

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

35 668

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61F 2/44 (2006.01)
A61L 27/42 (2006.01)
A61L 27/10 (2006.01)
A61L 27/24 (2006.01)
A61L 27/20 (2006.01)
A61L 27/26 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2021-39337**
(22) Přihlášeno: **02.11.2021**
(47) Zapsáno: **21.12.2021**

(73) Majitel:
Vysoké učení technické v Brně, Brno, Veveří, CZ
Fakultní nemocnice Brno, Brno, Bohunice, CZ
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,
Brno, Medlánky, CZ
České vysoké učení technické v Praze, Praha 6,
Dejvice, CZ

(72) Původce:
doc. Ing. Lucy Vojtová, Ph.D., Měnín, CZ
Ing. Jana Dorazilová, Ostrava, Třebovice, CZ
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D., Velešovice, CZ
MVDr. Eduard Göpfert, Ph.D., Brno, Jehnice, CZ
prof. Ing. Jozef Kaiser, Ph.D., Brno, Královo Pole,
CZ
MUDr. Milan Krtička, Ph.D., Brno, Veveří, CZ
MUDr. Vladimír Nekuda, Brno, Židenice, CZ
prof. MUDr. Ladislav Plánka, Ph.D., Brno, Starý
Lískovec, CZ
Ing. Radek Sedláček, Ph.D., Kladno, Kročehlavy,
CZ
Ing. Přemysl Šťastný, Ph.D., Šardice, CZ
prof. Ing. Martin Trunec, Dr., Brno, Komárov, CZ
Ing. Tomáš Zikmund, Ph.D., Brno, Komín, CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název užitného vzoru:
**Bioresorbovatelná hybridní náhrada páteře
pro meziobratlovou fúzi**

Bioresorbovatelná hybridní náhrada páteře pro meziobratlovou fúzi

Oblast techniky

5

Předmětem technického řešení je hybridní biokompozitní, plně vstřebatelná, náhrada páteře pro léčbu defektů bederní páteře v intervertebrální oblasti.

Dosavadní stav techniky

10

Bolesti bederní a krční páteře jsou celosvětově nejčastějším důvodem omezujícím tělesnou aktivitu a také značnou měrou zodpovídají za pracovní neschopnost či invaliditu. Ekonomické náklady na léčbu onemocnění páteře jsou extrémně vysoké a jen ve Spojených státech činí kolem 90 miliard USD ročně. 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. Cílem je vytvořit kostěné prohojení dvou nebo více sousedních obratlů.

20

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 až 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.

25

Prohojování a tvorba nové kostěné formace je ovlivněna jak lokálními podmínkami, tak i vlastnostmi použitého štěpu. Iniciální stabilita fúzované oblasti je zajištěna páteřním instrumentariem, přičemž štěp je základem pro kostěné 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 % a v případě vícesegmentálních krčních fúzí může tato hodnota dosahovat až 60 %. 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.

30

35

40

Ve světle těchto skutečností zůstává velkou výzvou pro vědecké týmy složené ze spinálních chirurgů, biomateriálových specialistů, biomechaniků i radiodiagnostiků vývoj a aplikace nových materiálů a operačních technik s cílem dosažení dřívější stabilní meziobratlové fúze v porovnání se současně užívanými konvenčními postupy v dané oblasti. Kostní náhrada by měla poskytovat podporu a strukturální intergritu během celého procesu osteogeneze a jejího vhojování. Náhrady kostní tkáň jsou definované jako anorganické, syntetické nebo biologicky organické kombinované materiály, které se implantují do místa kostěného defektu za účelem jeho prohojení. Užívají se jako náhrada za autogenní nebo alogenní kostní štěp. V minulosti byly používány především inertní materiály k náhradě kostních defektů, které především plnily roli „space holder“ během procesu hojení. Současným modelem je použití nových „inteligentních“ biomateriálů, které nejen podporují, ale také iniciují kostěné prohojení. Dle „diamantového konceptu“ tkáňového inženýrství by měla ideální kostní náhrada nabízet třídímenzionální osteoinduktivní strukturu, obsahovat osteogenní buňky a osteoinduktivní faktory, a také by měla indukovat vaskularizaci. To vše při dostatečné mechanické pevnosti materiálu. I přes rozsáhlý výzkum tento materiál podobný kostěnému autograftu nebyl doposud úspěšně vytvořen. Současným konceptem je tedy vytvoření

