

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA STROJNÍ

Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Analýza ohybové tuhosti páteře po provedení lumbální
intervertebrální fúze**

Praha 2020

Šárka Laxová



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Laxová** Jméno: **Šárka** Osobní číslo: **457568**
Fakulta/ústav: **Fakulta strojní**
Zadávající katedra/ústav: **Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky**
Studijní program: **Strojní inženýrství**
Studijní obor: **Biomechanika a lékařské přístroje**

II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

Analýza ohybové tuhosti páteře po provedení lumbální intervertebrální fúze

Název diplomové práce anglicky:

Determining Flexural Spine Stiffness after Lumbal Intervertebral Fusion

Pokyny pro vypracování:

1. Proveďte literární rešerši na téma kostní náhrady a tkáňové nosiče a na téma možnosti hodnocení tuhosti páteře.
2. Navrhněte metodiku pro analýzu ohybové tuhosti páteře včetně statistiky.
3. Realizujte experimenty se čtyřmi skupinami páteří a analyzujte hodnocený parametr.
4. Zpracujte a interpretejte získané výsledky, formulujte závěry.

Seznam doporučené literatury:

1. FIALA, Pavel et. al. Stručná anatomie člověka. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2015. ISBN 978-80-246-2693-2.
2. VOJTOVÁ, Lucy et al. Úvod do tkáňového inženýrství. Česká republika: MediaBros s.r.o., 2015. ISBN: 978-80-260-9720-4.
3. STASTNY, Premysl, Radek SEDLACEK et al. Structure degradation and strength changes of sintered calcium phosphate bone scaffolds with different phase structures during simulated biodegradation in vitro. 2019. ISSN 0928-4931.
4. MANNEN, Erin M. et al. Mechanical analysis of the human cadaveric thoracic spine with intact rib cage. Journal of Biomechanics. 2015, (48), 1-7.

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) diplomové práce:

Ing. Radek Sedláček, Ph.D., odbor biomechaniky FS

Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) diplomové práce:


Ing. Tomáš Suchý, Ph.D., odbor biomechaniky FS


Datum zadání diplomové práce: **22.04.2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **07.08.2020**

Platnost zadání diplomové práce:


Ing. Radek Sedláček, Ph.D.
podpis vedoucí(ho) práce


doc. Ing. Miroslav Španěl, CSc.
podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry


prof. Ing. Michael Valášek, DrSc.
podpis děkana(ky)

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Diplomantka bere na vědomí, že je povinna vypracovat diplomovou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v diplomové práci.

14.7.2020

Datum převzetí zadání



Podpis studentky

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala zcela samostatně a pouze s použitím literatury a podkladů uvedených v příloženém seznamu zdrojů.

V Praze dne

.....

Podpis

Anotační list

- Jméno autora:** Bc. Šárka Laxová
- Název DP:** Analýza ohybové tuhosti páteře po provedení lumbální intervertebrální fúze
- Anglický název:** Determination of Flexural Spine Stiffness after Lumbar Intervertebral Fusion
- Rok:** 2020
- Studijní program:** Strojní inženýrství
- Studijní obor:** Biomechanika a lékařské přístroje
- Ústav:** Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky
- Vedoucí práce:** Ing. Radek Sedláček, Ph.D.
- Konzultant práce:** Ing. Tomáš Suchý, Ph.D.
- Bibliografické údaje:** počet stran 62
počet obrázků 34
počet tabulek 6
- Klíčová slova:** Scaffold; Spinální fúze; Ohybová zkouška; Tuhost
- Keywords:** Scaffold; Spinal fusion; Bending test; Stiffness

Abstrakt: Diplomová práce se zabývá analýzou mechanických vlastností prasečích páteřních segmentů, do nichž byly implantovány náhrady navržené pro vylepšení kostní intervertebrální fúze. V rámci teoretické části práce jsou popsány defekty páteře, kostní náhrady a problematika spinální fúze. Experimentální část práce se pak věnuje ohybové zkoušce páteří se zamezením osového namáhání. Zkoumanými mechanickými vlastnostmi byly tuhost páteřních vzorků při extenzi a maximální ohybový moment potřebný k destrukci páteře. Získané hodnoty tuhostí při extenzi byly podrobeny statistickým testům.

Abstract: The diploma thesis deals with the analysis of the mechanical properties of spinal segments into which substitutes intended for bone intervertebral fusion were implanted. The theoretical part describes the defects of the spine, bone substitutes and the spinal fusion. The experiment was a pure bending test without axial loading of spines. The parameters evaluated were the stiffness of the spinal specimens at extension and the maximum bending moment required to destruct the spine. The obtained stiffness values were subjected to statistical tests.

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu mé diplomové práce, panu Ing. Radkovi Sedláčkovi, Ph.D., za jeho odborné vedení napříč celým experimentem, možnost zúčastnit se implantace vzorků a nahlédnout tak hlouběji do dané tematiky a také za cenné rady a připomínky, které mi poskytl při zpracování a vyhodnocování výsledků této práce.

Mé poděkování patří rovněž panu Ing. Tomáši Suchému, Ph.D., za odborné konzultace týkající se statistických testů a jejich užití při vyhodnocování naměřených dat.

Obsah

Seznam použitých zkratk	2
ÚVOD	3
1. TEORETICKÁ ČÁST	5
1.1 Kosti a jejich struktura	5
1.2 Anatomie lidské páteře	7
1.3 Defekty páteře	8
1.4 Remodelace kostní tkáně	10
1.5 Tkáňové inženýrství	11
1.6 Scaffoldy	12
1.7 Výroba scaffoldů	14
1.8 Spinální fúze	16
1.9 Biomechanika páteře	21
1.10 Experimenty na zvířatech	23
2. METODIKA	24
2.1 Experimentální zvířecí model	24
2.2 Princip testování	25
2.3 Statistické testy	26
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
3.1 Výroba implantátů	28
3.2 Zavedení implantátů	29
3.3 Příprava vzorků k měření	30
3.4 Princip zatěžování	32
3.5 Ohybová zkouška	34
4. VYHODNOCENÍ	37
4.1 Měření tuhosti	37
4.2 Zatěžování do destrukce	49
ZÁVĚR	50
SEZNAM ZDROJŮ	52
SEZNAM OBRÁZKŮ	55
SEZNAM TABULEK	57

Seznam použitých zkratek

BCP	bifázický kalcium fosfát
CaP	kalcium fosfát
DBM	demineralized bone matrix (demineralizovaný kostní matrix)
HA	hydroxyapatit
HPKS	hybridní porézní kostní scaffold
LSD	least significant difference – Fisherova LSD metoda
PCL	polykaprolakton
PGLA	polylaktidglykol
PLA	kyselina polyléčná
PRP	platelet-rich plasma (plazma bohatá na destičky)
TCP	trikalcium fosfát

ÚVOD

Degenerativní změny plotének, traumata, nádory a záněty v oblasti páteře, to vše může vést k útlaku míšního kanálu, doprovázeného bolestmi zad vystřelujícími do končetin a jejich omezenou hybností a citlivostí. Nejčastěji prováděným chirurgickým zákrokem páteře léčícím tyto morbidity je spinální fúze. Ve stádiu vyžadujícím výměnu meziobratlové ploténky, spočívá operace ve vyjmutí této ploténky (diskektomie) a vytvoření takzvaného kostního můstku. Kostní můstek vzniká principem kostní fúze, kterou podporuje implantát zavedený do meziobratlového prostoru. Okolí takto voperovaného implantátu je poté zpevněno osteosyntetickým materiálem, dlahami a šrouby. V současnosti jsou v ortopedii nejhojněji využívány implantáty v podobě autologních (autograft) či alogenních štěpů (alograft) zabudovaných do polymerních klecí nebo klecí z kovových slitin. Tyto metody s sebou ale mohou přinášet různé komplikace a omezení. Tradičně využívané autografty mohou být například doprovázeny chronickými bolestmi místa odběru, ale také nutná celková anestezie při odběru tkáně z pánve činí tuto metodu pro pacienta rizikovou, na druhou stranu využití alograftů od cizího dárce zase přináší možnost přenosu nemoci a nepřijetí náhrady imunitním systémem. [1, 2]

Pokrok v hledání materiálu, který by se svými vlastnostmi co nejvíce podobal kostní tkáni a také podporoval růst kostních buněk přináší biokeramika společně s tkáňovým inženýrstvím. Vytvoření syntetických kostních porézních náhrad – scaffoldů, jež mohou být osazeny buňkami, modifikovány růstovými faktory a případně i léky proti možným infekcím, s sebou ale přináší mnohé požadavky jako je biotolerance, biodegradabilita a dostatečná počáteční tuhost a pevnost při manipulaci s nosičem. [3] Tyto a mnohé další požadavky tak vedou k neustálému badání a snaze ve vylepšování kostních náhrad.

Cílem této diplomové práce je provedení experimentu a určení mechanických vlastností páteří s voperovanými implantáty sloužícími ke zlepšení spinální fúze a dále potvrzení či vyvrácení následujících hypotéz vypovídajících o aplikovaných implantátech:

- *Delší čas k hojení a srůstu tkáně přináší změnu v tuhosti páteřních segmentů.*
- *Některý z implantátů dosahuje po 8 týdnech přibližně tuhosti nativních vzorků.*
- *Některý z implantátů dosahuje po 16 týdnech přibližně tuhosti nativních vzorků.*
- *Některý z implantátů dosahuje oproti nativnímu vzorku nižší tuhosti.*
- *Některý z implantátů dosahuje výrazně vyšší tuhosti než ostatní skupiny vzorků.*

Součástí tohoto zjišťování je testování kvality kostního spojení mezi obratli a určení času, jež je potřebný pro srůst tkáně. Experiment je preklinicky prováděn na prasečích páteřních segmentech a je součástí projektu, který se zaměřuje právě na optimalizaci a zlepšení metody meziobratlové spinální fúze. V rámci experimentu budou prasečí páteře podrobeny zkoušce prostého ohybu ve smyslu zamezení parazitního osového namáhání. Hodnocen bude biomechanický dopad tří různých materiálů implantovaných do meziobratlového prostoru na tuhost a pevnost lumbální páteře.

Tato práce je součástí řešení projektu s názvem „Všestranné preklinické zhodnocení laterální lumbální intervertebrální dězy hybridním biodegradabilním nanokompozitním porézním implantátem“, který je podporován Ministerstvem zdravotnictví České republiky, grantem č. 17–31276 A. Účelem tohoto projektu je získat funkční, resorbovatelný, biomechanicky stabilní, osteoinduktivní a osteokonduktivní kostní implantát, který bude připraven pro klinické zkoušky.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Kostí a jejich struktura

Kost lze považovat za kompozitní, anizotropní materiál vznikající procesem zvaným osifikace. Mezi hlavní funkce kostí patří funkce podpůrná, kde spolu se svaly, šlachami a vazy poskytují oporu celému tělu. Další hlavní funkcí je ochrana životně důležitých orgánů jako je srdce, mozek, mícha a plíce. Společně se svaly umožňují pohyb a některé z nich i šíření zvuku. Mimo tyto zmíněné funkce hrají kosti významnou roli v metabolismu minerálních látek jako je vápník a fosfor, dále poskytují prostor pro krvetvorné buňky a částečně jsou také zdrojem chemické energie vázané v tukových buňkách. [4, 5]

Složení kosti závisí na jejím typu, umístění, stáří apod. Zralá kost obecně sestává z:

- anorganických složek (60 % - 70 %hm.) – kostní minerály
- organických složek (30 % - 40 %hm.) – 90 % kolagenu typu I, zbylých 10 % je složeno v podstatě z glykosaminoglykanů a glykoproteinů
- vody a tuků (cca. 20 %hm.)
- kostních buněk – osteoblasty, osteoklasty, osteocyty

Minerální látky obsažené v kostech dodávají kosti tvrdost, ale tím zároveň i křehkost, kolagenní matrice pak kosti dodává pružnost a houževnatost. Společně se významně podílí na biomechanických vlastnostech kostní tkáně. [6]

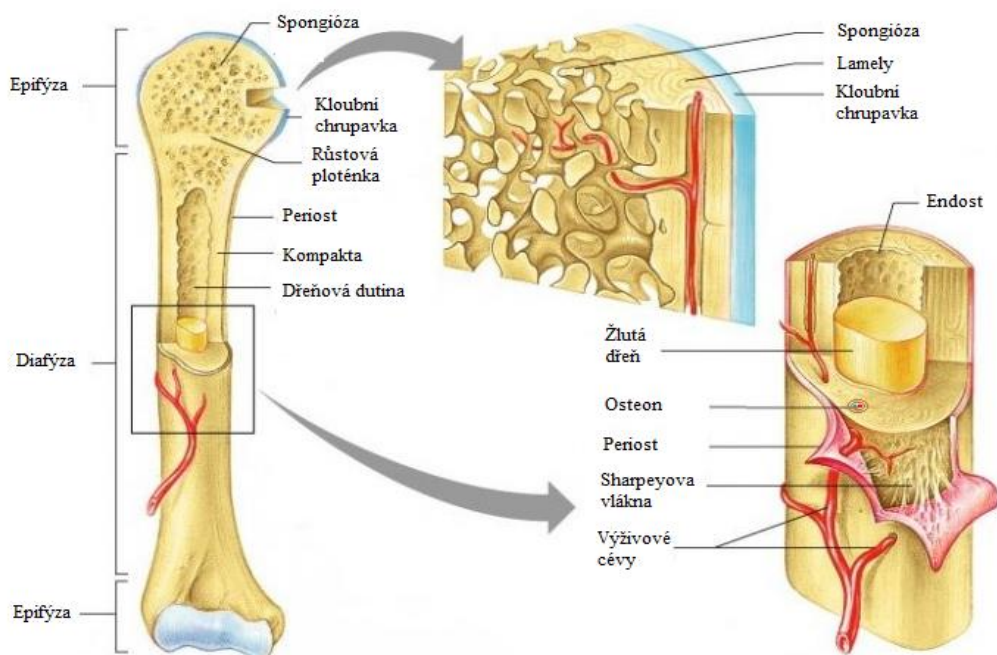
Můžeme je dělit dle:

- tvaru kosti na:
 - dlouhé – např. kosti končetin: kost stehenní, pažní
 - krátké – např. obratle, zánártní kosti
 - ploché – např. pánev, lopatka
 - nepravidelné – např. kost klínová, horní čelist
- způsobu osifikace:
 - desmogenní osifikace – tkáň vzniká osifikací z vaziva (např. kosti lebky)
 - chondrogenní osifikace – tkáň vzniká osifikací z chrupavky

Kosti se zde liší způsobem osifikace a vnitřní stavbou. Například u dlouhých kostí rozlišujeme části jako je diafýza, růstové ploténky a epifýzy, které u ostatních typů kostí nenajdeme. Různí se také v počtu osifikačních jader. Obecně je však kost na povrchu obalena kompaktní a vnitřek je v některých jejích částech, zejména v oblasti kloubních hlavic, tvořen spongiózní (houbovitou) tkání. Za další zvláštní skupinu lze navíc považovat kosti pneumatické (vzdušné), které obsahují dutinu vyplněnou vzduchem. Tento typ kostí můžeme nalézt v lebce a jsou napojené na horní cesty dýchací. [7, 8]

Základní stavba kosti

Kostní tkáň rozlišujeme na kost fibrilární a kost lamelární. Kost fibrilární, nebo také vláknitá, je označovaná jako nezralá kost – vyskytuje se hlavně během vývoje kosti. U dospělého člověka ji lze nalézt při úponech svalů a vazů, v okolí lebečních švů, vnitroušního labyrintu anebo při hojení po zlomeninách kostí. Během vývinu je postupně nahrazována kostí lamelární. Ta tvoří většinu kostního skeletu dospělého člověka a vyskytuje se ve dvou hlavních formách: hutná kostní tkáň – kompakta a houbovitá kostní tkáň – spongióza. Schéma struktury dlouhé kosti je zobrazeno na Obrázku 1. Rozložení těchto tkání se různí dle typu kostí. Například konce dlouhých kostí mají přibližně stejnou tloušťku kompakty jako mají kosti krátké, uprostřed dlouhé kosti je však kompaktní vrstva zesílená, a to až na několik milimetrů.



Obrázek 1 - Vnitřní struktura dlouhé kosti [9]

Spongióza připomíná strukturu houby. Jde o trámčité uskupení, které se přetváří samo tak, aby byla kost schopna co nejvíce odolávat aktuálnímu namáhání a případně se přestavit. [10] Nachází se v koncových částech dlouhých kostí a uvnitř krátkých a plochých kostí. Lamelární kompaktní tkáň je uspořádána do lamel a tvoří tvrdou povrchovou vrstvu kosti. Soubor těchto lamel obestavených kolem Haversova kanálku tvoří Haversův systém neboli osteon. Výživa, růst a obnova kostní tkáně je zajištěna pomocí cév a nervů procházejících právě Haversovými kanálky. Osteony jsou mezi sebou napříč propojeny tzv. Volkmannovými kanálky, které přivádějí cévy a nervy z okostice.

Okostice (periost) je vazivový obal zásobující kost živinami. Ke kosti je fixován Sharpeyovými vlákny. Další okostici podobná blána je endost, ta leží uvnitř kosti mezi kostní tkání a dřevnou dutinou vyplněnou kostní dření. [7, 8]

1.2 Anatomie lidské páteře

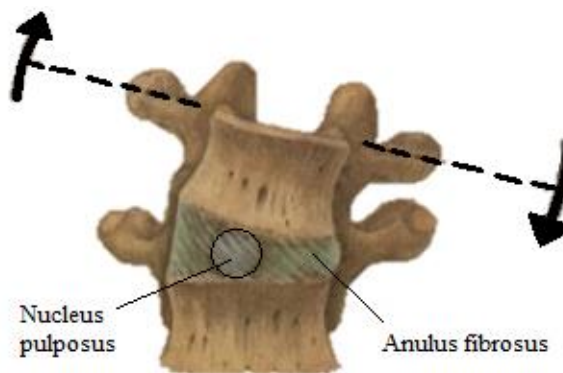
Páteř (*columna vertebralis*) je součástí axiálního skeletu a vytváří spolu s hrudníkem nosnou oporu těla. Je dvakrát prohnutá a tvarem tak připomíná tzv. „esíčko“, kde prohnutí v krční a bederní oblasti je označováno jako lordóza a prohnutí v oblasti hrudní a křížové označováno jako kyfóza. Tato zakřivení páteře, jsou-li v normální míře, pomáhají odpružení zátěže horní poloviny těla. [10] Páteř tvoří 33-34 obratlů, kde rozlišujeme obratle krční (7 – *vertebrae cervicales*), hrudní (12 – *vertebrae thoracicae*), bederní (5 – *vertebrae lumbales*), kost křížovou (5 srostlých křížových obratlů tvořící *os sacrum*) a kostrč (4-5 srostlých kostrčních obratlů tvořící *os coccygis*). Každý z těchto obratlů má tři mechanicky odlišně fungující složky a to tělo, oblouk a výběžky. Nosnou částí obratle ležící vpředu je tělo, ke kterému je vzadu připojen oblouk, jehož úkolem je ochrana míchy.



