

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Adéla Tesařová

Regenerace kosti a její analýza
Bone regeneration and its analysis

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: RNDr. Mária Hovořáková, Ph.D

Praha, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 27. 4. 2022

.....

Tesařová Adéla

Poděkování

Děkuji své školitelce RNDr. Márie Hovořákové, Ph.D. za trpělivost, čas a cenné rady při vedení této bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině a přítelovi za podporu během studia a při psaní této práce.

Abstrakt

Regenerace kostí může probíhat celý život jako přirozený proces (remodelace) nebo na základě traumatu, kdy dochází k hojení zlomenin, u kterých je poškozená nebo chybějící část nahrazovaná novou tkání.

Cílem mé bakalářské práce bylo vytvořit literární rešerši k problematice kostní regenerace. Úvodní část se věnuje kosti jako takové – její stavbě a procesu novotvorby (osifikaci) a remodelace. Následující část popisuje některé z metod používaných k podpoře regenerace kostní tkáně při terapii – vybrané typy nosičů a také molekul, které v regeneraci hrají důležitou roli a jsou součástí používaných nosičů či terapií. V závěru práce jsou popsány základní metody používané k analýze kostní regenerace a poskytují nám pohled na úspěšnost testovaných terapeutických přístupů, jak dobře se kost hojí a jak jsou tedy použité metody efektivní.

Bakalářská práce byla zpracována formou literární rešerše.

Klíčová slova: kost, regenerace kostí, scaffold, analýza kostí

Abstract

Bone regeneration can take place throughout life as a natural process (remodeling) or because of trauma when fractures heal in which the damaged or missing part is replaced by new tissue.

The aim of my bachelor thesis was to create a literature search on the issue of bone regeneration. The introductory part deals with the bone as such - its structure and the process of new formation (ossification) and remodeling. The following section describes some of the methods used to support bone regeneration in therapy - selected types of carriers and molecules that play an important role in regeneration and are part of the carriers or therapies used. At the end of the thesis, the basic methods used to analyze bone regeneration are described and provide us with an insight into the success of the tested therapeutic approaches, how well the bone heals and how effective the methods used are.

The bachelor thesis was processed in the form of a literary search.

Key words: bone, bone regeneration, scaffold, bone analysis

Obsah

1	Úvod.....	3
2	Kost	4
2.1	Stavba kosti	4
2.2	Kostní tkáň	6
2.2.1	Primární kost.....	6
2.2.2	Sekundární kost	6
2.3	Haversův systém	7
3	Osifikace.....	8
3.1	Intramembránózní osifikace, desmogenní	8
3.2	Endochondrální osifikace, chondrogenní.....	9
4	Regenerace kostí	10
4.1	Remodelace kosti	10
4.2	Procesy při hojení kostí.....	10
4.3	Metody terapeutické regenerace kostí v medicíně.....	11
4.3.1	Regenerace kostí s použitím kostních štěpů	11
4.3.2	Regenerace kosti s použitím syntetických biomateriálů a scaffoldů	11
4.3.3	Regenerace kosti s využitím nosičů s kyselinou hyaluronovou	12
4.3.4	Regenerace kosti s využitím fibrinových nosičů	13
4.3.5	Regenerace kostí za pomoci mezenchymálních kmenových buněk.....	14
4.3.6	Regenerace kostí za pomoci parathormonu	15
4.3.7	Neinvazivní metody regenerace kostí.....	15
5	Analýza regenerace kostí.....	16
5.1	Analýza pomocí mikro-CT	16

5.2	Histomorfometrická analýza	18
5.3	Imunohistochemická analýza	19
6	Závěr.....	21
7	Seznam použité literatury	23

Seznam použitých zkratek

ALN – alendronát sodný

ANOVA – analýza rozptylu

CT – počítačová tomografie

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

HA – kyselina hyaluronová

IHC – imunohistochemie

LIPUS – ultrazvuk s nízkou intenzitou

MSCs – mezenchymální kmenové buňky

MSNs – mezoporézní nanočástice oxidu křemičitého

OC – osteokalcin

OPN – osteopontin

Osx – osterix

PCL – polykaprolakton

PEMF – pulzní elektromagnetické pole

PG – polykaprolakton-želatina

PLGA – kyselina poly(mléčná-ko-glykolová)

PTH – parathormon

Runx2 – runt-related transkripční faktor 2

TCP – trikalciumfosfát beta

TGF – transformující růstový faktor

2D – dvourozměrný

3D – trojrozměrný

1 Úvod

I když jsou kosti velmi pevnou tkání, jsou zároveň velice křehké, a mohou tak být v průběhu života vystaveny situacím, při kterých dochází ke zraněním, která končí zlomeninou či jiným defektem. A ačkoli v těle fungují přirozené procesy, které k hojení zlomeniny vedou, někdy je defekt natolik rozsáhlý, že jen tyto procesy nestačí. V takovém případě přicházejí na řadu metody, které regeneraci kostí podporují a celkově tak urychlují proces hojení (některé z popsaných metod mohou být kromě řešení traumat využity například i v případě osteoporózy).

V centru zájmu této práce bylo popsat v jednotlivých kapitolách relativně široké spektrum metod v současnosti dostupných pro terapii kostních defektů se zaměřením na jejich úspěšnost v kostní regeneraci a léčbě. Je zde zmíněna regenerace pomocí kostních štěpů, scaffoldů, ale i regenerace založená na specifických molekulách, které jsou součástí nosičů, a tedy i součástí regenerační terapie. Často zmiňované jsou v této části právě nosiče neboli scaffoldy, které se kombinují s různými aditivami (molekuly, látky přidávané k nosičům). Těch je široké spektrum, takže v práci byly zmíněny jen vybrané pro vytvoření základní představy problematiky. Okrajově jsou zde zmíněny i metody neinvazivní.

Před samotnou regenerací je v práci nejprve popsána kost jako taková. Její nejdůležitější stavební komponenty, jejich uspořádání, struktura a v neposlední řadě i tvorba kostí – osifikace.

Závěrečná část shrnuje základní metody používané k analýze regenerace kostí při testování využívaných terapeutických přístupů, které poskytují informace o tom, jak dobře se kost hojí a jak jsou tedy použité metody terapie z hlediska následné regenerace efektivní a úspěšné. Cílem předložené práce je kompilačně zpracovat problematiku kostní regenerace a její následnou analýzu.

2 Kost

2.1 Stavba kosti

Kostní hmota se skládá z jednotlivých buněk a mezibuněčné hmoty. Buňkami kostní hmoty jsou osteoblasty, osteocyty a osteoklasty. První zmíněné – osteoblasty a osteocyty - vznikají z osteoprogenitorových buněk (mezenchymální původ). Oba typy buněk se po svém vzniku téměř nedělí, ale mohou se zpětně proměnit opět v osteoprogenitorové buňky, což zajišťuje vysokou plasticitu kostní tkáně. Když jsou osteoblasty zcela obklopeny základní hmotou, mění se v osteocyty (Ross a Pawlina, 2011).