45

50

kombinace nosiče nebo třídídimenzionální konstrukce s živými buňkami a biologicky aktivními molekulami. Dosud navržené materiály zahrnují:

- 5 ◦ Náhrady přírodního původu - autogenní a allogení kostní štěpy, demineralizovaná kostní hmota, xenogenní materiály jako je přírodní hydroxyapatit zvířecích kostí nebo také fyto­genní materiály získávané z řas nebo korálů.
- 10 ◦ Syntetické materiály - 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 polymethylmetakrylát (PMMA), polyetheretherketon (PEEK), polyglykolidy, poly­laktidy, polylaktony jako např. polykaprolakton (PCL) nebo jejich kopolymery.
- 15 ◦ Kompozitní materiály - 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.
- 20 ◦ Kombinace materiálů s růstovými faktory - přírodní nebo rekombinantní růstové faktory představuje např. morfogenní kostní protein (bone morphogenic protein, BMP), růstový faktor krevních destiček (platelet-derived growth factor, PDGF), transformující růstový faktor β (transforming growth factor- β , TGF- β), růstový faktor podobný insulinu (insuline-like-growth factor), vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) a fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor, FGF). Tyto faktory jsou přidány do
- 25 ◦ Kombinace materiálů a buněk - mesenchymální kmenové buňky, stromální buňky kostní dřene, periostální buňky, osteoblasty, stejně tak i embryonální či dospělé kmenové buňky jsou používané v tkáňovém inženýrství.

30 Do současné doby nebyl 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

35 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 kostí. Naopak syntetické polymery z polyméčné, nebo polyglykolové kyseliny mají dostatečnou

40 mechanickou stabilitu, avšak na úkor chybějící osteokonduktivity.

Podstata technického řešení

45 Implantáty třetí generace jsou biokompozity, které se snaží maximalizovat svoje biologické, mechanické a chemické vlastnosti k přípravě biologicky ekvivalentních náhrad tkání. Biokompozitní skafoldy s přidáním exogenními růstovými faktory nabízejí slibnou cestou ke zlepšení kostěné regenerace.

50 Předmětem předkládaného technického řešení je hybridní biokompozitní náhrada páteře pro meziobratlovou fúzi, kde biokompozit obsahuje keramickou matici ve formě porézní pěny, obsahující hydroxyapatit a fosforečnan vápenatý v hmotnostním poměru v rozmezí 1:1 až 1:5, s výhodou 1:2 až 1:4, a dále biokompozit obsahuje výplň matrice ve formě lyofilizované polymerní pěny z materiálu vybraného ze skupiny kolagenu, oxidované celulózy a jejích solí, popřípadě

55 z jejich směsí; přičemž biokompozit má velikost pórů, stanovenou rastrovací elektronovou mikroskopií, v rozmezí 200 až 300 mikrometrů.

Keramickou maticí je ve zvláště výhodném provedení dvoufázový systém obsahující hydroxyapatit a fosforečnan vápenatý v hmotnostním poměru 1:3.

5

Fosforečnan vápenatý s výhodou obsahuje fázi alfa i beta, výhodněji v poměru 1:4 až 1:6, nejvýhodněji v poměru 1:5.

10

Keramická matrice na bázi hydroxyapatitu a fosforečnanu vápenatého je biokompatibilní a resorbovatelná. Náhrady páteře, které jsou v současné době na trhu, jsou nevstřebatelné. Biokompatibilita a resorbovatelnost jsou značnými výhodami předkládaného technického řešení.

Polymerní pěna je s výhodou z kolagenu v kombinaci s antibakteriálním polysacharidem, kterým je oxidovaná celulóza nebo její soli, v hmotnostním poměru 1:9 až 9:1, s výhodou 1:1.

15

Polysacharidem je ve výhodném provedení vápenatá sůl oxidované celulózy.

Oxidovaná celulóza a její soli jsou biokompatibilní, bioresorbovatelné a mají antibakteriální vlastnosti.

20

Polymerní pěna zajišťuje lepší biokompatibilitu a umožňuje navázání dalších bioaktivních látek.