Obrázek 2 – Lidská páteř [7]

K tomuto oblouku jsou pak připojeny výběžky sloužící k pohybu obratle a celé páteře. Jedinými odlišnými obratli jsou obratle atlas (C1) a axis (C2), jejichž skloubením je umožněn rotační pohyb hlavy. [5, 7] Boční pohled na páteř lze vidět na Obrázku 2.

Meziobratlové destičky, nebo také ploténky (*discus intervertebrales*), jsou vazivově chrupavčité tkáně vyplňující meziobratlový prostor. Jsou velmi mechanicky namáhány a plní funkci pružných nárazníků. Tvarově se shodují s plochami sousedních obratlových těl a díky jejich stavbě umožňují pevné, ale současně pohyblivé spojení. Jádra těchto plotének (*nucleus pulposus*) jsou tvořena nestlačitelnou kapalinou, uzavřenou pomocí křížených vláken fibrózního prstence (*anulus fibrosus*) do kulovitého tvaru, kolem něhož se obratle při všech vzájemných pohybech naklánějí. Na obrázku níže (viz Obrázek 3) lze vidět posun jádra ploténky vlivem naklonění páteře. [7, 8]



Obrázek 3 - Funkce meziobratlové ploténky při vzájemném naklonění obratlových těl [upraveno z 7]

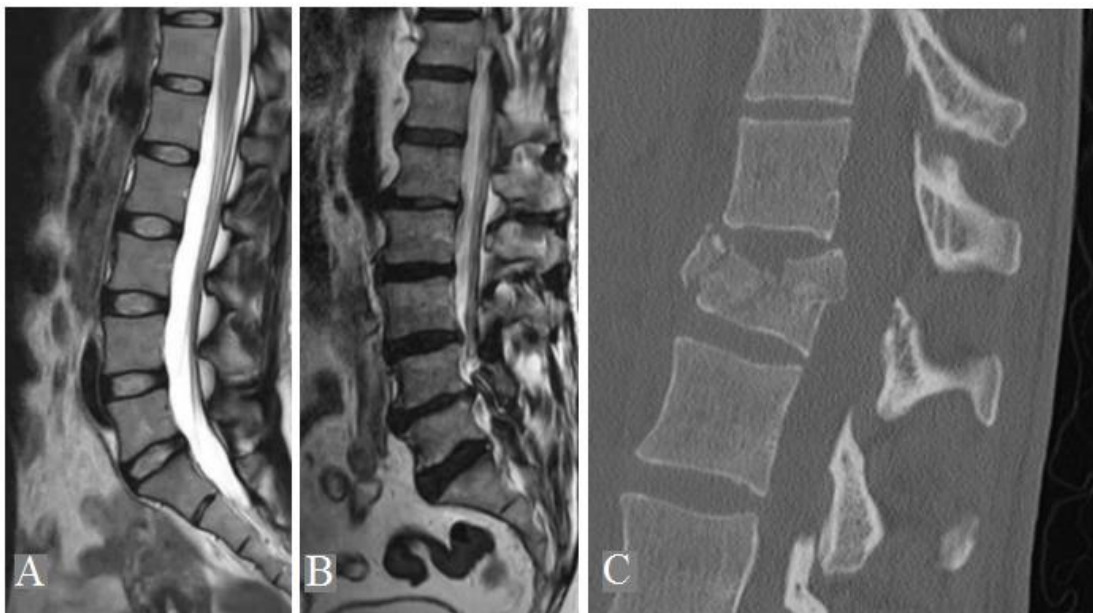
Dalším spojením na páteři jsou dlouhé a krátké vazy a meziobratlové klouby. Dlouhé vazy prakticky zesilují celou páteř a vazy krátké poutají oblouky a výběžky přilehlých obratlů. Tvarem a postavením pak meziobratlové klouby společně s ploténkami určují schopnost, typ a rozsah pohybů v dané části páteře. [7, 8]

1.3 Defekty páteře

Páteř je velmi mechanicky namáhanou částí lidského těla. Kromě mechanického namáhání je také podrobena degenerativními změnami vlivem stárnutí. Právě postupem stárnutí, a také například nedostatečně pravidelným zatížením páteře, dochází k řídnutí kostí a vysychání plotének, které se tak stávají pevnějšími a méně poddajnými. Vysycháním plotének taktéž dochází k poklesu výšky a tlaku jádra plotének, což má určitý vliv na biomechaniku páteře jako celku, a může kvůli tomu docházet k různým onemocněním páteře. [11, 12]

Mezi nejčastější onemocnění páteře patří vyhřezlá ploténka a zúžení (stenosa) páteřního kanálu (viz Obrázek 4), které může být způsobeno například zvětšenými nebo degenerativně změněnými meziobratlovými klouby anebo zvětšenými vazy. Meziobratlové ploténky a klouby však samy o sobě inervovány nejsou, tedy bolest nemůže pocházet přímo z nich. Bolest zde vzniká v důsledku toho, že tato onemocnění mohou způsobit, a často také způsobují utlačování míchy či míšních kořenů v páteřním kanálu. [13]

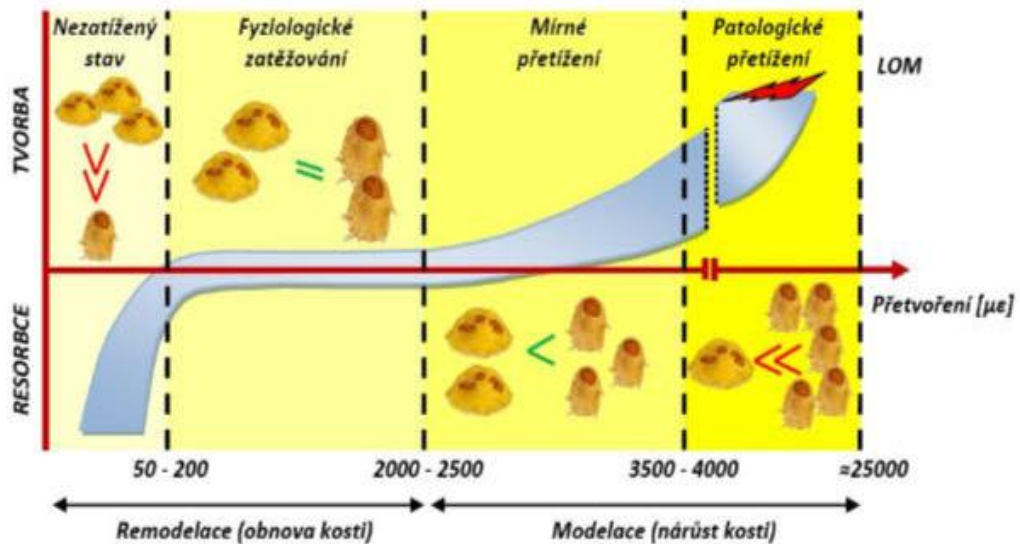
Takto zužovat páteřní kanál mohou ale také například kostní výrůstky (osteofyty), které vznikají v oblasti kloubů páteře postižených artrózou nebo posun obratle (spondylolistéza). [13] Mimo zmíněná degenerativní onemocnění, která utlačováním míchy a jejích kořenů způsobují různé problémy od bolestí v oblasti zad a končetin, až po omezení hybnosti, jsou ohrožením pro míchu také úrazy, záněty ale i rakovinná onemocnění zasahující oblast páteře.



Obrázek 4 – Rentgenové snímky páteře v sagitálním řezu (A – páteř ve fyziologickém stavu, B – páteř se zúženým míšním kanálem z důvodu vyhřezlých plotének, C – defekt obratle) [14]

1.4 Remodelace kostní tkáně

Po celý život probíhá autonomní přestavba kostí. Tato přestavba je řízena kostními buňkami – osteocyty, osteoblasty a osteoklasty. Osteocyty jsou obestavěné a uvízlé osteoblasty, jenž udržují metabolismus kosti a regulují vápník v těle. Funkcí osteoblastů je produkce základní kostní hmoty – tzv. kostního matrixu složeného látkami jako je kolagen typu I, proteoglykany a glykoproteiny. Vznikají diferenciací z mezenchymálních buněk. Jelikož ale kost nemůže růst rovnoměrně ve všech směrech stejně, je zapotřebí i osteoklastů, jež jsou schopny kostní tkáň odbourávat. [5, 7] Aktivita těchto buněk je pak závislá na zatížení a namáhání kostí. Tuto jejich činnost lze popsat například Frostovou teorií mechanostatu, viz Obrázek 5.



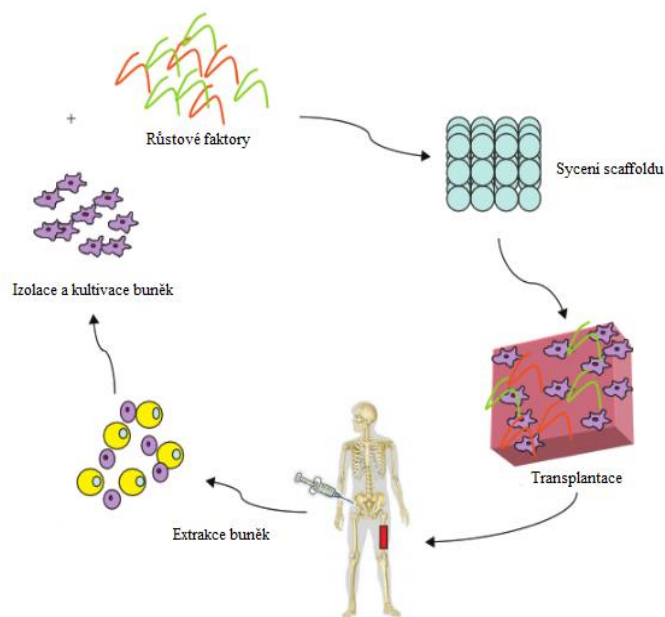
Obrázek 5 - Frostova teorie mechanostatu [15]

První část Frostova modelu popisuje případ, kdy je kostní tkáň nedostatečně zatěžována. V tomto případě je aktivován proces resorpce a osteoklasty rozpouštějí nezatěžovanou a z jejich pohledu nepotřebnou tkáň. Dochází-li k optimálnímu zatížení kostí, je aktivita osteoblastů a osteoklastů v rovnováze (viz druhá část modelu). Znamená to, že stará tkáň je v tomto případě nahrazena novou tkání a dochází pouze k její obnově. Při mírném přetížení mohou vznikat mikrotrhliny, které zaktivují osteoblasty. Aktivita osteoblastů zde převažuje nad aktivitou osteoklastů a dochází tak k nárůstu kosti. V poslední fázi je zaznamenán případ patologického přetížení. Kostní tkáň na tento stav reaguje rapidním nárůstem tkáně. Kost se stává velmi pevnou, ale zároveň i křehkou, což může zapříčinit lom. [15]

Z výše uvedeného je patrné, že kosti nepřetržitě reagují na fyziologické a biomechanické požadavky těla. V případě, kdy se kosti pravidelně nezatěžují mluvíme o kostní atrofii, tj. stav kdy dochází k resorpci a snižování hmotnosti a obsahu minerálů. Při zvýšených funkčních nárocích pak hovoříme o tzv. kostní hypertrofii. Obecně je však tvorba a úbytek kosti řízen řadou hormonů a dalších faktorů. [16] V případě, že už není možné samovolnou biologickou tvorbou a remodelací kosti vytvořit novou kostní tkáň v místě defektu, přichází na řadu kostní náhrady a tkáňové inženýrství.

1.5 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství lze definovat jako vědu, která cíleně aplikuje biologické, chemické a inženýrské poznatky k opravě, obnově nebo regeneraci živých tkání, a to za pomoci biomateriálů a buněk. [16] Kostí a chrupavky jsou v tkáňovém inženýrství předmětem rozsáhlého výzkumu. V ortopedické chirurgii a biomedicinském inženýrství jsou autologní transplantace těchto tkání jednou z nejslibnějších technik. [17] Tradičně se pro obnovení poškozené tkáně s vadami vylučujícími samovolné zhojení používají kostní štěpy. Bohužel, je ale tato metoda doprovázena značnými nevýhodami, jako jsou bolesti v místě odběru, nebezpečím infekce ran a nedostatečné dostupnosti. [12] Nedílnou součástí rozvoje léčby se tak staly syntetické náhrady. Ty ale mají samy o sobě, mimo jiné, problém s biotolerancí, biodegradabilitou a může u nich docházet k odmítnutí materiálu organismem. Nadějným řešením je kombinace syntetických náhrad s tkáňovým inženýrstvím. Základní princip tkáňového inženýrství lze vidět na Obrázku 6.



Obrázek 6 - Schéma principu tkáňového inženýrství [upraveno z 16]

Obecně je v tkáňovém inženýrství možno využít tři primární typy léčby [18]:

- Buněčná terapie

Využívá pouze buněk, které jsou dopravovány do místa poškození většinou injekčně. V případě kostních defektů jde zejména o osteoblasty a mesenchymální kmenové buňky, z kterých se osteoblasty diferencují. Buňky potřebné pro regeneraci a tvorbu kostní tkáně mohou být získávány z pacienta – autologní buňky, od dárce stejného druhu – alogenní buňky anebo v případě, kdy jde o jiný živočišný druh – xenogenní buňky. Výhodou je, že aplikace buněk do místa defektu není doprovázena složitými postupy transplantace, čímž je sníženo riziko nežádoucích reakcí. Naproti tomu buňky nejsou v tomto místě fixovány, takže mohou migrovat a snižovat tak efektivitu léčby. Významný je také čas, který je potřeba k izolaci a kultivaci buněk.

- Bezbuněčné materiály

Slouží především jako dočasná výplň v místech poškozené tkáně, která má značnou schopnost obnovy a u níž se předpokládá, že dojde k migraci buněk z okolní neporaněné tkáně do nosiče – scaffoldu. Odpadá zde čas potřebný k izolaci a namnožení buněk, takže ji lze označit za časově výhodnější. Tato metoda ale nepodporuje tvorbu nové mezibuněčné hmoty a tím nemusí být u některých tkání dostatečně účinná.

- Kombinace

Buněčné scaffoldy jsou vyvíjeny tak, aby napodobovali přirozené prostředí buněk a podporovali růst tkáně. Často tak slouží jako nosná opora, která zabezpečuje chemické a fyziologické podmínky pro buněčné množení a diferenciaci. Poskytují výhody buněčné terapie a bezbuněčných materiálů.

1.6 Scaffoldy

Tkáňové nosiče, známé též jako scaffoldy, jsou trojrozměrné syntetické štěpy, které se vyrábějí z porézních degradovatelných materiálů, často označovaných jako biomateriály. Kostní scaffoldy jsou vytvářeny tak, aby během regenerace kostí poskytovali nezbytnou podporu růstu tkáně. Jejich výhodou je, že mohou být naočkovány buňkami tvořící kosti, ale zároveň také doplněny například o růstové faktory, antibiotika a různé léky pro zabránění infekce. V současné době mají stále větší význam při léčbě velkých, ale i menších kostí. [12]

Na ideální scaffold je kladeno velké množství materiálových a geometrických požadavků, které jsou pečlivě kontrolovány a upravovány dle konkrétního využití. Mezi hlavní funkční úlohy ideálního scaffoldu patří následující [16, 17, 18]:

- **Biotolerance a cytokompatibilita nosiče**

Použitý materiál nesmí být pro tělo toxický a nesmí vyvolávat zánětlivou reakci. Zároveň by měl být kompatibilní s buňkami přítomnými v místě použití a měl by zajišťovat adhezi buněk na svém povrchu.
- **Biodegradabilita a resorpce nosiče**

Nosiče většinou nebývají cíleně tvořené jako permanentní implantáty. Rychlost jejich resorpce by měla být úměrná resorpci nahrazované tkáně tak, aby nedošlo k rozpadu dříve, než vznikne nová tkáň a zároveň ne později, aby scaffold bránil růstu nové tkáně.
- **Proliferace a diferenciaci buněk**

Materiál nosiče by měl interagovat s buňkami a tím umožňovat proliferaci, tedy množení buněk a diferenciaci na buňky tvořící požadovanou tkáň. Pro tyto požadavky je podstatná struktura a stavba nosiče.
- **3D struktura a vysoká porozita nosiče**

Struktura nosiče by měla mít vzájemně propojenou síť pórů, která umožní migraci buněk, buněčný růst, transport živin a látkovou výměnu. Pro zajištění růstu osteogenních buněk a vaskularizaci konstrukce je vhodný minimální průměr pórů 300 μm .
- **Mechanické vlastnosti odpovídající vlastnostem tkáně v místě implantace**

Stavba a struktura scaffoldu by měla napodobovat nahrazovanou tkáň i z pohledu namáhání. Důležité je také to, aby měl scaffold dostatečnou počáteční mechanickou pevnost a tuhost bez projevů únavy.
- **Teplotní stabilita**

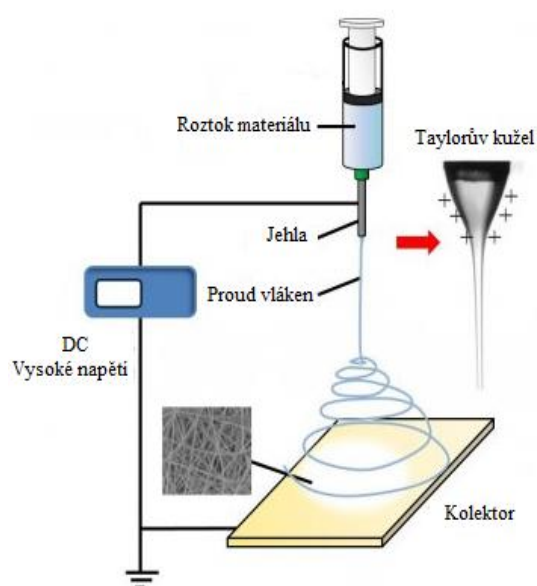
Je nutné podotknout, že tato věda se stále vyvíjí a různé postupy a strategie jsou předmětem experimentálních výzkumů. V žádném případě ještě není zcela jasné, jak definovat ideální scaffold pro konkrétní typ tkáně. Většinou totiž není možno vyhovět všem těmto náročným požadavkům najednou, jelikož jde o velmi složité biologické procesy. [19]

1.7 Výroba scaffoldů

Výroba trojrozměrné porézní struktury vyžaduje speciální techniky výroby. Velikost pórů, jejich propojení a celková struktura nosiče jsou důležitými parametry pro adhezi a proliferaci buněk, jak je popsáno v kapitole 1.6. Nejčastěji využívané moderní metody používané při výrobě kostních scaffoldů jsou souhrnně uvedeny níže.