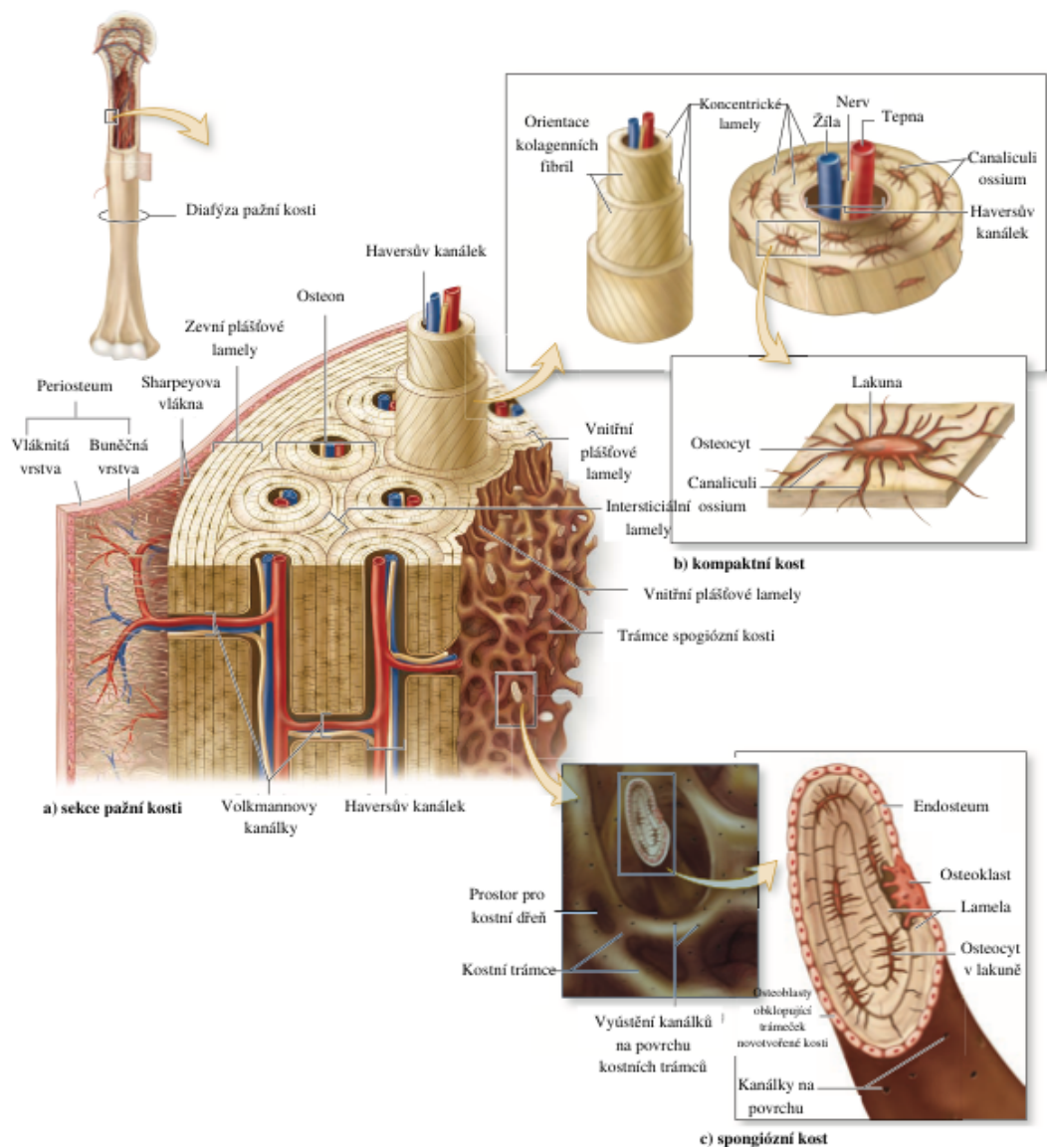
Osteoklasty vznikají z monocytů a jsou to velké, mnohojaderné buňky, které zajišťují odbourávání kostní hmoty pomocí proteolytických enzymů. Jsou schopny aktivního pohybu, ale většinou jsou uloženy v Howshipových lakunách (dutiny resorbované matrix). Jejich aktivita je řízena hormonálně, přičemž parathormon je aktivuje a kalcitonin inhibuje, zároveň je jejich aktivita ovlivněna i osteoblasty (Janqueira a kol., 1997).

Mezibuněčná hmota kostní tkáně se skládá z anorganické a organické části. Organická část je produktem osteoblastů, ty syntetizují a mezi buňky ukládají základní organickou hmotu kosti (vlákna kolagenu I, glykoproteiny, proteoglykany). Sem jsou následně ukládány i anorganické (minerální) látky (sloučeniny vápníku a fosforu v podobě krystalků, krystaly hydroxyapatitu pevně navázané na kolagenní vlákna, uhličitany, citráty a stopové prvky), které v kosti ale nejsou uloženy trvale, jsou v řízeném režimu uvolňovány a doplňovány. Anorganická složka ve spojení s kolagenem zajišťuje specifické vlastnosti kosti – tvrdost, pevnost a zároveň pružnost (Grim a Druga, 2001).

Mezibuněčná anorganická hmota tvoří 65 % hmotnosti kosti a způsobuje její tvrdost. Vápenaté anorganické soli představují největší zásobárnu vápníku v těle (asi 99 %). V dětství je v kosti mnoho kolagenních vláken, proto je kost pružná. Ve stáří převažují minerální látky, kost je tedy tvrdší, ale zároveň křehčí (Novotný a Hruška, 2002).

Povrch kosti (s výjimkou míst, kde se připojují vazy nebo šlachy a u hranice kloubů) kryje periost neboli okostice (obr. 1). Je to tuhý, pevný vazivový obal, který je

do kosti zakotven vazivovými úponovými vlákny - Sharpeyova vlákna. Má dvě vrstvy: zevní fibrózní a vnitřní kambiovou. Fibrózní vrstvu tvoří svazky kolagenních vláken a fibroblasty. Kambiová vrstva obsahuje vazivové a osteogenní buňky, mnoho cév a nervy, které zajišťují citlivost periostu (bolest). Dělí se zde osteogenní buňky, které se diferenciují v osteoblasty, ty zajišťují tvorbu nových lamel, které se vytvářejí pod okosticí. Periost má také velký význam v obnově kosti při hojení zlomenin. Další vazivovou vrstvou je endost, který se v mnoha ohledech podobá periostu, ale na rozdíl od něj kryje vnitřní povrch kostních dutin – výstelka dřevné dutiny, Volkmannových a Haversových kanálků (obr. 1). Je složen z jedné vrstvy oploštělých osteoprogenitorových buněk (Janqueira a kol., 1997).



Obr. 1 Stavba kosti (Převzato z Mescher, 2018)

Na dlouhé kosti můžeme rozlišit dvě části – diafýzu a epifýzu. Diafýza je střední válcovitá část, z velké části je tvořena kostí kompaktní a je zde jen malá příměs spongiózy, která hraničí s dřevnou dutinou. Zatímco epifýza je část koncová, rozšířená, součástí kloubního spojení. Ta je na povrchu kompaktní (tenká vrstva), ale uvnitř houbovitá (spongiózní). Krátké kosti mají spongiózní jádro obklopené kompaktní, ploché kosti lebeční klenby jsou tvořeny dvěma lamelami kompakty, které jsou od sebe odděleny vrstvou spongiózní kostní tkáně. (Bartoníček a Heřt, 2004)

Dutiny spongiózní kosti a prostor v diafýzách dlouhých kostí obsahují kostní dřev – ta je dvojího typu: červená, ve které se tvoří krvinky, a žlutá, která obsahuje především tukové tkáně (Čihák, 2016).

2.2 Kostní tkáň

Existují 2 varianty kostní tkáně, primární, nezralá neboli vláknitá a sekundární, zralá neboli lamelární, která může být spongiózní či kompaktní (Mescher, 2018), jak již bylo uvedeno výše.

2.2.1 Primární kost

Primární kost se objevuje již v embryonálním vývoji a potom při hojení zlomenin či remodelačních procesech. Kolagenní vlákna jsou zde náhodně rozložena. Je dočasná a v dospělosti je až na výjimky nahrazena kostí sekundární. Zmíněnými výjimkami jsou např.: oblast lebečních švů, zubní alveoly a úpony některých šlach. Je zde nižší obsah minerálů (což způsobuje, že je lépe propustná pro rentgenové záření) a vyšší zastoupení osteocytů než u kosti sekundární. Obecně má nižší mechanickou odolnost (Grim a Druga, 2001).

2.2.2 Sekundární kost

Sekundární kosti tvoří převážnou část dospělého skeletu. Na rozdíl od kosti primární jsou zde kolagenní vlákna uspořádaná organizovaně v lamelách, které jsou buď paralelně nebo koncentricky kolem cévy, v jednotlivých lamelách jsou kolagenní vlákna uspořádaná rovnoběžně. U kompaktní kosti jsou lamely uspořádány do vrstev/osteonů kolem cévy = Haversův systém (obr. 1). Osteocyty jsou uloženy mezi lamelami v komůrkách zvaných lakuny (Novotný a Hruška, 2002).