Polymerní pěna se připraví metodou lyofilizace.

25

Polymerní pěna je s výhodou elastická.

Polymerní pěna vyplňující keramickou maticí zajišťuje finální velikost pórů náhrady páteře v rozmezí 200 až 300 mikrometrů.

30

Polymerní pěna tvoří s výhodou 0,1 až 20 hmotn. % z hmotnosti celé náhrady páteře.

S výhodou je biokompozit připravitelný z polymerní pěny a keramické matrice zesílením, zejména chemickým zesílením s použitím činidel vybraných ze skupiny

35

N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimidu hydrochloridu (EDC), N-hydroxysukcinimidu (NHS), aldehydů (glutaraldehydů, formaldehydů), kyselin (citrónové, tříselné nebo alginové), enzymů (transglutaminázy, lisyloxidázy), přírodních síťovadel (genipinu, riboflavinů), epoxidových sloučenin (glycerol diglycidyl éterů, glycerol triglycidyl éterů a ethylenglykol glycidyl éterů), tetrakis hydroxymethyl fosfonium sulfátu a jodistanu, nebo zesílením fyzikálními vlivy (jako je teplo, záření gamma, nebo UV).

40

V porézní náhradě páteře mohou být adsorbovány bioaktivní látky, zejména polymery biogenních fosfátů a/nebo růstové faktory.

45

Polymerem biogenního fosfátu může být např. biogenní anorganický polyfosfát (polyP), záporně nabitý lineární polymer obsahující desítky až stovky fosfátových zbytků spojených dohromady prostřednictvím vysokoenergetické fosfoanhydridové vazby. PolyP je běžně obsažen v mamálních buňkách a podporuje diferenciaci a kalcifikaci osteoblastů, inhibuje aktivitu kostní resorpce osteoklastů a hraje významnou roli v pozitivní regulaci regenerace kostní tkáně. Zejména výhodný je polyfosfát vápenatý.

50

Růstový faktor může být vybrán ze skupiny zahrnující kostní morfogenní proteiny (BMP) 2, 6, 7 a 9, transformující růstový faktor- β (TGF- β) 1, 2 a 3, růstové faktory podobné inzulínu (IGF) 1 a 2, vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) A, B, C, D a E, fibroblastový růstový faktor (FGF) 2, 7, 10 a 18, růstový faktor krevních destiček (PDGF) AA, BB, AB a CC, prozánětlivé cytokiny interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) a tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α). Zejména výhodný je fibroblastový růstový faktor 2 (FGF2).

55

S výhodou je v porézni náhradě adsorbován biogenní polyfosfát vápenatý (bio-polyP), který zajišťuje lepší osteointegraci.

5

S výhodou je v porézni náhradě adsorbován fibroblastový růstový faktor FGF2. Tak lze využít jeho účinky pro urychlení osteointegrace a prorůstání nativních fibroblastů a cév.

10 Celková tloušťka náhrady páteře je závislá na vlastnostech páteře pacienta, a náhrada může být připravena na míru. S výhodou je tloušťka náhrady páteře v rozmezí 0,5 až 8 mm.

15 Na animálním modelu bílého prasete byla potvrzena účinná funkce náhrady páteře podle předkládaného technického řešení, která urychlila regeneraci poraněné páteře a vytvořila pevný kostní spoj v místě odstraněné (poraněné) plotýnky. Hodnocení bylo prováděno pomocí počítačové mikrotomografie (mikro-CT), biomechanicky (tuhost regenerované páteře) a imunohistochemickým barvením histologických řezů (osteogenez – stanovení plochy novotvořené kostní tkáně v místě kostního spoje).

