actbio.2007.03.014

194. Xu H, Zhang F, Wang H, et al. Evaluation of a Porous Bioabsorbable Interbody Mg-Zn Alloy Cage in a Goat Cervical Spine Model. *Biomed Res Int*. 2018;2018:7961509. doi:10.1155/2018/7961509
195. Abbah SA, Lam CX, Ramruttun AK, Goh JC, Wong HK. Fusion performance of low-dose recombinant human bone morphogenetic protein 2 and bone marrow-derived multipotent stromal cells in biodegradable scaffolds: a comparative study in a large animal model of anterior lumbar interbody fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. Oct 2011;36(21):1752-9. doi:10.1097/BRS.0b013e31822576a4
196. Sandhu HS, Toth JM, Diwan AD, et al. Histologic evaluation of the efficacy of rhBMP-2 compared with autograft bone in sheep spinal anterior interbody fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. Mar 2002;27(6):567-75. doi:10.1097/00007632-200203150-00003
197. Yong MR, Saifzadeh S, Woodruff M, et al. Biological performance of a polycaprolactone-based scaffold plus recombinant human morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in an ovine thoracic interbody fusion model. *Eur Spine J*. Mar 2014;23(3):650-7. doi:10.1007/s00586-013-3085-x
198. Sherman BP, Lindley EM, Turner AS, et al. Evaluation of ABM/P-15 versus autogenous bone in an ovine lumbar interbody fusion model. *Eur Spine J*. Dec 2010;19(12):2156-63. doi:10.1007/s00586-010-1546-z
199. Gu Y, Chen L, Yang HL, Luo ZP, Tang TS. Evaluation of an injectable silk fibroin enhanced calcium phosphate cement loaded with human recombinant bone morphogenetic protein-2 in ovine lumbar interbody fusion. *J Biomed Mater Res A*. May 2011;97(2):177-85. doi:10.1002/jbm.a.33018
200. Li H, Zou X, Xue Q, Egund N, Lind M, Büniger C. Effects of autogenous bone graft impaction and tricalcium phosphate on anterior interbody fusion in the porcine lumbar spine. *Acta Orthop Scand*. Aug 2004;75(4):456-63. doi:10.1080/00016470410001240-1
201. Abbah SA, Lam CX, Ramruttun KA, Goh JC, Wong HK. Autogenous bone marrow stromal cell sheets-loaded mPCL/TCP scaffolds induced osteogenesis in a porcine model of spinal interbody fusion. *Tissue Eng Part A*. Mar 2011;17(5-6):809-17. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0255

202. Abbah SA, Lam CX, Hutmacher DW, Goh JC, Wong HK. Biological performance of a polycaprolactone-based scaffold used as fusion cage device in a large animal model of spinal reconstructive surgery. *Biomaterials*. Oct 2009;30(28):5086-93. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.05.067
203. McGilvray KC, Easley J, Seim HB, et al. Bony ingrowth potential of 3D-printed porous titanium alloy: a direct comparison of interbody cage materials in an in vivo ovine lumbar fusion model. *Spine J*. 07 2018;18(7):1250-1260. doi:10.1016/j.spinee.2018.02.018

7 SEZNAM ZKRATEK

ACDF	– Anterior cervical discectomy and fusion (přední krční diskektomie a fúze)
ALIF	– Anterior lumbar interbody fusion (přední bederní meziobratlová fúze)
AP	– Anterior-posterior (předozaďní)
AVČR	– Akademie věď České republiky
BAK klec	– Bagbyho a Kuslichova klec
BCP	– Bifázický kalciumfosfát
Bio-PolyP	– Biogenní polyfosfát
BMP	– Bone morphogenetic protein (kostní morfogenní protein)
BMPs	– Bone morphogenetic proteins (kostní morfogenní proteiny)
BMSc	– Bone marrow stem cells (kmenové mesenchymální buňky kostní dřene)
BSM	– Bone Substitute Material (náhrada kostní tkáňe)
BNHI	– Biodegradable nanocomposite hybrid implant (biodegradabilní nanokompozitní hybridní implantát)
cDNA	– Complementary deoxyribonucleic acid (komplementární deoxyribonukleová kyselina)
CEITEC	– Central European Institute of Technology (Středoevropský technologický institut)
CFRP	– Carbon fibre-reinforced polymer (polymer vyztužen karbonovými vlákny)
CP	– Calcium phosphate (Kalcium fosfát)
ČVUT	– České vysoké učení technické
DBM	– Demineralized bone matrix (demineralizovaná kostní hmota)
DDD	– Degenerative disc disease (degenerativní postižení plotének)
Deg	– Degree (stupeň)
DiOC6	– Dietyloxakarbokyanin jodidu
DNA	– Deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
EDTA	– Ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina ethylendiamintetraoctová)

