

Hojení kritických kostních defektů trikalciemfosfátovým hydrogelem: hodnocení hydrogelu jako nosiče kmenových buněk a BMP-2

Healing of Critical-Size Bone Defects with Tricalcium Phosphate Hydrogel: Evaluation of Hydrogel as a Scaffold for Stem Cells and BMP-2

M. KORBEL^{1,2}, L. NOVOTNÝ², L. JANDOVÁ², P. ŠPONER^{1,2}

¹ Ortopedická klinika, Fakultní nemocnice Hradec Králové

² 2. Lékařská Fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Praha

ABSTRACT

PURPOSE OF THE STUDY

The preclinical study aimed to compare the healing of segmental bone defects treated with biodegradable hyaluronic acid and tricalcium phosphate-based hydrogel with the established autologous spongioplasty. Another aim was to evaluate the hydrogel as a scaffold for osteoinductive growth factor of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and stem cells.

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted in an in vivo animal model. A standardized rabbit model of a 15 mm long segmental bone defect of left radius was used. A total of 40 animals were divided into 5 groups of 8 individuals. In the KO- (negative control) group, the created defect was left to heal spontaneously. In the KO+ (positive control) group, the defect was filled with morselized bone autograft prepared from the resected segment. In the study group A, the defect was filled with hydrogel based on hyaluronic acid derivative and tricalcium phosphate. In the study group B, the defect was filled with hydrogel based on hyaluronic acid derivative, tricalcium phosphate and bone marrow aspirate. In the study group C, the defect was filled with hydrogel based on hyaluronic acid derivative, tricalcium phosphate, bone marrow aspirate and BMP-2. Healing was assessed using radiographs at 1, 6, and 12 weeks postoperatively and histology specimens were collected at 16 weeks postoperatively.

RESULTS

Altogether 35 rabbits survived (KO- 7, KO+ 7, A 7, B 6, C 8) until the end of the study. As concerns the radiographic assessment, the best results were achieved by the groups KO+ and C, where new bone formation across the entire width of the bone defect was clearly seen at 6 and 12 weeks and the osteotomy line was completely healed too. At 12 weeks, complete bone remodelling was observed in all animals in the group KO+, whereas in the group C, bone remodelling was fully completed in 5 animals and partially completed in 3 animals. In terms of histological assessment, however, the best results were achieved by the group C, where the bone defect was completely remodelled into lamellar bone in 7 specimens, while in 1 specimen it healed with bony callus formation. In the group KO+, the defect was healed in 4 specimens by cartilaginous callus with loci of remodelling into bony callus, in 2 specimens the bony callus was predominant with cartilaginous callus areas, and only one defect was completely remodelled into lamellar bone.

DISCUSSION

Compared to autografts that manifest osteogenic, osteoinductive and osteoconductive properties, the biodegradable hyaluronic acid and tricalcium phosphate-based hydrogel has osteoconductive properties only. Thus, it was also tested in our study as a scaffold for bone marrow cells and BMP-2 osteoinductive growth factor. Thanks to its semi-liquid properties, the biodegradable hyaluronic acid and tricalcium phosphate-based hydrogel is a promising material for use in 3D printing.

CONCLUSIONS

The preclinical study in an in vivo animal model confirmed the beneficial effect of the biodegradable hyaluronic acid and tricalcium phosphate-based hydrogel on the healing of critical-size segmental bone defects. Better healing of these defects was also confirmed for filling composed of hydrogel and BMP-2 osteoinductive growth factor. The benefit of bone marrow aspirate mixed with hydrogel was not confirmed.

Key words: bone defect, non-union, rabbit, hyaluronic acid, calcium phosphate, stem cells, BMP-2, scaffold, bone healing, spongioplasty.

ÚVOD

Kostní tkáň má unikátní schopnost regenerace. Tento regenerační potenciál se projevuje kontinuálně probíhající remodelací skeletu a také při hojení zlomenin (3). Kostní hojení je složitý proces, který tvoří interakce mnoha růstových faktorů, buněk a extracelulární matrix (8, 15). Tento proces lze ovlivnit na úrovni osteogeneze, osteoindukce nebo osteokondukce. Osteogenní materiály stimulují diferenciaci v osteoblasty a tím aktivně podporují tvorbu kosti. Osteoindukční cytokiny (BMP-2, BMP-7, rh-BMP-2) zase aktivují osteoblasty a tím urychlují kostní hojení (7, 9, 15, 18). Osteokondukční materiály (keramické materiály na bázi kalciumfosfátu, hydroxyapatity, hyaluronany) poskytují na molekulární úrovni mechanickou oporu pro kostní novotvorbu a také přitahují a vážou buňky s osteogenními schopnostmi (13). Do biomateriálu lze také přidat mezenchymální kmenové buňky, které se mohou dále diferencovat v osteoblasty. Dalšími důležitými faktory pro kostní hojení jsou mechanická stabilita kostního svalku a dobrá kvalita okolních měkkých tkání, která zajišťuje dostatečné krytí a dobré cévní zásobení (5, 17).

Kostní defekty vznikají nejčastěji v důsledku vysokoenergetických poranění, osteomyelitidy, resekce nádoru nebo jako vrozená vada (16, 19, 21). Pokud trauma přesáhne kritickou mez, kostní defekt se spontánně