Příklady uskutečnění technického řešení

20

Příklad A – srovnávací příklad

Keramická pěna tvořená hydroxyapatitem a fosforečnanem vápenatým

25 Porézni keramická pěna byla připravena metodami odlévání a slinování. K přípravě vodné keramické suspenze na bázi epoxidu byl použit prášek hydroxyapatitu (HA; 29,7 hmotn. %) kalcinovaného při 1000 °C / 3 h s práškem fosforečnanu vápenatého (CP; 29,7 hmotn. %) v poměru 1:1, dále pak voda (29 hmotn. %), epoxidová pryskyřice (ethylenglykol diglicidyléter; 5,7 hmotn. %) a dispergační prostředek (polyakrylát amonný; 0,7 hmotn. %). Suspenze byla mletím
30 homogenizována po dobu 8 hodin s kuličkami ze zirkonu. Po mletí byla získána jemná suspenze HA se střední velikostí částic 130 nm a CP se střední velikostí částic 1 mikrometr. Keramická pěna byla připravena přímým napěněním homogenizované suspenze za použití kuchyňského mixéru. Před napěněním bylo přidáno napěňovadlo obecného vzorce $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$, kde $n = 9$ až 10 (3,5 hmotn. %) a vytvrzovadlo (dipropylén triamin; 1,7 hmotn. %) v ekvimolárním poměru
35 k epoxidové pryskyřici. Keramická směs byla po napěnění odlita do formy o průměru 100 mm a výšce 10 mm a polymerována při 35 °C po dobu 40 min. Po konsolidaci byla keramická pěna vysušena, segmentována ve formě a slinována při 1250 °C po dobu 2 h. Po slinování byly keramické pěnové předlisky opracovány na konečnou velikost implantátu (25 mm x 15 mm x 3,3 mm).

40

Konečným složením keramické pěny byla směs hydroxyapatitu (26 %), β -fosforečnanu vápenatého (62 %) a α -fosforečnanu vápenatého (12 %) analyzována rentgenovou práškovou difrakcí (Rigaku SmartLab 3kW, Rigaku, Japonsko). Difrakční obrazce byly měřeny od 10° do 100°. Fázový obsah byl kvantifikován pomocí Rietveldovy analýzy.

45

Příklad B

Keramická pěna tvořená hydroxyapatitem a fosforečnanem vápenatým impregnovaná biopolymery

50 Keramická pěna připravená podle srovnávacího Příkladu A byla impregnována biopolymery na bázi bovinního kolagenu a vápenaté soli oxidované celulózy (oxycelulóza). Kolagen typu I z hovězí kůže se hydratoval v ultračisté vodě s oxycelulózou v poměru 1:1 tak, aby celková koncentrace byla 0,5 hmotn. %. Směs kolagen / oxycelulóza byla injektována jehlou 20G do keramické pěny k vyplnění veškerého volného objemu a následně byl vzorek
55 lyofilizován při -35 °C a tlaku pod 1 mBar (0,1 kPa) po dobu 15 hodin (lyofilizátor Martin Christ

Epsilon 2-10D) s následným sekundárním sušicím procesem při 25 °C a tlakem pod 0,01 mBar (1 Pa) až do poklesu Δp (změna tlaku pod 10 %). Lyofilizované porézní vzorky byly následně stabilizovány chemickým síťováním použitím činidel

- 5 N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimidu hydrochloridu (EDC)
a N-hydroxysukcinimidu (NHS) v poměru 2:1 a následně 2x promyty 0,1M roztokem Na_2HPO_4 po dobu 30 minut a 1x ultračistou vodou, také po dobu 30 minut. Po síťování byly vzorky opět zmrazeny a znovu zlyofilizovány (dle výše uvedených parametrů).

10 Příklad 1

Keramická pěna tvořená hydroxyapatitem a fosforečnanem vápenatým impregnovaná biopolymery s adsorbovaným růstovým faktorem

- 15 Kompozitní náhrada pro řešení kostních defektů je složená z keramické pěny tvořené hydroxyapatitem a fosforečnanem vápenatým impregnovaná zesíťovanou lyofilizovannou pěnou z bovinního kolagenu typu I a oxidované celulózy připravené postupy popsány v příkladech A a B. Pěna je dále následně zesíťována stejně jako v Příkladu B s tím rozdílem, že před lyofilizací po zesíťování EDC/NHS byla kompozitní pěna zalita roztokem fibroblastového růstového faktoru 2 - FGF2, tak aby výsledná koncentrace FGF2 byla 0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Následně byly vzorky opět zmrazeny a lyofilizovány.

