

TECHNIKI BIOLOGICZNE W ORTOPEDII



ORTOPEDYCZNO-REHABILITACYJNY SZPITAL KLINICZNY IM. W. DEGI UM W POZNANIU

**dr Małgorzata Kaczmarek
dr hab. n. med. Tomasz Trzeciak**

SPIS TREŚCI

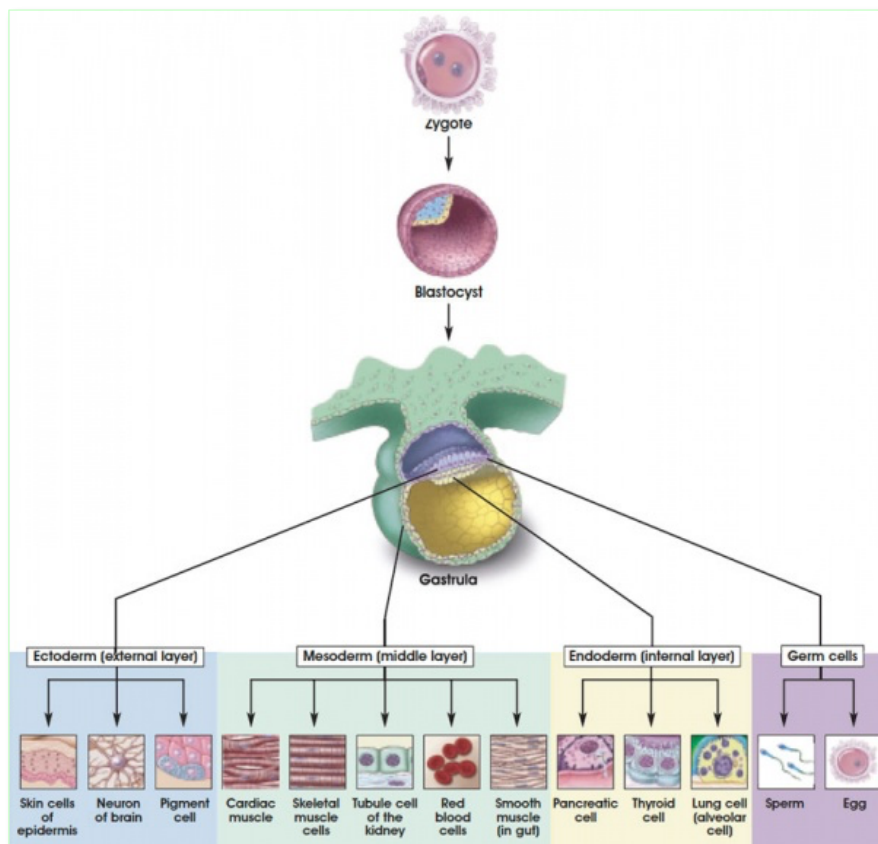
MEDYCYNA REGENERACYJNA	1
Komórki macierzyste.....	1
Komórki macierzyste w regeneracji tkanki chrzęstnej	3
Terapia w chorobie zwyrodnieniowej stawów (osteoarthritis – OA)..	3
Kliniczne techniki zastosowania autologicznego przeszczepu chondrocytów	3
Źródła komórek macierzystych	4
Badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych	5
Terapia uszkodzeń tk. chrzęstnej wywołanych urazem	8
Terapia uszkodzeń tk. chrzęstnej wywołanych chorobą zwyrodnieniową stawów	9
Produkty ortopedii regeneracyjnej w regeneracji chrząstki.....	10
Matryca (scaffold).....	12
Białka biomimetyczne	13
KOMÓRKI MACIERZyste W REGENERACJI KOŚCI	16
Bioreaktory w inżynierii tkankowej	24
Osocze bogatopłytkowe	25

MEDYCYNA REGENERACYJNA

Ortobiologia jest nową dziedziną, z pogranicza nauki i medycyny, która wykorzystuje osiągnięcia biologii i biochemii, w celu tworzenia materiałów zastępczych dla kości i tkanek miękkich, w procesie leczenia aparatu ruchowego.

KOMÓRKI MACIERZyste

Jednym z osiągnięć biologii komórki było poznanie mechanizmów różnicowania komórek i regulacji ekspresji ich genów, dzięki czemu możliwe stało się zastosowanie komórek pluripotencjalnych w leczeniu wielu chorób, jak chociażby cukrzyca, choroba Leśniowskiego-Crohna, dystrofia mięśniowa czy reumatoidalne zapalenie stawów.



KOMÓRKI MACIERZYSTE (stem cells) to multipotencjalne komórki, które pod wpływem odpowiednich czynników mogą różnicować się we wszystkie rodzaje tkanek – wywodzące się ze wszystkich trzech listków zarodkowych czyli ektodermy, endodermy i mezodermy, jak również w komórki rozrodcze.

Komórki pluripotencjalne – różnicują się do wszystkich komórek (poza komórkami łożyska), w przyrodzie takie komórki znajdują się w zarodku (etyczne restrykcje wykorzystania takich komórek). Powstają one także z dojrzałych komórek – indukowane pluripotencjalne kom. macierzyste; Shinya Yamanaka otrzymał w 2012 roku Nagrodę Nobla za to odkrycie.

Komórki multipotencjalne – różnicują się tylko do kom. pochodzących z trzech listków zarodkowych, np. kom. hematopoetyczne w szpiku kostnym, poza nimi w szpiku kostnym obecne są mezenchymalne kom. macierzyste.

Komórki unipotencjalne- różnicują do jednego rodzaju komórek, np. obecne w mięśniach komórki satelitarne, które mają zdolność do regeneracji mięśni szkieletowych.

Wyróżniamy trzy rodzaje komórek macierzystych:

- mezenchymalne kom. macierzyste (MSC),
- embrionalne komórki macierzyste (ESC),
- indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPSC).

Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC) są prekursorami komórek chrząstki, kości, tkanki tłuszczowej, skóry, czy mięśni. Pozyskiwane są w większości ze szpiku kostnego, jednak ich niewielka liczba, dostępna do pobrania i izolacji, ogranicza możliwość wykorzystania komórek w terapii.

KOMÓRKI MACIERZyste W REGENERACJI TKANKI CHRZĘSTNEJ

Komórki macierzyste wykorzystywane są zarówno w terapii ogniskowych uszkodzeń chrząstki lub chrzęstnokostnych uszkodzeń o niskim potencjale regeneracyjnym oraz w uszkodzeniach powstałych w przebiegu choroby zwyrodnieniowej stawów (osteoarthritis OA).

Problemem w terapii komórkowej tych ostatnich są znaczne rozmiary tych uszkodzeń w porównaniu do izolowanych, pourazowych uszkodzeń chrząstki stawowej.

TERAPIA W CHOROBIE ZWYRODNIENIOWEJ STAWÓW (OSTEOARTHRITIS – OA)

Obecnie stosowana terapia w chorobie zwyrodnieniowej stawów nie opiera się na regeneracji i w niewielkim stopniu hamuje postępujący charakter choroby. Głównie polega na redukcji bólu, zaaplikowaniu niesteroidowych leków przeciwzapalnych, wiskosuplementacji, a z czasem koniecznej wymianie stawu.

Problemy w zastosowaniu terapii komórkowej w OA:

- duża powierzchnia uszkodzeń,
- konieczność umieszczenia delikatnego konstrukt w biomechanicznie i chorobowo zmienionym, niesprzyjającym środowisku otaczającej tkanki,
- konieczność kontroli tego otaczającego środowiska.

KLINICZNE TECHNIKI ZASTOSOWANIA AUTOLOGICZNEGO PRZESZCZEPU CHONDROCYTÓW

Iniekcja

- + mniejsza inwazyjność,
- + iniekcja krwi czy aspiratu ze szpiku kostnego nie wymaga regulacji etycznych w przeciwieństwie do komórek hodowanych poza ustrojem,
- – brak precyzji w aplikacji w miejscu uszkodzenia.