Electrospinning

Elektrostatické zvlákňování je relativně levná výrobní technologie pro výrobu nanovláken z polymerních roztoků a tavenin. Proces je řízen elektrickým napětím vysoké intenzity, vytvořeným mezi dvěma elektrodami opačných polarit. První elektroda je umístěna u zvlákňovací trysky, kde je čerpán polymer. Tryska směřuje k uzemněné podložce – kolektoru, zde je umístěna druhá elektroda. K vytlačení paprsku polymeru dojde, jestliže elektrické pole vytvoří v načerpané kapičce polymeru sílu schopnou překonat povrchové napětí roztoku. S rostoucí intenzitou elektrického pole se pak kapička polymeru prodlužuje a protahuje do tzv. Taylorova kužele, viz Obrázek 7. [19, 20]



Freeze drying

Lyofilizace známá též jako sušení mrazem, je metoda založená na sublimaci ledových krystalů rozpouštědla, které se tvoří během procesu zmrazování. Pórovitost a vzájemnou propojitelnost pórů nosiče je možno řídit změnou doby tuhnutí, koncentrací rozpouštědla a zavedením více teplotních gradientů. V kombinaci s vymýváním částic pak lze získat ještě více pórovitou strukturu. [20]

Gas foaming

Plynné napěňování biologicky rozložitelných polymerů našlo své uplatnění v biomedicínských vědách během 80. let minulého století. Jde o výrobní metodu nosičů, která umožňuje tvorbu porézní struktury vytvářením bublin plynu (např. CO₂)

v polymeru. Polymer je zde lisován do formy a poté je tlakován plynem do nasycení – takto vznikají vzduchové bubliny až do 100 µm. Propojení pórů u této metody ale není příliš optimální, proto se často kombinuje s vyluhováním částic. [19, 20]

Rapid prototyping

Proces 3D tisku řízený počítačem nabízí potenciál pro výrobu implantátů s vynikající složitostí. Struktura a architektura pórů je navržena v prostředích CAD/CAM, čímž je možné je navrhovat tak, aby odpovídaly specifickým požadavkům na tkáň. Nosiče mohou být touto metodou vyrobeny z různých materiálů. Využívá se také v kombinaci s vymýváním částic. [19, 20]

Přehled používaných metod a jejich vlastnosti lze souhrnně vidět v Tabulce 1.

Tabulka 1 - Tabulka vlastností některých technologií pro výrobu scaffoldů [16]

Metoda	Vlastnosti
Gas foaming	<ul style="list-style-type: none"> • bez organické složky • vysoké teploty při zpracování • horší propojenost pórů
Electrospinning	<ul style="list-style-type: none"> • struktura podobná extracelulární matici • malé póry • s organickou složkou
Rapid prototyping	<ul style="list-style-type: none"> • možné začlenění buněk • kontrola velikosti a průměru póru • vysoké teploty při zpracování
Freeze drying	<ul style="list-style-type: none"> • rychlý proces • malé póry s nepravidelnou strukturou
Thermally induced phase separation	<ul style="list-style-type: none"> • struktura podobná extracelulární matici • aplikovatelné pouze na malý počet polymerů
Solvent casting/particulate leaching	<ul style="list-style-type: none"> • jednoduchý proces • snadná kontrola porézní struktury • omezená tloušťka nosiče

1.8 Spinální fúze

Spinální fúze představuje hojně využívaný postup v oblasti spinální chirurgie, který bývá obvykle prováděn ortopedy nebo neurochirurgy. Ke spojení dvou nebo více obratlů se přistupuje za účelem uvolnění utlačované míchy a míšních kořenů, úlevy od bolesti či k odstranění dalších patologických stavů, viz kapitola 1.3.

Samotný biologický proces spinální fúze byl rozčleněn S. D. Bodenem na následující fáze [1]:

- Zánět

Je důležitou částí procesu, jehož intenzita a trvání závisí na použité náhradě a trvá přibližně 7-14 dní. Kolem kostní náhrady vzniká hematoma a tkáň je napadána zánětlivými buňkami. Fibroblastům podobné buňky v zánětlivé tkáni se později transformují do podpůrné vazivově cévnaté tkáně – fibrovaskulární stromy.

- Vaskularizace

Ve stróze se objevují vaskulární pupeny, díky nimž se v místě štěpu vyvíjejí osteogenní buňky, které podporují fúzi. Vznik vaskulární sítě dále poskytuje tkáni živiny a minerály nezbytné pro léčebný proces. Vaskularizace je ovlivněna pórovitou strukturou a složením náhrady.

- Osteoindukce

Probíhá resorpce nekrotické tkáně a diferenciace kmenových buněk na osteoblasty, které vytváří novou kostní tkáň. Ta se rozšiřuje směrem k centrální zóně náhrady.

- Osteokondukce

Při fázi osteokondukce dochází k prorůstání do hostitelské kosti a její částečné substituci. Zároveň je osteoklasty resorbována implantovaná náhrada.

- Remodelace

Kolem nově vzniklého kostního můstku se tvoří kortikální kost a se zvyšující se aktivitou kostní dřene i tvorba spongiózy. Remodelace začíná obvykle po 6-10 týdnech a je obvykle dokončena do 1 roku od implantace.

Během regenerace kostní tkáně je pórovitá struktura velmi důležitá, jelikož usnadňuje rozvoj vaskulární sítě. Podpora rozvoje vaskulární sítě je možná například přidáním růstových faktorů k implantátům nebo využitím porézních biodegradabilních scaffoldů. [2]

Náhrady, které se využívají k podpoření růstu kostního můstku, se mohou v závislosti na jejich materiálu, geometrii a prostředí, v kterém jsou užity, rozkládat od několika týdnů až po několik let. Jak už bylo řečeno, musí splňovat mnoho požadavků a po jejich implantaci mohou vyvolat nanejvýš minimální zánětlivou reakci, viz kapitola 1.6. Je dobré konstatovat, že se všechny materiály využívané k těmto účelům stále vyvíjejí a že například řešení pro ideální scaffold, který by posloužil pro rekonstrukci velkých kostních segmentálních defektů stále neexistuje. [22] Níže lze najít přehled nejčastěji využívaných a testovaných materiálů v oblasti spinální fúze. Dále pak existují kombinace jmenovaných materiálů, které přinášejí širokou škálu vlastností.

Autograft

Díky svým optimálním osteoinduktivním, osteokonduktivním a osteogenním vlastnostem je autologní kostní štěp (autograft) nejvíce využívanou kostní náhradou a zlatým standardem pro spinální fúzi. Získáván je z vlastní kostní tkáně pacienta, čímž je zabráněno riziku přenosu nemoci od dárce. K získání kvalitního a kvantitativního kostního štěpu je tkáň nejčastěji odebírána z hřebene pánevní kosti. [23] Odebrání autologního štěpu nicméně přináší i nevýhody, jako je prodloužení chirurgického zákroku, ztrátu krve, možné poškození nervů, infekce, pooperační bolesti v místě odběru, a další. [1, 23]

Alograft

V případě absence autograftu je druhým nejvyužívanějším štěpem alograft. Při alogenní transplantaci je do místa defektu zaváděn štěp odebraný dárci tkáně. Alografty jsou možné k dostání v různých tvarech a velikostech. Jejich nevýhodou je možnost přenosu virů či nemoci od dárce. Aby se možnosti přenosu zamezilo, bývají alografty sterilizovány a zamrazovány. Čerstvé alografty se tak nevyužívají. Zmrazený a lyofilizovaný aloštěp je více osteokonduktivní díky své struktuře, avšak ve srovnání s čerstvým aloštěpem jsou osteoinduktivní vlastnosti vlivem zpracování slabší. [23] Ve srovnání s autograftem vykazuje alograft pomalejší integraci s nativní kostí a snížené schopnosti osteoindukce a osteokondukce. [1]

Demineralizovaný kostní matrix

Zkratkou DBM, je vyráběn kyselou extrakcí z alogenní kosti, která má za následek ztrátu většiny minerální matrice. Výsledný produkt obsahuje kolagen typu I, kostní proteiny a růstové faktory. [1] Osteogenní schopnosti kosti jsou během zpracování z velké části ztraceny. Díky některým růstovým faktorům může DBM vykazovat osteoinduktivní vlastnosti a za přítomnosti kolagenové struktury i vlastnosti osteokonduktivní. DBM je ve srovnání s autograftem získaným z pánevního hřebene dražší alternativou a ani mechanické vlastnosti u této metody nejsou velmi dobré. Používán je tedy spíše k plnění než jako samotná náhrada kosti. [2]

Plazma bohatá na destičky

Plazma bohatá na destičky (PRP) je obvykle využívána ve formě gelu, který je aplikován do místa defektu. Získává se z krve pacienta a po jejím odstředění se krevní destičky mísí s dalšími látkami. Při stadiu hojení jsou z krevních destiček uvolňovány růstové faktory. Ty zlepšují hojení kosti tím, že podporují proliferaci kmenových buněk a osteoblastů. [1] Ve studiích však dosud nejsou záznamy, že by PRP sloužilo k urychlení hojení kosti. PRP samo o sobě nemá žádnou mechanickou odolnost, je tedy využíván jako doplněk k jiným materiálům. [1, 2]

Biokeramika

Pro tuhé a relativně silné keramické scaffoldy jsou první volbou slinuté scaffoldy na bázi kalcium fosfátů – fosforečnanu vápenatého (CaP). Keramika na bázi CaP podporuje růst kosti tím, že podporuje adhezi, diferenciaci, proliferaci a migraci buněk. Mezi nejčastěji studované a využívané keramické CaP materiály v tkáňovém inženýrství patří hydroxyapatit (HA), trikalcium fosfát (formy α -TCP a β -TCP) a jejich dvoufázové směsi označovány jako bifázické (BCP). [3, 20]

Hydroxyapatit

HA je přírodním materiálem obsaženým v zubech a kostech. Tím, že je součástí lidského organismu nemá negativní imunitní odpověď a je vysoce biokompatibilní. Nabízí dobré mechanické vlastnosti v tlaku (napětí v tlaku 160 MPa), porézní strukturu, ale je křehký a pomalu se resorbuje. Z tohoto důvodu může HA sloužit jako podpora při pomalé kolonizaci buněk a růstu kosti. [2] V současné

době je využíván v kombinaci s TCP a jako nosič pro další materiály, například pro kolagen, růstové faktory apod. [23]

Trikalcium fosfát

Zkráceně TCP, je vysoce biokompatibilní a porézní materiál, který na rozdíl od HA poskytuje rychlejší resorpci. Jeho mechanické vlastnosti jsou ale horší než u kostního štěpu a spongiózní kosti. [2] Povrchovými vrstvami TCP na implantátu lze docílit zlepšení spojení s hostitelskou kostí. [23]

Při porovnání HA a β -TCP bylo zjištěno, že HA degraduje příliš pomalu, naopak β -TCP degraduje rychleji ale obvykle není dostatečně stabilní, aby odolal fyziologickému zatížení. U jejich **bifázických směsí** pak lze pozorovat vyšší pevnost v tlaku než u samotných fází. Výhodou je, že vykazují blízkou podobnost s anorganickou složkou kostí a slibné vlastnosti jako je biologická odbouratelnost a osteoinduktivita. Jsou málo rozpustné ve vodě, ale zato snadno rozpustné v kyselinách, proto se ke studiu rozpouštění CaP *in vitro* obvykle používají roztoky při různých pH. Toto dlouhodobé působení kyselého prostředí má simulovat aktivitu osteoklastů. [3, 20] Keramické scaffoldy se vyznačují vysokou hodnotou tvrdosti, nízkou elasticitou a křehkostí, což má za příčinu obtížnou tvarovatelnost. [18]

Polymery

Většina scaffoldů je vyrobena buďto čistě z polymerů nebo jsou polymery používány jako spojitá fáze v kompozitních materiálech. U polymerů lze přizpůsobit chemickou strukturu a molekulovou hmotnost. S rozvojem tkáňového inženýrství se ukázalo, že ke zlepšení růstu tkáně a chování buněk lze využít i kombinace přírodních a syntetických polymerů. [20]

- **Přírodní polymery**

Přirozeně vyskytující se polymery mohou být extrahovány z živočišných tkání nebo rostlin a mohou být biokompatibilnější než jejich syntetické protějšky. Jsou přirozené pro lidský organismus a nevyvolávají imunitní odpověď. Mezi přírodní polymery řadíme například proteiny přírodních extracelulárních matic jako je kolagen, chitosan a polypeptidy. Kolagen je nejhojněji přítomným proteinem u obratlovců. Lze identifikovat více než 20 druhů a v kostech najdeme nejvíce kolagen typu I. Chitosan je přírodním polysacharidem, jehož strukturální vlastnosti jsou podobné

glykosaminoglykanům. Funkcí polypeptidů je usnadnění adheze buněk, a proto slouží pro lepší transplantaci a připojení buněk. [20]

- Syntetické polymery

V porovnání s polymery získávanými z přírodních zdrojů jsou syntetické polymery více konzistentnější. Výrobními postupy lze také lépe vyladit molekulovou hmotnost a stupeň hydrofilnosti. Některé příklady syntetických polymerů pro kostní tkáňové inženýrství jsou kyselina polymléčná (PLA), polylaktidglykoly (PGLA) s různými poměry laktidu ke glykolidu a polykaprolakton (PCL). [16, 20]

Hydrogely

Jde o hydratované polymerní řetězce, které účinně slouží při dodávání buněk a růstových faktorů. [20] Jsou snadno tvarovatelné a umožňují výplň defektů o různých nepravidelných tvarech a velikostech. Jejich vlastnosti záleží zejména na koncentraci a druhu polymeru a jeho struktuře. Z přírodních polymerů je většinou využíván kolagen a želatina, chitosan nebo například kyselina hyaluronová. Ze syntetických polymerů jsou pak využívány PLA a PGLA. Nevýhodou hydrogelů jsou horší mechanické vlastnosti. [18] Nebylo prokázáno, že by samy o sobě zlepšovaly tvorbu kosti. [20]

Kompozity

Kompozitní materiály se skládají z matrice a plniva. Jako plnivo se u nich užívá částic na bázi kalcium fosfátů, které svou chemickou strukturou připomínají složení kostí savců. Nejčastěji používanými kalcium fosfáty jsou hydroxyapatit, trikalcium fosfát a oktakalcium fosfát. Výhodná je i kombinace výše zmíněných. Například spojení stability HA a dobré degradace β -TCP umožňuje lepší hojení kostní tkáně a růst krystalů. [18]

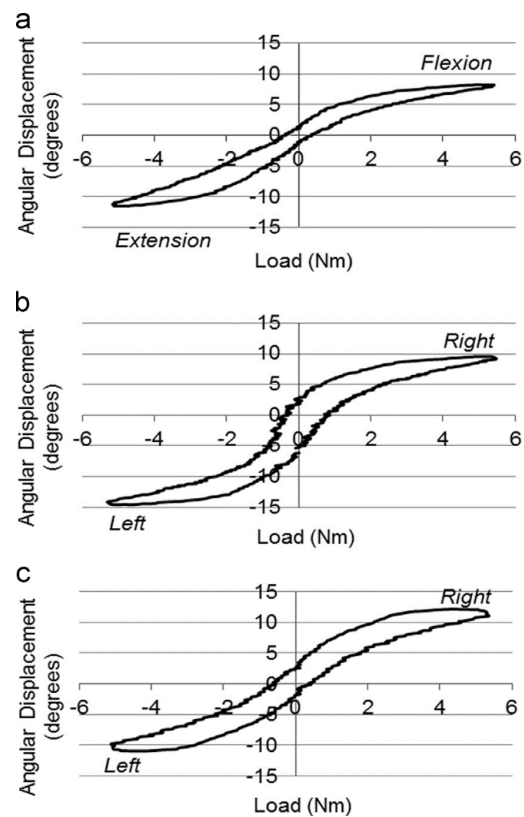
Příhodnými materiály pro matrice jsou biokompatibilní a biodegradabilní polymery, které jsou schopny interagovat s buňkami. Jmenovitě se z přírodních biopolymerů využívá například kolagen, hyaluronan a želatina. Ze syntetických materiálů je využívána např. kyselina polymléčná, jenž je vhodná jako kostní fixační materiál a poly β -estery, které se využívají jako výztuže v ortopedii a stimulují růst kosti, a další. [18]

Existuje mnoho materiálů využívaných a vyvíjených k výplni kostních defektů. Převážná většina z nich však nabízí pouze osteokonduktivní vlastnosti, a nikoliv vlastnosti osteoinduktivní. Doposud je tedy stále nejideálnějším materiálem využívaným ke kostní fúzi autograft, jenž splňuje většinu specifikací ideálního materiálu. [2]

1.9 Biomechanika páteře

Existuje několik studií, které se zabývají zkoumáním pohybu a flexibility lidské páteře. Experimenty týkající se mechanického testování páteře napomáhají k lepšímu porozumění její funkce, ale umožňují také například testování nových implantátů nebo páteřních stabilizačních systémů. Pokročilý výzkum a biomechanické zhodnocení mohou pak nabídnout třeba i pokrok ve výpočetních modelech či posuzování optimálních chirurgických metod. [24, 25]

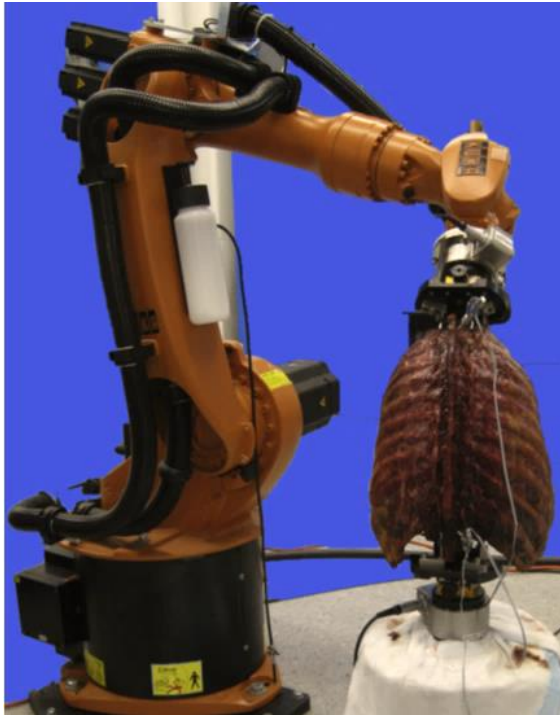
Je dobré poznamenat, že studie se zabývají různými částmi páteře, načež každá z těchto částí je schopna jiného rozsahu pohybu a parametrů. Konkrétně hrudní páteř je vzhledem ke krční a bederní páteři z části jedinečná kvůli kostovertebrálním skloubením, která zvyšují její tuhost a stabilitu. [25] Nejvíce zatěžovaným a namáhaným úsekem páteře je pak bederní oblast, která nese značnou část hmotnosti těla. Studie ([24, 25]) se shodly, že s rozsahem pohybu páteře negativně koreluje věk, narozdíl od faktorů jako jsou: pohlaví, kuřáctví, váha a výška, které s rozsahem pohybu v neporušeném stavu nekorelují ve všech módech zátěže (flexe-extenze, axiální rotace a laterální ohyb).



Obrázek 8 – Typický průběh při zatěžování páteři do: a) flexe-extenze, b) laterální flexe, c) axiální rotace [24]

Při provádění experimentů na páteřích *in vitro* je zatěžování prostým ohybem akceptovaným standardem. Prostý ohyb zde bývá aplikován na volný kraniální konec páteřního segmentu a kaudální konec je pevně upevněn k základně testovací platformy. [26] Způsob uchycení je možno vidět na Obrázku 10.