20 Příklad 2

- 25 Keramická pěna tvořená hydroxyapatitem a fosforečnanem vápenatým impregnovaná biopolymery s adsorbovaným polyfosfátem

- 30 Kompozitní náhrada pro řešení kostních defektů je složená z keramické pěny tvořené hydroxyapatitem a fosforečnanem vápenatým impregnovaná zesíťovanou lyofilizovannou pěnou z bovinního kolagenu typu I a oxidované celulózy připravené postupy popsány v příkladech A a B. Po zesíťování EDC/NHS ještě před lyofilizací byla kompozitní pěna ponořena do roztoku polyfosfátu sodného o koncentraci 0,25 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 1 hodiny a následně vyjmuta a ponořena do roztoku chloridu vápenatého o koncentraci 0,125 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro vytvoření mikročástic polyfosfátu vápenatého přímo "in-situ" na vláknech biopolymerů a povrchu hybridního implantátu. Následně byl vzorek zlyofilizován, jak je již popsáno výše.

35 Příklad 3

- 40 Náhrady páteře připravené v příkladech A a B, a modifikované náhrady připravené v příkladech 1 a 2 byly podrobeny měření velikosti pórů pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM, Tescan MIRA3, Česká republika). Všechna pozorování byla prováděna v režimu emise sekundárních elektronů s vysokým napětím 10 kV. Pro lepší rozlišení byly vzorky potaženy 20 nm vrstvou zlata. Velikost pórů připravených materiálů byla vypočítána ze snímků SEM pomocí softwaru ImageJ. Póry byly hodnoceny z 5-ti různých SEM obrázků každého vzorku se zorným polem 1,5 mm. Průměrná velikost pórů byla vypočítána pomocí 150 naměřených hodnot ze snímků SEM.

Tab. 1: Provnání výsledků velikosti pórů: vliv biopolymerů a bioaditiv.

Označení příkladu	Průměrná velikost pórů (μm)
Příklad A	258
Příklad B	200
Příklad 1	243
Příklad 2	297

Z Tab. 1 je patrné, že všechny vzorky mají propojené póry, jejichž velikost je v rozmezí od 200 až 300 mikrometrů, což zajišťuje správný přísun živin skrz dvouvrstvu a také vhodnou velikost pórů pro adhezi a proliferaci fibroblastů. Biopolymerní pěna tvořená vlákny kolagenu a oxidované celulózy se modifikací FGF2 ani polyfosfátem moc nezměnila, čímž je zajištěna dobrá adheze a proliferace buněk.

Příklad 4

Náhrady páteře připravené v příkladech A a B byly podrobeny tlakovým zkouškám podle normy ISO 13314 na 10 kubických vzorcích každého typu o rozměrech 5 x 5 x 10 mm. Vzorky byly testovány ve vlhkém stavu po hydrataci po dobu 60 minut v roztoku PBS při 37 °C. Maximální pevnost v tlaku, elastický gradient a absorpce energie byly stanoveny pomocí systému MTS Mini Bionix 858.02 (MTS, Eden Prairie, MN, USA) vybaveného 100N siloměrem. Měření byla prováděna při konstantní rychlosti příčné hlavičky 3 mm/min (rychlost deformace přibližně 0,005 s⁻¹). Získané křivky napětí-deformace byly použity ke stanovení pevnosti v tlaku, elastického gradientu a energie absorbované během stlačování. Maximální pevnost v tlaku byla vypočtena jako maximální tlaková síla dělená plochou průřezu testovaného vzorku. Elastický gradient představuje modul pružnosti v tlaku. Absorpce energie (celková absorbovaná energie na jednotku objemu) byla vypočtena jako plocha pod křivkou napětí-deformace až do 40% deformace.

Tab. 2: Porovnání výsledků mechanických vlastností: vliv polymerní pěny.

Označení příkladu	Maximální pevnost (MPa)	Elastický gradient (MPa)	Absorpce energie (kJ/m ³)
Příklad A	0,51 ± 0,15	105 ± 76	51 ± 29
Příklad B	0,50 ± 0,18	124 ± 47	63 ± 23

Z Tab. 1 je patrné, že maximální pevnost v tlaku pro materiály z Příkladu A a B je po plné hydrataci velmi podobná, kdy polymerní výplň nezměnila pevnost keramických vzorečků. Polymerní síť však pozitivně ovlivnila modul pružnosti v tlaku. V důsledku toho biopolymerní výplň zvýšila celkovou absorbovanou energii, kdy během namáhání musí být materiály schopné udržet postupné zatížení, což je důležité pro nosné materiály meziobratlové fúze.