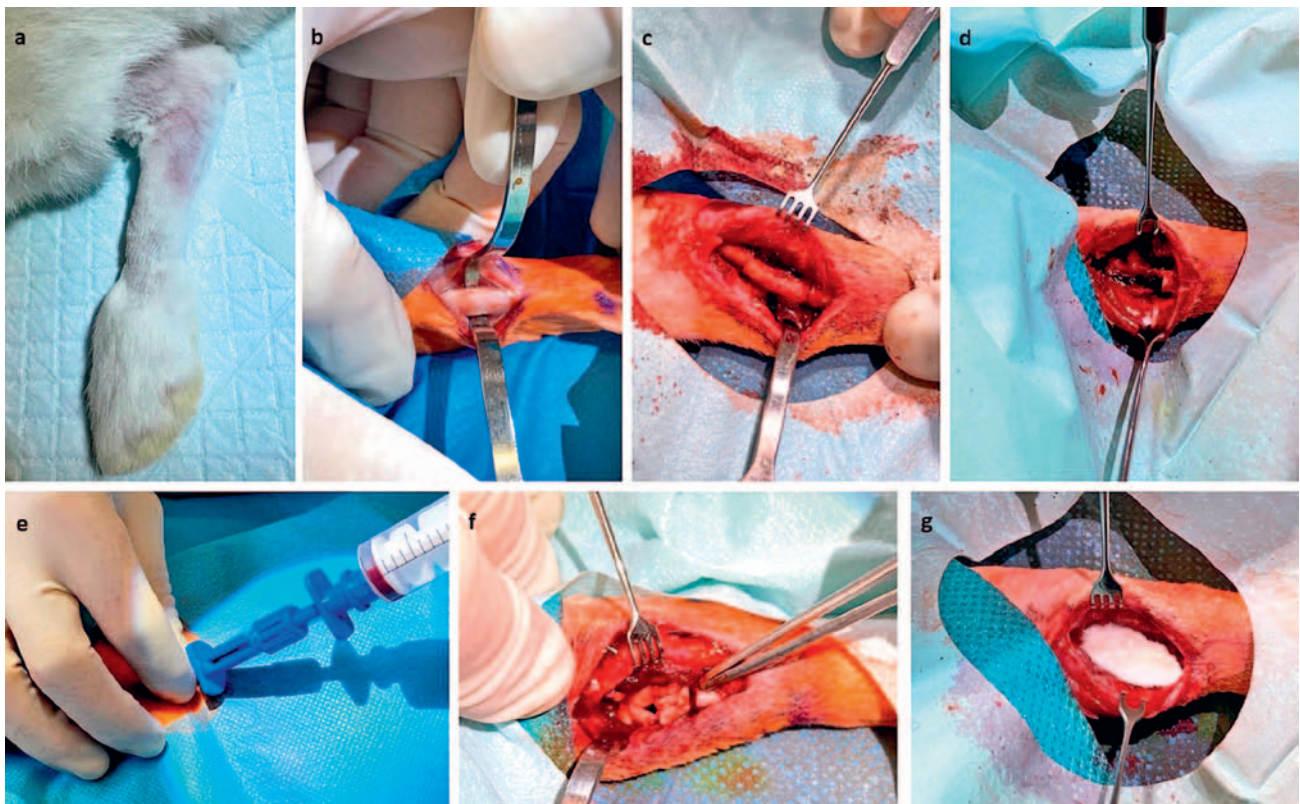
nezhojí. Termín kritický kostní defekt je definován jako poranění skeletu, které se nezhojí bez chirurgické intervence (2, 24).

Cílem naší preklinické studie je porovnání hojení segmentárních kostních defektů ošetřených biodegradabilním hydrogelem na bázi kyseliny hyaluronové a trikalciumpfosfátu se zavedenou technikou autologní spongioplastiky. Dalším cílem je zhodnocení hydrogelu jako nosiče osteoindukčního faktoru bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) a kmenových buněk přítomných v aspirátu kostní dřeně.

MATERIÁL A METODIKA

Experimentální zvířata

Studie byla prováděna na zvířecím modelu *in vivo*. Pokusnými zvířaty bylo 40 samic králíka kmene Novozélandský bílý. Jednalo se o standardizovaný králíčí model segmentárního kostního defektu radia. Se zvířaty bylo zacházeno šetrně v souladu se schváleným projektem pokusů podle § 16a zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů. Králíci byli ustájeni ve viváriu Lékařské fakulty v Hradci Králové. Po 2týdenní aklimatizaci byl na levém předloktí proveden operační zákrok. Věk králíků v době operace byl 14 týdnů a průměrná hmotnost 3,2 kg.



Obr. 1. Operační postup: a) oholená levá přední končetina; b) založení elevatorií kolem radia; c) stav po osteotomii radia; d) stav po odstranění kostního segmentu (skupina KO-); e) aspirace kostní dřeně z lopaty kosti kyčelní; f) výplň kostního defektu autoštěpy (skupina KO+); g) výplň defektu hydrogelem (skupina A).

Fig. 1. Surgical procedure: a) shaved left forelimb; b) insertion of elevators around the radius; c) status after the radial osteotomy; d) status after the bone segment removal (group KO-); e) aspiration of bone marrow from the iliac crest; f) filling of the bone defect with autografts (group KO+); g) filling of the bone defect with hydrogel (group A).

Operační postup

Předoperačně byla podána profylaktická dávka antibiotika enrofloxacinu (Enroxil 50 mg/ml v dávce 5 mg/kg s.c.). Zvířata byla po premedikaci medetomidinem (Domitor 1 mg/ml v dávce 0,3 mg/kg s.c.) uvedena do celkové anestezie ketaminem (Narkamon 100 mg/ml v dávce 25 mg/kg i.v.) a fixována na malý operační stůl v poloze na břiše. Operační pole bylo oholeno, dezinfikováno jodovaným povidonem (chirurgický roztok Betadine) a sterilně zarouškováno.

Podélný kožní řez délky 4 cm byl veden na dorzální straně levého předloktí ve vzdálenosti 2–6 cm od radio-karpálního kloubu (obr. 1). Fascie na dorzální straně předloktí byla podélně protnuta a kolem vřetení kosti byla založena elevatoria. Ve vzdálenosti 2,5–4 cm od radio-karpálního kloubu byl oscilační pilou vytnut kostní segment radia (včetně periostu a membrana interosea) délky 15 mm. Jako prevence termického poškození oscilační pilou bylo použito chlazení fyziologickým roztokem. Ponechaná loketní kost sloužila jako biologická dlaha. 40 zvířat bylo rozděleno do 5 skupin po 8 jedincích a segmentární defekt byl v jednotlivých skupinách ošetřen podle následujícího schématu:

Skupina KO- negativní kontrola (n=8). Vytvořený defekt byl ponechán spontánnímu hojení.