Společným prvkem studií Mannen a kol. ([24]), Healy a kol. ([25]) a Lubelski a kol. ([27]) bylo zatěžování hrudní páteře s neporušeným hrudním košem třemi módy pohybu, jmenovitě: flexe-extenze, laterální ohyb a axiální rotace. Testovacími zařízeními v těchto studiích byli na zakázku upravení průmysloví roboti. Robota využívaného ve studiích [25, 27] lze vidět na Obrázku 9. Jak lze taktéž vidět na tomto obrázku, byla kaudální část páteře pevně připevněna k podstavci, zatímco kranální část byla připevněna k robotické paži se silovým senzorem tak, aby byl umožněn neomezený a volný pohyb.



Obrázek 9 - Robotický systém pro testování páteře s kompletním hrudním košem, robot KUKA (Augsburg, Německo) [27]



Obrázek 10 - Programovatelný robot vyvinutý k zatěžování páteří prostým ohybem, stupně volnosti jsou vyznačeny černými šipkami [26]

Ve výše zmíněných studiích byl na páteřní vzorky aplikován prostý ohyb s mezním zatížením ± 5 Nm, přičemž se nepřetržitě minimalizovala veškerá další zatížení mimo osu. Po celou dobu experimentu byly vzorky periodicky vlhčeny postřikem fyziologického roztoku. Na výše zobrazeném Obrázku 8 lze vidět obvyklé průběhy při zatěžování páteře. Křivky vykazují běžný průběh viskoelastických tkání v podobě hystereze.

1.10 Experimenty na zvířatech

Úplné pochopení biologického procesu kostních náhrad v přirozeném prostředí je zásadní pro další pokrok v léčbě spinální fúzi. Bohužel však je v klinickém prostředí tento komplikovaný proces z důvodu nedostatku dostupných technik obtížné posuzovat. Cennou alternativou, která se využívá jsou tak zvířecí modely. [1] Ačkoliv rozdíly mezi lidmi a zvířaty co se týče anatomie, věku a měřítka mohou vést k problémům při interpretaci výsledků, je používání zvířecích modelů při experimentech hojně využíváno. [12] Vybraná experimentální zvířata musí podléhat určitým kritériím. Při výběru vhodného zvířecího modelu je nutné zhodnotit následující kritéria [28]:

- fyziologická podobnost zvířete s lidmi
- velikosti a anatomické vlastnosti zvířete
- biomechanické vlastnosti
- dostupnost zvěře
- chov, manipulace se zvířetem a riziko pro personál
- požadavky na ustájení
- odolnost zvířete vůči chorobám a stresu
- tolerantní povaha k experimentům
- existence anestetických, chirurgických a pooperačních protokolů
- etické a společenské důsledky

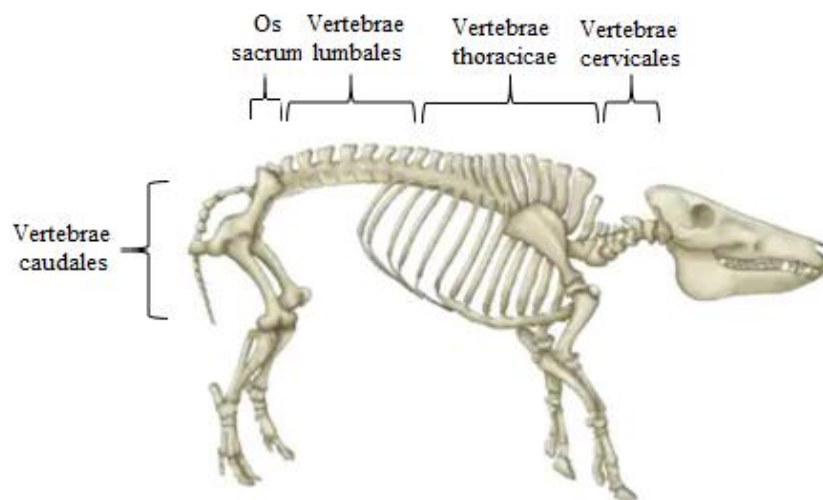
Nakonec však výběr zvířete zvoleného pro experiment musí schválit odborná komise pro etické zacházení se zvířaty, která dbá na humánnost a etiku experimentu jako celku. Ta je povinna řídit se směrnici jako je například Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely, jenž zahrnuje i oblast vývoje, výroby nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv. Jejím účelem je omezení počtu zvířat použitých v projektech na absolutní minimum, aniž by tím byly ohroženy cíle projektu a nastavení standardů ohledně jejich používání, ustájení a péče.

2. METODIKA

Tato kapitola popisuje pracovní postup, který byl proveden napříč experimentem. Obsahuje výběr experimentálního zvířete, princip a režimy zatěžování, postup získání hledaných veličin a přehled statistických testů, kterými byla získaná data posuzována.

2.1 Experimentální zvířecí model

K preklinickému experimentálnímu testování studie, již se zabývá tato práce, bylo vybráno zvířecího prasečího modelu. Důvodem tohoto výběru byla podobnost velikosti prasečí páteře vůči velikosti lidské páteře, díky čemuž mohl být použit implantát, který se užívá v humánní medicíně. Prasečí páteř se skládá z obratlů krčních (7), hrudních (14-18), bederních (6-7), kosti křížové (4 srostlé obratle) a na rozdíl od člověka také obratlů ocasních (20-23). [29] Kostru prasete lze vidět na Obrázku 11. Všechna experimentální zvířata byla na začátku experimentu dospělá a měla přibližně hmotnost kolem 80 kg. Vybrána byla ze speciálního chovu, který splňuje podmínky pro to, aby na nich mohly být prováděny experimenty.



Obrázek 11 - Skelet prasete [30]

2.2 Princip testování

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 14,15Th + 6L a horní část páteře byla uložena tím způsobem, aby byl umožněn její volný pohyb. Páteře byly rozděleny a označeny do jednotlivých skupin dle druhu užitých implantátů a dle doby ponechání implantátů v těle zvířete. Po přivezení vzorků do laboratoře byly vzorky očištěny a jejich konce upraveny tak, aby mohly být zasunuty do připravených novodurových trubkových úchytek. K upevnění vzorků páteří v trubkách byl použit technický dentakryl.

Zkouška prostého ohybu proběhla v akreditované Laboratoři mechanických zkoušek na ČVUT v Praze, na Fakultě strojní. Zde se nachází testovací systém MTS Mini Bionix 858.2 (MTS, Minnesota, USA) se speciálním spinálním simulátorem, jehož konstrukce je primárně určena k testování páteří (viz Obrázek 12). Páteře byly při experimentu ohýbány nejprve do extenze a následně do flexe. Zatěžování proběhlo ve dvou režimech. Nejprve byla hodnocena tuhost testovaných páteří při extenzi bez poškození tkáně a následně byl vzorek zatěžován do limitů testovacího systému a použitého 6DOF snímače, případně do destrukce vzorku. U každého vzorku byl cyklus opakován třikrát. Po dokončení zkoušky následovalo vyjmutí vzorku ze simulátoru, umístění do igelitového obalu a uložení do mrazícího boxu.



Obrázek 12 – Testovací zařízení MTS Mini Bionix 858.2 se spinálním simulátorem

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

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

Nastavené principy zatěžování, jako je například standardní zátěž páteří prostým ohybem bez parazitních sil, jsou v souladu, s již uskutečněnými studii zmíněnými v kapitole 1.9.

2.3 Statistické testy

Pro potvrzení či vyvrácení počátečních hypotéz je potřeba naměřená data vhodně zpracovat a hypotézy otestovat statistickými testy. Teprve poté lze posoudit, zda získaná data mohou dostatečně a objektivně vypovídat o zkoušeném materiálu. Skupinu naměřených dat týkajících se jednotlivých použitých materiálů nazýváme soubor dat. Testy obecně dělíme na parametrické a neparametrické. Použití zmíněných testů závisí na splnění podmínek normality a shody rozptylů, přičemž předpokládáme, že data jsou náhodné a nezávislé veličiny. Důležitými veličinami u vyhodnocování statistických testů jsou následující hodnoty:

- p hodnota – vyjadřuje pravděpodobnost, s níž zamítáme či potvrzujeme nulovou hypotézu
- hladina významnosti α – vybraná pravděpodobnost, při níž se chybně zamítne nulová hypotéza, ačkoliv platí (tzv. chyba I. druhu) – nejčastěji $\alpha = 0,05$ (5 %)

Normalitu dat lze zjistit například Shapiro-Wilkovým testem, ten zkoumá rozložení dat po jednotlivých souborech a říká nám, jestli lze toto rozložení považovat za normální (Gaussova křivka). Shoda rozptylů je testována Leveneovým testem, který testuje shodu rozptylů posuzovaných souborů dat.

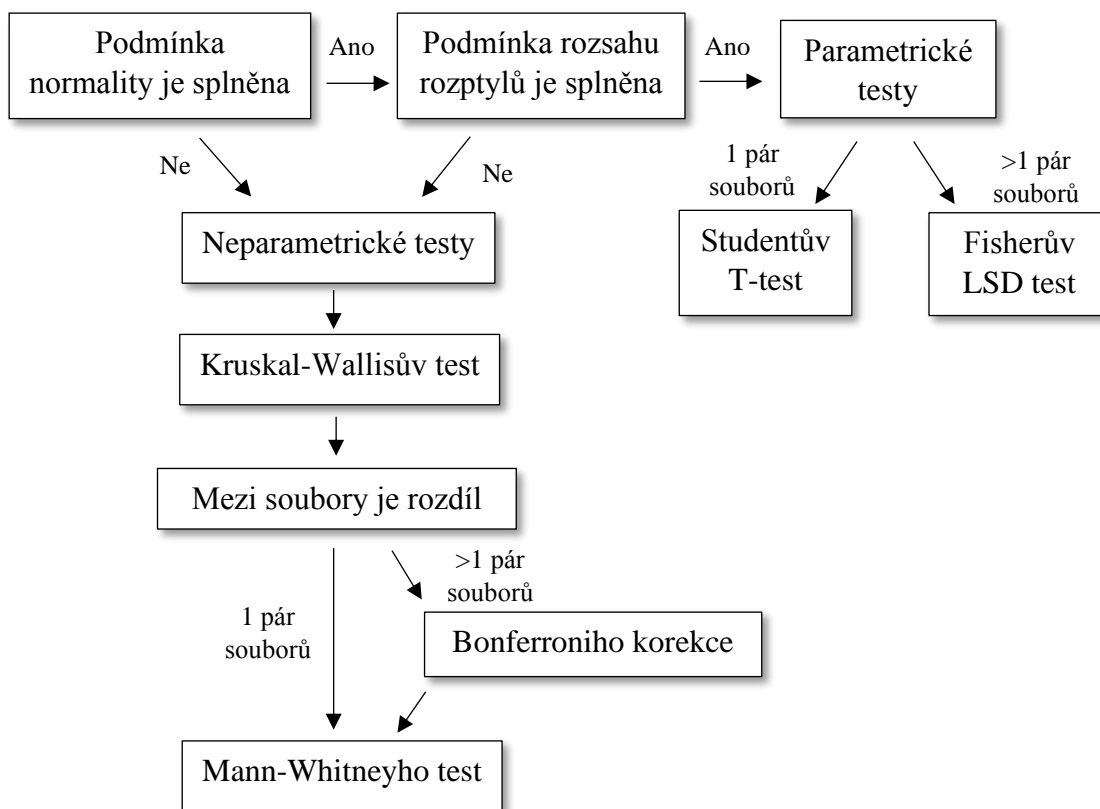
Pro využití parametrických srovnávacích testů je potřeba, aby zkoumané porovnávané soubory dat vyhovovaly podmínkám normality a měly shodné rozptyly. Jsou-li splněny obě tyto podmínky je možné využít těchto testů. Mezi parametrické srovnávací testy patří Studentův t-test, který je určen pro párové porovnávání a Fisherův LSD (Least Significant Difference) test pro vícenásobné porovnávání, tedy tří a více souborů.

Není-li splněna alespoň jedna z podmínek je nutné využít neparametrických testů. Zde je využíván Kruskal-Wallisův test, který identifikuje, zdali je někde mezi porovnávanými soubory rozdíl. K určení dvojic, mezi kterými statisticky významný rozdíl je, lze pak využít Mann-Whitneyho test. Ten má bohužel ale tu nevýhodu, že je určený pro párové porovnávání a nemá korekci pro vícenásobné porovnávání. Pro zamezení rizika vzniku chyby I. řádu při porovnávání více párů se využívá Bonferroniho korekce. Ta spočívá v podělení míry chyby (0,05) počtem porovnávání. Korekcí se zajistí, že k chybě dojde se stejnou pravděpodobností, jako kdyby se neporovnávalo více souborů ale pouze dva. Schematický postup při výběru testu je vyobrazen na Obrázku 13.

Závěrem testování je velikost hodnoty p vůči hladině významnosti α tak, že je-li:

- $p \geq \alpha$, pak lze říci, že bylo dosaženo statisticky nevýznamného rozdílu
- $p < \alpha$, pak lze říci, že bylo dosaženo statisticky významného rozdílu

Všechny výše zmíněné testy budou provedeny v programu Statgraphics Centurion 15 (Statpoint Technologies, Virginia, USA). Výsledky ze statistických testů poté poslouží pro ověření platnosti hypotéz stanovených na počátku experimentu.



Obrázek 13 - Schéma postupu při výběru statistických testů

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V této kapitole je popsán postup výroby scaffoldů, implantace a přípravy vzorků páteří a jejich následného upnutí a zatěžování v mechanické laboratoři. Dále pak popisuje zpracování a vyhodnocení experimentálních dat získaných při měření. Zkouška prostého ohybu je prováděna na vzorcích páteřního segmentu prasat v rozsahu 14,15Th + 6L.

3.1 Výroba implantátů

Příprava vzorků započala výrobou implantátů ve výzkumném vědeckém centru CEITEC Vysokého učení technického v Brně zaměřeném na oblast pokročilých materiálů a nanotechnologií. Navrženy a připraveny zde byly dva typy implantátů kompozitního charakteru určené pro regeneraci kostí v postupech nahrazujících „zlatý standard“ v podobě autograftu. Vzorky byly souhrnně označeny jako hybridní porézní kostní scaffoldy (zkráceně HPKS) a liší se modifikací nosičů bioaktivními sloučeninami.

Matrice HPKS je tvořena směsí hydroxyapatitu (HA) a trikalcium fosfátu (TCP), která byla připravena úpravou postupu publikovaného v práci Šťastný a kol. ([3]). Nejprve byly zvláště vytvořeny suspenze pro každou složku. HA prášek (extra čistý fosforečnan vápenatý) byl před použitím zprvu kalcifikován. Poté byl prášek dispergován v roztoku deionizované vody, epoxidové pryskyřice a dispergátoru. Vzniklá suspenze byla dále míchána a rozmělnována v mlecím zařízení zirkonovými koulemi. Výsledkem těchto operací byla jemná HA suspenze. Stejným procesem přípravy prošel i prášek TCP. Jediným rozdílem je prodloužení délky rozmělnovacího procesu na delší dobu kvůli hrubosti prášku. Směs k výrobě HPKS vzniká smícháním HA a TCP suspenzí ve stejném poměru (hmotnostní poměr keramického prášků v suspenzích). Poté byla HA a TCP suspenze doplněna pěnicím činidlem a tužidlem, a posléze byla metodou přímého napěňování za použití mixéru připravena pěna. Tato pěna byla po ustálení odlita do plastových forem, zpolymerována a nakonec sušena v klimatické komoře při řízené teplotě a relativní vlhkosti. [3]

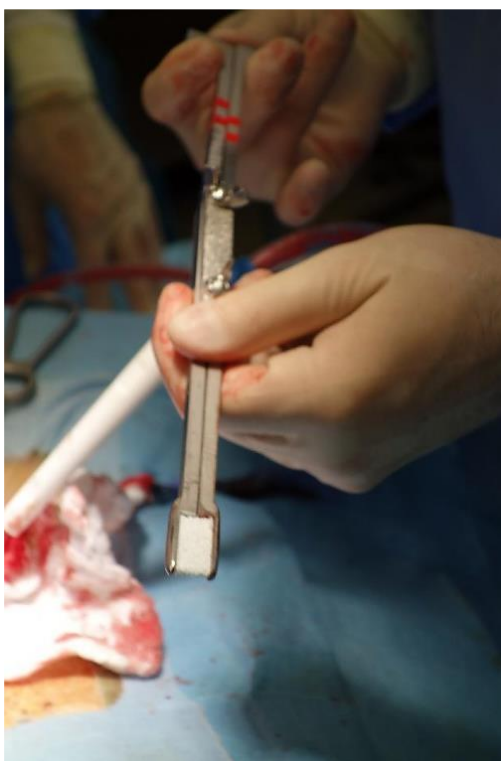
Tato výchozí biokeramická matrice byla dále modifikována bioaktivními složkami označenými z důvodu patentové ochrany pouze jako složka typu I a složka typu II. Plniva jsou od sebe odlišná jak biologickou účinností, tak cenou jednotlivých složek. Složka typu I, která je na biologické bázi je výrazně dražší a je syntetizována pouze jednou

firmou, jenž má nad touto složkou patentovou ochranu. Složka typu II je na anorganické bázi, je zcela volně dostupná a oproti složce typu I je podstatně levnější.

Prvním typem vyráběných implantátů byl scaffold HPKS obohacený biologickou složkou typu I (dále značený jako skupina B) a druhým typem byl scaffold HPKS modifikovaný anorganickou složkou typu II (značený jako skupina C).

3.2 Zavedení implantátů

Jak již bylo napsáno v kapitole 2.1, byl pro experimentální preklinické testování implantátů zvolen prasečí model, konkrétně prasečí páteř. Preklinická část experimentu na animálním prasečím modelu včetně ustájení zvířat před chirurgickým zákrokem tak i po něm probíhala ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. v Brně. Prasata (konvenční hybridní masného typu) byla rozdělena do skupin dle typu použitého implantátu a dle doby ponechání testovaných materiálů v těle zvířete – 8/16 týdnů. Konkrétně šlo o 3 druhy implantátů, jmenovitě: autograft z hřebene pánevní kosti, hybridní porézní kostní scaffoldy (zkráceně HPKS) obohacené biologickou složkou typu I a HPKS modifikované anorganickou složkou typu II.



Obrázek 14 - Implantát HPKS připravený k implantaci

Do prasečích páteří byly scaffoldy a autograft implantovány v celkové anestezii. Chirurgický řez byl proveden v levé lumbální oblasti, mimo peritoneální oblast tak, aby nebyla porušena žádná z okolních důležitých tkání. Poté byl vypreparováním meziobratlové destičky (diskektomie) mezi obratli L2 a L3 uměle vytvořen defekt, do kterého byl posléze zaveden implantát. Snímek HPKS implantátu zachycený těsně před implantováním lze vidět na Obrázku 14 výše. Voperování autograftu předcházela dodatečný řez v oblasti levého pánevního hřebene kvůli odběru tkáně. Pro zajištění stability operovaného lumbálního segmentu byla oblast osazena osteosyntetickou konstrukcí fixovanou šrouby do obratlových těl, která posloužila i při orientaci na rentgenových snímcích. Po zákroku byla provedena RTG kontrola lumbální oblasti. Prasatům byla po zákroku podávána antibiotika a léky proti bolesti, a po celý čas probíhajícího experimentu byla pod veterinárním dozorem.