Operacja chirurgiczna

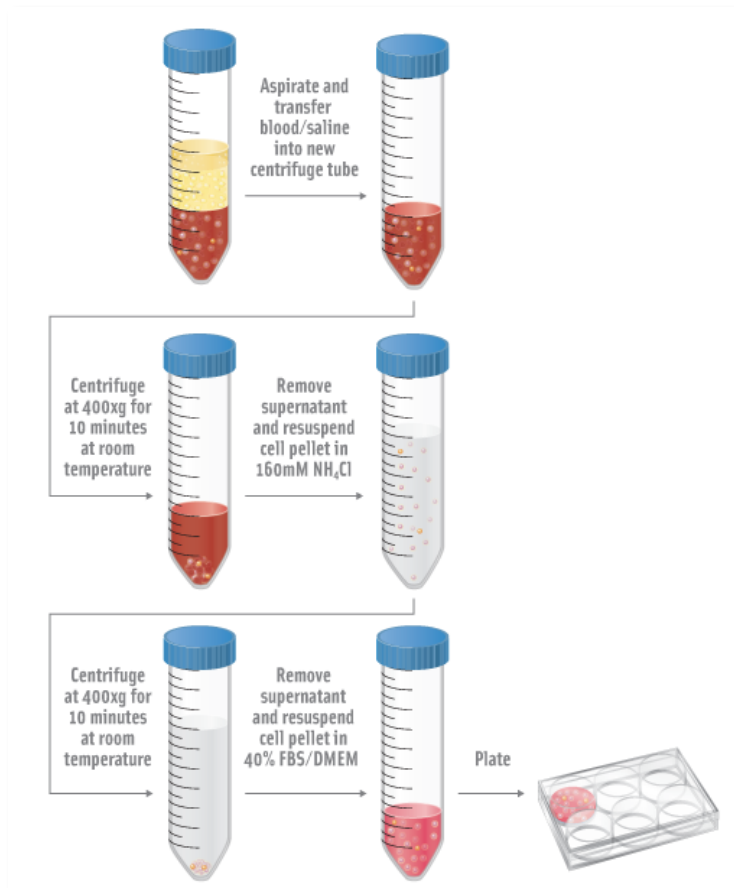
transplantacja, implantacja

- + bezpośrednia aplikacja w miejscu uszkodzenia,
- - inwazyjność samej procedury.

ŹRÓDŁA KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Źródłem mezenchymalnych kom. macierzystych jest najczęściej szpik kostny zawierający poza nimi płytki krwi (wraz z czynnikami wzrostowymi), krwiotwórcze kom. macierzyste i cytokiny. Przeciwzapalne i immunomodulujące właściwości tych komórek mogą stymulować proces naprawczy. Jednak zawartość kom. macierzystych może być niewystarczająca i nie podlega ocenie, a może być zwiększona jedynie nieznacznie przez wirowanie i zagęszczania.

Istnieje alternatywna droga obejmująca pozyskanie komórek mezenchymalnych z krwi pępowinowej, krwi obwodowej lub po trawieniu z innych tkanek (np. z tkanki tłuszczowej), przez ich adhezję do plastikowych powierzchni.



<http://www.irvinesci.com/protocol-for-mesenchymal-stem-cell-isolation>

Szybka procedura izolacji mezenchymalnych komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej. (1)

Populacje komórek są utrzymywane w kulturach tkankowych, co pozwala na kontrolę ich jakości i ilości do momentu iniekcji. Regulacje prawne dotyczące samej iniekcji takich komórek ulegają dodatkowej komplikacji w przypadku zastosowania rusztowania z biomateriałów, czynników wzrostu, kwasów nukleinowych i mechanicznych stymulatorów.

BADANIA Z WYKORZYSTANIEM MODELI ZWIERZĘCYCH

Pierwszym etapem badań nad wykorzystaniem takich komórek są oczywiście badania z wykorzystaniem organizmów zwierzęcych. Należy wziąć pod uwagę, że średnia grubość chrząstki stawowej wynosi 2.2-2.5 mm (2), średnia wielkość uszkodzenia to 550 mm², przy czym 95% uszkodzeń obejmuje tylko chrząstkę, a nie

znajdująca się pod nią kość (3). Model zwierzęcy powinien naśladować morfologię ludzką. Stosowane w badaniach modele to: mysz, pies, owca, koza, królik, koń, świnia. Trzeba jednak pamiętać, że u małych zwierząt trudno uniknąć uszkodzenia również kości podchrzęstnej.

U owcy grubość chrząstki kłykcia kości udowej wynosi 0.4-1.7 mm, jej anatomia jest podobna do ludzkiej (3). Zwierzęta te są relatywnie tanie i łatwe w utrzymaniu. Gdy uszkodzenie obejmuje kość podchrzęstną nie ma pewności, czy defekt ulega naprawie dzięki obecności autosomalnych kom. mezenchymalnych pochodzących ze szpiku kostnego czy też z implantacji. Stąd konieczność testowania kom. mezenchymalnych na uszkodzeniach obejmujących wyłącznie chrząstkę. Doświadczenia z udziałem owiec pokazały, że w przypadku tego gatunku, lepsze właściwości gojące miały zastosowane kom. mezenchymalne w połączeniu z czynnikami wzrostowymi i rusztowaniami z krwi lub chitozanu (4).

Świnia stwarza trudności w utrzymaniu i opiece, jednak grubość jej chrząstki jest podobna jak u człowieka 1.5-2.2 mm (3). W badaniach porównywano zastosowanie odróżnicowanych do stadium chondrocytów kom. mezenchymalnych pochodzących ze szpiku kostnego z nieodróżnicowanymi kom., stosując analizę ekspresji genów kolagenu II, X oraz MMP-13. Na podstawie wyników tych doświadczeń zaopiniowano, że użycie odróżnicowanych wstępnie kom. mezenchymalnych nie daje lepszych rezultatów w regeneracji uszkodzeń chrząstki (5).

W przypadku uszkodzeń obejmujących tkankę podchrzęstną lepsze efekty uzyskano stosując odróżnicowane kom. na szkielecie PGA-PLA (kw. poliglikolowy/kw. polimlekowy). Nawet po siedmiu miesiącach analiza z białkiem GFP wykazała ich obecność w miejscu uszkodzenia (6).

Miejsce uszkodzenia również ma znaczenie: w rowku rzepki uszkodzenie goi się szybciej niż na kłykciu przyśrodkowym (7).

Grubość tkanki chrzęstnej u konia wynosi 1.75-2.0 mm, jednak wysokie koszty utrzymania, brak ras specjalnie hodowanych do celów

laboratoryjnych oraz skomplikowane względy etyczne ograniczają wykorzystanie tego gatunku w badaniach.

Doświadczenie z zastosowaniem nieodróżnicowanych kom. mezenchymalnych osadzonych na fibrynowym szkielecie po 30 dniach pokazało przewagę konstruktów z komórkami. Jednak po 8 miesiącach nie odnotowano żadnych różnic, na co częściowo miał wpływ ograniczony ruch zwierząt. W innym doświadczeniu wyraźnie lepsze efekty uzyskano przez zastosowanie komórek macierzystych pozyskanych ze szpiku kostnego (BMSC).

Kolejnym etapem jest oczywiście próba odniesienia otrzymanych wyników do modelu ludzkiego. I tutaj pierwszy wniosek jaki się nasuwa to, że niewiele doświadczeń naśladuje najczęstsze uszkodzenia dotyczące tylko tkankę chrzęstną.

Większość doświadczeń ma zbyt krótki okres obserwacji, zwykle poniżej 12 miesięcy, biorąc pod uwagę obserwację fenotypową chrząstki, powstanie warstwy chrząstki szklistej, integrację implantu z otoczeniem, oraz charakterystykę biomechaniczną naprawionego uszkodzenia.

W odniesieniu do uszkodzeń chrzęstnokostnych wszystkie badania, niezależnie od wykorzystanego modelu zwierzęcego, wskazują na efektywniejszą regenerację z użyciem mezenchymalnych kom. macierzystych.

W kolejnych badaniach należy uwzględnić wpływ wieku zwierząt na regenerację, czas upływający od powstania uszkodzenia do jego naprawy (symulacja OA), wykorzystanie innych niż tylko szpik kostny źródeł mezenchymalnych kom. macierzystych, wykorzystanie samych komórek (zawiesiny). Konieczne jest zastosowanie markerów hipertrofii do testowania stabilności fenotypowej wprowadzonych komórek, oraz przeprowadzenie oceny biomechaniki powstałej tkanki chrzęstnej.