Příklad 5

Náhrady páteře připravené v příkladech 1 a 2 byly testovány na animálním modelu bílého prasete, kde byla potvrzena účinná funkce náhrady páteře podle předkládaného technického řešení, která urychlila regeneraci poraněné páteře a vytvořila pevný kostní spoj v místě odstraněné (poraněné) plotýnky. Do studie bylo zahrnuto celkem třicet šest kastrovaných klinicky zdravých experimentálních zvířat samčího pohlaví. Jednalo se o komerční hybrid bílého ušlechtilého prasete 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 páteřního segmentu L2/3 byla provedena laterální bederní meziobratlová fúze (LBMF). Ve skupině A (n = 12) byl použit autologní kostní štěp odebraný z levé lopaty kosti kyčelní operovaného prasete, ve skupině B (n = 12) pak byl použit materiál dle Příkladu 1 a ve skupině C (n = 12) byl použit materiál dle Příkladu 2. 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 vypreparován 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).

Hodnocení bylo prováděno pomocí počítačové mikrotomografie (mikro-CT, hodnocení kvality srůstu páteře), biomechanicky (hodnocení tuhosti regenerované páteře) a imunohistochemickým barvením histologických řezů (stanovení plochy nové kostní tkáně v místě kostního spoje tzv. osteogeneze).

Pro kontrolní skupinu celého experimentu bylo použito 7 zdravých neporušených prasečích páteří (vypreparovaný segment od Th15–L6) získaných z kadaverosních prasat stejného stáří a hmotnosti jako ve výše popsaných skupinách (skupina N, n = 7). 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.

Mikro-CT hodnocení kvality meziobratlové fúze

Všechny resekované vzorky páteře ze skupin A, B a C, byly podrobeny mikro-CT vyšetření ve stejný den, kdy byla prasata utracena. 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 Nanofocus180 kV/ 15 W a plochým detektorem DXR 250. Rentgenová trubice byla nastavena na zrychlující napětí 100kV a proud 300 µA. Rentgenové spektrum bylo filtrováno 1,5 mm silným hliníkovým filtrem. Doba expozice detektoru byla 400 ms v každé z 2200 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 do 4 následujících stupňů kvality fúze:

- 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.

- 5 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 prasete. Všechny tyto vzorky byly klasifikovány zmíněným klasifikačním systémem.

10 Tab. 4: Shrnutí dosaženého stupně intervertebrální fúze po 8 a 16 týdnech, dle jednotlivých podskupin.

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	

15 A - autologní kostní štěp; B - náhrada páteře dle Příkladu 1; C - náhrada páteře dle Příkladu 2

15 Výsledky fúze mezi podskupinami A1, B1, C1 se statisticky významně nelišily ($p = 0,737$), zatímco rozdíly dosažené meziobratlové fúze v podskupině A2 a podskupinách B2 a C2 byly statisticky významné ($p = 0,023$). Statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami byl testován Mann-Whitney U-testem.

20 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 B2 a shodně i skupině C2 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 B2 dosaženo kompletní fúze v 5 z 6 případů a ve skupině C2 ve 4 z 6 případů s nulovým výskytem tvorby pakloubu. Jedná se o další z nepřímých důkazů, že nově vyvinutá náhrada, jak podle Příkladu 1, tak i podle Příkladu 2 je schopna tvorby intervertebrální fúze.

30 Biomechanické hodnocení tuhosti páteře

35 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). 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 na testovacím systému 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. Zatěžování proběhlo ve dvou režimech. V první části zatěžování bylo 45 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 $20^\circ/\text{min}$ do extenze a následně do flexe.

Tab. 5: Porovnání ohybové tuhosti páteřních segmentů mezi podskupinami.