Dle zařazení prasat do skupin došlo po 8 nebo 16 týdnech k eutanazii zvířete. Lumbální úsek páteře byl vytnut a veškerá podpůrná konstrukce odstraněna. Polovina vzorků z každé skupiny sloužila k biomechanickému testování a druhá polovina k histologickým testům.

3.3 Příprava vzorků k měření

Vzorky páteří byly bezprostředně po utracení prasat vytnuty a dovezeny do testovací laboratoře v chladícím boxu zabalené obinadly napuštěnými v 10 % formalinu a uloženy v nepropustném vaku, tak aby nedošlo k brzkému rozkladu a znehodnocení vlastností vzorků. Po odstranění obinadel a vyvětrání vzorků došlo k úpravě konců páteří tím způsobem, aby bylo možné je zasunout do připravených úchytek. Jako úchytek bylo využito novodurových trubek o průměru 63 mm a délce 55 mm, jejichž dno bylo vytvořeno za pomoci textilní pásky PATTEX. Pro upevnění páteří v úchytkách byl použit technický dentakryl. Ten byl připravován v poměru 2:1 (prášek:kapalná složka) a jeho konzistence po promíchání by měla být medového charakteru. Pro zajištění pevného a nepropustného dna se takto připravenou směsí nejdříve zalije spodek trubky do výše 5 mm a až poté jsou zalévány konce vzorků páteří. Takto upevněné konce bylo nutné před samotným zkoušením nechat zatuhnout. Napůl zalité a označené vzorky lze vidět na Obrázku 15.



Obrázek 15 - Příprava vzorků páteří

Každý vzorek páteře byl kvůli rozpoznání ještě před zalitím označen dle druhu použitého materiálu, čísla vzorku a počtu týdnů, po kterém došlo k eutanazii prasete a následného vytnutí segmentu páteře v rozsahu 14,15Th + 6L (viz Tabulka 2). Testovanými materiály byly:

- skupina A – kostní autograft z hřebene pánevní kosti
- skupina B – HPKS obohacený biologickou složkou typu I
- skupina C – HPKS modifikovaný anorganickou složkou typu II

Tyto skupiny označují vzorky páteří, do kterých byly implantovány výše zmíněné nové materiály a kostní autograft. Testované materiály jsou pak doplněny o skupinu nativních páteří značenou písmenem N, která slouží jako kontrolní skupina. Lze ji také brát jako míru tuhosti, které chceme přibližně dosáhnout. Nativní vzorky páteří byly získány z jatek.

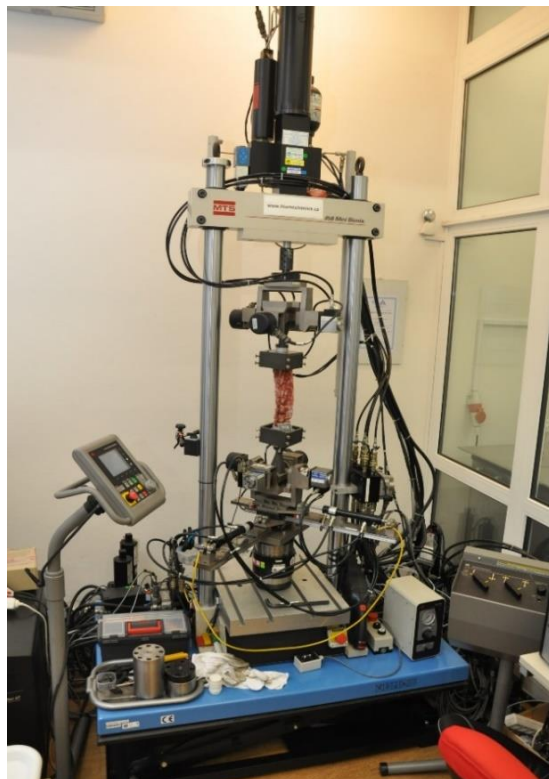
Tabulka 2 - Přehled značení vzorků

Počet týdnů	Skupina materiálu	Druh materiálu
	N	Nativní
8	A	Autologní štěp
16		
8	B	HPKS + biologická složka
16		
8	C	HPKS + anorganická složka
16		

3.4 Princip zatěžování

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

Celá soustava byla zpočátku uvedena do souosé polohy, posléze byly vynulovány relativní souřadnice, a nakonec byl vypnut pohon Superior Flex/Extenze tak, aby byl umožněn volný pohyb horního dílu simulátoru. Dále byl vzorek vložen do spodní části simulátoru a za použití řízeného pohonu byl vykloněn a poté sestaven s horním dílem simulátoru. Testování začalo po upnutí vzorku do svěrných šroubových spojů. Upnutý vzorek páteře v testovacím systému MTS Mini Bionix lze vidět na Obrázcích 16 a 17.



Obrázek 16 - Páteř upnutá v testovacím zařízení MTS Mini Bionix

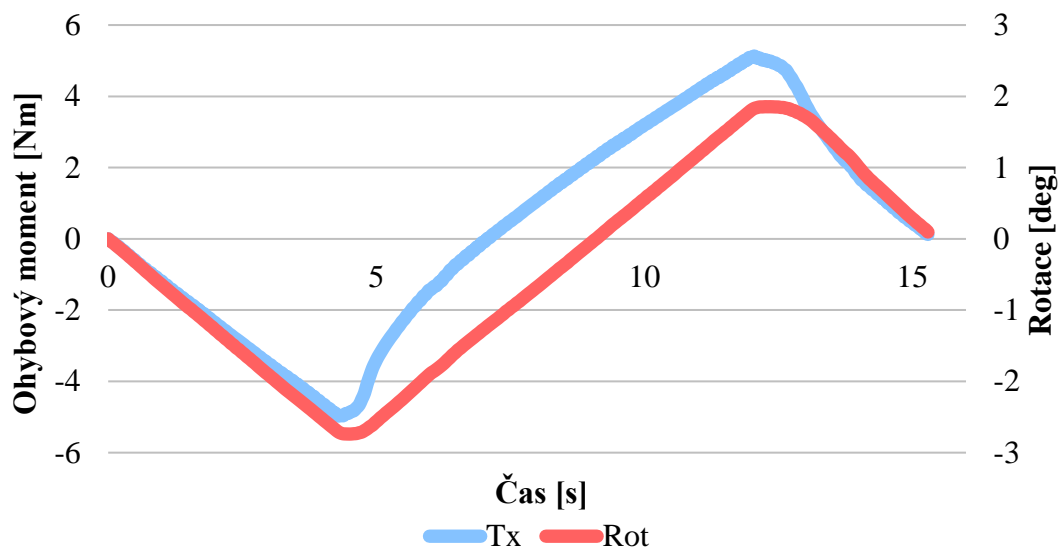
Zatěžování vzorků bylo rozděleno na dvě části. V první části zatěžování bylo cílem zjistit tuhost testovaných páteří při extenzi bez poškození tkáně. Maximální aplikovaný ohybový moment zde byl ± 5 Nm (+ flexe, - extenze). Tato zatěžovací část byla opakována třikrát. Ve druhé části byl vzorek zatěžován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



Obrázek 17 – Detailní záběr upnutého vzorku páteře (nalevo) a vzorku páteře, u které došlo při ohybu k destrukci (napravo)

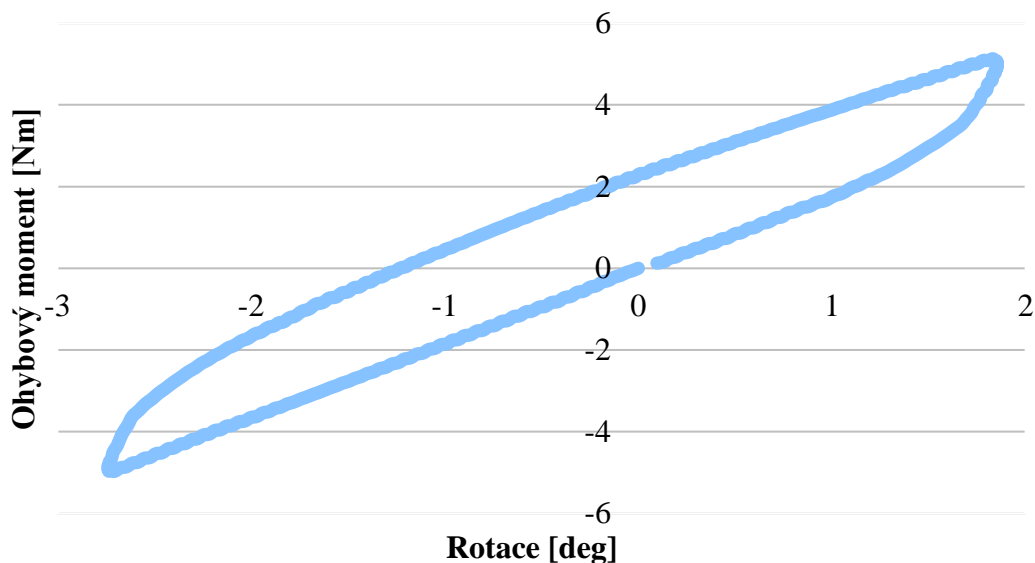
3.5 Ohybová zkouška

Každý vzorek páteřního segmentu byl podroben zatěžování, jehož principy jsou popsány výše v kapitole 3.4. Během zatěžování vzorků bylo systémem naměřeno množství posuvů, natočení, sil a momentů, pro vyhodnocení tohoto experimentu však byly užity pouze naměřené hodnoty v podobě natočení vrchního (superior flex/extension rotation) a spodního dílu simulátoru (inferior flex/extension rotation) a ohybového momentu (T_x). Naměřená data byla upravena a posunuta do počátečních nulových hodnot a dále importována do šablon vytvořených v programu Microsoft Excel, kde za pomoci těchto dat byly vytvořeny grafy závislosti ohybového momentu a rotace na čase (viz Obrázek 18) a ohybového momentu na rotaci (viz Obrázek 19).



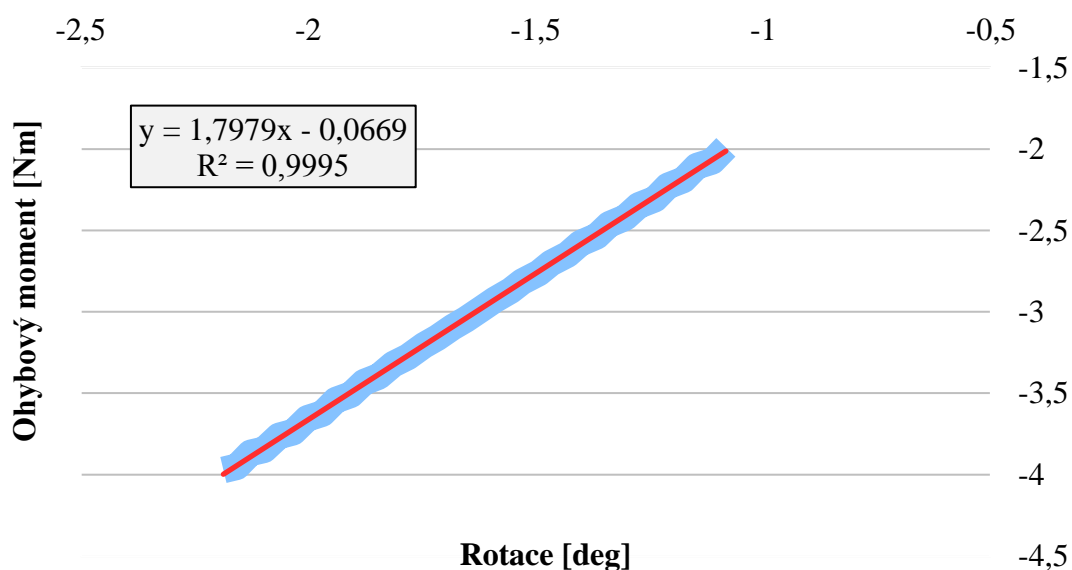
Obrázek 18 - Průběh ohybového momentu a rotace v závislosti na čase vzorku 12B16

Na grafu závislosti ohybového momentu na rotaci (viz Obrázek 19) můžeme vidět výraznou nelinearitu a hysterezi. V první fázi tohoto grafu lze pozorovat náběžnou křivku, která pokračuje klesáním do záporných hodnot při extenzi zkoušených páteří. Při odlehčení zde vzniká hysterezní smyčka a páteř je pak dále zatěžována do flexe.



Obrázek 19 - Průběh ohybového momentu v závislosti na rotaci vzorku 12B16

Z tohoto grafu (viz Obrázek 19) byla pro získání směrnice tuhosti vybrána lineární část ve fázi extenze páteře. Tato zvolená část byla dále vynesena do samostatného grafu (viz Obrázek 20) a za pomoci lineární regrese byla zjištěna hledaná směrnice. Požadavek na lineární oblast, z které byla směrnice vyhodnocována, je hodnota spolehlivosti R^2 větší než 0,998. Pro kontrolu byla směrnice tuhosti navíc zjištěna i z dat za pomoci excelovské funkce SLOPE. Hodnota lineární regrese obsahující hledanou směrnici byla ještě v grafu doplněna a zkontrolována hodnotou spolehlivosti lineární regrese R^2 .



Obrázek 20 - Vybraná část průběhu pro určení tuhosti vzorku 12B16

Výše uvedené vzorové grafy byly vytvořeny pro každý cyklus měření ve všech skupinách vzorků zvlášť. Pro vyhodnocení tuhosti bylo tedy u každého vzorku získáno celkem devět grafů a tři hodnoty tuhosti. U vyhodnocování zatížení potřebného k destrukci byla směrodatným údajem hodnota maximálního momentu, který vzorek vydržel.

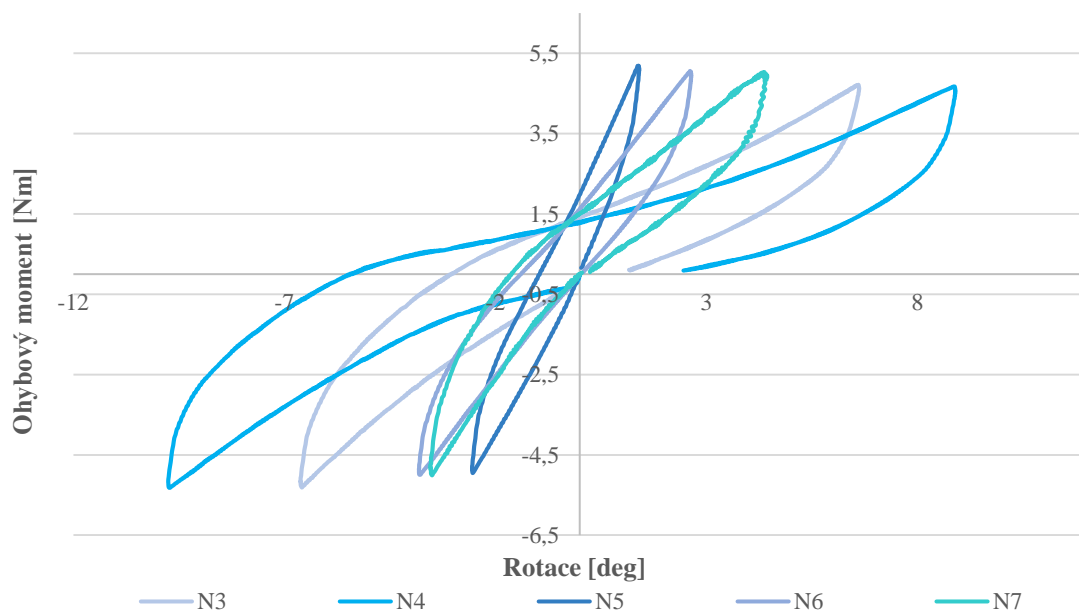
4. VYHODNOCENÍ

4.1 Měření tuhosti

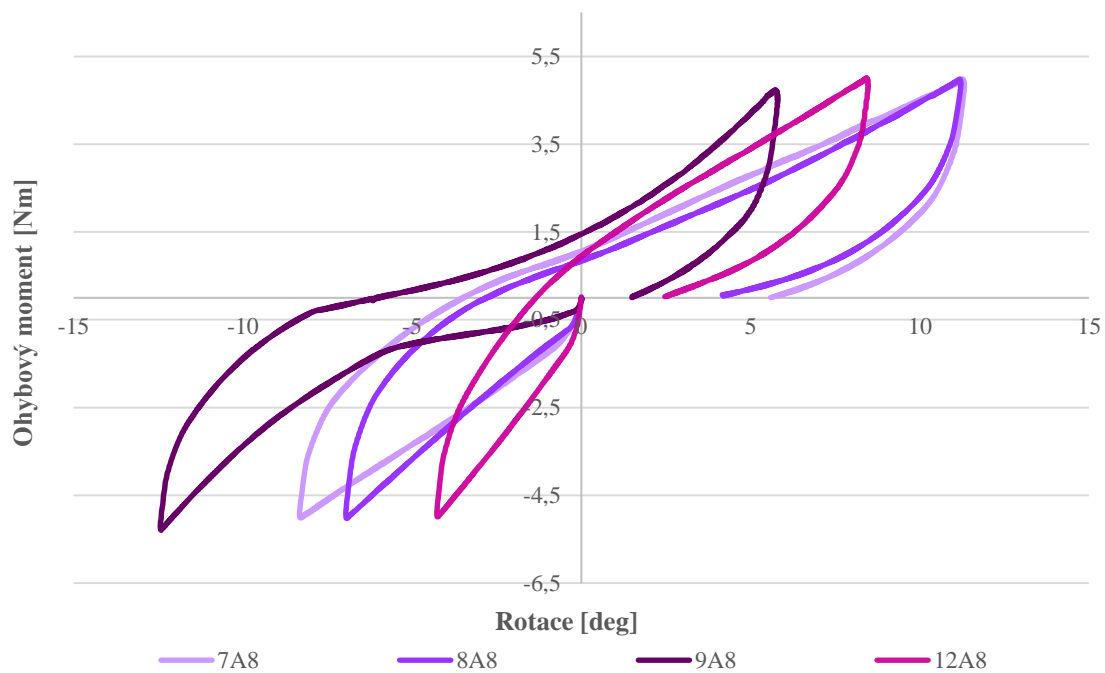
Po importování naměřených raw dat do předem připravených Excelovských souborů, byly vytvořeny grafy závislosti ohybového momentu na rotaci (viz kapitola 3.5). Tyto závislosti jednotlivých vzorků byly sjednoceny do grafů (viz Obrázek 21 až Obrázek 27) tak, aby se vzorky ve skupinách daly porovnat.

Ve skupině N bylo testováno 5 páteřních vzorků. V každé z ostatních testovaných skupin (A8, A16, B8, B16, C8 a C16) byly testovány vzorky čtyři. Každý vzorek byl podroben 3 cyklům zátěže. Celkem bylo zpracováno a následně vyhodnoceno 87 záznamů zatěžování.