2.3 Haversův systém

Haversův systém neboli osteon je komplex koncentrických lamel obklopujících endostem vystlaný kanál s krevními cévami, nervy a řídkým vazivem (obr. 1). Hlavním úkolem je přivádět do kompaktní tkáně živiny (proto tyto kanály nejsou přítomny ve spongiózní kosti, kde mohou živiny volně difundovat z okolních kapilár). Haversovy systémy jsou rovnoběžné s osou diafýzy. Průměr kanálků je variabilní. Systém se vytváří ukládáním lamel směrem od periferie, takže mladší systémy mají kanálky větší. Haversovy kanálky komunikují s dřevnou dutinou, s periostem i samy mezi sebou prostřednictvím Volkmannových kanálků. Ty vznikly tak, že cévy periostu buď napříč nebo šikmo prorazily kost. Volkmannovy kanálky tedy nejsou obaleny koncentrickými lamelami, ale prostupují jimi. Oba typy kanálků – jak Haversovy, tak Volkmannovy – propojují všechny buňky v kosti a zásobují je živinami (Slípka a Tonar, 2018).

3 Osifikace

Tvorba kostí neboli osifikace probíhá dvěma způsoby. Buď na podkladě vaziva = desmogenní neboli intramembránózní osifikace - přímou mineralizací mezenchymálního blastému, nebo na podkladě chrupavčité hmoty = endochondrální osifikace - ukládání kostní matrix na předem vytvořenou matrix chrupavky (Dylevský, 2009).

V obou případech vzniká nejdříve kost primární neboli vláknitá, která je následně nahrazena kostí sekundární neboli lamelózní. Primární kost je na některých místech těla již definitivní podobou a dále se nevyvíjí/nepřeměňuje – jedná se např. o skelet středoušní dutiny (labyrint), drsnatiny na kostech, kam se upíná sval. Sekundární kost vzniká přestavbou z kosti primární. Na rozdíl od vláknité kosti je pružnější, pevnější a nosnější. Tvorba kosti neprobíhá v celém základu současně, ale vychází z osifikačních center. Počet center závisí na typu vznikající kosti. Např. u dlouhé kosti se nacházejí tři osifikační centra – jedno v diafýze a dvě v epifýzách. V diafýze začíná osifikace ještě před narozením. V oblasti epifýz dochází k osifikaci až po narození. Kost roste do délky díky vrstvě chrupavky (růstová chrupavka), která zůstává mezi diafýzou a epifýzami (Mescher, 2018).

3.1 Intramembránózní osifikace, desmogenní

Odehrává se uvnitř kondenzátů mezenchymové tkáně (zahuštěné embryonální vazivo, tzv. mezenchymový blastém), kde je počáteční bod osifikace, nazývaný jako primární osifikační centrum. Celý proces začíná diferenciací osteogenních buněk v osteoblasty podél kapilár, poté následuje tvorba osteoidu a kalcifikace, což vede k obklopení některých osteoblastů vytvořenou matrix. Takto opouzdřené osteoblasty se potom mění v osteocyty. Ostrůvky takto vzniklé kostní tkáně označujeme jako spikuly neboli trámce. Vazivem mezi kostními trámcí prorůstají krevní cévy a další nediferencované elementy mezenchymu, které jsou zdrojem buněk kostní tkáně. Ta část vazivové vrstvy, která nepodléhá osifikaci pak u membránózních kostí dává vzniknout endostu a periostu. Tímto způsobem se vytváří většina plochých kostí (klenba lebeční, obličej), dále je tak přispíváno k růstu krátkých kostí a k růstu dlouhých kostí do šířky (Lüllmann-Rauch, 2012).

3.2 Endochondrální osifikace, chondrogenní

Odehrává se uvnitř hyalinní chrupavky, respektive na jejím základě – tvar chrupavčitého modelu připomíná tvar definitivní kosti. Dochází k ukládání osteoblastů na zvápenatělou matrix hyalinní chrupavky, která je ale současně odbourávána. Má dvě fáze – nejdříve dochází k hypertrofii (zvětšení) a resorpci chondrocytů chrupavčitého modelu – ty po sobě zanechají rozšířené lakuny oddělené septy zvápenatělé chrupavkové matrix. K hypertrofii chondrocytů dochází na základě tvorby kostěné manžety, která znemožňuje výživu chrupavky, ta totiž není vaskularizovaná a vyživuje se pouze difúzí z okolních cév. V druhé fázi do opuštěných prostor po degenerujících chondrocytech pronikají osteogenní pupeny. Ty sestávají z osteoprogenitorových buněk a krevních kapilár. Osteoprogenitorové buňky diferencují v osteoblasty, které vytvářejí kostní matrix na zbytcích zvápenatělé základní hmoty chrupavky, která je resorbována chondroklasty. Uplatnění tohoto typu osifikace především u dlouhých a krátkých kostí, kostí báze lebeční a kostí páteře a hrudníku (Dylevský, 2019).

4 Regenerace kostí

K procesu kostní regenerace nedochází jen na základě traumatu, kdy je nahrazována chybějící nebo poškozená kostní tkáň novou (hojení zlomenin), ale může probíhat po celý život jako přirozený proces, na základě zátěže (remodelace) (Zhai a kol., 2020).

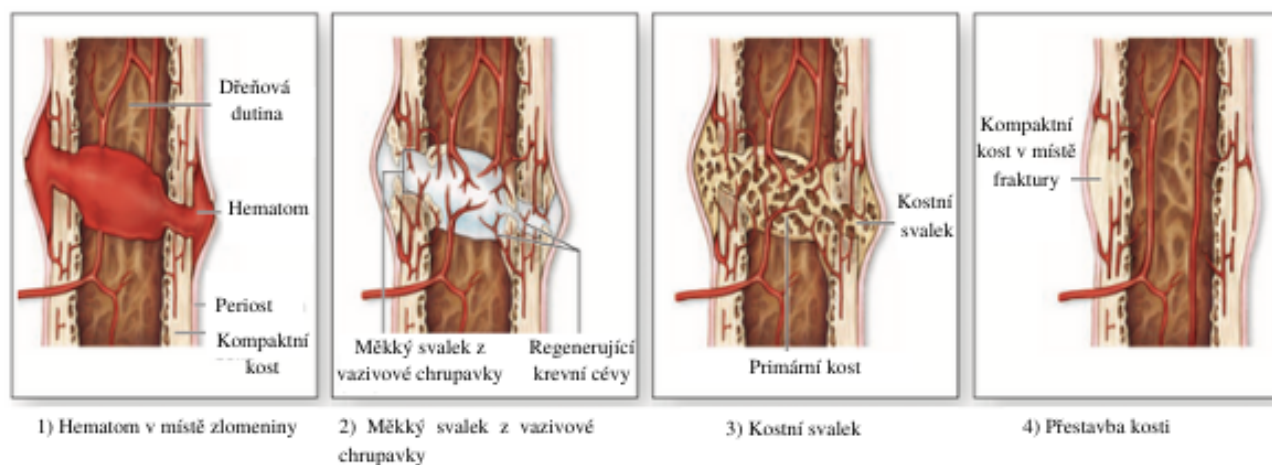
4.1 Remodelace kostí

Již vytvořená kost podléhá neustálé přestavbě. Remodelace kostí je výsledkem dynamické rovnováhy mezi jednotlivými buňkami kostní tkáně, které podněcují vytváření zásob vápníku (osteoblasty a osteocyty), a buňkami, které vyvolávají rozklad (osteoklasty) proteolytickými enzymy – ty jsou schopné rozpustit krystalky solí a rozložit kolagenová vlákna. Kostní tkáň tedy neustále roste, ale zároveň se i rozpadá (Bartoníček a Heřt, 2004). Zjednodušeně jde o protichůdné procesy: osteoklasty odstraňují části kosti a osteoblasty tato místa nahrazují novou tkání. Dochází k tomu na základě zatížení kosti. Tímto způsobem jsou odstraňovány drobná poškození a je tak udržována určitá kvalita kostní tkáně. Remodelace má také podíl na metabolismu vápníku a fosfátu. Mezi regulátory remodelace můžeme zařadit estrogen, androgeny, parathormon, kalcitonin a další (Raggatt a Partridge, 2010).