Skupina KO+ pozitivní kontrola (n=8). Vytvořený defekt byl vyplněn morselizovanými autoštěpy, které byly připraveny z resekovaného segmentu.

Skupina A (n=8). Vytvořený defekt byl vyplněn hydrogelem na bázi derivátu kyseliny hyaluronové 0,5 ml a trikalciumfosfátu 0,3 ml dle následujícího postupu. Roztok č. 1: Derivát kyseliny hyaluronové HA-CHO (Contipro) byl rozpuštěn v koncentraci 40 mg/ml ve fyziologickém roztoku. Roztok č. 2: Síťovací činidlo POA O,O'-1,3-propanediylbishydroxylalmine (Merck) byl rozpuštěn v koncentraci 0,8 mg/ml ve fyziologickém roztoku. Granule trikalciumfosfátu Poresorb 1–2 mm (Lasak) byly rozdrceny. Finální hydrogel byl připraven smícháním 0,25 ml roztoku č. 1 s 0,25 ml roztoku č. 2 a 0,3 ml trikalciumfosfátu.

Skupina B (n=8). Vytvořený defekt byl vyplněn hydrogelem na bázi derivátu kyseliny hyaluronové 0,4 ml, trikalciumfosfátu 0,15 ml a aspirátu kostní dřevě 0,25 ml dle následujícího postupu. Aspirát kostní dřevě byl získán punkcí hřebene lopaty kosti kyčelní. Granule trikalciumfosfátu o objemu 0,15 ml byly rozdrceny a smíchány s 0,25 ml aspirátu kostní dřevě, 0,2 ml roztoku č. 1 a 0,2 ml roztoku č. 2.

Skupina C (n=8). Vytvořený defekt byl vyplněn hydrogelem složeným z derivátu kyseliny hyaluronové 0,25 ml, trikalciumfosfátu 0,3 ml, aspirátu kostní dřevě 0,125 ml a BMP-2 proteinu 0,125 ml dle následujícího postupu. BMP-2 protein (Abbexa, UK) byl rozředěn ve fyziologickém roztoku na koncentraci 200 ug/ml. Granule trikalciumfosfátu o objemu 0,3 ml byly rozdrceny a smíchány s 0,125 ml BMP-2 (25 ug BMP-2), 0,125 ml aspirátu kostní dřevě a 0,25 ml derivátu kyseliny hyaluronové.

Po výplni segmentárního kostního defektu byla provedena sutura fascie Dafilon 3/0 a kůže Vicryl Rapid 3/0 stehy. Operační pole bylo dezinfikováno jodovaným povidonem a sterilně zakryto.

K tlumení pooperační bolesti byl ihned po operaci podán buprenorfin (Bupredine vet 0,3 mg/ml v dávce 0,05 mg/kg s.c.) v jednodenních intervalech po dobu 48 hodin a meloxicam (Meloxicam vet 5 mg/ml v dávce 0,6 mg/kg s.c.) v jednodenních intervalech po dobu 7 dnů. Králíci dále dostávali profylakticky antibiotika enrofloxacinu (Enroxil 50 mg/ml v dávce 5 mg/kg s.c.) v jednodenních intervalech po dobu 4 dnů. Po operaci byla sledována hmotnost zvířat, schopnost přijímat potravu, postoj, mobilita a stav operační rány.

Rentgenové vyšetření

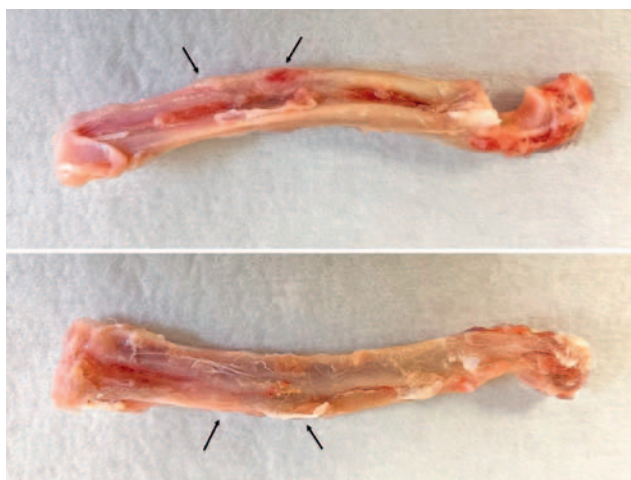
V 1., 6. a 12. týdnu od operace byl u všech zvířat proveden rentgen levé přední končetiny. Zvířata byla při rentgenu sedována medetomidinem (Domitor 1 mg/ml v dávce 0,15 mg/kg s.c.). Rentgenové snímky byly zaslepeny a ohodnoceny dvojicí pozorovatelů dle skórovacího systému Josepha Lane (tab. 1). Byla hodnocena novotvorba kosti, prohojení kostního defektu a remodelace kosti v 6. a 12. týdnu od operace. Výsledky hodnocení obou pozorovatelů byly zprůměrovány.

Tab. 1. Skórovací systém pro hojení segmentárního kostního defektu volně podle Josepha Lane (10). Hodnocena novotvorba kosti, prohojení defektu a remodelace kosti. Maximálním možným počtem bodů 12

Table 1. Scoring system to assess segmental bone defect healing based on the Joseph Lane scoring system (10). New bone formation, defect healing and bone remodelling were assessed. The maximum possible score was 12

Novotvorba kosti	
žádná novotvorba	0
kost tvoří 25% defektu	1
kost tvoří 50% defektu	2
kost tvoří 75% defektu	3
kost tvoří 100% defektu	4
Prohojení defektu	
patrná celá linie osteotomie	0
patrná část linie osteotomie	2
není patrná linie osteotomie	4
Remodelace kosti	
žádná remodelace kosti	0
remodelace nitrodřeň. kanálu	2
plná remodelace	4

Statisticky zpracovány byly výsledky rentgenového hodnocení všech skupiny v 6 a 12 týdnech od operace. Testovala se hypotéza shody mezi negativní kontrolou (KO-) a pozitivní kontrolou (KO+), dále hypotéza shody mezi negativní kontrolou (KO-) a testovanými skupinami (A, B, C), dále hypotéza shody mezi pozitivní kontrolou (KO+) a testovanými skupinami (A, B, C) a také hypotéza shody mezi jednotlivými testovanými



Obr. 2. Odebrané předloktí očištěné od měkkých tkání. Šipky znázorňují původní místo kostního defektu (skupina C).
Fig. 2. Resected forearm cleaned of soft tissue. The arrows show the original location of the bone defect (group C).

skupinami (A, B, C). Alternativní hypotézou bylo, že se skupiny se od sebe liší. Byla použita neparametrická Kruskalova-Wallisova analýza s post-hoc Dunnovým testem.