EEF	– Eukaryotic elongation factor (eukaryotický elongační faktor)
EGF	– Epidermal growth factor (Epidermální růstový faktor)
FBSS	– Failed back surgery syndrome (syndrom selhání operace na páteři)
FGF	– Fibroblast growth factor (růstový faktor pro fibroblasty)
FGF2-stab	– Stabilized fibroblast growth factor (termostabilním růstový faktor pro fibroblasty 2)
FN	– Fakultní nemocnice
HA	– Hydroxyapatit
HIV	– Human Immunodeficiency Virus (virus lidské imunitní nedostatečnosti)
hMSCs	– Human mesenchymal stem cells (humánní mezenchymální kmenové buňky)
IGF	– Insuline-like growth factor (Inzulinu podobný růstový faktor)
IGHF	– Insuline-like human growth factor (Inzulinu podobný humánní růstový faktor)
LF MU	– Lékařská fakulta Masarykovy univerzity
LIF	– Lumbar interbody fusion (bederní meziobratlová fúze)
LLIF	– Lateral lumbar interbody fusion (laterální bederní meziobratlová fúze)
Micro-CT	– Micro-computed tomography (mikro-výpočetní tomografie)
MIS	– Minimally invasive surgery/surgical (minimálně invazivní chirurgie/chirurgický)
MI-TLIF	– Minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion (minimálně invazivní transforaminální bederní meziobratlová fúze)
mPCL-TCP	– medical-grade-polycaprolactone-tricalciumphosphate (polykaprolakton-trikalcium fosfát)
MSCs	– Mesenchymal stem cells (mezenchymální kmenové buňky)
MTS test	– Test pro hodnocení buněčné metabolické aktivity
ODI	– Oswestry Disability Index
OLIF/ATP	– Oblique lumbar interbody fusion/Anterior to psoas (šikmá bederní meziobratlová fúze/ventrálně od bederního svalu)
PBS	– Phosphate buffered saline (fosfátem pufovaný solný roztok)

PCL	– Polykaprolakton
PCR	– Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PDGF	– Platelet-derived growth factor (destičkový růstový faktor)
PDLA	– Poly D-lactic acid (kyselina D-polymléčná)
PEEK	– Polyetereterketon
PLA	– Polylactic acid (kyselina polymléčná)
PLGA	– Polylactic-co-glycolic acid (kopolymer polymléčné a glykolové kyseliny)
PLIF	– Posterior lumbar interbody fusion (zadní bederní meziobratlová fúze)
PLLA	– Poly L-lactic acid (kyselina L-polymléčná)
PMMA	– Polymethylmetakrylát
PRP	– Platelet rich plasma (krevní plazma obohacená o destičky)
Rh	– Rekombinantní humánní
RNA	– Ribonucleic <i>acid</i> (ribonukleová kyselina)
RT	– Reverse Transcriptase (reverzní transkriptáza)
RTG	– Rentgen/rentgenový
SEM	– Scanning electron microscopy (rastrovací elektronová mikroskopie)
SiCaP	– Silicate–substituted calcium phosphate (křemíkem nahrazený kalciumfosfát)
TCP	– Trikalcium fosfát
TEC	– Tissue engineering construct
TGF	– Transforming growth factor (transformující růstový faktor)
TLIF	– Transforaminal lumbar interbody fusion (transforaminální bederní meziobratlová fúze)
U-PLIF	– Unilateral posterior lumbar interbody fusion (unilaterální zadní bederní meziobratlová fúze)
USA	– United States of America (Spojené státy americké)
USD	– United States dollar (americký dolar)
VEGF	– Vascular endothelial growth factor (vaskulární endoteliální růstový faktor)

- VUT** – Vysoké učení technické
- XLIF** – Extreme lateral interbody fusion (extrémně laterální bederní meziobratlová fúze)
- ZEN** – ZEISS Efficient Navigation
- β -TCP** – β -trikalciumfosfát
- 3-D** – Trojrozměrný
- 6DOF** – Six degrees of freedom (šest stupňů volnosti)