Podskupina	N (n=5)	A1 (n=4)	B1 (n=4)	C1 (n=4)	A2 (n=4)	B2 (n=4)	C2 (n=4)
Ohybová tuhost v extenzi (nM/deg)	1,32 $\pm 0,41$	0,73 $\pm 0,17$	0,64 $\pm 0,23$	0,62 $\pm 0,11$	1,09 $\pm 0,25$	2,17 $\pm 0,27$	1,32 $\pm 0,11$

10 N - nativní kost; A - autologní kostní štěp; B - biokeramický materiál dle Příkladu 1; C - biokeramický materiál dle Příkladu 2, sk. 1 – 8 týdnů, sk. 2 – 16 týdnů

Na základě provedeného biomechanického experimentu je možné nepřímo dokázat navyšující se pevnost fúzaného 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 B2. V případě skupiny A byl také prokázán nárůst ohybové tuhosti páteře, která nebyla spíše dána kvalitou proběhlé fúze ale spíše tvorbou perivertebrálního kalcifikujícího fibrózního infiltrátu, který byl i prokázán na Mikro-CT vyšetření.

Histologické hodnocení fúze páteře

25 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 formalímem. Přibližně po 24-hodinovém fixování byly vzorky shodnou technikou ve všech skupinách paralelně sériově rozřezány v místech, kde byla provedena implantace kostního štěpu nebo náhrady. 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 složeného z kyseliny mravenčí a formaldehydu. Použitý roztok reaguje s vápníkem ve tkáni a vytvoří rozpustnou sůl, která zůstává v roztoku. Čas odvápnění záleží na velikosti a tloušťce vzorku, a také na obsahu vápníku. 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 parafínem). Poté následovalo prosycení tkáně parafínem za zvýšené teploty (56 až 58 °C). Parafín vyplnil všechny volné mikroskopické prostory v tkáni, celý proces probíhal v autotechnikonu. Tkáň prosycená parafínem byla zalita do podoby parafínového bloku – tkáň se orientovala do středu formy o velikosti jednotek centimetrů a byla přelita roztaveným parafínem. Po zchladnutí vznikl parafínový bloček s tkání uprostřed. K tvorbě parafínových bloku byla využita manuálně ovládaná parafínová zalévací linka Medite TES 99 (Bamed, Česká republika). Následně byly parafínové bloky nakrájeny na mikrotomu, síla řezu byla 3 až 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. Skla s obarvenými tkáňovými řezy byla digitalizována 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 objektivích se zvětšením 20x/0,8 M27. Analýza obrazu pomocí grafického programu ZEN 2.6 umožnila označení a výpočet plochy kostní tkáně v daných vzorcích.

Tab. 6: Porovnání plochy novotvořené kosti v intervertebrálním prostoru v místě implantovaného kostního štěpu (A) nebo náhrady (B a C).

<i>Podskupina</i>	<i>A1</i>	<i>B1</i>	<i>C1</i>	<i>A2</i>	<i>B2</i>	<i>C2</i>
	<i>(n=4)</i>	<i>(n=4)</i>	<i>(n=4)</i>	<i>(n=4)</i>	<i>(n=4)</i>	<i>(n=4)</i>
Plocha novotvořené kosti (mm ²)	94,2 ± 3,2	52,5 ± 8,9	53,9 ± 18,3	46,1 ± 2,0	65,4 ± 7,1	82,4 ± 4,6

A - autologní kostní štěp; B - náhrada dle Příkladu 1; C - náhrada dle Příkladu 2; sk. 1 – 8 týdnů, sk. 2 – 16 týdnů

Vypočtená plocha novotvořené kosti je ve skupině hodnocených vzorků po 8 týdnech nejvyšší ve skupině A1 (průměrná hodnota 94,2 mm²), což může i odpovídat implantovanému kostnímu štěpu, ve skupině B1 (průměrná hodnota 52,5 mm²) a C1 (průměrná hodnota 53,9 mm²) je tato naměřená plocha menší, avšak odpovídá pouze novotvořené kosti neb intervertebrální prostor byl vyplněn pouze umělou náhradou, tím je nepřímou 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 (46,1 mm²), kdy i na základě mikroskopického zhodnocení byla prokázána fibrózní přestavba kostního štěpu. Ve skupině B2 průměrná plocha novotvořené kosti tvořila 65,4 mm², a ve skupině C2 pak 82,4 mm². 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 náhrada obohacená o FGF2 prokázala v histologickém obraze schopnost novotvorby kostní hmoty obdobně jako kostní štěp. Struktura náhrady dle Příkladu 1 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 náhrady dle Příkladu 2 obohacené o polyfosfát obdobně jako skupina B jevila známky novotvorby kosti v místě implantované náhrady. Zaznamenaná plocha novotvořené kosti po 16 týdnech experimentu byla celkově největší ve srovnání se skupinou A a B, a také svou plochou novotvořené kosti se v 16 týdnech experimentu oproti výsledku v 8 týdnech prakticky zdvojnásobila.