TERAPIA USZKODZEŃ TK. CHRZĘSTNEJ WYWOŁANYCH URAZEM

Poza pionierskimi badaniami na modelach zwierzęcych mezenchymalne kom. macierzyste wykorzystuje się również w leczeniu uszkodzeń wywołanych urazami. Jedną ze stosowanych metod są mikrouszkodzenia (microfracturing), polegająca na wprowadzaniu mikro uszkodzeń by wywołać krwawienie z kości podchrzęstnej i doprowadzić do powstania superskrzepu, który stymuluje regenerację (8). Technika ta ma swoje plusy: jest prosta, nieskomplikowaną, minimalnie inwazyjną, jedno etapową procedurą, z niską śmiertelnością oraz niskimi kosztami (9). Minusem jest fakt, że powodzenie tej techniki zależy w dużej mierze od wieku pacjenta, a tkanka, która powstaje to w większości tkanka chrzęstna włóknista z niewielką domieszką szklistej, o gorszej od otaczającej ją zdrowej tkanki stabilności i jakości (10).

Wykorzystanie koncentratu szpiku kostnego (BMC-bone marrow concentrate) do leczenia urazowo indukowanych uszkodzeń przyspiesza proces regeneracji:

- heterogeny skład zastosowanego koncentratu komórek wzbogaca jednoetapowe techniki takie jak autologiczna chondrogeniza stymulowana przez matriks (AMIC) (11), lub mikrourazy (MFX) (12),
- zwiększa to udział chrząstki szklistej w powstającej tkance, niezależnie od użytych materiałów i kombinacji technik.

Wykorzystanie mezenchymalnych kom. macierzystych pozyskanych ze szpiku kostnego (BMSC) do leczenia urazowo indukowanych uszkodzeń (13):

- + większa liczba komórek,
- - zwiększone ryzyko kontaminacji podczas wzrostu,
- uzupełnienia są w większości złożone z tkanki włóknistej, a nie szklistej, co wykazały badania histologiczne,

- porównanie techniki z użyciem BMSC i chondrocytów wykazało wyższość tej pierwszej (14).

TERAPIA USZKODZEŃ TK. CHRZĘSTNEJ WYWOŁANYCH CHOROBA ZWYRODNIENIOWĄ STAWÓW

Komórki macierzyste wykorzystuje się również w leczeniu uszkodzeń powstałych na skutek choroby zwyrodnieniowej stawów (OA). W tym przypadku wykorzystuje się zdolność kom. macierzystych do inhibicji katabolicznej aktywności metalloproteinaz macierzy tkanki chrzęstnej.

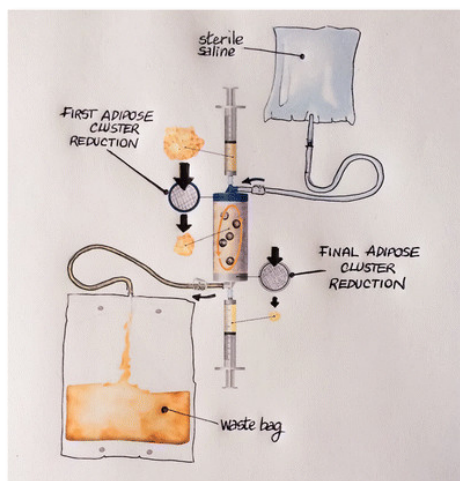
Biorąc pod uwagę chroniczny charakter OA i obecność wielu uszkodzeń chrząstki, najłatwiejsza byłaby iniekcja z MSC lub BMC do przestrzeni między stawowej (8):

- iniekcje z BMC: zarówno iniekcje połączone z oczyszczaniem stawu jak i iniekcje BMC wraz z BMAC (z tkanki tłuszczowej) poprawiły znacznie jakość życia pacjentów i zmniejszyły dolegliwości bólowe (15, 16);
- iniekcje z BMSC / ADMSC: iniekcja BMSC połączona z iniekcją autologicznego lizatu płytek krwi przygotowanego z bogatego w płytki krwi osocza. Na obrazie MRI wykazano zwiększenie objętości zarówno łąkotek, jak i chrząstki oraz zmniejszenie VAS o 95% w ciągu 3 m-cy (17,18). ADMSC - macierzyste kom. mezenchymalne pozyskane z tkanki tłuszczowej (przez podwójne wirowanie i trawienie kolagenazą). Po 3 miesiącach obserwowano wyraźne pogrubienie chrząstki i poprawę jakości życia (ocena funkcjonalna i odczuwanie bólu) (19).
- implantacje BMSC i ADSC: pacjenci po osteotomii kości piszczelowej otrzymali na szkielecie kolagenowym kom. BMSC, konstrukt umieszczony na środkowym kłykciu kości udowej w miejscu znacznego ubytku chrząstki i odsłoniętej kości podchrzęstnej. Po roku nie zaobserwowano różnic w ocenie klinicznej, ale artroskopia i ocena histologiczna wykazały przewagę grupy z komórkami. W badaniach gdzie podano same komórki bez wsparcia dodatkowym szkieletem, nie uzyskano

pozytywnych rezultatów, a powstająca tkanka była nieprawidłowa (20).

PRODUKTY ORTOPEDII REGENERACYJNEJ W REGENERACJI CHRZĄSTKI

- ADSC (adipose derived stem cells) Unistation (NeoGenesis Co.,LTD.)
- Q-graft ® Body Jet Evo®
11.05.2017 Marek Krzemiński i Michał Bogdański oraz Jakub Grocholski przeprowadzili po raz pierwszy w Polsce zabieg regeneracji stawów z wykorzystaniem kom. macierzystych odseparowanych w urządzeniu Q-graft zintegrowanym z systemem do poboru tk. tłuszczowej Body Jet Evo, co pozwoliło na uzyskanie 4 040,00 kom. macierzystych/ml, o żywotności 89,7%.
- LipoGems:
Lipogems zawiera kom. okołonaczyniowe zwane perycytami, które ulegają konwersji do mezenchymalnych kom. macierzystych, produkujących białko LL 37 o właściwościach przeciwzapalnych i bakteriobójczych. Mezenchymalne komórki macierzyste powstrzymują również procesy bliznowacenia, zwiększają unaczynienie, zatrzymują proces obumierania komórek z powodu niedotlenienia i faktycznie wzmacniają naturalną zdolność tkanek do ich regeneracji. Stosowane w takich schorzeniach jak:
 - zmiany degeneracyjne stawów i ścięgien,
 - entezopatie (tj. łokieć tenisisty i golfisty, oraz kolano skoczka),
 - rekonstrukcja tkanek kostnych i chrzęstnych.



Tremolada et al. 2016

Polski Bank Komórek Macierzystych jako jedyny w Polsce posiada pozwolenie Głównego Inspektora Farmaceutycznego na wytworzenie produktów zaawansowanej terapii komórkowej z komórek macierzystych galarety Whartona sznura pępowiny. Wśród ośrodków wykorzystujących ten produkt w ortopedii regeneracyjnej są:

- Ośrodek Medyczny Galen w Bieruniu
- Szpital Lekmed w Warszawie
- Klinika Zdrowej Kości w Łodzi
- Szpital Kliniczny nr 4 w Lublinie
- NZOZ Przyjaciel w Kielcach

MATRYCA (SCAFFOLD)

Implantacja kom. macierzystych w miejsce uszkodzenia zazwyczaj odbywa się z wykorzystaniem w tym celu matrycy zasiedlonej przez wspomniane komórki. Matryca ta powinna spełniać określone funkcje takie jak:

- przywrócenie, zachowanie lub poprawa funkcji naprawianej tkanki,
- umożliwienie komórkom migracji, proliferacji i różnicowania,
- brak reakcji zapalnej i immunologicznej,
- właściwości mechaniczne i szybkość degradacji dostosowane do czasu potrzebnego do pełnego odtworzenia uszkodzonej powierzchni stawowej,
- biodegradacja i eliminacja z organizmu.

Naturalne	Syntetyczne
<ul style="list-style-type: none">• polimery białkowe:<ul style="list-style-type: none">• kolagen• żelatyna• fibryna• polisacharydy:<ul style="list-style-type: none">• hialuronian• alginat• agaroza• chitosan• włókna jedwabiu	<ul style="list-style-type: none">• poliestry:<ul style="list-style-type: none">• kwas polimlekowy (PLA)• kwas poliglikolowy (PGA)• ko-polimer PLGA• polikaprolakton (PCL)

Do budowy takich matryc wykorzystuje się zarówno materiały naturalne jak i syntetyczne.

Część z nich w organizmie człowieka ulega wchłonięciu:

- gąbka kolagenowa, kwas hialuronowy,
- polimery kwasu mlekowego i glikolowego,

bądź podlegają integracji z otaczającymi tkankami:

- np. włóknina węglowa, Dacron, Teflon.