Histologické vyšetření

Po uplynutí 16 týdnů sledovaného období byla zvířata uvedena do celkové anestezie stejným protokolem jako při operaci. V celkové anestezii byla zvířata usmrčena intrakardiálně podaným pentobarbitalem (Pentobarbital sodium 1000 mg/ml v dávce 140,0 mg/kg). Levé předloktí bylo odebráno, očištěno od měkkých tkání a vloženo do 10% roztoku formaldehydu (obr. 2). Po dekalcifikaci v 10% kyselině mravenčí byly vzorky zpracovány klasickou parafínovou technikou a byly zhotoveny mikrořezy o tloušťce 5 μ m. Tyto řezy byly obarveny hematoxylin-eozinem (HE) a Massonovým trichromem (MT). Zaslepené vzorky byly hodnoceny certifikovaným veterinárním patologem pod světelným mikroskopem a digitalizovány.

VÝSLEDKY

Do konce studie přežilo 35 králíků (KO- 7, KO+ 7, A 7, B 6, C 8). Jeden králík uhynul při operaci v důsledku předávkování anestetiky. Dva králíci uhynuli v důsledku střevní dismikrobie při profylaktickém podávání antibiotik a to 3. a 7. den od operace. Dva králíci uhynuli 2. a 14. den po operaci z nejasné příčiny, ale byla u nich nalezena pneumonie a zánětlivé změny horních cest dýchacích, které se vyskytují u pasterelózy.

Byly zaznamenány také infekční komplikace, kdy se u dvou králíků ze skupiny A rozvinul absces v operační ráně. V jednom případě 10. pooperační den

a ve druhém 14. pooperační den. Absces byl evakuován a byla nasazena antibiotika enrofloxacin (Enroxil 50 mg/ml v dávce 5 mg/kg s.c.) po dobu 7 dnů bez dalších komplikací.

Výsledky rentgenového vyšetření

Pooperační rentgenové snímky byly zhotoveny 1. pooperační den a sloužily především ke kontrole pooperačního stavu. Byla hodnocena délka kostního defektu a umístění výplně. Ve všech případech byla délka vytvořeného defektu 15 mm. Segmentární defekt byl ve všech skupinách (A, B, C) vyplněn hydrogelem v celém rozsahu. Ve skupině A byl ve dvou případech viditelný únik části hydrogelu mimo kostní defekt. Ve skupině B (s nejmenším procentuálním podílem trikalciumpfosfátu) byla bezprostředně pooperačně pozorována nejnižší denzita provedené výplně. Nejvyšší denzita výplně hydrogelem byla ve skupině C (s vysokým procentuálním podílem trikalciumpfosfátu ve výplňové substanci) a ve skupině KO+, kde byla provedena výplň autoštěpy (obr. 3).

Rentgenové snímky v 6. a 12. týdnu byly hodnoceny dle skórovacího systému Josepha Lane.

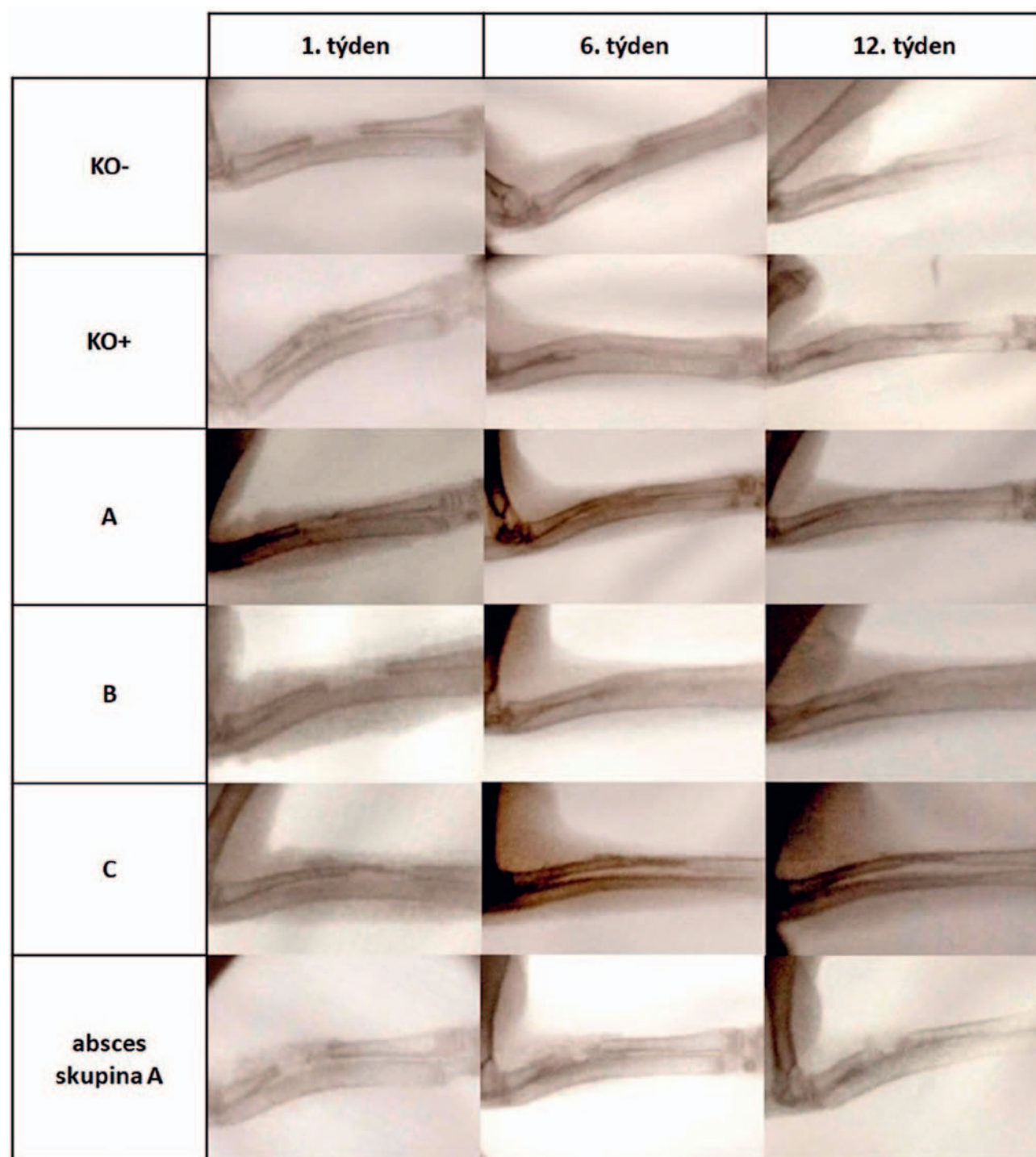
Ve skupině KO- nebyl defekt kosti zhojen v žádném případě v 6 ani 12 týdnech. V pěti případech byla patrná novotvorba kosti pouze při okrajích defektu. Průměrné hodnocení v 6 týdnech bylo 2,4 bodu a ve 12 týdnech 2,6 bodu.