4.2 Procesy při hojení kosti

Oprava kosti v místě traumatu má několik fází: tvorbu hematomu, zánětlivou fázi, tvorbu granulační tkáně, tvorbu kalusu a remodelaci (obr. 2). Po zlomenině je narušena okolní tkáň a cévní integrita. Je vytvořen hematoma, který spustí zánětlivou reakci - začnou se shlukovat neutrofilny produkující imunokompetentní látky (chemokiny), které dále rekrutují další součásti zánětu jako jsou monocyty a makrofágy. Vedou k získávání kmenových buněk a fibroblastů, ty po akutním zánětu přispívají k hojení. V pozdní fázi zánětu se tvoří měkký svalek z chrupavčité a fibrinózní matrix (chondrocyty a fibroblasty diferencované z progenitorových buněk). Svalek je jakousi dočasnou mechanickou podporou tkáně. Následuje proces podobný chondrogenní osifikaci - resorpce chrupavčité matrix a apoptóza chondrocytů. Chrupavčitý svalek je postupně nahrazován mineralizovanou tkání - tvrdý kalus (mineralizovaný kolagen I - vylučován osteoblasty), který se nakonec transformuje do lamelární struktury. Popsaný proces neprobíhá samovolně, ale je řízen na základě mnoha signálních drah. Výsledkem zlomeniny je také

lokální hypoxické prostředí tvořící se po zánětlivé fázi, díky němuž se vytvoří granulační tkáň vytvořená neorganizovanou extracelulární matrix (Zhai a kol., 2020).



Obr. 2: Proces hojení zlomeniny (Převzato z Mescher, 2018)

4.3 Metody terapeutické regenerace kostí v medicíně

V případech, kdy přirozené procesy hojení kostních defektů nestačí, musí medicína sáhnout po metodách, které hojení podpoří.

4.3.1 Regenerace kostí s použitím kostních štěpů

V mnoha případech je poškození tkáně tak rozsáhlé, že nestačí spontánní regenerace a kosti samotné nejsou schopny se plně uzdravit. V tu chvíli přichází na řadu řešení jako autogenní nebo alogenní kostní štěpy či použití syntetických biomateriálů (Noori a kol., 2017).

Použití autogenních štěpů vyžaduje jejich dřívější odběr z jiné nepoškozené kosti pacienta. Nejčastěji bývá štěp odebrán z hřebene kyčelního kloubu a následně transplantován na poškozené místo. U alogenních štěpů dárce není pacient sám, což s sebou může nést mnoho rizik jako například odhojení štěpu (Pape a kol., 2010).

4.3.2 Regenerace kosti s použitím syntetických biomateriálů a scaffoldů

S pokrokem techniky přichází pokrok i v oblasti regenerace kostí. Nové terapeutické přístupy v oblasti tkáňového inženýrství umožnily zkonstruování různých biologických lešení/nosičů (scaffold) umožňujících efektivnější hojení zlomenin. K jejich vytvoření mohou být použity nejrůznější biomolekuly, které ale musí splňovat mnoho základních kritérií pro správnou funkci. Musí např.: být biokompatibilní, biologicky

odbouratelné, musí usnadňovat buněčnou penetraci a vrůstání kostí, poskytovat biomechanickou podporu – dokud nedojde k úplné regeneraci. Dále je důležité, aby materiály byly snadno dostupné (i ekonomicky) a snadno manipulovatelné (Noori a kol., 2017).

Tyto metody jsou používány za předpokladu, že normální proces hojení kosti není možný, nebo je nějakým způsobem nedostatečný či narušený – např.: u velkých kostních defektů při traumatu - a to jako doplněk či alternativa kostního štěpu, jehož odběr by v tomto případě musel být rozsáhlejší (v závislosti na velikosti defektu) a mohl by tak ohrozit dárce (autologní štěp) (Dimitriou a kol., 2011).

Scaffolds neboli nosiče/lešení jsou používanou metodou tkáňového inženýrství. Jejich vlastnosti závisí na zvoleném biomateriálu a obecně jsou navrhovány tak, aby co nejvíce napodobily strukturu přirozené kostní tkáně. Aby bylo podpůrné lešení použitelné, musí splňovat mnoho kritérií. V první řadě musí být biochemicky a topograficky kompatibilní, aby umožňovalo infiltraci osteoprogenitorových buněk (jako například mezenchymálních kmenových buněk). Dále nesmí žádným způsobem blokovat normální buněčnou aktivitu včetně buněčné signalizace a nesmí vyvolávat nežádoucí reakce hostitele. Po vykonání svého „úkolů“ musí být vhodnou rychlostí degradováno a to tak, aby degradované materiály nijak neškodili vnitřnímu prostředí a byly schopny metabolizace a eliminace. V neposlední řadě jsou nutné jeho vhodné mechanické vlastnosti – jako pružnost, pevnost. Všechny tyto kritérií je dosaženo zvolením vhodných materiálů, jejichž nabídka se v posledních letech rozrůstá (Park a kol., 2018).

4.3.3 Regenerace kosti s využitím nosičů s kyselinou hyaluronovou

Kyselina hyaluronová (HA) je přirozeně součástí extracelulární matrix a v posledních letech je hojně aplikována v problematice regenerace kostí. Slouží jako součást lešení (scaffoldu), do kterého jsou vysety další buňky v rámci regenerační terapie. To je možné díky mnoha specifickým vlastnostem HA: antiadhezivita, antimikrobiální účinky, interakce s povrchovým markerem CD44 (díky tomu usnadňuje migraci mezenchymálních kmenových buněk), specifické povrchové receptory. Sama o sobě HA nemá velký vliv na osteogenezi, ten přichází až po kombinaci s dalšími molekulami a materiály, bylo ale dokázáno, že vysokomolekulární HA výrazně urychluje tvorbu kosti.

HA je k tvorbě lešení neboli scaffoldů kombinovaná s anorganickými složkami, jako je fosforečnan vápenatý, kolagen, hydroxyapatit atd. Ty zlepšují osteoinduktivitu – jsou zde předem vytvořená krystalická jádra, která zvyšují srážení minerálních iontů a tím usnadňují hojení kostí. Každý scaffold má specifické vlastnosti. Jako příklad můžeme uvést „biosklo“, jedná se o kombinaci kolagenu (Co), kyseliny hyaluronové a fosfatidylserinu, který slibně podporuje osteogenezi, zároveň je ale relativně tuhý a zároveň křehký, což způsobuje jeho sníženou tvarovatelnost, která je pro regeneraci kostí podstatná (Zhai a kol., 2020).

4.3.4 Regenerace kosti s využitím fibrinových nosičů

Možným prostředkem v regeneraci kostí může být použití biokompatibilního fibrinu. Ten se ve tkáních přirozeně vyskytuje a poskytuje podporu pro následnou buněčnou adhezi, migraci, proliferaci a diferenciaci buněk, vytváří tedy jakýsi dočasný skelet k podpoře hojení a remodelace tkáně (Noori a kol., 2017).

Fibrinové sraženiny účastníci se hojení ran, jsou v závěru své funkce rozpuštěny, aby se zabránilo možné trombóze. To se děje aktivací fibrinolýzy, jejímž hlavním enzymem je plazmin, jehož prekursor plazminogen cirkuluje v krvi. Dochází ke štěpení fibrinu na specifických místech a produkty štěpení jsou uvolněny do krve (Kolev a Machovich, 2003).

Studie ukázaly, že fibrin není schopen sám o sobě vyléčit kostní defekty, proto je nutné ho smíchat s dalšími složkami (kostní štěpy, osteoinduktivní biomateriály, osteogenní buňky, bioaktivní molekuly) (Van der Stok a kol., 2015).