BIAŁKA BIOMIMETYCZNE

Kość jest jedną z nielicznych tkanek, które posiadają zdolność do gojenia i przebudowy bez bliznowacenia, co wynika z formowania nowej tkanki kostnej, zamiast tkanki łącznej, w miejsce ubytku (21). Naśladuje to procesy embrionalne (regeneracja zamiast naprawy uszkodzeń) (22). Limit stanowi wielkość uszkodzenia, a co za tym idzie dostępność tlenu i składników odżywczych.

Kiedy wielkość ubytku jest znacząca, potrzebny jest substytut, który wypełni ten ubytek (23).

Zgodnie z definicją zaproponowaną przez Muschlera i Lanea oraz adaptowaną przez Bauera (24-26), za przeszczep kostny uznamy każdy wszczepiony materiał, który po przeszczepieniu, poprzez swoje właściwości osteogenne (zdolność żywych komórek z przeszczepu do osteogenezy), osteoindukcyjne (zdolność do pobudzania okolicznych komórek biorcy do osteogenezy) lub osteokonduktywne (zdolność do zapewnienia odpowiedniego podłoża sprzyjającego odkładaniu nowej kości) będzie wpływał dodatnio na proces gojenia.

Zastosowanie zarówno fragmentów pochodzących z organizmu pacjenta (autograft) lub organizmu innego człowieka (allografty), wiąże się z pewnymi ograniczeniami (27).

Autografty:

- martwica w miejscu pobrania graftu,
- ból,
- paraliż,
- wydłużony czas hospitalizacji/rehabilitacji,
- wysokie ryzyko infekcji,
- krwiaki,
- ograniczona dostępność tkanki: miednica, grzebień kości biodrowej.

Allografty:

- sukces związany z fizycznym i biologicznym podobieństwem pomiędzy dawcą i biorcą,
- ryzyko infekcji 13%,
- odpowiedź immunologiczna biorcy,
- możliwość transmisji chorób.

Insercja graftu wiąże się ze znajomością komórkowych i pozakomórkowych składowych kości.

Tkanka kostna składa się z komórek (osteocytów, osteoblastów, osteoklastów) oraz substancji zewnątrzkomórkowej, która składa się z kolei z części organicznej – włókien kolagenu i innych białek oraz mineralnej (związki wapnia, magnezu i fosforu – głównie hydroksyapatyt).

Grafty z tkanki kostnej stanowią wsparcie w trakcie procesu naprawy kości, mogą częściowo odżywiać substancję podstawową, a w przypadku autograftów dostarczać komórkowych komponentów. Mogą również stymulować procesy angiogenezy oraz regulować procesy werbowania i różnicowania się komórek macierzystych tkanki kostnej (27).

Skoro istnieje narzędzie do dostarczenia komórek i wsparcia substancji podstawowej należy TYLKO uzyskać właściwe autografty. Nie jest to może końcowe rozwiązanie problemu, ale w porównaniu do tkanek miękkich o ograniczonej zdolności regeneracji i tak doskonały punkt wyjściowy do badań.

Wśród stosowanych naturalnego pochodzenia, wchłanialnych biomateriałów jeden odgrywa w ortopedii dominującą rolę. Jest to kolagen, rodzina 26 białek, której strukturą potrójnej helisy zbudowanej z trzech łańcuchów α . Każdy z łańcuchów zawiera powtórzenia trójpeptydowe (Gly-X-Y) gdzie X- prolina a Y- hydroksyprolina, a łańcuchy występują w kombinacjach homo lub heterotrimerów.

Włókna kolagenowe pełnią funkcje biomechaniczne, oddziałują z komórkami, aby wpłynąć na adhezję, wzrost i różnicowanie oraz wiele innych procesów komórkowych, wspólnie z czynnikami wzrostu oraz cytokinami, podczas rozwoju tkanki i naprawy (27).

Stosuje się dwie strategie tworzenia takich rusztowań z kolagenu:

1. poprzez usunięcie komponentów komórkowych z tkanki łącznej, stanowiącej bogate źródło kolagenu,
2. poprzez formowanie rusztowań *de novo* z cząsteczek kolagenu.

Strategia 1 pozwala na:

- + zachowanie struktury przestrzennej,
- + wykorzystanie obecności natywnej formy kolagenu,
- + wykorzystanie obecności innych białek substancji podstawowej,

problem stanowi:

- - zasiedlanie przez nowe komórki,
- - konieczność usunięcia całej populacji wyjściowych komórek (ksenotransplantacja),
- - obecność antygenów w pobranym materiale,
- - ograniczona dostępność transplantantów,

- przykładami takich produktów są: SIS (Small Intestinal Submucosa) (28), oraz Graftjacket, Wright Medical Technologies, Inc.; TissueMend, TEI Biosciences, Inc.

Drugie podejście pozwala na rozwój komórek na *de novo* wytworzonej matrycy. W oparciu o tą strategię powstają trzy typy konstruktów:

- **włókniste:** powstają na drodze ekstrakcji nierozpuszczalnych włókien kolagenowych z natywnej substancji podstawowej, a następnie ich ponownego łączenia, w celu uzyskania materiału o pożądanych własnościach. Stosowane z powodzeniem w regeneracjach nerwów peryferyjnych (produkt firmy Koken Co, Ltd., Japan, 4000 cząsteczek włókien kolagenowych uzyskanych z bydlęcej skóry) (29);
- **hydrożele:** stanowią substraty dla wzrostu i transportu komórek do miejsca docelowego (iniekcja) (30); oczyszczone w roztworze kwasowym włókna kolagenu I zostają doprowadzone do fizjologicznego pH i temperatury, aby uformować stabilny żel; wykorzystywane do regeneracji skóry, nerwów (27). Dobre wyniki uzyskuje się w regeneracji skóry w żylnym owrzodzeniu podudzi i „stopie cukrzyka” (31,32).
- **gąbki:** formowane na drodze dyspersji i liofilizacji włókien kolagenu I, z możliwością regulacji wielkości porów, na drodze zmian w stężeniu i parametrów liofilizacji (33). Wykorzystywane w produkcie firmy InFUSEk, Medtronic - fuzje kręgosłupa i InductOsk, Wyeth Europa - złamania kości piszczelowej, dostarczają białek morfogenetycznych do kości (34).

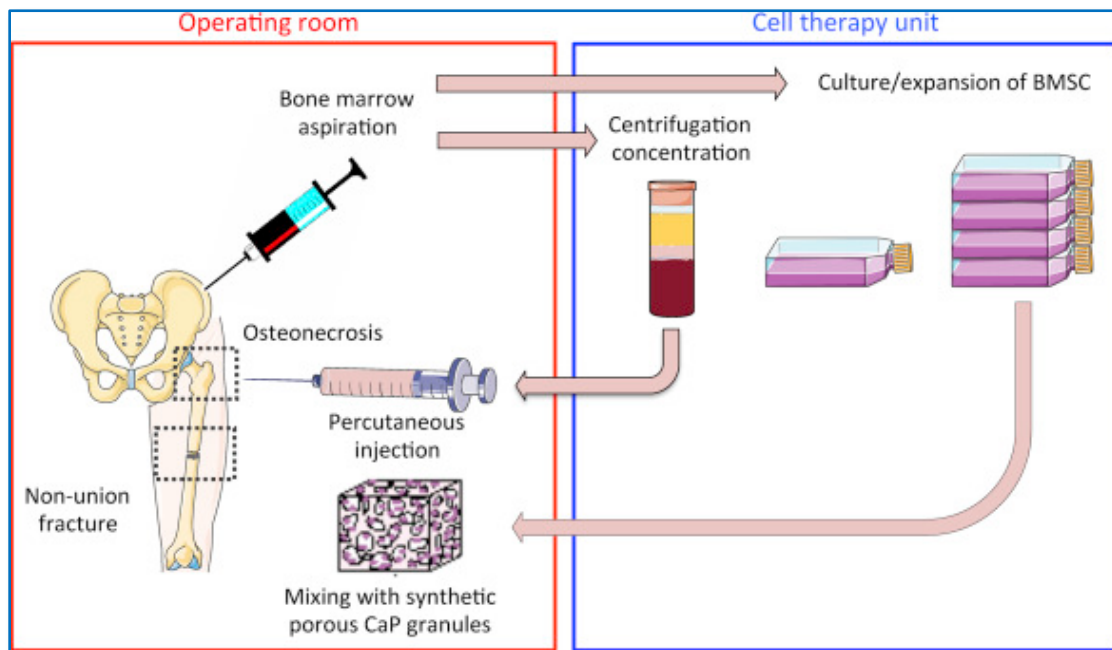
KOMÓRKI MACIERZyste W REGENERACJI KOŚCI

Komórki macierzyste stosuje się w następujących przypadkach dotyczących szeroko pojętych ubytków kostnych:

1. Brak zespolenia lub opóźnione wypełnienie ubytku kostnego powstałego na skutek urazu, guza lub infekcji.

Zastosowanie autograftu z kości gąbczastej jest nadal złotą regułą w takich przypadkach. Jeśli jednak z różnych przyczyn autografty są niewystarczające lub regeneracja nie następuje, można również zastosować aspirat ze szpiku kostnego zawierający kom. macierzyste w ilości 1:10 000 lub 1:100 000 komórek/ml podane na szkielecie z hydroksyapatytu, demineralizowanej macierzy kostnej lub fosforanu trójwapniowego.

Komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego wykorzystuje się w regeneracji uszkodzeń tkanki kostnej w przypadku braku zespolenia lub opóźnionego wypełnienia ubytku kostnego spowodowanego urazem, resekcją guza, lub infekcją. Aspirat szpiku kostnego pobierany jest do strzykawki heparynowej z użyciem trokara, w wielopunktowej punkcji tylnego grzebienia biodrowego, pod miejscowym lub ogólnym znieczuleniem. Nieskoncentrowany aspirat można podać przezskórną iniekcją w miejsce trudno gojące się. Frakcja komórkowa obejmuje białe krwinki, limfocyty, kom. hematopoetyczne, oraz macierzyste. Odwirowanie 400-500 ml daje 40-50 ml koncentratu z 3-6 krotną ilością kom. macierzystych. Szpik kostny można również podawać na allogenicznym graftach kostnych lub granulkach ceramicznych z fosforanu trójwapniowego.

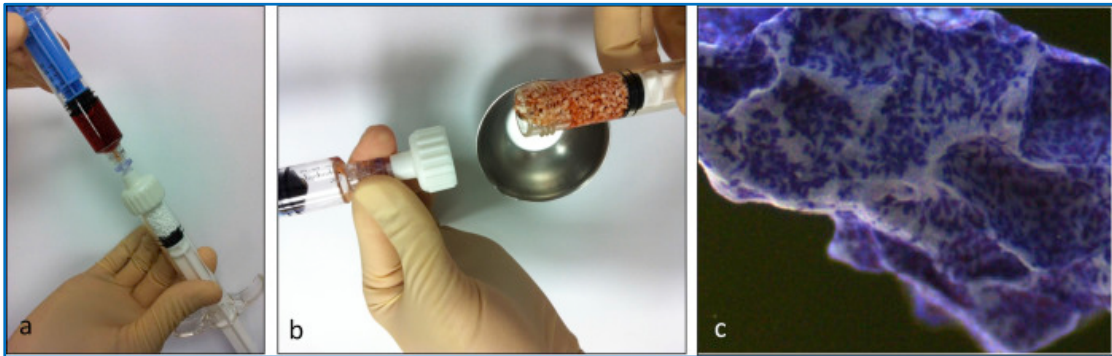


J. Stanovici et al. / Current Research in Translational Medicine 64 (2016) 83–9084

2. Martwica jałowa kości udowej.

Martwica jałowa głowy kości udowej jest wynikiem zmniejszenia ukrwienia i zwiększenia ciśnienia śródkostnego. Integralność płytki podchrzęstnej ma decydujące znaczenie przy doborze procedury oszczędzającej (osteotomia, grafty kostne, odbarczenie stawu biodrowego) lub poświęcenia głowy kości udowej (artroplastyka, resurfacing biodra). We wczesnych etapach choroby można zastosować dekompresję stawu biodrowego i jednocześnie podać komórki macierzyste lub aspirat szpiku kostnego, wykorzystując tym samym ich angiogenne i osteogenne właściwości. Na zdjęciach poniżej pokaane jest połączenie komórek i biomateriałów koncentrat szpiku kostnego lub namnożonych w toku kultur tkankowych kom. macierzystych z granulami fosforanu wapnia. Po 60 min. połączenie jest gotowe (barwienie błękitem metylowym), a mieszanina gotowa do podania w miejsce uszkodzone.

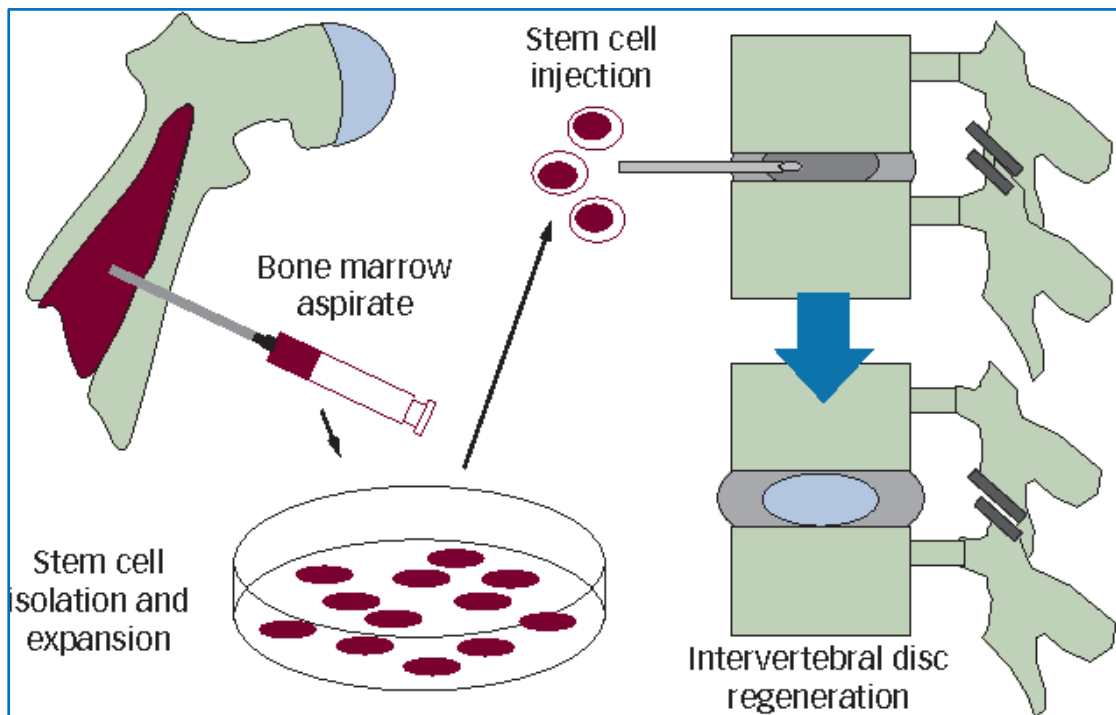
W przypadku osteotomii piszczelowej i artroplastyki zastosowanie mają liofilizowane kości pokryte żelazem zawierającym płytki krwi i kom. macierzystym, które zwiększają współczynnik osteointegracyjny.



J. Stanovici et al. / Current Research in Translational Medicine 64 (2016) 83–9084

3. Degeneracja dysków międzykręgowych.

W tym wypadku sprawdza się przezskórna iniekcja z kom. macierzystych, która zwiększa zawartość proteoglikanu.