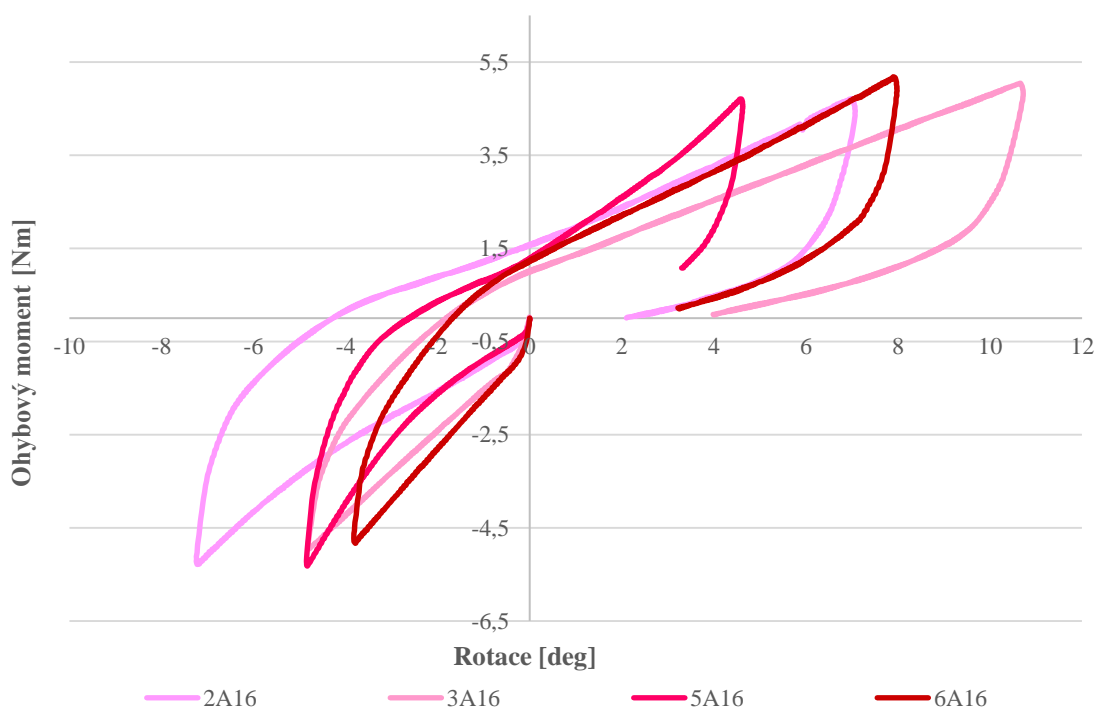
Je-li tří prvkové značení vzorku na konci doplněno o písmeno A, znamená to, že experimentální zvíře ve skupině uhynulo a skupina byla následně doplněna o nového testovaného jedince ve stejné hmotnostní kategorii a se stejným použitým typem implantátu.



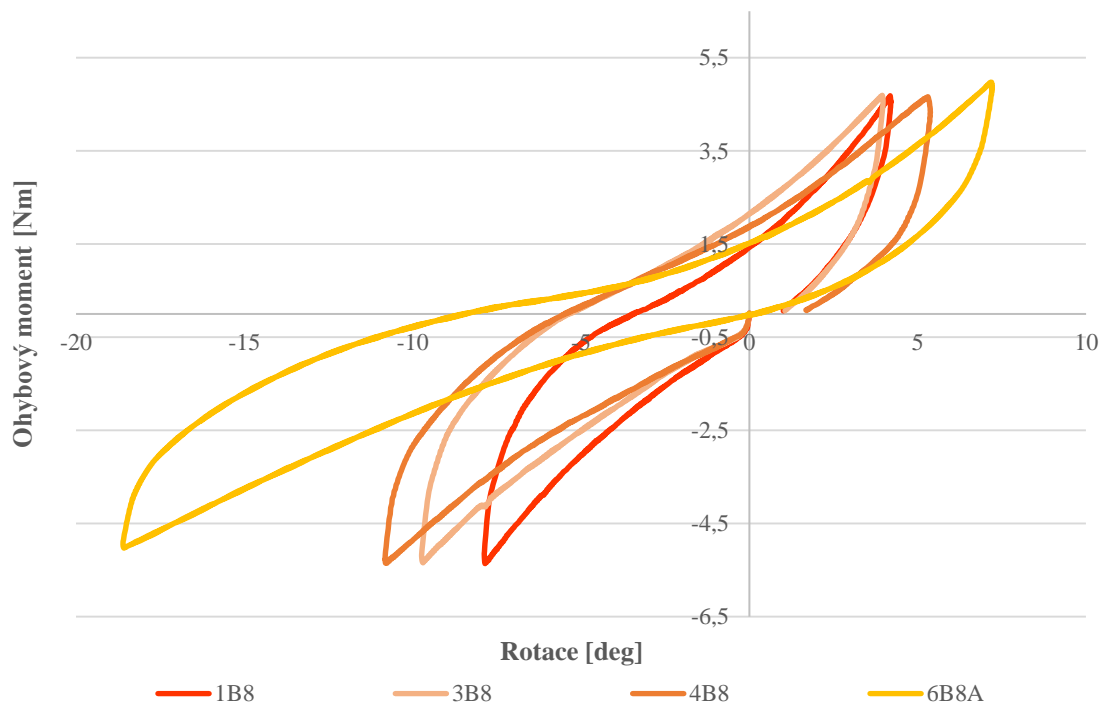
Obrázek 21 - Závislost ohybového momentu na rotaci nativních páteří (skupina N)



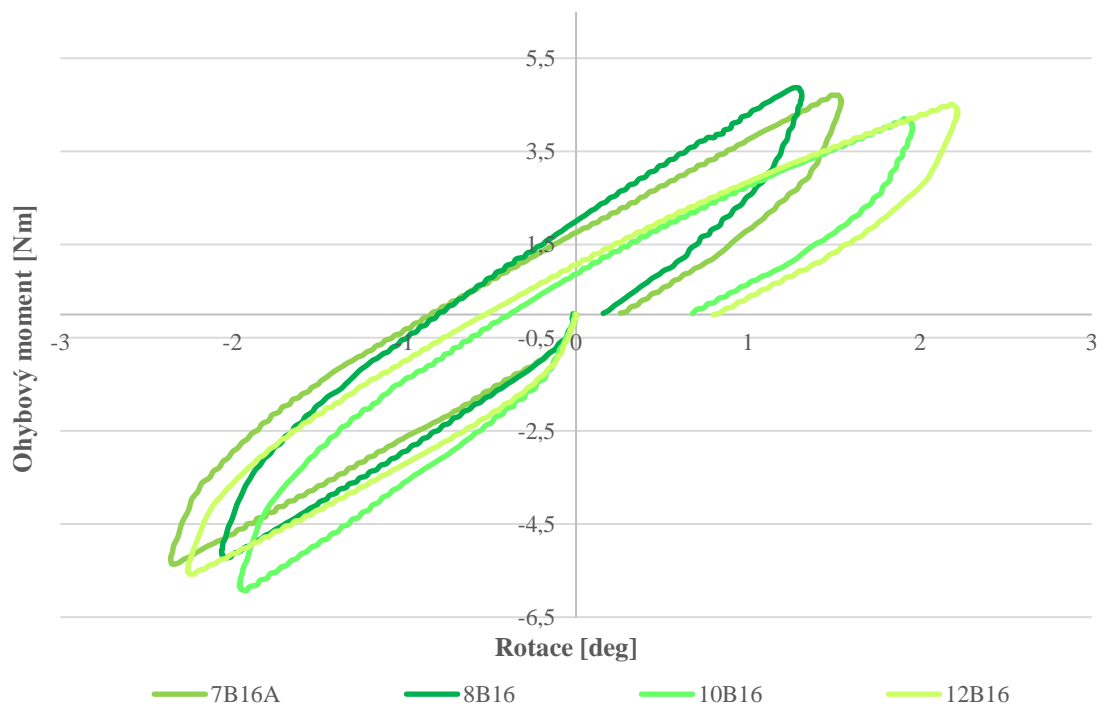
Obrázek 22 - Závislost ohybového momentu na rotaci páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě autograftu (skupina A); 8 týdnů po implantaci



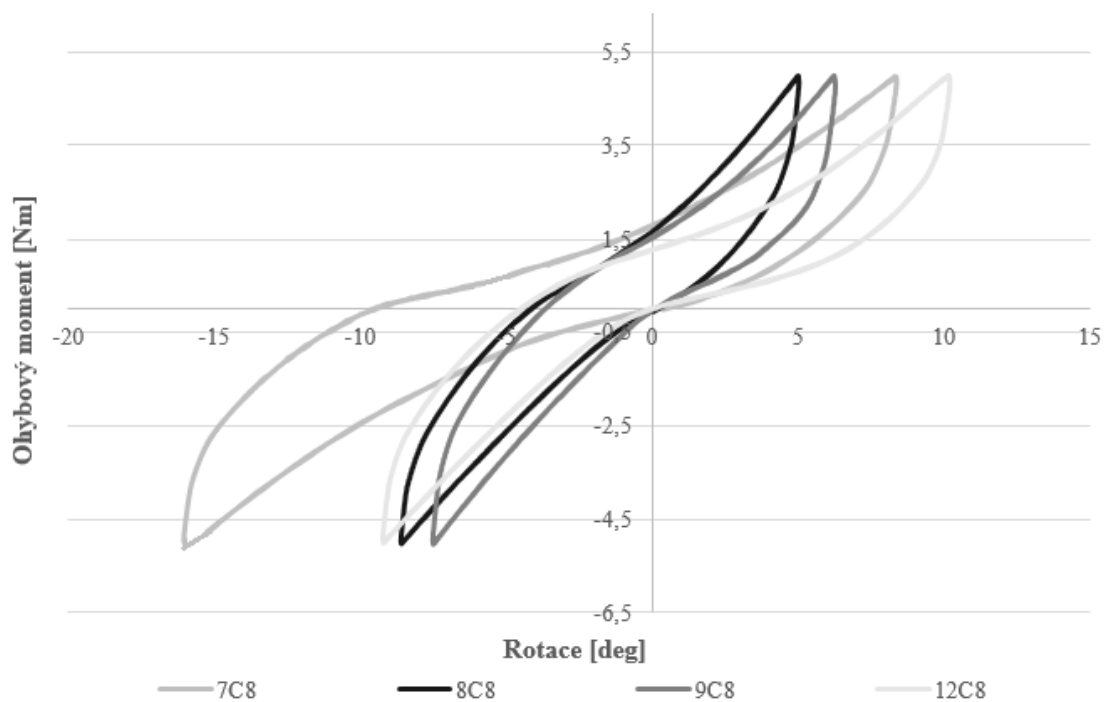
Obrázek 23 - Závislost ohybového momentu na rotaci páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě autograftu (skupina A); 16 týdnů po implantaci



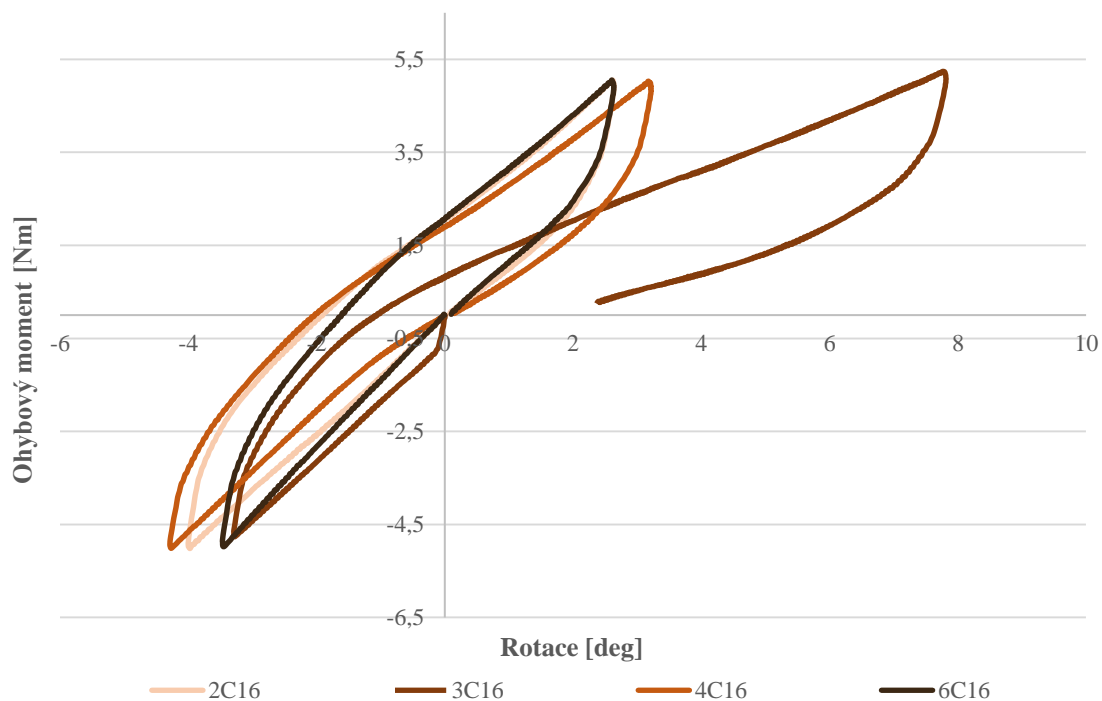
Obrázek 24 - Závislost ohybového momentu na rotaci páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě HPKS obohaceného biologickou složkou (skupina B); 8 týdnů po implantaci



Obrázek 25 - Závislost ohybového momentu na rotaci páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě HPKS obohaceného biologickou složkou (skupina B); 16 týdnů po implantaci

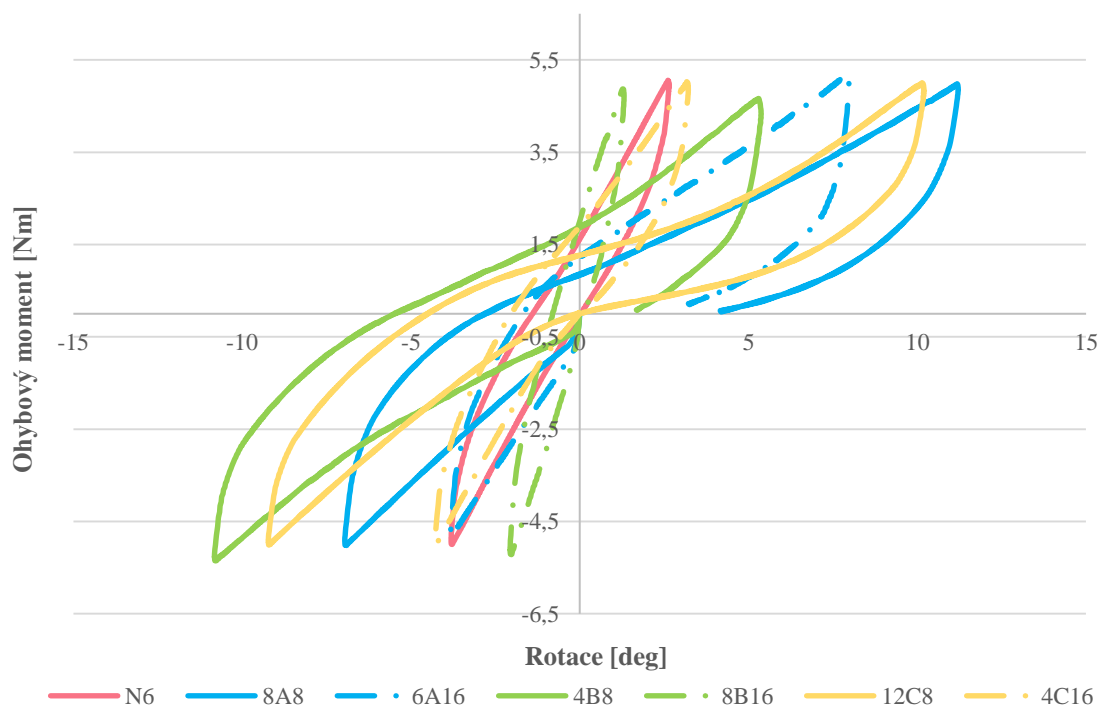


Obrázek 26 - Závislost ohybového momentu na rotaci páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě HPKS modifikovaného anorganickou složkou (skupina C); 8 týdnů po implantaci



Obrázek 27 - Závislost ohybového momentu na rotaci páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě HPKS modifikovaného anorganickou složkou (skupina C); 16 týdnů po implantaci

Z výše znázorněných grafů jednotlivých skupin vzorků byl vybrán vždy jeden reprezentativní vzorek za skupinu. Ten byl zvolen tak, aby hodnota jeho tuhosti se co nejvíce blížila hodnotě průměrné tuhosti skupiny. Na tomto grafu (viz Obrázek 28) lze vidět rozdíly sklonu křivek v oblasti extenze (3. kvadrant grafu). Při porovnání reprezentativních vzorků zkoušených po 8 týdnech a po 16 týdnech lze pozorovat, že sklon křivky v oblasti extenze je po 16 týdnech více strmější než u výsledků po 8 týdnech, dalo by se tedy říct, že při prodloužené době zanechané k hojení v podobě 16 týdnů docílíme lepšího srůstu spojovaných částí páteře a tím i větší tuhosti. Zdali vzorky po vystavení delší době v těle zvířete opravdu získaly větší tuhosti díky lepšímu srůstu spojovaných tkání lze ověřit poznatky a histologii z Lékařské fakulty. Po 16 týdnech lze zároveň říci, že se křivky v extenzivní části průběhu začínají shlukovat a přibližovat k průběhu zaznamenaném u nativního vzorku, což by se dalo pokládat za příznivý průběh, jelikož nativní vzorek nám reprezentuje fyziologický stav, kterého bychom chtěli minimálně dosáhnout.