Výhodou fibrinu je možnost získání od pacienta samotného - z krve, kde se vyskytují prekuzory fibrinu (fibrinogen a trombin). Fibrinová lepidla jsou ale vyráběna i komerčně na základě umělé výroby. Fibrinová lepidla se připravují z krevní plazmy. Ta je buď od jednoho dárce (autologní nebo alogenní) nebo komerčně vyráběná. Obojí s sebou přináší řadu výhod i nevýhod. Lepidla od jednoho dárce jsou na rozdíl od komerčních levnější a jsou také bezpečnější, pokud se jedná o autologní plazmu, není zde riziko přenosu viru. Mezi kladné stránky komerčních lepidel patří jejich standardizovaná kvalita (naopak u fibrinu od dárce je mezi jednotlivými šaržemi variabilita), dále vysoká pevnost v tahu a dostupnost, zároveň je u nich ale snížená bioaktivita (Noori a kol., 2017).

K izolaci fibrinogenu se používá několik metod jako např.: chemické srážení ethanolem nebo síranem amonným (Abiraman a kol., 2002).

Fibrin se v regeneraci kostní tkáně používá ve formě kuliček, mikrokuliček, krycích činidel nebo jsou injikovány fibrinové hydrogely. Fibrinové kuličky jsou syntetizovány mícháním směsi fibrinogenu a trombinu při 65-75 °C po dobu 6-8 hodin v oleji. Poté je skladován jako suchý prášek (Gurevich a kol., 2002).

Fibrin sám o sobě nemá příliš dobré mechanické vlastnosti, a proto se někdy používá jako krycí činidlo, kdy je potahován na mechanicky stabilnější materiály - kovy, polymery, biokeramika (Noori a kol., 2017).

4.3.5 Regenerace kostí za pomoci mezenchymálních kmenových buněk

Mezenchymální kmenové buňky (MSCs) jsou takové buňky, které jsou schopny diferencovat se do mnoha buněčných typů, mezi něž patří i buňky kostní (osteocyty), ale třeba i chrupavkové a tukové. Lze je izolovat z mnoha typů tkání, např.: pupečník, kostní dřev, tuková tkáň, a dalších. Kromě diferenciačního potenciálu mají ještě imunomodulační vlastnosti, čímž ovlivňují přirozenou i adaptivní složku imunity a to z důvodu produkce mnoha typů imunologických molekul, jako jsou například cytokiny (Kobolak a kol., 2016).

Pozitivní roli MSCs v regeneraci kostní tkáně potvrzuje mimo jiné Bruder a kol. (1998). Ve výzkumu byly odebrány MSC z lidské kostní dřev, kultivovány a následně vloženy na připravený keramický scaffold. Ten byl dále implantován do dospělých athymických potkanů s defektem stehenní kosti. Pro porovnání byly do určité skupiny potkanů implantovány i scaffoldy bez MSCs. Následně byly potkani v různých týdnech léčby usmrceni a hojící se defekty byly porovnány pomocí mnoha testů (radiologie, imunohistochemie a další), což nakonec dokázalo, že MSCs mohou regenerovat kost a umožňují tak poskytnout alternativu k autogenním kostním štěpům. Podobné závěry byly dokázány i na frakturách holenní kosti u myši ve výzkumech dle Granero-Moltó a kol. (2009).

4.3.6 Regenerace kostí za pomoci parathormonu

Parathormon (PTH) je hormonem příštítných tělísek. Je lineárním polypeptidem o celkové délce 84 aminokyselin. Jeho funkcí je regulace homeostázy vápníku v těle a hraje důležitou roli v metabolismu kostí (Stárka a Zamrazil, 2005).

Celkový potenciál parathormonu v hojení kosti ještě není zcela objasněn, ale na základě mnoha studií na zvířecích modelech je jeho role nepopiratelná. Z výzkumů na myších a potkanech autorů Tsunori a kol. (2015), Milstrey a kol. (2017) a dalších jasně vyplynulo, že denní lokální podávání parathormonu (pomocí scaffoldů) do místa defektu kosti významně napomáhá regeneraci, začlenění štěpu či fixaci implantátu. Dle výzkumu Milstrey a kol. (2017) bylo prokázáno, že PTH v závislosti na dávce stimuluje tvorbu kosti u myší. Hojení zlomenin vychází z působení na více typů buněk, čímž dochází nejen k ovlivnění tvorby kostí, ale i přestavbě osteoklastického kalusu (Wojda a Donahue, 2018).

Výzkum Tsunori a kol. (2015) ukazuje na fakt, že v hojení lebky u potkanů záleží na dávce injikovaného PTH. Čím vyšší je dávka, tím více a rychleji se kost formuje. Je tedy důležité najít množství PTH, které by pro hojení kostních defektů u člověka mělo nejlepší možné výsledky.

Zatím se parathormon využívá také k léčbě osteoporózy neboli řídnutí kostí - onemocnění kostí, které často vede ke zlomeninám, protože je narušena stavba kosti (Neer a kol., 2001).

4.3.7 Neinvazivní metody regenerace kostí

Kromě výše zmíněných lze jako doplněk léčby použít i několika neinvazivních přístupů, které regeneraci kostí stimulují. Mezi ně řadíme například ultrazvuk s nízkou intenzitou (LIPUS) a pulzní elektromagnetická pole (PEMF) (Dimitriou a kol., 2011).

Dle Schofer a kol. (2010) věnujících se zlomeninám holenní kosti LIPUS může urychlit hojení. Podobně i Busse a kol. (2002) uvádí, že doba do zhojení zlomeniny byla při použití ultrazvuku nízké intenzity významně kratší než u kontrolních skupin.

5 Analýza regenerace kostí

Pro vyhodnocení účinnosti jednotlivých metod regenerace kostí zejména při jejich experimentálním testování je potřeba adekvátně zvolená analýza. Některé její možné způsoby budou rozebrány v následujících kapitolách. V analýzách regenerace kostí se sleduje mnoho parametrů, jako například: objem nové kosti (objem části segmentované jako kost), procentuální objem kosti (poměr objemu segmentované kosti k celkovému objemu v oblasti), hustota povrchu kosti (poměr povrchu segmentované kosti k celkovému objemu v oblasti), hustota tkáňových minerálů a obsah kostních minerálů (Lee a kol., 2021).

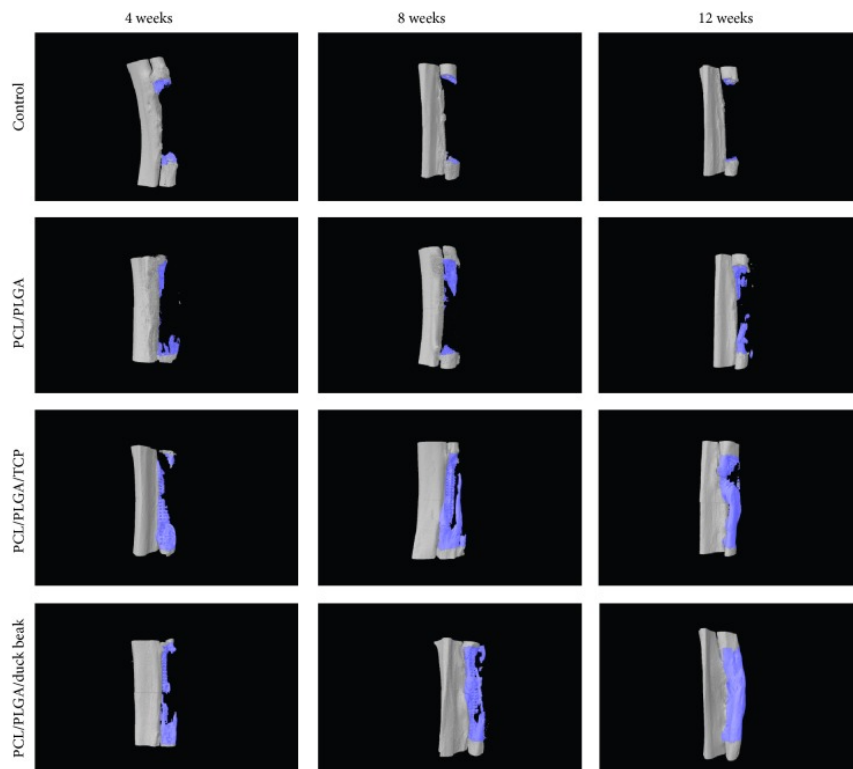
Naměřené parametry jsou dále podrobeny statistickým analýzám. V tomto kroku jsou veškerá naměřená data shromážděna a jsou z nich vyjádřeny různé statistické veličiny (Shi a kol., 2019).