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1 – Zobrazení Albeeho techniky kostní fúze.
- Obr. 2 – Chirurgické přístupy k bederní páteři pro vytvoření meziobratlové fúze.
- Obr. 3 – Kompozitní keramický skafold.
- Obr. 4 – Radiolucentní implantát pro přední cervikální fúzi.
- Obr. 5 – Klec s PEEK jádrem a titanovým integrovaným povrchem.
- Obr. 6 – Titanové 3-D tištěné implantáty.
- Obr. 7 – Obraz bioimplantátu (BNHI) z rastrovací elektronové mikroskopie
- Obr. 8 – Obraz bioimplantátu (BNHI) z rastrovací elektronové mikroskopie
- Obr. 9 – Srovnání trikortikálního štěpu odebraného z lopaty kosti kyčelní prasete a nově vyvinutého HBNI.
- Obr. 10 – Operační skupina 2 chirurgů, v pozadí je zobrazen instrumentující chirurg.
- Obr. 11 – Levostranný minilumbotomický přístup k operovanému segmentu L2–3 páteře.
- Obr. 12 – HBNI je uložen ve speciálním instrumentáriu připraven k implantaci.
- Obr. 13 – Pooperační boční RTG bederní páteře prasete.
- Obr. 14 – Operovaná experimentální prasata byla pooperačně observována v kóji.
- Obr. 15 – Vyobrazení průběhu RTG vyšetření bederní páteře v bočné projekci u experimentálního zvířete před provedením operačního zákroku.
- Obr. 16 – RTG bederní páteře v bočné projekci před a pooperačně.
- Obr. 17 – Mikro-CT zobrazení kvality kostěné fúze mezi obratli
- Obr. 18 – Testovací spinální simulátor Bionix (A) s fixovanou kadaverózní prasečí páteří.
- Obr. 19 – Detailní záběr upnutého vzorku páteře (nalevo) a vzorku páteře, u které došlo při ohybu k destrukci (napravo).
- Obr. 20 – Grafické znázornění průběhu ohybového momentu v závislosti na rotaci testovaného vzorku.

- Obr. 21 – Detail naskenovaného preparátu ze skupiny C1.
- Obr. 22 – Detailní informace ke skenu histopatologicky zpravového vzorku bederní páteře.
- Obr. 23 – Buněčná proliferace měřená pomocí kvantifikace DNA.
- Obr. 24 – Měření metabolické aktivity buněk pomocí MTS testu.
- Obr. 25 – Metabolická aktivita vztažená k hmotnosti buněčné DNA.
- Obr. 26 – Konfokální mikroskopie 1. den po nasazení buněk na nosič, barvení DiOC6.
- Obr. 27 – Konfokální mikroskopie, projekce penetrace buněk dovnitř nosičů.
- Obr. 28 – Relativní genová exprese RunX2 – časného markeru osteogenní diferenciaci.
- Obr. 29 – Imunofluorescenční barvení osteokalcinu.
- Obr. 30 – Autoptická fotografie znázorňuje detail L2–3 segmentu páteře zvířete ze skupiny A2 po 16 týdnech experimentu.
- Obr. 31 – Autoptická fotografie znázorňuje vytnutý segment páteře zvířete ze skupiny C2 v rozsahu Th15-L6.
- Obr. 32 – Detail autoptických vzorků páteří vybraných zástupců jednotlivých podskupin
- Obr. 33 – RTG bederní páteře v předozadní projekci, kde je patrné kompletní uvolnění a dislokace implantátu z obratlových těl L2 a L3.
- Obr. 34 – Závislost ohybového momentu na rotaci dle skupin.
- Obr. 35 – Grafické znázornění naměřených hodnot ohybových tuhostí pro jednotlivé podskupiny, včetně skupiny N.
- Obr. 36 – Porovnání ohybové tuhosti páteřních segmentů mezi podskupinami A1, A2; B1, B2; C1, C2.
- Obr. 37 – Porovnání ohybové tuhosti páteřních segmentů mezi podskupinami N, A1, B1, C1.
- Obr. 38 – Porovnání ohybové tuhosti páteřních segmentů mezi podskupinami N, A2, B2, C2.
- Obr. 39 – Mikro-CT zobrazení nativní páteře v segmentu L2–3. Intervertebrální prostor je vyplněn fyziologickou meziobratlovou ploténkou.