Obrázek 28 - Závislost ohybového momentu na rotaci u reprezentativních vzorků

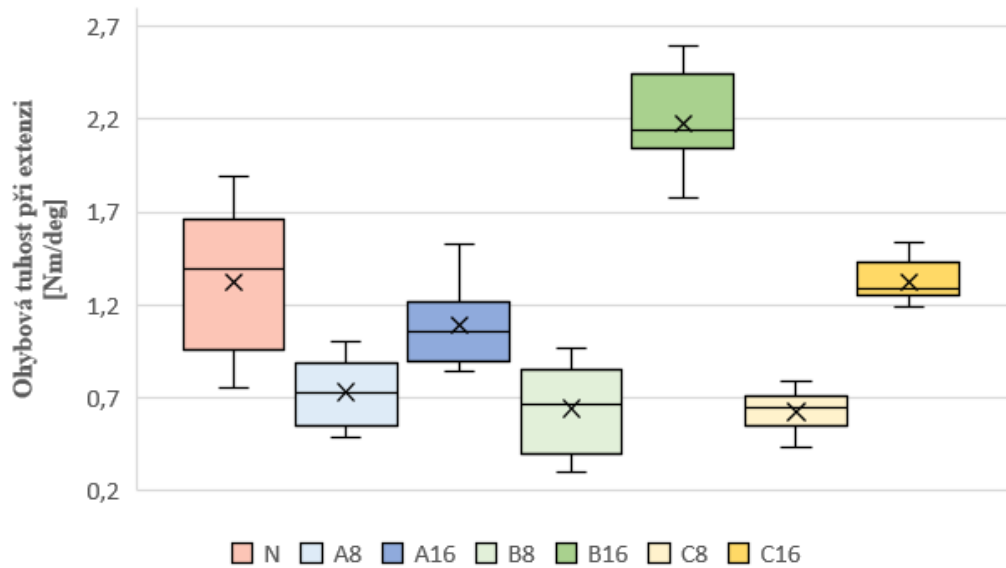
Konečnými výsledky získanými z těchto grafů jsou ohybové tuhosti páteří při extenzi (viz Tabulka 3). V této tabulce jsou tučně zvýrazněni vybraní reprezentanti, jejichž hodnoty tuhosti se nejvíce blíží k aritmetickému průměru skupiny. Sloupce I, II a III označují při kolikátém cyklu byla dosažena naměřená tuhost.

Tabulka 3 - Ohybové tuhosti páteřních segmentů při extenzi

Vzorek č.	Ohybová tuhost při extenzi [Nm/deg]			Střední ohybová tuhost [Nm/deg]	Rozptyl [Nm/deg]	
	I	II	III			
N3	1,029	0,956	0,965	1,32	0,41	N
N4	0,834	0,757	0,755			
N5	1,656	1,892	1,855			
N6	1,393	1,393	1,400			
N7	1,704	1,633	1,628			
7A8	0,508	0,510	0,490	0,73	0,17	A8
8A8	0,661	0,706	0,706			
9A8	0,821	0,786	0,754			
12A8	1,003	0,905	0,916			
2A16	1,017	0,907	-	1,06	0,21	A16
3A16	0,903	0,838	0,867			
5A16	-	1,518	1,525			
6A16	1,113	1,116	1,102			
1B8	0,967	0,878	0,885	0,64	0,23	B8
3B8	0,763	0,690	0,709			
4B8	0,635	0,620	0,613			
6B8A	0,302	0,327	0,324			
7B16A	2,066	2,068	2,042	2,17	0,27	B16
8B16	2,216	2,238	2,229			
10B16	2,596	2,520	2,508			
12B16	2,037	1,798	1,778			
7C8	0,526	0,433	0,431	0,62	0,11	C8
8C8	0,706	0,651	0,641			
9C8	0,790	0,720	0,704			
12C8	0,661	0,621	0,613			
2C16	1,250	1,205	1,189	1,32	0,11	C16
3C16	1,282	1,280	1,250			
4C16	1,372	1,301	1,286			
6C16	1,539	1,467	1,450			

Poznámka: Typem střední hodnoty a rozptylu je u skupiny A16 z důvodu jiného, než normálního rozdělení medián a mezikvartilové rozpětí. U ostatních skupin je pak uvedena průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

Lze pozorovat, že nejvyšší hodnoty tuhosti je dosaženo u vzorků B16, tzn. u HPKS obohaceného biologickou složkou po 16 týdnech. Průměrná hodnota tuhosti této skupiny dosáhla 2,17 Nm/deg. Nejmenší hodnoty tuhosti jsou pak porovnatelné u skupin B8 (HPKS obohacený biologickou složkou po 8 týdnech) a C8 (HPKS modifikovaný anorganickou složkou po 8 týdnech), kde se hodnoty pohybují kolem 0,62 Nm/deg. Aby bylo možno porovnávat získané hodnoty tuhostí, bylo ještě potřeba ověřit statistickou významnost získaných dat uvedených v Tabulce 3 statistickými testy. Tato data jsou taktéž znázorněna za pomoci krabicového grafu na Obrázku 29.



Obrázek 29 - Ohybové tuhosti nativních páteří a páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě: A – autologního štěpu, B – HPKS obohaceného biologickou složkou, C – HPKS modifikovaného anorganickou složkou; 8 a 16 týdnů po implantaci

Postup výběru při užití parametrických nebo neparametrických testů je uveden v kapitole 2.3. V tabulkách níže (viz Tabulka 4) je zaznamenáno vyhovění podmínek normality a shody rozptylů pro skupiny vzorků. Normalita naměřených hodnot tuhostí byla testována Shapiro-Wilkovým testem pro každou skupinu vzorků zvlášť. Shoda rozptylů mezi porovnávanými skupinami byla testována za pomoci Levenova testu. Zelená pole označují splněnou podmínku, červená pole označují nesplnění podmínky.

Tabulka 4 - Normalita a shoda rozptylů skupin vzorků (podmínka $p > 0,05$)

Skupina	p	Normalita	Skupiny	p	Shoda rozptylů
N	0,116		N+A8	0,005	×
A8	0,552		N+B8	0,029	×
A16	0,036	×	N+C8	6E-05	×
B8	0,229		N+A16	0,066	
B16	0,376		N+B16	0,094	
C8	0,251		N+C16	6E-04	×
C16	0,159		A8+A16	0,369	
			B8+B16	0,537	
			C8+C16	0,984	
			A8+B8+C8	0,117	
			A16+B16+C16	0,061	

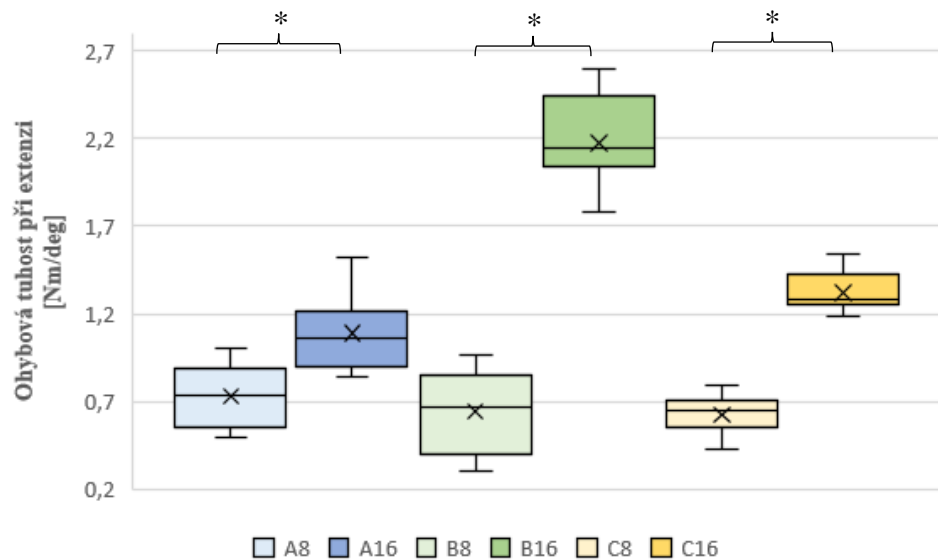
Dle ověřených podmínek zaznamenaných v Tabulce 4, bylo využito parametrických testů pro porovnávané skupiny N+B16, B8+B16 a C8+C16, které byly testovány Studentovým t-testem a pro skupinu A8+B8+C8, jenž byla testována za pomoci LSD testu. Neparametrických testů (Kruskal-Wallisův test a Mann-Whitneyho test) bylo využito u porovnávaných skupin N+A8, N+B8, N+C8, N+A16, N+C16, A8+A16 a A16+B16+C16. Zde se využila Bonferroniho korekce, jelikož Mann-Whitneyho test je určen pouze pro párové hodnocení a vícenásobným porovnáváním by se do výsledků vnesla chyba. Pro porovnávání 3 souborů mezi sebou byla hodnota hladiny $\alpha = 5 \%$ zkorigována na hodnotu $\alpha = 1,66 \%$. Přehledněji vypsané porovnávané skupiny i s použitými testy lze vidět níže v Tabulce 5.

Tabulka 5 - Použité statistické testy

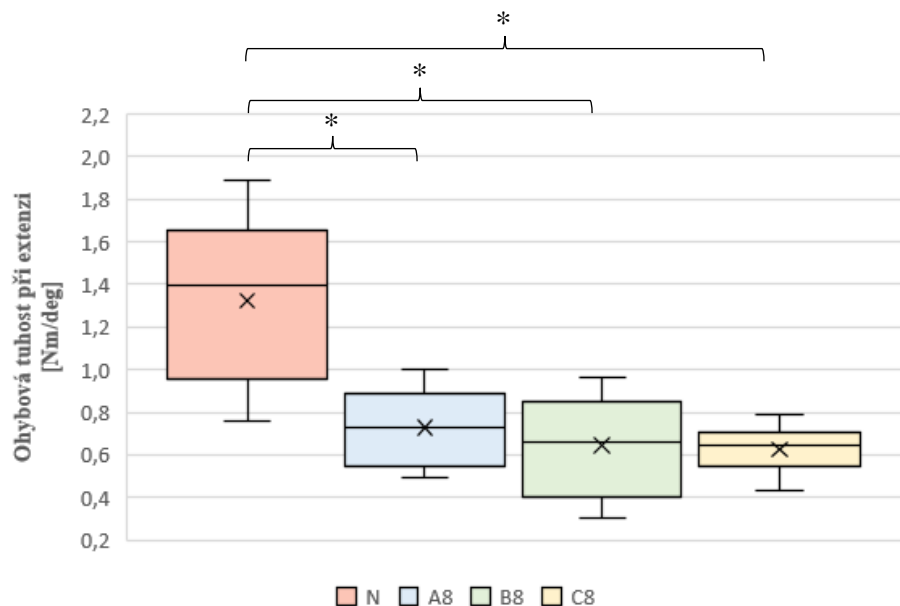
Parametrické	Test	Neparametrické	Test
N+B16	Studentův t-test	N+A8	Kruskal-Wallis + Mann-Whitney
B8+B16		N+B8	
C8+C16		N+C8	
A8+B8+C8	Fisherův LSD test	N+A16	
		N+C16	
		A8+A16	
		A16+B16+C16	

Vyhodnocení statisticky významných rozdílů bylo po provedení testů pro větší přehlednost zaneseno do krabicových grafů, viz níže. Statisticky významný rozdíl v grafech je značen svorkou s hvězdou nad porovnávanými dvojicemi. Pro přehlednost je zachována paleta barev z Tabulky 3.

Co se týče porovnávaných tuhostí ve skupinách po 8 a po 16 týdnech (viz Obrázek 30), je vidět, že delším zanechaným obdobím pro srůst tkání opravdu dosáhneme větší tuhosti páteře u všech testovaných materiálů. Dostáváme zde statisticky významné rozdíly mezi skupinami A8+A16, B8+B16 a C8+C16.

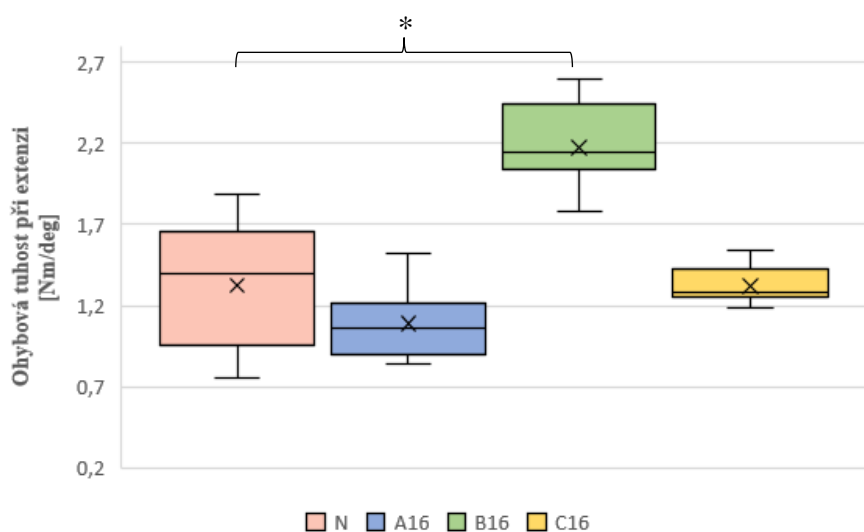


Obrázek 30 - Ohybové tuhosti páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě: A – autologního štěpu, B – HPKS obohaceného biologickou složkou, C – HPKS modifikovaného anorganickou složkou; 8 a 16 týdnů po implantaci;
* značí statisticky významné rozdíly mezi 8. a 16. týdnem v jednotlivých skupinách páteří při 95 % hladině spolehlivosti



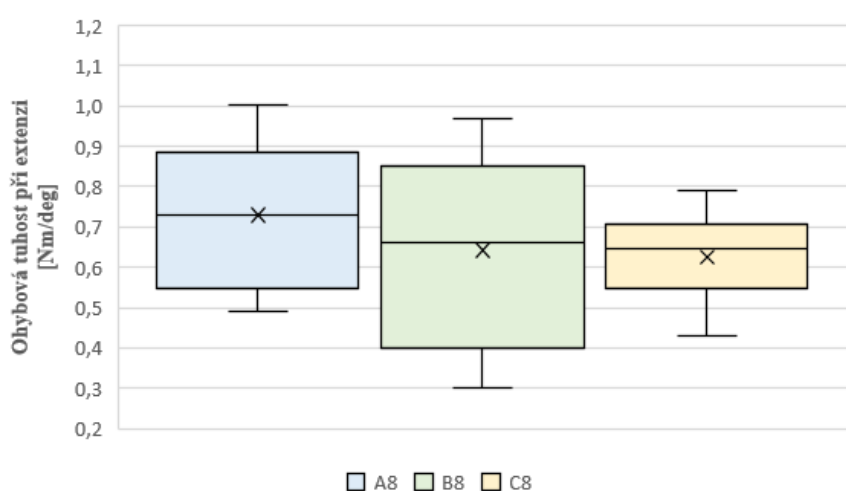
Obrázek 31 - Ohybové tuhosti nativních páteří (N) a páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě: A – autologního štěpu, B – HPKS obohaceného biologickou složkou, C – HPKS modifikovaného anorganickou složkou; 8 týdnů po implantaci;
* značí statisticky významné rozdíly mezi nativní skupinou a 8. týdnem jednotlivých skupin páteří při 95 % hladině spolehlivosti

Při porovnání nativních vzorků se vzorky odebranými po 8 týdnech byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi všemi porovnávanými skupinami (viz Obrázek 31). Na Obrázku 32 lze pozorovat, že autologní štěp (A16) a HPKS s anorganickou složkou (C16) se z mechanického hlediska po 16 týdnech nachází ve shodě s nativní skupinou N. HPKS obohacený biologickou složkou (B16) se na druhou stranu statisticky významně odlišuje od skupiny nativních páteří po 8 i 16 týdnech. Po 16 týdnech se dokonce dostává na o dost vyšší hodnotu tuhosti, než má nativní skupina páteří a ostatní vzorky po 16 týdnech.



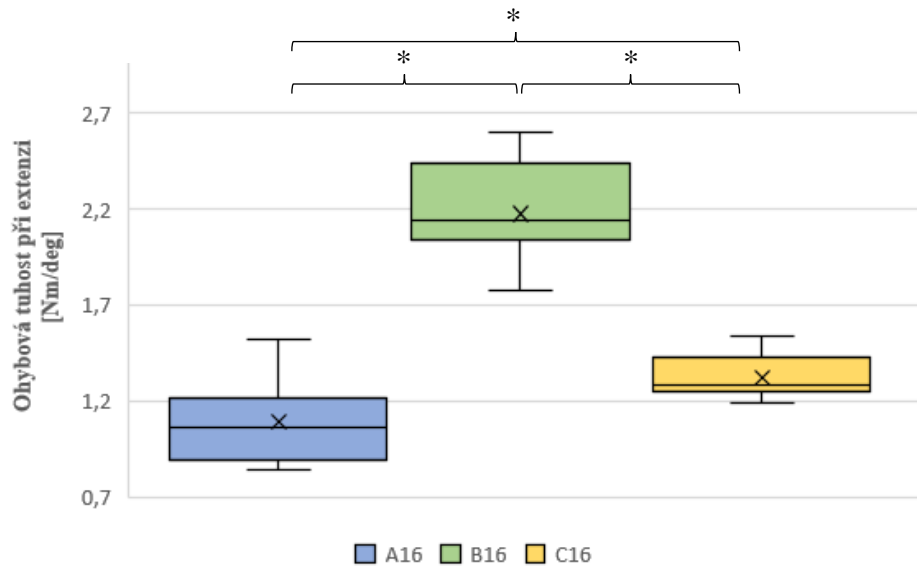
Obrázek 32 - Ohybové tuhosti nativních páteří (N) a páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě: A – autologního štěpu, B – HPKS obohaceného biologickou složkou, C – HPKS modifikovaného anorganickou složkou; 16 týdnů po implantaci;

* značí statisticky významné rozdíly mezi nativní skupinou a 16. týdnem jednotlivých skupin páteří při 95 % hladině spolehlivosti



Obrázek 33 - Ohybové tuhosti páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě: A – autologního štěpu, B – HPKS obohaceného biologickou složkou, C – HPKS modifikovaného anorganickou složkou; 8 týdnů po implantaci; bez statisticky významných rozdílů mezi skupinami po 8 týdnech od implantace při 98,34 % hladině spolehlivosti

Porovnávané skupiny A8+B8+C8 jsou bez statisticky významných rozdílů (viz Obrázek 33) a jejich tuhosti nabývají přibližně stejných hodnot. Ve skupině po 16 týdnech (A16+B16+C16) se zde objevují statisticky významné rozdíly mezi všemi soubory (viz Obrázek 34). Obě tříprvková porovnání jsou na upravené úrovni 98,34% hladiny spolehlivosti.



Obrázek 34 - Ohybové tuhosti páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě:
A – autologního štěpu, B – HPKS obohaceného biologickou složkou, C – HPKS modifikovaného anorganickou složkou; 16 týdnů po implantaci;
bez statisticky významných rozdílů mezi skupinami po 16 týdnech od implantace při 98,34 % hladině spolehlivosti

Na základě výše uvedených grafů, ve kterých jsou zaznamenány statisticky významné rozdíly, bylo možno zodpovědět dříve uvedené hypotézy:

- *Delší čas k hojení a srůstu tkáně přináší změnu v tuhosti páteřních segmentů.*

Ano, ve všech porovnávaných skupinách (párové porovnání: A8+A16, B8+B16, C8+C16) byl testy prokázán statisticky významný rozdíl. Hodnoty tuhostí vzorků vytnutých po 16 týdnech dosahují konkrétně vyšších hodnot oproti tuhosti vzorků vytnutých po 8 týdnech. Hypotézu nezamítáme na 95 % hladině významnosti.

- *Některý z aplikovaných implantátů dosahuje po 8 týdnech přibližně tuhosti nativních vzorků.*

Ne, žádná ze skupin A8, B8, C8 porovnávaná se skupinou N nedosahovala hodnot tuhosti nativního vzorku. U každé párově porovnávané skupiny je statisticky významný rozdíl. Hypotézu zamítáme na 95 % hladině významnosti.