Ve většině studií se pro vizualizaci kostní regenerace používá radiologie, pro kvantifikaci mikro-CT, k popisu mikroarchitektury histologie či histomorfometrie a k barvení a detekci struktur (jako jsou třeba krevní cévy) se používá imunohistochemie s protilátkami (Bissinger a kol., 2016).

5.1 Analýza pomocí mikro-CT

Mikro-CT neboli mikrotomografie je jednou z metod, která se v analýze kostní regenerace využívá. Jedná se o neinvazivní zobrazovací metodu, která umožňuje vizualizovat strukturu sledované oblasti, a to v takovém rozlišení, které žádnou jinou neinvazivní metodou nelze dosáhnout – práce na úrovni jednoho mikronu, což je tisícina milimetru, a menší. Mikro-CT skenery vytváří 2D snímky pomocí rentgenových paprsků (mnoho 2D snímků s různým pootočením), a ty jsou následně pomocí speciálních softwarů zpracovány do 3D modelů. Výhodami této metody jsou nedestruktivita (skenovaný vzorek se během testování nijak nezmění ani nezničí), časová efektivita a možnost přímé analýzy 3D modelu. Naopak, jako záporné lze označit vysokou závislost na zpracování obrazových dat a v neposlední řadě vysokou pořizovací cenu (Bartoš, 2018).

Použití mikro-CT k analýze regenerace kostí můžeme ukázat na příkladu studie Lee a kol. (2016), na modelu králíka. Cílem této studie bylo prozkoumat schopnost hojení u kostních defektů diafýzy levého radia za použití syntetických materiálů v různém složení – kombinace čtyř typů materiálů: PCL (polykaprolakton), PLGA (kyselina poly(mléčná-ko-glykolová)), TCP (trikalciumfosfát beta) a kachní zobák, který byl použit jako alternativa xenogenní kosti - je totiž nákladově efektivní a snadno dostupný ve velkém množství, protože se nepoužívá jako potrava či krmivo pro zvířata, ani jako hnojivo. Pro tyto účely byl rozemlet na mikroprášek a použit jako keramický biomateriál. Králíci byly tedy rozděleny do čtyř skupin: skupina 1 – kontrolní (bez přidání lešení), skupina 2 – hybridní scaffoldy PCL/PLGA, skupina 3 – hybridní scaffoldy PCL/PLGA/TCP a skupina 4 – hybridní scaffoldy PCL/PLGA/kachní zobák. V určitých intervalech po implantaci (4, 8 a 12 týdnů) byly vždy 4 králíci z každé skupiny usmrceni a defekty byly podrobeny analýze pomocí mikro-CT. Z mikro-CT snímků (obr. 3) je patrné, jak hojení kosti v jednotlivých případech probíhá. Lze z nich usoudit, že k nejvýznamnějšímu zhojení došlo u králíků, kterým bylo implantováno hybridní lešení PCL/PLGA/kachní zobák.

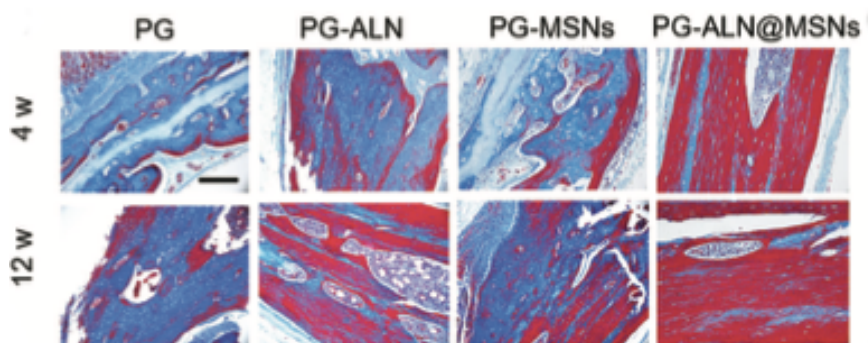


Obr. 3: Snímky mikro-CT kostního defektu levého radia. (Převzato z Lee a kol.,2016)

5.2 Histomorfometrická analýza

Histomorfometrická analýza je rutinní metoda a probíhá metodicky vždy velmi podobně. Liší se v podstatě jen použitými látkami v jednotlivých krocích nebo jejich koncentrací. Zpracování vzorku je značně časově náročné a celá příprava trvá řádově týdny. Zhotovení histologického preparátu vhodného pro morfometrickou analýzu má svou posloupnost a jednotlivé kroky jsou vždy prováděny ve stejném pořadí – fixace, zalití, krájení, barvení. U kostních preparátů přibývá ještě krok dekalifikace, tedy odvápnění. Prvním krokem je fixace vzorku, která probíhá nejčastěji v paraformaldehydu a trvá 24 - 48 hodin. Po fixaci je nutná dehydratace, pro kterou je použit ethanol. Následuje odvápnění, které se nejčastěji provádí za použití EDTA (kyseliny ethyldiamintetraoctová) nebo jiné kyseliny – např.: kyseliny mravenčí, v závislosti na potřebách dalšího zpracování. Tento krok je v celém procesu nejdelší, trvá několik týdnů (doba závisí na použité kyselině a její koncentraci). Vzorek je potom zalit do parafínu, aby se vytvořil bloček, ze kterého se následně nakrájí plátky o velikosti v řádech mikrometrů. Aby na řezu byly rozeznatelné jednotlivé struktury, je nutné ještě řezy obarvit. To se provádí typicky přehledným barvením hematoxylinem a eosinem, případně jinými barvicími metodami, jako například Massonovými trichomy, které specificky barví kolagen. Po obarvení struktur už je možno jednotlivé řezy pozorovat, a to nejčastěji pomocí světelného mikroskopu. Jednotlivé obrázky jsou nakonec analyzovány pomocí nejrůznějších softwarů (Image Pro, SigmaScan Pro, a další) (Zhang a kol., 2017, Shi a kol., 2019, Wang L. a kol., 2019).

Massonovo barvení (zde modrý trichom) se běžně používá k určení zralosti kostní tkáně. Zralá kost je zbarvena do jasně červené, zatímco kost nezralá je modře (obr.4) (Wang Y. a kol., 2019).



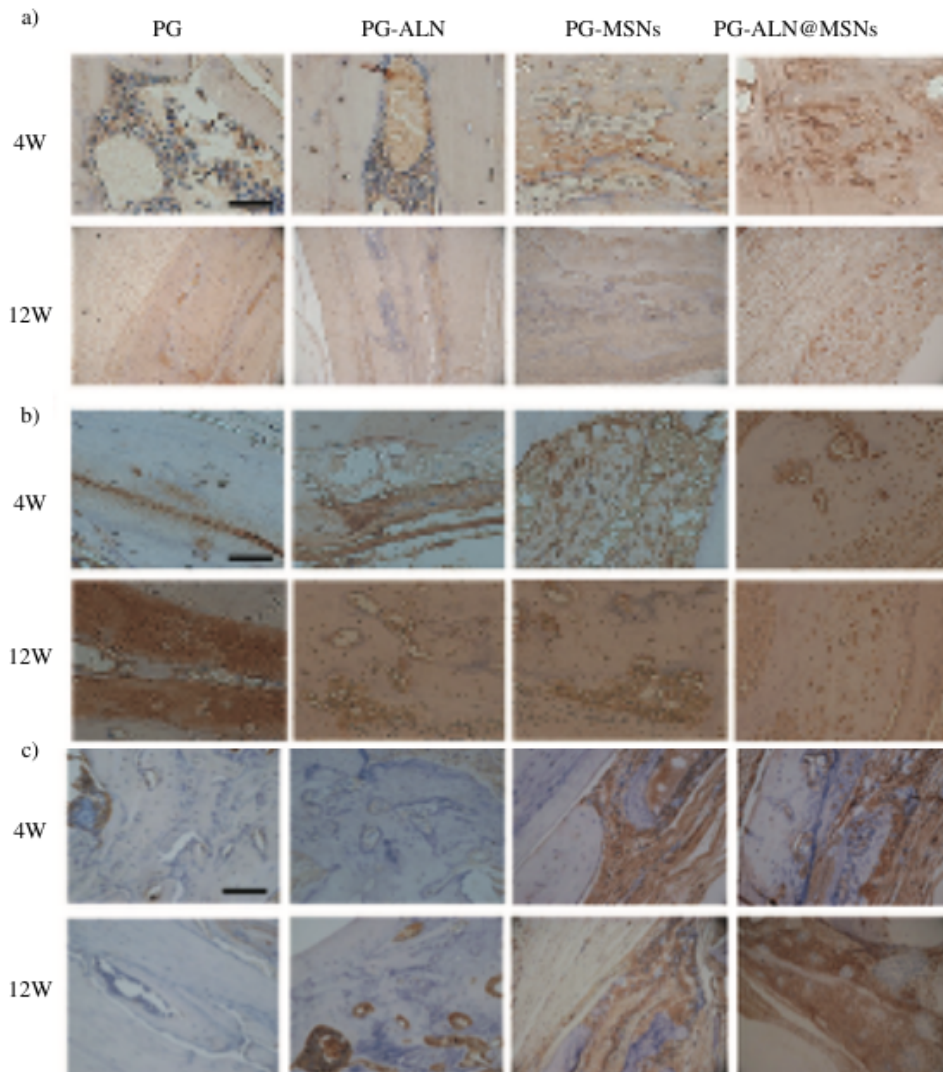
Obr. 4: Snímky Massonova barvení na kraniálním defektu krys – detaily studie v následující kapitole – imunohistochemická analýza (Převzato z Wang Y. a kol., 2019)