Ve skupině KO+ byla novotvorba kosti patrná v 6 i 12 týdnech v plné šíři kosti, stejně tak linie osteotomie byla zcela prohojena u všech případů. Remodelace kosti byla v 6 týdnech ve většině případů částečná, ve 12 týdnech již kompletní. Průměrné hodnocení v 6 týdnech bylo 9,9 bodu a ve 12 týdnech 11,7 bodu.

Ve skupině A byly pooperační rentgeny značně heterogenní. V této skupině se u dvou králíků vyvinul v ráně absces, který se projevil kompletním neprohojením kostního defektu v 6 i 12 týdnech. V jednom dalším případě byl defekt kosti prohojen atrofickým svalkem. Ve čtyřech případech byl defekt zhojen v plné šíři kosti s částečnou remodelací v 6 týdnech a kompletní remodelací ve 12 týdnech. Průměrné hodnocení v 6 týdnech bylo 6,6 bodu a ve 12 týdnech 8,4 bodu.

Ve skupině B byly známky hojení opožděny. V 6 týdnech byl ve většině případů kostní defekt prohojen, ale remodelace kosti byla patrná až ve 12 týdnech. V jednom případě se kostní defekt prohojil atrofickým svalkem. Průměrné hodnocení v 6 týdnech bylo 6,8 bodu a ve 12 týdnech 9,2 bodu.

Ve skupině C byla novotvorba kosti patrná v 6 i 12 týdnech v plné šíři defektu, stejně tak linie osteotomie byla zcela prohojena ve všech případech. Na rentgenu však byly v 6 i ve 12 týdnech stále patrné partikule trikalciumpfosfátu, který se ne zcela resorboval. Přítomnost radiodenzních partikulí byla hodnocena jako neúplná remodelace kosti, což snižovalo dosažený výsledek rentgenového hodnocení. Průměrné hodnocení v 6. týdnu bylo 7,3 bodu a ve 12. týdnu 9,5 bodu.



Obr. 3. Vybrané rtg snímky předloktí jednotlivých skupin zobrazující kostní defekty v 1., 6. a 12. týdnu od operace.

Fig. 3. Selected radiographs of the forearms of each group showing bone defects at 1, 6 and 12 weeks postoperatively.

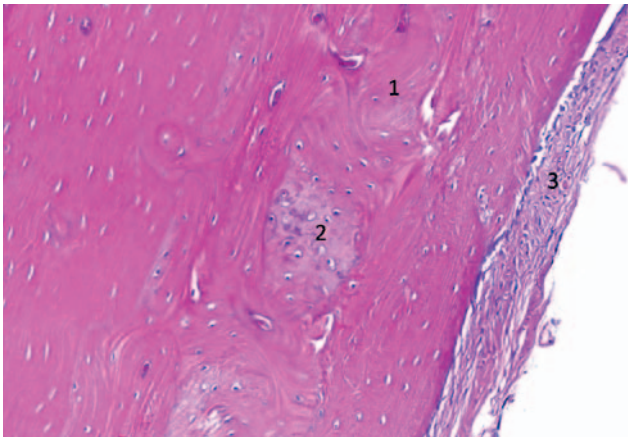
Statistické zpracování rentgenového hodnocení

Hypotéza shody mezi negativní (KO-) a pozitivní kontrolou (KO+) v 6 i 12 týdnech od operace byla zamítnuta ve prospěch pozitivní kontroly ($p \leq 0,001$), čímž byla prokázána funkčnost biologického modelu.

Hypotéza shody mezi negativní kontrolou (KO-) a testovanými skupinami (A, B, C) byla v 6 i 12 týdnech

ve všech případech zamítnuta ve prospěch testovaných skupin ($p \leq 0,05$). To prokazuje reparační schopnost biodegradibilního hydrogelu.

Hypotéza shody mezi pozitivní kontrolou (KO+) a testovanými skupinami (A, B, C) byla v 6 i 12 týdnech ve všech případech zamítnuta, ale tentokrát ve prospěch pozitivní kontroly ($p \leq 0,05$). Výsledky rentgenového hodnocení byly tedy nejlepší u pozitivní kontroly.