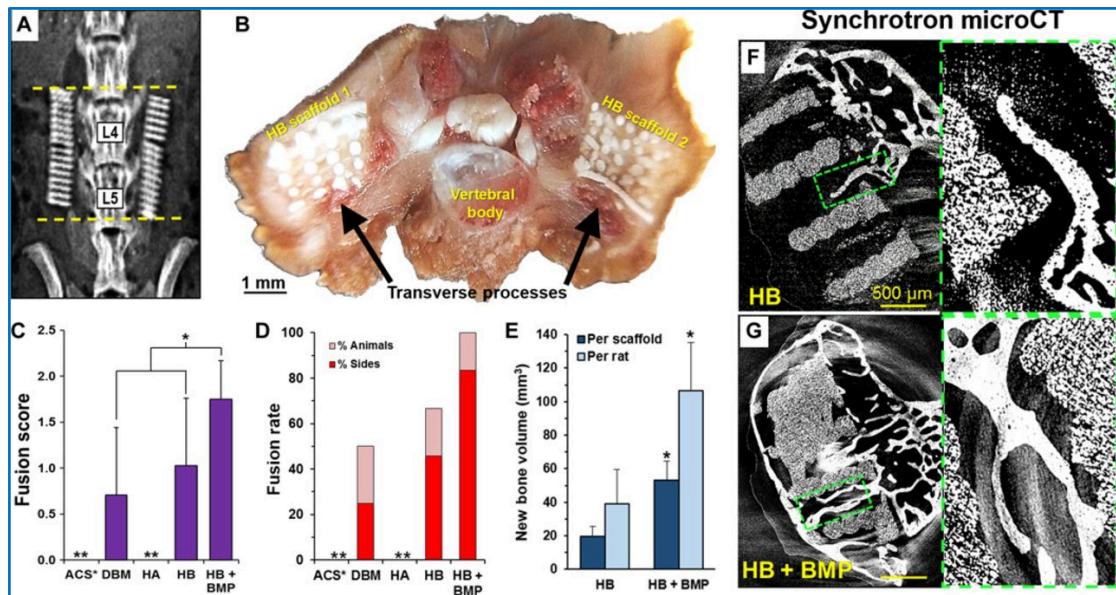


Gianluca Vadalà, incenzo Denaro, James D. Kang; Published 2010

Pomimo wysiłków ukierunkowanych na utworzenie regenerujących kości biomateriałów, istnieje nadal potężna luka w obecnych na rynku produktach. Ograniczenia te dotyczą braku możliwości szybkiej, dokładnej i powtarzalnej regeneracji kości, wysokich kosztów i ograniczonej produkcji, łatwych do obróbki chirurgicznej materiałów. W celu pokonania tych ograniczeń powstał produkt, nazywany hiperelastyczną kością, zbudowany w 90% z hydroksyapatytu i 10% z polikapromleczanu lub polimleczanu/kwasu poliglikolowego, który można drukować w 3D z wydajnością 275 cm³/godzinę) z wytłaczanych w temp. pokojowej linków. Powstały produkt odznacza się mechanicznymi właściwościami (~32 do 67% odporności na złamanie, ~4 do 11 MPa modułu sprężystości), jest wysoce porowaty (50% porowatości), wspomaga żywotność komórek i ich namnażanie, oraz jest osteoinduktywny w stosunku do pozyskanych ze szpiku kostnego mezenchymalnych kom. macierzystych hodowanych w kulturach tkankowych przez 4 tyg. w buforze pozbawionym innych czynników osteoindukcyjnych. Biokompatybilność tego materiału była testowana:

- na myszach po podaniu podskórnym przez 7-35 dni,
- szczurach przez 8 tyg. formowania się kości w fuzji kręgosłupa tylnobocznej,
- u dużych nieczłekokształtnych małp w doświadczeniu ubytku kostnego przez 4 tygodnie.

Produkt nie wywoływał reakcji immunologicznej ze strony organizmu, był ukrwiony, szybko integrował się z otaczającymi tkankami, szybko ulegał osteointegracji i stymulował wzrost kości bez konieczności podania innych czynników biologicznych.



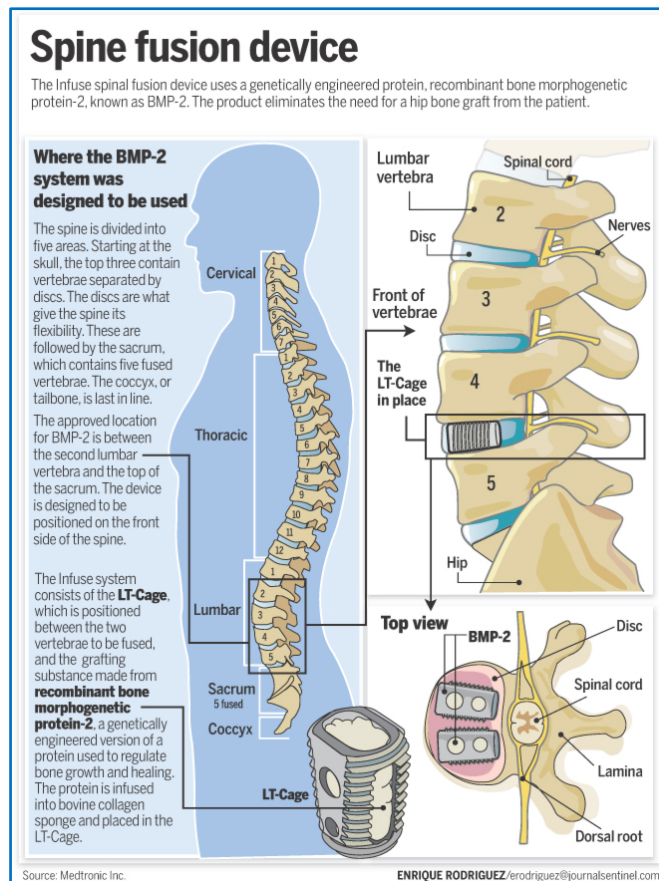
Jakus A. et al. doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf7704

4. Fuzja kręgosłupa

Wspomniane wcześniej kom. macierzyste na szkielecie z hydroksyapatytu mogą sprawdzić się równie dobrze jak same czynniki wzrostu.

W chorobie zwyrodnieniowa kręgosłupa degeneracja dysków kręgowych dolnego odcinka kręgosłupa może skutkować:

- stenozą kanału kręgowego tj. lędźwiowym zwężeniem kanału kręgowego,
- kręgozmykiem, czyli inaczej spondylolistezą polegającą na wypadnięciu dysku ku przodowi, czy też
- tyłozmykiem, czyli retrospondylolistezą czyli wypadnięciem dysku ku tyłowi.

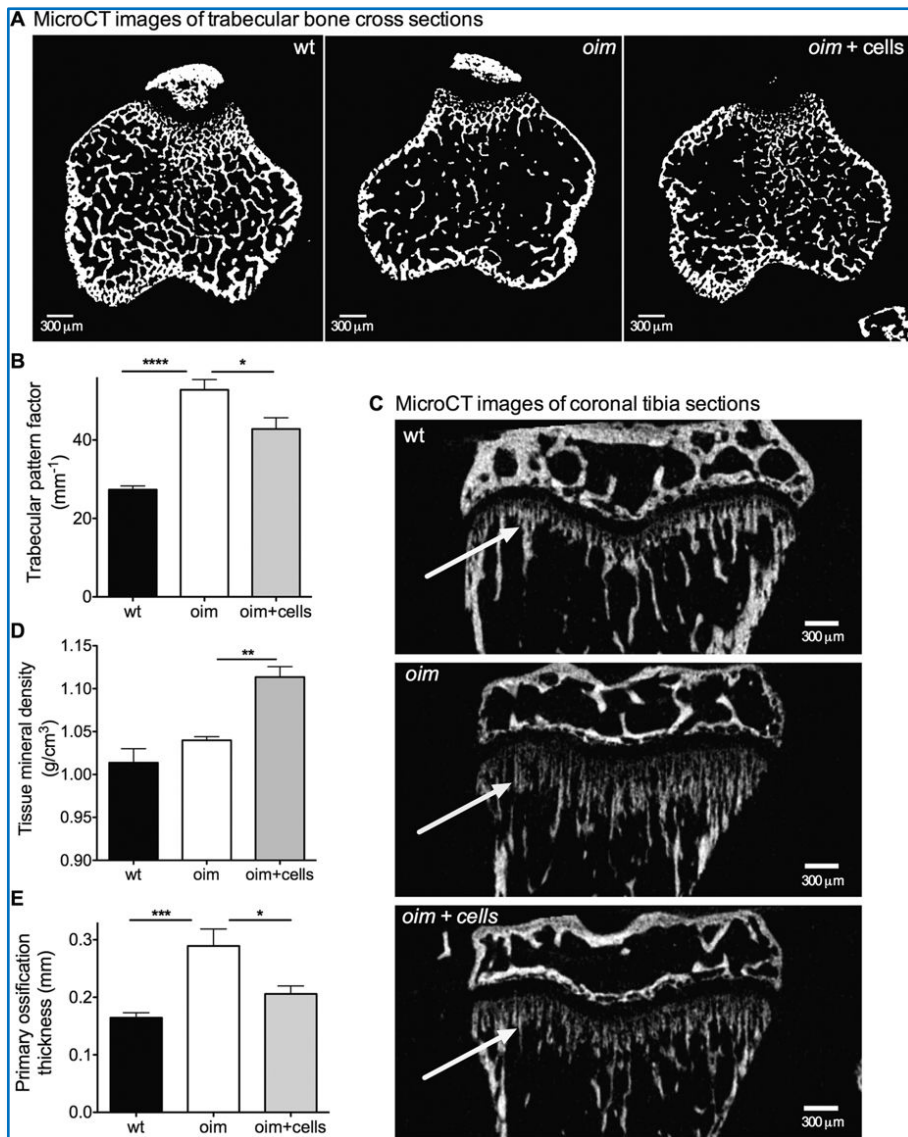


Medtronic Inc.