5.3 Imunohistochemická analýza

Imunohistochemie (IHC) je oproti histomorfometrii pokročilejší metodou. Prerekvizitou však je dekalcefikace pomocí EDTA, jelikož použití agresivnějších kyselin způsobuje degradaci nukleových kyselin. Je založena na imunologických procesech a jejím principem je vazba protilátky k antigenu. Existují buď přímé nebo nepřímé imunohistochemické analýzy. U přímé se antigen detekuje potom, co je aplikována primární protilátka, která je značená enzymem, který po specifické vazbě vyvolá nějaký barevný signál, který je možné zachytit, nebo může být primární protilátka značená přímo fluorescenční barvou. Druhou variantou je nepřímá IHC, která je oproti přímé variantě citlivější. Může být několika stupňová. Další kroky vedou k výraznému zesílení barevného signálu a tedy i ke zlepšení detekce struktur. (Brychtová a Hlobilková, 2008)

Ve studii Wang Y. a kol. (2019) byly k IHC analýze použity 3 látky: CD31-vylučovaný endoteliálními buňkami a používá se k hodnocení stupně angiogeneze – pro regeneraci kostí je tvorba krevních cév zásadní, OC (osteokalcin) – ten má důležitou roli v úpravě metabolismu kostního vápníku a nakonec OPN (osteopontin), který podporuje osteogenezi. Autoři se věnovali hojení kraniálních defektů kryš srovnáváním efektivity 4 typů nanovláken: PG (polykaprolakton/želatina), PG-ALN (polykaprolakton/želatina-alendronát sodný), PG-MSNs (polykaprolakton/želatina-mezoporézní nanočástice oxidu křemičitého) a PG-ALN-MSNs (polykaprolakton/želatina-alendronát sodný a mezoporézní nanočástice oxidu křemičitého (obr. 5). Provedenou analýzou bylo zjištěno, že použitím nanovlákn PG-ALN-MSNs došlo ke zkrácení doby hojení.

Kromě výše zmíněných markerů se k IHC analýze používají například Runx2, Osx a TGF- β 1. Runx2 (runt-related transkripční faktor) a Osx (osterix) jsou dva časté transkripční faktory, potřebné pro osteoblastogenezi a tvorbu kosti. TGF- β 1 (transformující růstový faktor) ovlivňuje růst, diferenciaci a sekreci extracelulární matrix během vývoje kosti (Zhang a kol., 2017).



Obr. 5: Snímky IHC barvení kraniálních defektů krys, a) OC b) OPN c) CD31 (Převzato z Wang Y. a kol. 2019)

6 Závěr

Tato práce se věnuje kosti jako takové, její stavbě, novotvorbě, remodelaci a zejména možnostem regenerace a následné analýze. Cílem bylo tuto problematiku kompilačně zpracovat.

V první části je popsána stavba kosti, typy kostní tkáně a osifikace, na což navazuje téma regenerace kostí. Ta může v rámci remodelace kostí probíhat v průběhu života jako přirozený proces – jako tzv. remodelace při zátěži, která je zde zmíněna spíše okrajově, anebo probíhá na základě zranění kosti – například zlomeniny, ale i traumata při chirurgických zákrocích například v důsledku odstranění nádorů atd.. Při frakturách a jiných poškozeních kosti je v těle nastartován proces hojení, který v mnoha případech k úplnému uzdravení kosti stačí, nicméně v některých případech je poškození tak rozsáhlé, že pouze přirozené procesy nestačí a medicína tak musí sáhnout po metodách, které hojení zlomeniny podpoří. Předložená práce se věnuje vybraným takto používaným metodám. Stručně je zde zmíněno využití kostních štěpů. Větší pozornost je potom věnována scaffoldům neboli nosičům (lešení), které jsou v současnosti hojně využívány a také jsou předmětem zájmu výzkumu z hlediska optimalizace využívaných materiálů a také způsobu jejich využití. Jsou popsány jejich základní charakteristiky a zmíněny některé materiály, které se k vytvoření nosičů používají. V rámci práce byly shrnuty poznatky o lešení z kyseliny hyaluronové a fibrinu. Byla zde rozebrána i role mezenchymálních kmenových buněk, jako buněk, kterými mohou být nosiče osazeny a vedou tak k podpoře regenerace. Zmíněný je v této části i parathormon, který se účinně používá k léčbě osteoporózy, ale dle zmíněných studií má potenciál i v kostní regeneraci. V tomto smyslu ještě není zcela objasněno, jaká dávka by pro hojení kostních defektů měla nejlepší možné výsledky, a proto je tato metoda nadále cílem některých odborných studií. Roli v regeneraci kostí zaujímají i neinvazivní metody, které jsou v práci taktéž krátce zmíněny.

Poslední oblastí zájmu byla analýza kostí, respektive analýza úspěšnosti jejich regenerace. Jedná se o metody, které poskytují data, jež vedou k vyhodnocení úspěšnosti hojení defektu. Téměř ve všech studiích byly k analýze použity tyto základní metody: mikro-CT, histomorfometrie a imunohistochemie, proto jsou v této práci popsány jako nejčastěji využívané.

Z provedené rešerše vyplývá, že se díky tkáňovému inženýrství podařilo vytvořit mnoho materiálů, které mohou být efektivní náhradou kostních štěpů, jejichž získání i použití není příliš komfortní záležitostí. Z hlediska analýzy úspěšnosti provedených terapeutických zásahů se mi jako nejefektivnější jeví použití mikro-CT. A to hlavně z důvodu, že se jedná o metodu neinvazivní.

Závěrem lze říci, že regenerace kostí je ještě stále velice otevřeným tématem a výzkum v této oblasti je i nadále velice důležitý, protože nesprávné či nedostatečné zhojení kostních defektů vede ke zhoršení kvality života.

7 Seznam použité literatury

Abiraman, S., Varma, H. K., Umashankar, P. R., & John, A. (2002). Fibrin glue as an osteoinductive protein in a mouse model. *Biomaterials*, 23(14), 3023-3031.

Bartoníček, Jan a Jiří Heřt, (2004). *Základy klinické anatomie pohybového aparátu*. Praha: Maxdorf. ISBN 80-7345-017-8.

Bartoš, M. (2018). Micro-ct in tissue engineering scaffolds designed for bone regeneration: principles and application. *Ceramics - Silikaty*, 194-199.

Bissinger, O., Kirschke, J. S., Probst, F. A., Stauber, M., Wolff, K. -D., Haller, B., Götz, C., Plank, C., Kolk, A., & Reilly, G. (2016). Micro-CT vs. Whole Body Multirow Detector CT for Analysing Bone Regeneration in an Animal Model. *PLOS ONE*, 11(11).