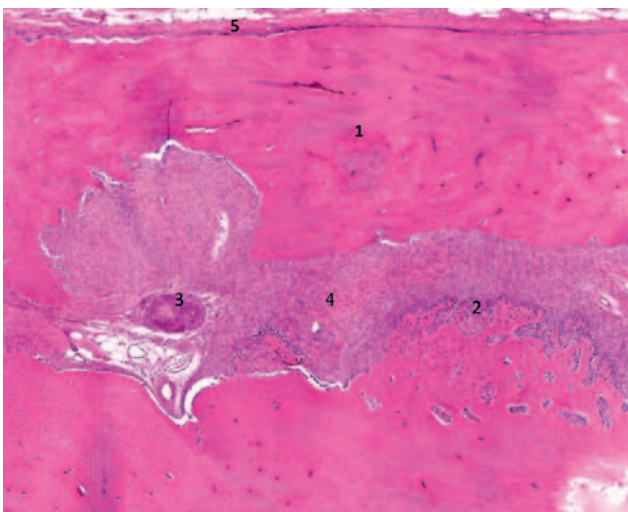
Obr. 4. Longitudinální řez kostním defektem – skupina A: 1. lamelární kost; 2. chrupavčitý svaček; 3. periost.
Fig. 4. Longitudinal section through the bone defect – group A: 1. lamellar bone; 2. cartilaginous callus; 3. periosteum.

Hypotéza shody mezi jednotlivými testovanými skupinami (A, B, C) nebyla v 6 i 12 týdnech zamítnuta. To znamená, že výsledky rentgenového hodnocení nebyly mezi testovanými skupinami statisticky významné.

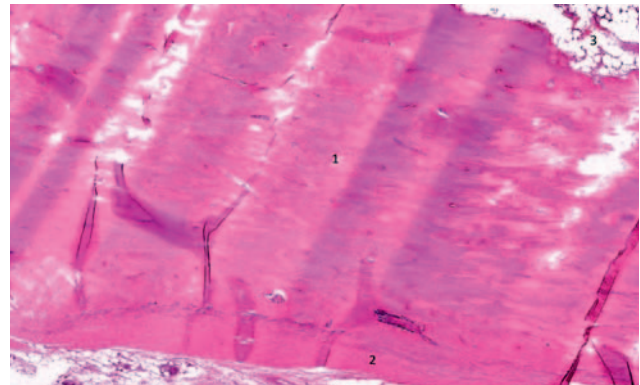
Výsledky histologického vyšetření

V histologických vzorcích byla hodnocena novotvorba kosti, míra prohojení defektu a zralost kostního svalu.

Ve skupině KO- nebyl kostní defekt zhojen v žádném případě. Ve všech 7 vzorcích byl kostní defekt vyplněn fibrózní nebo tukovou tkání. Z toho ve 3 vzorcích byl také nalezen pruh chondrogenní osifikace, který však zanikal ve fibrózní nebo tukové tkáni.



Obr. 5. Longitudinální řez kostním defektem – skupina B: 1. lamelární kost; 2. ložisko fibrózní osifikace; 3. ložisko granulomatózního zánětu; 4. fibrózní svaček; 5. periost.
Fig. 5. Longitudinal section through the bone defect – group B: 1. lamellar bone; 2. fibrous ossification locus; 3. granulomatous inflammation locus; 4. fibrous callus; 5. periosteum.



Obr. 6. Longitudinální řez kostním defektem – skupina C: 1) lamelární kost; 2) periost; 3) dřevná dutina.
Fig. 6. Longitudinal section through the bone defect – group C: 1. lamellar bone; 2. periosteum; 3. medullary cavity.

Ve skupině KO+ byl kostní defekt zhojen ve všech případech. Jeden vzorek byl kompletně prohojen remodelovanou lamelární kostí, ve 2 vzorcích byl defekt zhojen kostěným svačkem s okrsky chrupavčitého svalu a ve 4 vzorcích bylo místo defektu zhojeno převážně chrupavčím svačkem s ložisky přestavby do kostěného svalu.

Ve skupině A byl ve 2 vzorcích defekt kompletně prohojen remodelovanou lamelární kostí, ve 2 vzorcích byl defekt prohojen remodelovanou lamelární kostí s okrsky kostěného a chrupavčitého svalu (obr. 4) a ve 3 vzorcích byl nalezen granulomatózní zánět přecházející do periostu a defekt nebyl zcela prohojen. Jednalo se o dvojici králíků se známým abscesem a o králíka s atrofickým svačkem na rentgenu.

Ve skupině B byl defekt ve 2 vzorcích kompletně prohojen remodelovanou lamelární kostí, ve 2 vzorcích byl defekt zhojen remodelovanou lamelární kostí s okrsky fibrózního a chrupavčitého svalu a drobným ložiskem granulomatózního zánětu (obr. 5) a ve 2 vzorcích byl granulomatózní zánět a defekt nebyl zcela prohojen. Jednalo se o králíky s atrofickým svačkem na rentgenu, u kterých se zánět klinicky neprojevil.

Ve skupině C byl kostní defekt zhojen ve všech případech a zralost kostního svalu byla nejpokročilejší. V 7 vzorcích byl kostní defekt zhojen remodelovanou lamelární kostí (Obr. 6) a v 1 případě kostěným svačkem. Ve vzorcích se stále nacházely ne zcela rezorbované partikule trikalciemfosfátu.

DISKUSE

Pro studii jsme použili standardizovaný králíčí model segmentárního kostního defektu radia délky 15 mm (1, 6, 17). Minimální délka kostního defektu, který se přirozeně nezahojí, je stanovena na 14 mm (25).