5. Wrodzona łamliwość

Wrodzona łamliwość kości to grupa chorób pierwotnie spowodowana wadliwą postacią kolagenu typu I, co objawia się podatnością na złamania, wolniejszym wzrostem i mniejszą masą kości. Podanie na drodze iniekcji allogenicznych mezenchymalnych kom. macierzystych przyczynia się do zwiększenia masy kostnej i przyspieszenia wzrostu kości.

Deformacje kątowe lub wzdłużne powstające w wyniku infekcji, urazu lub innych uszkodzeń płytki wzrostu prowadzą do powstania tzw. mostu kostnego. Wyniki badań na świniach wskazują, że zastosowanie mezenchymalnych komórek macierzystych prowadzi do ich odróżnicowania do chondrocytów i formowania tkanki chrzęstnej szklistej hamującej tworzenie mostu kostnego.



Ranzoni A. et al. *Scientific Reports* volume 6, Article number: 39656 (2016)

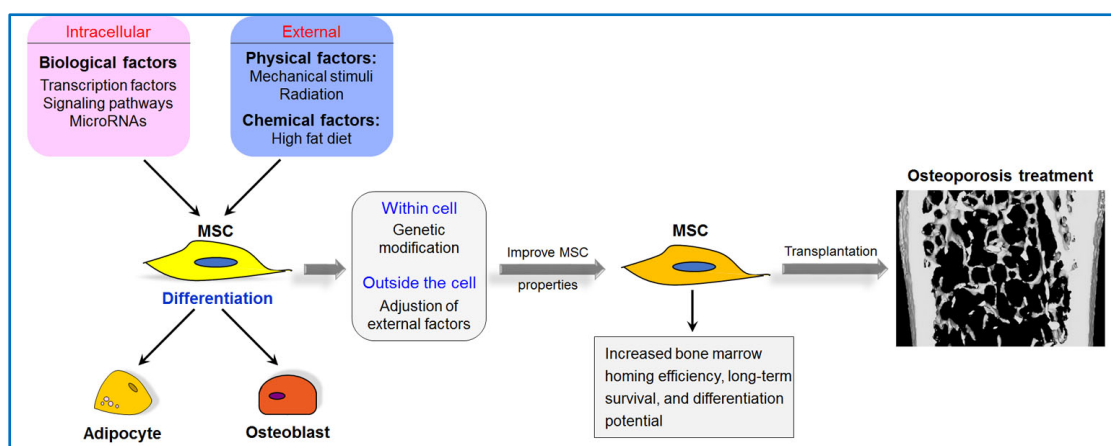
- A. Zdjęcia z mikrotomografu komputerowego z przekroju poprzecznego przez beleczki kostne
- C. Przekrój poprzeczny kości piszczelowej z pierwotnymi kostnieniami ukazany strzałkami.

Do ootrzewnowe podanie kom. macierzystych myszom przyczynia się do zwiększenia masy kostnej i przyspieszenia wzrostu kości.

6. Osteoporoza.

Wraz z wiekiem zmniejsza się liczba i aktywność osteoblastów. Systemiczna infuzja mezenchymalnych komórek macierzystych nie

spowodowała spodziewanego wzrostu kości, ze względu na brak możliwości migrowania w kierunku powierzchni kości, co jest warunkiem koniecznym do wzrostu kości. Użycie zmodyfikowanych mezenchymalnych komórek macierzystych, posiadających białka powierzchniowe umożliwiło migrację komórek do okostnej i tworzenie beleczek kostnych oraz zwiększenie masy kostnej.



Hu, L.; Yin, C.; Zhao, F.; Ali, A.; Ma, J.; Qian, A. Mesenchymal Stem Cells: Cell Fate Decision to Osteoblast or Adipocyte and Application in Osteoporosis Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 360.

BIOREAKTORY W INŻYNIERII TKANKOWEJ

W celu zasiedlenia matrycy komórkami stosuje się metody inżynierii tkankowej.

Inżynieria tkankowa w rekonstrukcji tkanki kostnej powstała by przezwyciężyć ograniczenia tradycyjnych metod rekonstrukcji kości stosowanych w ortopedii.

Celem jest uzyskanie konstruktów naśladujących tak blisko jak jest to możliwe tkankę kostną, zarówno pod względem struktury, jak i mechaniki.

Pierwsza generacja strategii inżynierii tkankowej wykorzystywała statyczne kultury tkankowe, gdzie komórki kostne były zawieszane na matrycach i hodowane na płytkach przez określony czas.

Komórki miały tendencje do osadzania się w peryferyjnych częściach matrycy, brak wymiany substancji odżywczych i produktów przemiany materii w środku matrycy prowadził do nekrozy komórek (35,36).

Obecne stosowane strategie wykorzystują dynamiczne bioreaktory.

Bioreaktory to urządzenia umożliwiające monitorowanie i ścisłą kontrolę środowiska, w którym zachodzą procesy biologiczne i biochemiczne (37).

Zapewniają wysoką powtarzalność, kontrolę i automatyzację procesów, niektóre mogą dodatkowo umożliwiać aplikację bodźców fizycznych, jak ciśnienie czy stres ścinania.

Dotychczas parametry hodowli osteoblastów były dobierane na zasadzie prób i błędów. Rozwiązaniem tego problemu jest wykorzystanie metod symulacji warunków hodowli, porównanie z wynikami doświadczeń *in vitro* i wybór kluczowych parametrów dla hodowli (38).

W inżynierii tkankowej stosuje się różnego typu bioreaktory:

- kolby obrotowe,
- bioreaktor z obracającymi się ściankami,
- bioreaktor ze sprężeniem,
- bioreaktor perfuzyjny.

OSOCZE BOGATOPŁYTKOWE

Osocze bogatopłytkowe jest coraz częściej stosowanym w ortopedii oraz medycynie sportowej produktem inżynierii tkankowej, mieszczącym się w koncepcji ortobiologii (39). Mechanizm jego działania polega na wydzieleniu przez aktywowane trombocyty czynników wzrostu, które są kluczowym składnikiem procesu regeneracji tkanek (40). Płytkowe czynniki wzrostu stosuje się głównie w leczeniu zmian obejmujących tkanki miękkie, w celu zmniejszenia wzmożonego degeneracyjnie lub przeciążeniowo

napięcia tkanek w okolicach stawów dotkniętych procesem chorobowym np.

- zespół „łokcia tenisisty”,
- zespół „łokcia golfisty”,
- „kolano skoczka”,
- zapalenia i uszkodzenia ścięgna Achillesa,
- zapalenie powięzi podszwowej,
- uszkodzenia stożka rotatorów,
- uszkodzenia chrząstki stawowej,
- uszkodzenia łokotkowe,
- uszkodzenia więzadeł krzyżowych,
- wczesne zmiany zwyrodnieniowe stawów,
- opóźniony wzrost kostny,
- trudno gojące się rany.

Od kilku lat wykorzystuje się płytkowe czynniki wzrostu (PRP) jako stymulant wzrostu kostnego. Zaletą tej terapii jest fakt, że wykorzystywana jest wyłącznie krew własna pacjenta i wykluczone jest ryzyko transmisji chorób wirusowych lub reakcji uczuleniowych.

Do uwalnianych przez płytki krwi czynników wzrostu należą:

- transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-B),
- czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF)
- insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-1)
- epidermalny czynnik wzrostu (EGF),
- czynnik wzrostu tkanki łącznej (CTGF),
- Czynniki wzrostu fibroblastów (FGF-2).