Bruder, S. P., Kurth, A. A., Shea, M., Hayes, W. C., Jaiswal, N., & Kadiyala, S. (1998). Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 16(2), 155-162.

Brychtová, Svetlana a Alice Hlobilková, (2008). *Histopatologický atlas*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-1650-3.

Busse, J. W., Bhandari, M., Kulkarni, A. V., & Tunks, E. (2002). The effect of low-intensity pulsed ultrasound therapy on time to fracture healing: a meta-analysis. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 166(4), 437-441.

Čihák, Radomír, (2016). *Anatomie*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3817-8.

Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D., & Giannoudis, P. V. (2011). Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine*, 9(1).

Dylevský, Ivan, (2009). *Funkční anatomie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3240-4.

Dylevský, Ivan, (2019). *Somatologie: pro předmět Základy anatomie a fyziologie člověka*. 3. přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-2111-3.

Granero-Moltó, F., Weis, J. A., Miga, M. I., Landis, B., Myers, T. J., O'Rear, L., Longobardi, L., Jansen, E. D., Mortlock, D. P., & Spagnoli, A. (2009). Regenerative Effects of Transplanted Mesenchymal Stem Cells in Fracture Healing. *Stem Cells*, 27(8), 1887-1898.

Grim, Miloš a Rastislav Druga, (2001). *Základy anatomie*. Praha: Karolinum. ISBN 80-7262-112-2.

- Gurevich, O., Vexler, A., Marx, G., Prigozhina, T., Levdansky, L., Slavin, S., Shimeliovich, I., & Gorodetsky, R. (2002). Fibrin Microbeads for Isolating and Growing Bone Marrow-Derived Progenitor Cells Capable of Forming Bone Tissue. *Tissue Engineering*, 8(4), 661-672.
- Junqueira, Luiz Carlos Uchoa, José Carneiro a Robert O. Kelley, 1997. *Základy histologie*. Jinočany: H & H. ISBN isbn80-85787-37-7.
- Kobolak, J., Dinnyes, A., Memic, A., Khademhosseini, A., & Mobasheri, A. (2016). Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods*, 99, 62-68.
- Kolev K., & Machovich R. (2003). Molecular and cellular modulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost*, 89(4), 610-21.
- Lee, J. Y., Son, S. J., Son, J. S., Kang, S. S., & Choi, S. H. (2016). Bone-Healing Capacity of PCL/PLGA/Duck Beak Scaffold in Critical Bone Defects in a Rabbit Model. *BioMed Research International*, 2016, 1-10.
- Lee, Y. -K., Wadhwa, P., Cai, H. X., Jung, S. -U., Zhao, B. C., Rim, J. -S., Kim, D. -H., Jang, H. -S., Lee, E. -S., & Jin, G. (2021). Micro-CT and Histomorphometric Study of Bone Regeneration Effect with Autogenous Tooth Biomaterial Enriched with Platelet-Rich Fibrin in an Animal Model. *Scanning*, 2021, 1-7.
- Lüllmann-Rauch, Renate, (2012). *Histologie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3729-4.
- Mescher, Anthony L., (2018). *Junqueirovy základy histologie*. Praha: Galén. ISBN 9788074923241.
- Milstrey, A., Wieskoetter, B., Hinze, D., Grueneweller, N., Stange, R., Pap, T., Raschke, M., & Garcia, P. (2017). Dose-dependent effect of parathyroid hormone on fracture healing and bone formation in mice. *Journal of Surgical Research*, 220, 327-335.
- Neer, R. M., Arnaud, C. D., Zanchetta, J. R., Prince, R., Gaich, G. A., Reginster, J. -Y., Hodsman, A. B., Eriksen, E. F., Ish-Shalom, S., Genant, H. K., Wang, O., Mellström, D., Oefjord, E. S., Marcinowska-Suchowierska, E., Salmi, J., Mulder, H., Halse, J., Sawicki, A. Z., & Mitlak, B. H. (2001). Effect of Parathyroid Hormone (1-34) on Fractures and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *New England Journal of Medicine*, 344(19), 1434-1441.
- Noori, A., Ashrafi, S. J., Vaez-Ghaemi, R., Hatamian-Zaremi, A., & Webster, T. J. (2017). A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 4937-4961.
- Novotný, Ivan a Michal Hruška, (2002). *Biologie člověka*. 3. rozš. a upr. vyd. Praha: Nakladatelství Fortuna. ISBN 80-7168-819-3.

- Pape, H. C., Evans, A., & Kobbe, P. (2010). Autologous Bone Graft: Properties and Techniques. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 24(Supplement 1), S36-S40.
- Park, J. Y., Park, S. H., Kim, M. G., Park, S. -H., Yoo, T. H., & Kim, M. S. (2018). Biomimetic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. In I. Noh (Ed.), *Biomimetic Medical Materials* (pp. 109-121). Springer Singapore.
- Raggatt, L. J., & Partridge, N. C. (2010). Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25103-25108.
- Ross, Michael H. a Wojciech Pawlina, (2011). *Histology: a text and atlas : with correlated cell and molecular biology*. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer. ISBN 978-1-4511-0150-8.
- Schofer, M. D., Block, J. E., Aigner, J., & Schmelz, A. (2010). Improved healing response in delayed unions of the tibia with low-intensity pulsed ultrasound: results of a randomized sham-controlled trial. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 11(1).
- Shi, A., Heinayati, A., Bao, D., Liu, H., Ding, X., Tong, X., Wang, L., Wang, B., & Qin, H. (2019). Small molecule inhibitor of TGF- β signaling enables robust osteogenesis of autologous GMSCs to successfully repair minipig severe maxillofacial bone defects. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1).
- Slípka, Jaroslav a Zbyněk Tonar, (2018). *Základy histologie*. 2. vydání. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-3934-5.
- Stárka, Luboslav a Václav Zamrazil, (2005). *Základy klinické endokrinologie*. 2., rozš. vyd. Praha: Maxdorf. Jessenius. ISBN 80-7345-066-6.
- van der Stok, J., Koolen, M. K. E., de Maat, M. P. M., Amin Yavari, S., Alblas, J., Patka, P., Verhaar, J. A. N., van Lieshout, E. M. M., Zadpoor, A. A., Weinans, H., & Jahr, H. (2015). Full regeneration of segmental bone defects using porous titanium implants loaded with BMP-2 containing fibrin gels. *European Cells and Materials*, 29, 141-154.
- Tsunori, K., Sato, S., Hasuike, A., Manaka, S., Shino, H., Sato, N., Kubota, T., Arai, Y., Ito, K., & Miyazaki, M. (2015). Effects of Intermittent Administration of Parathyroid Hormone on Bone Augmentation in Rat Calvarium. *Implant Dentistry*, Publish Ahead of Print.
- Wang, L., Xu, W., Chen, Y., & Wang, J. (2019). Alveolar bone repair of rhesus monkeys by using BMP-2 gene and mesenchymal stem cells loaded three-dimensional printed bioglass scaffold. *Scientific Reports*, 9(1).
- Wang, Y., Cui, W., Zhao, X., Wen, S., Sun, Y., Han, J., & Zhang, H. (2019). Bone remodeling-inspired dual delivery electrospun nanofibers for promoting bone regeneration. *Nanoscale*, 11(1), 60-71.
- Wojda, S. J., & Donahue, S. W. (2018). Parathyroid hormone for bone regeneration. *Journal of Orthopaedic Research®*, 36(10), 2586-2594.

Zhai, P., Peng, X., Li, B., Liu, Y., Sun, H., & Li, X. (2020). The application of hyaluronic acid in bone regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, *151*, 1224-1239.

Zhang, C., Yan, B., Cui, Z., Cui, S., Zhang, T., Wang, X., Liu, D., Yang, R., Jiang, N., Zhou, Y., & Liu, Y. (2017). Bone regeneration in minipigs by intrafibrillarly-mineralized collagen loaded with autologous periodontal ligament stem cells. *Scientific Reports*, *7*(1).