Hlavním cílem preklinické studie bylo porovnání hojení segmentárních defektů vyplněných biodegradabilním hydrogelem s hojením defektů ošetřených morselizovanými autoštěpy. Autoštěpy jsou dosud považo-

vány za zlatý standard léčby kostních defektů pro své osteogenní, osteoindukční i osteokondukční vlastnosti. Biodegradabilní hydrogel byl složen z derivátu kyseliny hyaluronové, který zajišťoval potřebné tekuté vlastnosti a poskytoval médium pro reparační procesy a trikalciumfosfátu, který dodal osteokondukční vlastnosti. Hydrogel jsme také testovali jako nosič buněk s osteogenním potenciálem, tedy mezenchymálních kmenových buněk z kostní dřeně a jako nosič osteoindukčního faktoru BMP-2. Kombinací trikalciumfosfátu s autologními kmenovými buňkami jsme již dříve prokázali schopnost zhojit kostní defekt v remodelované kosti (20). BMP-2, jako silný osteoindukční cytokin, aktivuje osteoblasty, osteoklasty i adipocyty. Několik klinických studií ukázalo i jeho vedlejší účinky (4,7). Aktivace osteoblastů sice vede k tvorbě kosti, ve vyšších koncentracích však způsobuje tvorbu kosti v ektopických lokalitách. Aktivované osteoklasty mohou vést k osteolýze a aktivované adipocyty se mohou projevit tvorbou kostních cyst. BMP-2 také iniciuje uvolnění prozánětlivých cytokinů a interleukinů. To může v prozánětlivé fázi kostního hojení vést k zánětlivým a raným komplikacím (8, 14, 21, 22). I přes tyto komplikace je BMP-2 hojně využíván ve spondylochirurgii a maxilofaciální chirurgii. Bylo prokázáno, že keramické materiály jako kalciumfosfáty mají vysokou afinitu k BMP-2 (12, 24). Walsh porovnal dynamiku uvolňování BMP-2 keramického hydroxyapatitového a kolagenového skafoldu. Zatímco u keramického skafoldu se v prvních 5 dnech uvolnilo 30 % a ve 30 dnech 60 % BMP-2, u kolagenového skafoldu se v prvních 5 dnech uvolnilo 70–80 % a ve 30 dnech 88 % BMP-2 (23). Keramické materiály tedy optimalizují uvolňování BMP-2. Tímto lze minimalizovat prozánětlivý efekt v časně fázi kostního hojení, zatímco zvýšíme koncentraci BMP-2 ve fázi kostní novotvorby. Koncentrace vázaného BMP-2 na keramické materiály u králičího modelu se v jednotlivých studiích dosti liší v rozmezí od 6 ug/ml až přes 100 ug/ml (10, 11). K přípravě našeho hydrogelu jsme použili koncentraci 31 ug/ml a vedlejší účinky BMP-2 jsme nezaznamenali.

Ve skupině KO⁻, která reprezentovala negativní kontrolu, nedošlo na rtg snímcích ke zhojení ani ve 12 týdnech a ve všech vzorcích byl defekt vyplněn fibrózní nebo tukovou tkání. To prokázalo, že kostní defekt je kritický, tedy že se spontánně nezhojí.

Ve skupině KO⁺, která reprezentovala autologní spongioplastiku, byl výsledek rtg hodnocení v 6 i ve 12 týdnech statisticky významně nejlepší ($p \leq 0,05$). Kostní defekt byl zhojen v celé šíři zhojen, linie osteotomie zaniklá a kost byla ve 12 týdnech kompletně remodelována. V testované skupině C byl kostní defekt také zhojen v celé šíři kosti a linie osteotomie zcela zaniklá, přítomnost radiodenzních partikulí trikalciumfosfátu však byla hodnocena jako neúplná remodelace kosti, což negativně ovlivnilo výsledek rtg hodnocení. Výsledek histologického hodnocení naopak dopadl nejlépe ve skupině C, kde i přes přítomnost partikulí trikalciumfosfátu bylo 7 vzorků zhojeno remodelovanou lamelární kostí

a jen jeden vzorek kostěným svalkem. Ve skupině KO⁺ byl defekt zhojen remodelovanou lamelární kostí pouze v jednom případě, zatímco u dalších vzorků byl zhojen svalkem s nižším stupněm zralosti. Vysoký stupeň zralosti svalu ve skupině C přikládáme osteogenním schopnostem BMP-2.

Ve skupinách A i B byl u několika vzorků nalezen granulomatózní zánět, který devalvoval výsledky rtg i histologického hodnocení. Zánět v místě kostního svalu vedl k odpálení nebo degradaci kostní výplně. Skupina B (oproti skupině A) byla obohacena o aspirát kostní dřeně s kmenovými buňkami. Výsledky rentgenového hodnocení však nebyly mezi skupinami A a B statisticky významné. Stejně tak výsledky histologického hodnocení byly u obou skupin podobné, a to i ve vzorcích, kde se granulomatózní zánět nevyskytl. Přidání aspirátu kostní dřeně do hydrogelu tedy nevedlo k požadovanému účinku. Schopnost hydrogelu vázat kmenové buňky z aspirátu kostní dřeně se nám tedy prokázat nepodařilo. Příčinou vysokého výskytu granulomatózního zánětu ve skupinách A a B mohla být vysoká viskozita připravených hydrogelů, které sice dokázaly výborně vyplnit kostní defekt, při následné sutuře fascie a podkoží ovšem ulpívaly na šicím materiálu a mohly být cestou pro vstup bakterií z vnějšího prostředí. Ve skupině C měl hydrogel mnohem vyšší podíl trikalciumfosfátu, což výrazně zvýšilo hustotu hydrogelu. V důsledku toho již nedocházelo k jeho ulpívání na šicím materiálu a infekční komplikace se zde nevyskytly. Nepotvrdily se také obavy, že prozánětlivý efekt BMP-2 by mohl vést k infekčním komplikacím. To mohlo být ovlivněno vysokou afinitou BMP-2 k trikalciumfosfátu a jeho postupným uvolňováním. Výsledky rentgenového hodnocení skupiny C sice nebyly v porovnání s dalšími testovanými skupinami statisticky významně lepší, ale při histologické hodnocení dopadla skupina C bezpečně nejlépe.