- Obr. 40 – Mikro-CT zobrazení segmentu L2–3 nativní páteře. Intervertebrální prostor je po excizi intervertebrálního disku vyplněn testovaným HBNI.
- Obr. 41 – Skupina A1 (n=6), sagitální mikro-CT řezy střední části 6 vzorků úseku L2–3 prasečích páteří.
- Obr. 42 – Skupina A2 (n=6), sagitální mikro-CT řezy střední části 6 vzorků úseku L2–3 prasečích páteří.
- Obr. 43 – Mikro-CT obraz RTG kontrastní rezistence přítomné perivertebrálně v obl. operovaného L2–3 segmentu páteře.
- Obr. 44 – Skupina B1 (n=6), sagitální mikro-CT řezy střední části 6 vzorků úseku L2–3 prasečích páteří.
- Obr. 45 – Skupina B2 (n=6), sagitální mikro-CT řezy střední části 6 vzorků úseku L2–3 prasečích páteří.
- Obr. 46 – Skupina C1 (n=6), sagitální mikro-CT řezy střední části 6 vzorků úseku L2–3 prasečích páteří.
- Obr. 47 – Skupina C2 (n=6), mikro-CT řezy střední části 5 vzorků úseku L2–3 prasečích páteří.
- Obr. 48 – Histologický řez vzorkem A1 v místě implantovaného kostního štěpu.
- Obr. 49 – Histologický řez vzorkem B1 v místě implantovaného HBNI.
- Obr. 50 – Histologický řez vzorkem C1 v místě implantovaného HBNI.
- Obr. 51 – Histologický vzorek ze skupiny C1.
- Obr. 52 – Histologický vzorek ze skupiny C2.
- Obr. 53 – Histologické obrazy zástupců z jednotlivých podskupin A1-C1 s označenou a změřenou plochou novotvorby kostěnné tkáně.
- Obr. 54 – Histologické obrazy zástupců z jednotlivých podskupin A2-C2 s označenou a změřenou plochou novotvorby kostěnné tkáně.

9 SEZNAM TABULEK

- Tab. 1 – Přehled tří generací biokeramiky.
- Tab. 2 – Náhrady kostní tkáně a jejich vlastnosti.
- Tab. 3 – Postup při barvení dekalifikovaného vzorku páteře.
- Tab. 4. – Výsledek barvení hematoxylin-eosin.
- Tab. 5 – Tabulka shrnující naměřené per a pooperační hodnoty délky operace, pooperačních krevních ztrát a doby do obnovení chůze.
- Tab. 6 – Naměřené hodnoty úhlu segmentální kyfózy operovaného úseku páteře v rozsahu L2–3.
- Tab. 7 – Vyjádření maximálního ohybového momentu testovaných páteří.
- Tab. 8 – Shrnutí dosaženého stupně intervertebrální fúze po 8 a 16 týdnech, dle jednotlivých podskupin.
- Tab. 9 – Výsledky histomorfologické analýzy.
- Tab. 10 – Přehled výsledků vybraných publikací, u kterých byla provedena lumbální intervertebrální fúze pomocí různých biomateriálů na zvířecích modelech.

10 SOUHRN POZNATKŮ HABILITAČNÍ PRÁCE

V předkládané experimentální studii byly provedeny in vitro testy, které vyloučily cytotoxicitu nově vyvinutého hybridního biodegradabilního nanokompozitního implantátu (HBNI), který je složen z biokeramiky, nanostrukturovaného kolagenu, oxycelulózy a byl obohacen o biogenní prvky, které implantát modifikovaly, a byly jimi termostabilní Fibroblast Growth Faktor 2 (FGF2-stab) a biogenní polyfosfát (bioPolyP).

Ověření biokompatibility implantátu, stejně tak jeho schopnosti úspěšně provést intervertebrální dězu (fúzi), bylo provedeno na zvířecím experimentálním modelu. Celkem bylo provedeno 36 operačních výkonů na experimentálních prasatech, které přinesly nadějně výsledky ve smyslu zlepšení výsledků lumbální intervertebrální fúze (LIF) ve skupině s použitým HBNI oproti kontrolní skupině s autologním kostním štěpem.

Na tomto místě předkládám výsledky experimentu, které by měly vést k redukci možných komplikací LIF v případě, že jako fúzovací agens je použit kostní štěp či inertní titanová nebo PEEKová klec. U obou modifikací HBNI se podařilo prokázat jejich schopnost osteokondukce i osteoindukce, na základě čehož došlo k úspěšnému průběhu kostní dězy meziobratlového prostoru L2–3 po 16 týdnech experimentu, kdy došlo i v případě HBNI s FGF2-stab k jeho kompletní resorbci.