- *Některý z aplikovaných implantátů dosahuje po 16 týdnech přibližně tuhosti nativních vzorků.*

Ano, konkrétně skupiny A16 a C16. Mezi skupinami N+A16 a N+C16 není statisticky významný rozdíl – dosahují přibližně stejných hodnot jako nativní vzorek. U skupiny N+B16 vychází statisticky významný rozdíl. Hypotézu nezamítáme pro skupiny A16 a C16 na hladině 95 % významnosti. Hypotézu zamítáme pro skupinu B16 na hladině 95% významnosti.

- *Některý z aplikovaných implantátů dosahuje oproti nativnímu vzorku nižší tuhosti.*

Ano, jako skupiny s nejmenšími tuhostmi, u nichž byly při porovnání s nativní skupinou zjištěny statisticky významné rozdíly, se jeví skupiny A8, B8 a C8. Vícenásobným porovnáním těchto skupin (A8+B8+C8) nebylo při hladině významnosti 98,34 % zjištěno statisticky významných rozdílů. Všechny skupiny dosahují přibližně stejných hodnot.

- *Některý z aplikovaných implantátů dosahuje výrazně vyšší tuhosti než ostatní.*

Ano, vyšších tuhostí dosahovaly skupiny vytnuté po 16 týdnech, tedy A16, B16 a C16. Vícenásobným porovnáním těchto skupin (A16+B16+C16) bylo při hladině významnosti 98,34 % zjištěno statisticky významných rozdílů mezi všemi skupinami. Nejvyšší tuhosti dosáhla skupina B16.

4.2 Zatěžování do destrukce

Záměrem druhého režimu zatěžování bylo vyhodnotit maximální ohybový moment M_{Omax} potřebný k destrukci páteří. Jak lze vidět v Tabulce 6, u většiny vzorků nebylo destrukčního stavu dosaženo. Pevnost těchto vzorků tedy reálně dosahovala hodnot větších, než byl limit použitého snímače ± 25 Nm. Vzorky, u kterých k poškození došlo, byly celkem tři. Je třeba poznamenat, že u žádného ze vzorků, u kterého k poškození došlo, nebylo místo implantace nejslabším článkem, jelikož páteř praskla vždy v jiném místě.

Tabulka 6 – Maximální ohybové momenty páteří (* nedošlo k destrukci, byl dosažen limit snímače)

Vzorek č.	M_{Omax} [Nm]	
N3, N4, N5, N6, N7	*	N
7A8, 9A8, 12A8	*	A8
8A8	23,3	
2A16, 3A16, 5A16, 6A16	*	A16
1B8	24,2	B8
3B8, 4B8	*	
6B8A	11	
7B16A, 8B16, 10B16, 12B16	*	B16
7C8, 8C8, 9C8, 12C8	*	C8
2C16, 3C16, 4C16, 6C16	*	C16

ZÁVĚR

Cílem práce bylo provést experiment a vyhodnotit biomechanické vlastnosti páteřních segmentů, do nichž byly voperovány implantáty sloužící ke zlepšení spinální fúze a hojení kostí. V rámci experimentu byla provedena zkouška prostého ohybu, kdy při zajištění volnosti horní části páteře byla osová síla po celou dobu zatěžování řízena na nulovou hodnotu tak, aby se zamezilo parazitnímu zatížení. Jmenovitě byly testovány a porovnávány vzorky páteří s implantovanými náhradami v podobě autologního štěpu (skupina A), hybridního porézního kostního scaffoldu obohaceného biologickou složkou typu I (skupina B) a hybridního porézního kostního scaffoldu modifikovaného anorganickou složkou typu II (skupina C). Tento experiment byl pro srovnání tuhostí doplněn skupinou nativních páteří (skupina N). Srovnání těchto materiálů mělo také za cíl dokázat, že i levná náhrada biologické složky složkou anorganickou (v podobě vzorků skupin C) může mít bioaktivní a osteoinduktivní vlastnosti.

K určení času potřebného pro srůst tkáň byl experiment rozdělen na skupiny páteří vytnutých po 8 a po 16 týdnech od implantace. Po provedení experimentu a zpracování získaných dat byly výsledné ohybové tuhosti páteřních segmentů otestovány statistickými testy, prostřednictvím nichž byly zodpovězeny počáteční hypotézy.

Z hlediska ohybové tuhosti dosahují vzorky, které měly delší čas k hojení a prorůstání do okolní tkáň (skupiny A, B a C vytnuté po 16 týdnech od implantace) větších tuhostí, nežli dosahují skupiny A, B a C vytnuté po 8 týdnech. Dá se tedy říci, že po 16 týdnech dochází k lepšímu srůstu spojovaných částí páteře a tím i k dosažení větších tuhostí. Všechny zmíněné skupiny vytnuté po 16 týdnech navíc narozdíl od skupin vytnutých po 8 týdnech, dosahují minimálně tuhosti nativních páteří. Doba hojení 16 týdnů se tedy jeví jako dostatečný čas pro spinální fúzi u všech užitých implantátů a lze tvrdit, že po 16 týdnech je nově vytvořená struktura nosná.

Největší tuhosti dosáhla skupina B16, a to průměrné hodnoty $2,17 \pm 0,27$ Nm/deg za skupinu. V porovnání se skupinou nativních vzorků, jejíž průměrná hodnota se dle měření pohybovala kolem $1,32 \pm 0,41$ Nm/deg, je to 64% nárůst tuhosti. Ze statistického hlediska, se jako shoda s nativními vzorky jeví skupiny A16 a C16. Hodnota mediánu skupiny A16 dosahovala $1,09$ Nm/deg s mezikvartilovým rozpětím $0,21$ Nm/deg. Průměrná hodnota tuhosti za skupinu C16 činila $1,32 \pm 0,11$ Nm/deg.

Otázkou může být, zdali je dobré získat výrazně vyšší hodnoty, než je tuhost nativních vzorků. Větší tuhost jednotlivých segmentů by totiž vedla k nerovnoměrnému zatížení páteře a tím i k dalším komplikacím. Na druhou stranu vytnutí meziobratlové destičky a její nahrazení pevným spojením v podobě fúze musí přivodit zvětšení tuhosti oproti fyziologickému stavu. Řekla bych, že z fyziologického hlediska, kdy považujeme tuhost nativních vzorků za ideální tuhost a z hlediska možných komplikací, které se mohou vyskytnout u léčby kostním autograftem (skupina A16), dosahuje nejlepších výsledků léčba s hybridním porézním kostním scaffoldem po 16 týdnech hojení (skupina C16).

Co se týče druhého režimu zatěžování, při němž bylo záměrem zjistit maximální ohybový moment potřebný k destrukci páteře, nebylo získáno očekávané množství dat. Většina vzorků totiž vydržela namáhání v rozsahu snímače, který byl při měření použit, tedy namáhání ± 25 Nm. Příznivým zjištěním však je, že došlo-li k destrukci páteře, pak mimo oblast implantátu což se dá pokládat za pozitivní výsledek.

Celkové zhodnocení efektu testovaných implantátů je potřeba ještě doplnit o poznatky lékařů, kteří výsledky porovnají s histologickými testy a posoudí vhodnost jejich užití.

Na základě výše uvedeného se domnívám, že cíle mé diplomové práce byly splněny.

SEZNAM ZDROJŮ

- [1] GUPTA, Ashim, Nitin KUKKAR, Kevin SHARIF, Benjamin J MAIN, Christine E ALBERS a Saadiq F EL-AMIN III. Bone graft substitutes for spine fusion: A brief review. *World Journal of Orthopedics*. 2015. ISSN 2218-5836. (6), 449-456
- [2] FERNANDEZ, Gabriel de Grado, Laetitia KELLER, Ysia IDOUX-GILLET, Quentin WAGNER, Anne-Marie MUSSET, Nadia BENKIRANE-JESSEL, Fabian BOURNERT a Damien OFFNER. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *Journal of Tissue Engineering*. 2018. (9), 1-18.
- [3] STASTNY, Premysl, Radek SEDLACEK, Tomas SUCHY, Vera LUKASOVA, Michala RAMPICHOVA a Martin TRUNEC. Structure degradation and strength changes of sintered calcium phosphate bone scaffolds with different phase structures during simulated biodegradation in vitro. 2019. ISSN 0928-4931.
- [4] BRINCKMANN, Paul, Wolfgang FROBIN, Gunnar LEIVSETH a Burkhard DRERUP. *Orthopedic Biomechanics* [online]. Druhé vydání. Thieme Medical Publishers, Incorporated, 2015 [cit. 2019-11-24]. ISBN 978-3-13-176832-2. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/cvut/reader.action?docID=5247381&query=9783131768223>
- [5] HUDÁK, Radovan a David KACHLÍK. *Memorix anatomie*. První vydání. Praha: Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-674-6.
- [6] CURREY, John D. *Bones: structure and mechanics* [online]. Princeton: Princeton University Press, 2002 [cit. 2019-11-24]. ISBN 06-910-9096-3. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/cvut/reader.action?docID=1441378>
- [7] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie*. První vydání. Praha: Avinecum, 1987. ISBN 08-102-87.
- [8] FIALA, Pavel, Jiří VALENTA a Lada EBERLOVÁ. *Stručná anatomie člověka*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2015. ISBN 978-80-246-2693-2.
- [9] *Structure and functions of bones* [online]. 2017 [cit. 2019-11-24]. Dostupné z: <https://onlinesciencenotes.com/structure-functions-bones>
- [10] ČAPEK, Lukáš, Petr HÁJEK a Petr HENYŠ. *Biomechanika člověka*. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0367-6.
- [11] DANILOV, Igor' Michajlovič. *Osteochondróza pro profesionálního pacienta*. Praha: Ibis, 2014. ISBN 978-80-904796-7-8.
- [12] *Biomechanics of the human intervertebral disc: A review of testing techniques and results* [online]. (May 2017) [cit. 2019-11-24]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1751616117300449>

- [13] Degenerativní onemocnění bederní a hrudní páteře [online]. [cit. 2019-11-24]. Nemocnice na Homolce. Dostupné z: <https://www.homolka.cz/nase-oddeleni/11635-neuroprogram/11635-neurochirurgie-nch/11751-nase-sluzby/11752-spondylochirurgie/degenerativni-onemocneni-bederni-a-hrudni-patere>
- [14] Typy postižení páteře a léčba [online]. In: SPINESURGERY.CZ [online]. [cit. 2019-11-24]. Dostupné z: <http://www.spondylo.cz/disability.html>
- [15] SUCHÝ, Tomáš. Biomechanika kosti I [výukový podklad – prezentace]. [cit. 2019-11-24].
- [16] HOLLINGER, Jeffrey O. An introduction to biomaterials [online]. 2nd ed. CRC Press LLC, 11n. l. [cit. 2019-11-26]. Biomedical engineering series (Boca Raton, Fla.). ISBN 978-1-4398-1257-0. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/cvut/detail.action?docID=1446213>
- [17] HUTMACHER, Dietman W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage [online]. 2007 [cit. 2019-11-26]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080451541500216>
- [18] VOJTOVÁ, L.; WOLFOVÁ, L.; JUREČKOVÁ, L.; KOHUTOVÁ, L. Úvod do tkáňového inženýrství. In Úvod do tkáňového inženýrství. Česká republika: MediaBros s.r.o., 2015. s. 19-45. ISBN: 978-80-260-9720-4
- [19] BLITTERSWIJK, Clemens A. Van a Jan de BOER. Tissue engineering [online]. Druhé vydání. [cit. 2019-12-01]. ISBN 978-0-12-420145-3. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/cvut/reader.action?docID=1887711>
- [20] TOMLINS, Paul. Characterisation and Design of Tissue Scaffolds [online]. Woodhead Publishing, 2015 [cit. 2019-12-01]. ISBN 978-1-78242-095-8. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/cvut/reader.action?docID=4082037>
- [21] Electrospinning. In: Weistron [online]. [cit. 2019-12-01]. Dostupné z: <http://www.weistron.com/electrospinning-tech/>
- [22] LIU, Xin, Mohamed N. RAHAMAN, Gregory E. HILMAS a B. Sonny BAL. Mechanical properties of bioactive glass (13-93) scaffolds fabricated by robotic deposition for structural bone repair: Acta materialia. Elsevier. 2013. ISSN 1742-7061.
- [23] GIANNOUDIS, Peter V., Haralambos DINOPOULOS a Eleftherios TSIRIDIS. Bone substitutes: An update. Injury: International journal of the care of the injured. Elsevier, 2005, (36 S), 20-27.
- [24] MANNEN, Erin. M., John T. ANDERSON, Paul M. ARNOLD a Elizabeth A. FRIIS. Mechanical analysis of the human cadaveric thoracic spine with intact rib cage. *Journal of Biomechanics*. 2015, (48), 1-7.

- [25] HEALY, Andrew T., Daniel LUBELSKI, Prasath MAGESWARAN, Deb A. BHOWMICK, Adam J. BARTSCH, Edward C. BENZEL a Thomas E. MROZ. Biomechanical analysis of the upper thoracic spine after decompressive procedures. *The Spine Journal*. 2014, (14), 1-7.
- [26] FRAYSUR, K. D., B. P. KELLY a D. J. DIANGELO. *Use of a Spine Robot to Simulate Pure Moment Testing for Spine Biomechanics*. School of Biomedical Engineering and Imaging, University of Tennessee Health Science Center, Memphis, TN, USA, 1-4.
- [27] LUBELSKI, Daniel, Andrew T. HEALY, Prasath MAGESWARAN, Deb A. BHOWMICK, Adam J. BARTSCH, Edward C. BENZEL a Thomas E. MROZ. Biomechanics of the lower thoracic spine after decompression and fusion: a cadaveric analysis. *The Spine Journal*. 2014, (14).
- [28] BLACK, Cameron R. M., Vitali GORAINOV, David GIBBS, Janos KANCZLER, Rahul S. TARE a Richard O. C. OREFFO. *Bone Tissue Engineering : Molecular Biology of Skeletal Tissue Engineering*. 2015.
- [29] TOHARA, Shiro. Pig Improvement with Special Reference to the Number of Vertebrae: Variation of the Number of Vertebrae in Pigs.
- [30] Kostra prasete [online]. In: Shutterstock. [cit. 2020-02-02]. Dostupné z: <https://www.shutterstock.com/image-illustration/pig-anatomy-skeleton-731383198>

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Vnitřní struktura dlouhé kosti	6
Obrázek 2 – Lidská páteř	7
Obrázek 3 - Funkce meziobratlové ploténky při vzájemném naklonění obratlových těl .	8
Obrázek 4 – Rentgenové snímky páteře v sagitálním řezu.....	9
Obrázek 5 - Frostova teorie mechanostatu	10
Obrázek 6 - Schéma principu tkáňového inženýrství	11
Obrázek 7 - Schéma principu elektrosvláknování	14
Obrázek 8 – Typický průběh při zatěžování páteří do: a) flexe-extenze, b) laterální flexe, c) axiální rotace.....	21
Obrázek 9 - Robotický systém pro testování páteře s kompletním hrudním košem, robot KUKA	22
Obrázek 10 - Programovatelný robot vyvinutý k zatěžování páteří prostým ohybem, stupně volnosti jsou vyznačeny černými šipkami.....	22
Obrázek 11 - Skelet prasete	24
Obrázek 12 – Testovací zařízení MTS Mini Bionix 858.2 se spinálním simulátorem...	25
Obrázek 13 - Schéma postupu při výběru statistických testů	27
Obrázek 14 - Implantát HPKS připravený k implantaci	29
Obrázek 15 - Příprava vzorků páteří.....	31
Obrázek 16 - Páteř upnutá v testovacím zařízení MTS Mini Bionix.....	32
Obrázek 17 – Detailní záběr upnutého vzorku páteře (nalevo) a vzorku páteře, u které došlo při ohybu k destrukci (napravo)	33
Obrázek 18 - Průběh ohybového momentu a rotace v závislosti na čase vzorku 12B16	34
Obrázek 19 - Průběh ohybového momentu v závislosti na rotaci vzorku 12B16.....	35
Obrázek 20 - Vybraná část průběhu pro určení tuhosti vzorku 12B16	35
Obrázek 21 - Závislost ohybového momentu na rotaci nativních páteří (skupina N)	37
Obrázek 22 - Závislost ohybového momentu na rotaci páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě autograftu (skupina A); 8 týdnů po implantaci.....	38
Obrázek 23 - Závislost ohybového momentu na rotaci páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě autograftu (skupina A); 16 týdnů po implantaci.....	38
Obrázek 24 - Závislost ohybového momentu na rotaci páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě HPKS obohaceného biologickou složkou (skupina B); 8 týdnů po implantaci	39

Obrázek 25 - Závislost ohybového momentu na rotaci páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě HPKS obohaceného biologickou složkou (skupina B); 16 týdnů po implantaci	39
Obrázek 26 - Závislost ohybového momentu na rotaci páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě HPKS modifikovaného anorganickou složkou (skupina C); 8 týdnů po implantaci.....	40
Obrázek 27 - Závislost ohybového momentu na rotaci páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě HPKS modifikovaného anorganickou složkou (skupina C); 16 týdnů po implantaci.....	40
Obrázek 28 - Závislost ohybového momentu na rotaci u reprezentativních vzorků	41
Obrázek 29 - Ohybové tuhosti nativních páteří a páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě: A – autologního štěpu, B – HPKS obohaceného biologickou složkou, C – HPKS modifikovaného anorganickou složkou; 8 a 16 týdnů po implantaci.....	43
Obrázek 30 - Ohybové tuhosti páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě: A – autologního štěpu, B – HPKS obohaceného biologickou složkou, C – HPKS modifikovaného anorganickou složkou; 8 a 16 týdnů po implantaci	45
Obrázek 31 - Ohybové tuhosti nativních páteří (N) a páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě: A – autologního štěpu, B – HPKS obohaceného biologickou složkou, C – HPKS modifikovaného anorganickou složkou; 8 týdnů po implantaci;	45
Obrázek 32 - Ohybové tuhosti nativních páteří (N) a páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě: A – autologního štěpu, B – HPKS obohaceného biologickou složkou, C – HPKS modifikovaného anorganickou složkou; 16 týdnů po implantaci.....	46
Obrázek 33 - Ohybové tuhosti páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě: A – autologního štěpu, B – HPKS obohaceného biologickou složkou, C – HPKS modifikovaného anorganickou složkou; 8 týdnů po implantaci.....	46
Obrázek 34 - Ohybové tuhosti páteřních segmentů se zavedeným implantátem v podobě: A – autologního štěpu, B – HPKS obohaceného biologickou složkou, C – HPKS modifikovaného anorganickou složkou; 16 týdnů po implantaci.....	47

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Tabulka vlastností některých technologií pro výrobu scaffoldů	15
Tabulka 2 - Přehled značení vzorků	31
Tabulka 3 - Ohybové tuhosti páteřních segmentů při extenzi	42
Tabulka 4 - Normalita a shoda rozptylů skupin vzorků.....	44
Tabulka 5 - Použité statistické testy	44
Tabulka 6 – Maximální ohybové momenty páteří.....	49