ZÁVĚR

Provedenou preklinickou studií na zvířecím modelu *in vivo* byl prokázán příznivý vliv biodegradabilního hydrogelu na bázi kyseliny hyaluronové a trikalciumfosfátu na hojení kriticky velkých segmentárních kostních defektů. Dále bylo prokázáno lepší hojení při výplni defektu hydrogelem v kombinaci s osteoindukčním faktorem BMP-2. Nebyl prokázán přínos aspirátu kostní dřeně po jeho smísení s hydrogelem. Za hlavní výhodu biodegradabilního hydrogelu považujeme vysokou prostorovou tvárnost, čímž se materiál stává příslibem pro využití v 3D tisku.

Literatura

1. Beck A, Woods S, Lansdowne JL, Arens D. The effects of multiple high-resolution peripheral quantitative computed tomography scans on bone healing in a rabbit radial bone defect model. *Bone*. 2013;56:312–319.
2. Bezstarosti H, Metsemakers WJ, van Lieshout EMM, Voskamp LW, Kortram K, McNally MA, Marais LC, Verhofstad

- MHJ. Management of critical-sized bone defects in the treatment of fracture-related infection: a systematic review and pooled analysis. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2021;141:1215–1230.
3. ElHawary H, Baradaran A, Abi-Rafeh J, Vorstenbosch J, Xu L. Bone healing and inflammation: principles of fracture and repair. *Semin Plast Surg.* 2021;35:198–203.
 4. Epstein NE. Complications due to the use of BMP/INFUSE in spine surgery: the evidence continues to mount. *Surg Neurol Int.* 2013;4(Suppl 5):S343–S352.
 5. Fröhlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobnic M, Vunjak-Novakovic G. Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2008;3:254–264.
 6. Geiger F, Lorenz H, Xu W, Szalay K, Kasten P. VEGF producing bone marrow stromal cells (BMSC) enhance vascularization and resorption of a natural coral bone substitute. *Bone.* 2007;41:516–522.
 7. James AW, LaChaud G, Shen J, Asatrian G, Nguyen V, Zhang X, Ting K, Soo C. A review of the clinical side effects of bone morphogenetic protein-2. *Tissue Eng Part B Rev.* 2016;22:284–297.
 8. Jeon MJ, Kim JA, Kwon SH, Kim SW, Park KS, Park SW, Kim SY, Shin CS. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts. *J Biol Chem.* 2003;278:23270–23277.
 9. Kathami N, Moreno-Vicente C, Martín P, Vergara-Arce JA, Ruiz-Hernández R, Gerovska D, Aransay AM, Araújo-Bravo MJ, Camarero-Espinosa S, Abarrategi A. rhBMP-2 induces terminal differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells only by synergizing with other signals. *Stem Cell Res Ther.* 2024;15:124.
 10. Kim J, Lee S, Choi Y, Choi J, Kang BJ. Sustained release of bone morphogenetic protein-2 through alginate microbeads enhances bone regeneration in rabbit tibial metaphyseal defect model. *Materials (Basel).* 2021;14:2600.
 11. Kim JS, Cha JK, Cho AR, Jung UR. Acceleration of bone regeneration by BMP-2-loaded collagenated biphasic calcium phosphate in rabbit sinus. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015;17:1103–1113.
 12. Konishi T, Honda M, Nagaya M, Nagashima H, Thian ES, Aizawa M. Injectable chelate-setting hydroxyapatite cement prepared by using chitosan solution: fabrication, material properties, biocompatibility, and osteoconductivity. *J Biomater Appl.* 2017;31:1319–1327.
 13. Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am.* 1987;18:213–225.
 14. Liu J, Chen L, Zhou Y, Liu X, Tang K. Insulin-like growth factor-1 and bone morphogenetic protein-2 jointly mediate prostaglandin E2-induced adipogenic differentiation of rat tendon stem cells. *PLoS One.* 2014;9:e85469.
 15. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury.* 2011;42:551–555.
 16. Mo Z, Xu F, Cao J, Dou Q, Wang J. Research advances of nano-materials for the acceleration of fracture healing. *Bioact Mater.* 2024;31:368–394.
 17. Niemeyer P, Szalay K, Luginbühl R, Südkamp NP, Kasten P. Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model. *Acta Biomater.* 2010;6:900–908.
 18. Sandler AB, Scanaliato JP, Raiciulescu S, Nesti L, Dunn JC. Bone morphogenic protein for upper extremity fractures: a systematic review. *Hand.* 2023;18:80–88.
 19. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc.* 2012;7:1918–1929.
 20. Šponer P, Kučera T, Brtková J, Urban K, Kočí Z, Měřička P, Bezrouk A, Konrádová Š, Filipová A, Filip S. Comparative study on the application of mesenchymal stromal cells combined with tricalcium phosphate scaffold into femoral bone defects. *Cell Transplant.* 2018;27:1459–1468.
 21. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* 1999;20:345–357.
 22. van Houdt CIA, Koolen MKE, Lopez-Perez PM, van Houdt CIA, Koolen MKE, Lopez-Perez PM, Ulrich DJO, Jansen JA, Leeuwenburgh SCG, Weinans HH, van den Beucken JJJP. Regenerating critical size rat segmental bone defects with a self-healing hybrid nanocomposite hydrogel: effect of bone condition and BMP-2 incorporation. *Macromol Biosci.* 2021;21:e2100088.
 23. Walsh DP, Raftery RM, Chen G, Heise A, O'Brien FJ, Cryan SA. Rapid healing of a critical-sized bone defect using a collagen-hydroxyapatite scaffold to facilitate low dose, combinatorial growth factor delivery. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;13:1843–1853.
 24. Yuan H, Zou P, Yang Z, Zhang X, De Bruijn JD, De Groot K. Bone morphogenetic protein and ceramic-induced osteogenesis. *J Mater Sci Mater Med.* 1998;9:717–721.
 25. Zhao MD, Huang JS, Zhang XC, Gui KK, Xiong M, Yin WP, Yuan FL, Cai GP. Construction of radial defect models in rabbits to determine the critical size defects. *PLoS One.* 2016;11:e0146301.

Korespondující autor:

MUDr. Martin Korbel
Ortopedická klinika
Fakultní nemocnice Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
E-mail: martin.korbel@fnhk.cz