Průmyslová využitelnost

Technické řešení se týká porézní, plně vstřebatelné hybridní náhrady pro akcelerovanou regeneraci páteře pomocí meziobratlové fúze. Náhrada páteře podle technického řešení je určena pro klinické použití v traumatologii a ortopedii pro vyplnění defektu páteře např. po úrazu, po extrakci nádoru nebo vlivem degenerativních změn. Tato nová náhrada by měla co nejvíce eliminovat nedostatky a nevýhody současných náhrad, kterými jsou nedostatečně vyvinutá vaskularizace implantátu v průběhu kostní fúze a také jejich nedostatečná vstřebatelnost.

NÁROKY NA OCHRANU

- 5 1. Biokompozitní náhrada páteře pro meziobratlovou fúzi, **vyznačující se tím**, že biokompozit obsahuje keramickou matici ve formě porézní pěny obsahující hydroxyapatit a fosforečnan vápenatý v hmotnostním poměru v rozmezí 1:1 až 1:5, a dále biokompozit obsahuje výplň matrice ve formě polymerní pěny z materiálu vybraného ze skupiny ze skupiny kolagen, oxidovaná celulóza a její soli, popřípadě z jejich směsí, přičemž biokompozit má velikost pórů v rozmezí 200 až 300 mikrometrů, stanoveno rastrovací elektronovou mikroskopií.
- 10 2. Náhrada páteře podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že fosforečnanem vápenatým je směs alfa a beta fáze fosforečnanu vápenatého, s výhodou v hmotnostním poměru 1:4 až 1:6.
- 15 3. Náhrada páteře podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že polymerní pěna je z kolagenu a oxidované celulózy nebo její soli, s výhodou v hmotnostním poměru kolagenu k oxidované celulóze nebo její soli 9:1 až 1:9.
- 20 4. Náhrada páteře podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že polymerní pěna je z kolagenu a vápenaté soli oxidované celulózy, s výhodou v hmotnostním poměru kolagenu k vápenaté soli oxidované celulózy 9:1 až 1:9.
- 25 5. Náhrada páteře podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že polymerní pěna tvoří 0,1 až 20 hmotn. % z hmotnosti celé náhrady páteře.
- 30 6. Náhrada páteře podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že biokompozit je připravitelný z lyofilizované polymerní pěny a keramické matrice chemickým zesílením s použitím činidel vybraných ze skupiny N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimidu hydrochloridu, N-hydroxysukcinimidu, aldehydů, kyselin, enzymů transglutamináz nebo lisyloxidázy, genipinu, riboflavinů, epoxidových sloučenin, tetrakis hydroxymethyl fosfonium sulfátu a jodistanu, nebo zesílením fyzikálními vlivy vybranými z tepla, záření gamma a záření UV.
- 35 7. Náhrada páteře podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje alespoň jednu bioaktivní látku vybranou ze skupiny zahrnující polymery biogenních fosfátů a růstové faktory.
- 40 8. Náhrada páteře podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že růstový faktor je vybrán ze skupiny zahrnující kostní morfogenní proteiny 2, 6, 7 a 9, transformující růstový faktor- β 1, 2 a 3, růstové faktory podobné inzulinu 1 a 2, vaskulární endoteliální růstový faktor A, B, C, D a E, fibroblastový růstový faktor 2, 7, 10 a 18, růstový faktor krevních destiček AA, BB, AB a CC, prozánětlivé cytokiny interleukin-1, interleukin-6 a tumor nekrotizující faktor alfa.
- 45 9. Náhrada páteře podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že biogenním fosfátem je anorganický polyfosfát vápenatý.
10. Náhrada páteře podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9, **vyznačující se tím**, že celková tloušťka náhrady páteře je v rozmezí 0,5 až 8 mm.