Procedura podania PRP:

- pobranie pełnej krwi żyłnej pacjenta, której ilość uzależniona jest od danego schorzenia,
- wirowanie krwi z wykorzystaniem odpowiedniego systemu filtrów w przystosowanej do takich procedur medycznych wirówce (około 15 minut),
- aspiracja do strzykawki frakcji osocza bogato płytkowego, zawierającego czynniki wzrostu,

- iniekcja koncentratu bogatopłytkowego w warunkach aseptycznych, w znieczuleniu miejscowym w leczonej okolicę (41).

W procesie pozyskiwania bogatopłytkowego osocza (PRP) jako produkt uboczny uzyskuje się osocze ubogopłytkowe, które po zaktywizowaniu jonami wapnia może służyć jako biologiczna membrana hemostyczna (hamująca krwawienie) lub biologiczny opatrunek i stelaż dla nowopowstających tkanek.

Skuteczność terapii z użyciem osocza bogatopłytkowego nie została potwierdzona wysokiej klasy doniesieniami literaturowymi (orthobullets.com):

- urazy tkanek miękkich: brak zgody co do urazów więzadeł, ścięgien, mięśni lub chronicznych urazów ścięgien;
- zapalenie stawów i kości: brak zgodnych dowodów, brak badań z długim okresem obserwacji;
- złamania leczenie/zespolenie: ograniczona liczba doniesień dotyczących formowania się kości (niektóre badania wskazują na szkodliwy efekt działania);
- rekonstrukcja ACL: brak potwierdzenia roli osocza w naprawie więzadeł/graftów, wyniki na podstawie informacji od pacjenta; bezpośrednie podanie w miejsce połączenia rzepki i kości piszczelowej poprawia funkcjonalność kolana w ocenie pacjenta i zmniejsza przestrzeń pomiędzy rzepką a ścięgnem;
- naprawa łąkotek: brak jednoznacznych danych;
- naprawa rotatorów: brak korzystnych efektów (niektóre badania wskazują na szkodliwy efekt działania);
- naprawa ścięgien: pozytywne efekty leczenia tzw. „łokcia tenisisty”, zmniejszenie dolegliwości bólowych, brak doniesień

literaturowych dotyczących leczenia patologii w obrębie ścięgna Achillesa.

Ficek and Ficek-Kiesler (42) opisali przypadek zastosowania osocza bogatopłytkowego w leczeniu urazu tkanki kostnej. Pacjentka 57-letnia zgłosiła się do diagnostyki z niejasnymi dolegliwościami bólowymi prawego stawu kolanowego, nasilonymi w okolicy gęsiej stopy po zastosowanym leczeniu sanatoryjnym (miejscowa krioterapia) oraz po zabiegach falą uderzeniową. Po zebranim wywiadzie lekarskim, badaniu klinicznym oraz ocenie wcześniej zleconych i wykonanych badań obrazowych pacjentkę zakwalifikowano do leczenia z wykorzystaniem osocza bogatopłytkowego.

Aplikacja płytkowych czynników wzrostu korzystnie wpłynęła na proces regeneracji tkanki kostnej w obrębie leczonego obszaru, jednocześnie zmniejszając dolegliwości bólowe chorej. Opisany przypadek przedstawia możliwość zastosowania osocza bogatopłytkowego jako efektywnego środka leczniczego, umożliwiającego uniknięcia ingerencji chirurgicznej.

1. Francis MP, Sachs PC, Elmore LW et al. Isolating adipose-derived mesenchymal stem cells from lipoaspirate blood and saline fraction. *Organogenesis* 6: 11-14, 2010
2. Frisbie DD, Cross MW, McIlwraith CW. A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. *Vet Comp Orthop Traumatol VCOT*. 2006;19(3):142–6.
3. Hjelle K, Solheim E, Strand T, et al. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy*. 2002;18(7):730–4.
4. Mrugala D, Bony C, Neves N, et al. Phenotypic and functional characterisation of ovine mesenchymal stem cells: application to a cartilage defect model. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(3):288–95.
5. Steck E, Fischer J, Lorenz H, et al. Mesenchymal stem cell differentiation in an experimental cartilage defect: restriction of hypertrophy to bone-close neocartilage. *Stem Cells Dev*. 2009;18(7): 969–78.
6. Zhou G, Liu W, Cui L, et al. Repair of porcine articularosteochondral defects in non-weightbearing areas with autologous bone marrow stromal cells. *Tissue Eng*. 2006;12(11): 3209–21.
7. Ho ST, Hutmacher DW, Ekaputra AK, et al. The evaluation of a biphasic osteochondral implant coupled with an electrospun membranę in a large animal

- model. Tissue Eng A. 2010;16(4):1123–41.*
8. Grassel S, Lorenz J. *Tissue-engineering strategies to repair chondral and osteochondral tissue in osteoarthritis: use of mesenchymal stem cells. Curr Rheumatol Rep, 2014; 16: 452.*
 9. Steinwachs MR, Guggi T, Kreuz PC. *Marrow stimulation techniques. Injury. 2008;39 Suppl 1:S26–31.*
 10. Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, et al. *Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. Arthroscopy. 2003;19(5):477–84.*
 11. Gigante A, Calcagno S, Cecconi S, et al. *Use of collagen scaffold and autologous bone marrow concentrate as a one-step cartilage repair in the knee: histological results of second-look biopsies at 1 year follow-up. Int J Immunopathol Pharmacol. 2011;24(1 Suppl 2):69–72.*
 12. Gigante A, Cecconi S, Calcagno S, et al. *Arthroscopic knee cartilage repair with covered microfracture and bone marrow concentrate. Arthrosc Tech. 2012;1(2):e175–80.*
 13. Filardo G, Madry H, Jelic M et al. *Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc Off J ESSKA. 2013; 21 (8):1717-29.*
 14. Nejadnik H, Hui JH, Feng Choong EP, et al. *Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. Am J Sports Med. 2010;38(6):1110–6.*
 15. Varma HS, Dadarya B, Vidyarthi A. *The new avenues in the management of osteo-arthritis of knee—stem cells. J Indian Med. Assoc. 2010;108(9):583–5.*
 16. Kim JD, Lee GW, Jung GH, et al. *Clinical outcome of autologous bone marrow aspirates concentrate (BMAC) injection in degenerative arthritis of the knee. Eur J Orthop Surg Traumatol Orthop Traumatol. 2014.*
 17. Centeno CJ, Schultz JR, CheeverM, et al. *Safety and complications reporting on the re-implantation of culture-expanded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique. Curr Stem Cell Res Ther. 2010;5(1):81–93.*
 18. Centeno CJ, Schultz JR, CheeverM, et al. *Safety and complications reporting update on the re-implantation of culture-expanded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique. Curr Stem Cell Res Ther. 2011;6(4):368–78.*
 19. Pak J. *Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: a case series. J Med Case Rep. 2011;5:296.*
 20. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, et al. *Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. Osteoarthr Cartil. 2002;10(3):199–206.*
 21. Sommerfeldt, D. W., and Rubin, C. T. (2001). *Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. Eur. Spine J. 10 (Suppl. 2), S86–S95.*
 22. Hing, K. A. (2004). *Bone repair in the twenty-first century: Biology, chemistry or engineering? Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci. 362, 2821–2850.*
 23. Salgado, A. J., Coutinho, O. P., and Reis, R. L. (2004). *Bone tissue engineering: State of the art. and future trends. Macromol. Biosci. 4, 743–765.*

24. Bauer T W, Muschler G F: *Bone Graft Materials: An overview of the basic science. Clin Orthop Related Res* 2000, 371: 10-27.
25. Muschler G F, Lane J M: *Orthopedic Surgery. Red. M B Habal, A H Reddi in: Bone Grafts and Bone substitutes. WB Saunders Co, Philadelphia* 1992, p. 375-407.
26. Kneser U, Schaefer D J, Polykandriotis E, Horch R E: *Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. J Cell Mol Med* 2006, 10: 7-19.
27. Brown RA and Phillips JB. *Cells responses to biomimetic protein scaffolds used in tissue repair and engineering. International Review of cytology* 2007, 262: 75-150.
28. Santucci, R. A., and Barber, T. D. (2005). *Resorbable extracellular matrix grafts in urologic reconstruction. Int. Braz. J. Urol.* 31, 192–203.
29. Yoshii, S., Oka, M., Shima, M., Taniguchi, A., and Akagi, M. (2003). *Bridging a 30-mm nerve defect using collagen filaments. J. Biomed. Mater. Res. A* 67, 467–474.
30. Wallace, D. G., and Rosenblatt, J. (2003). *Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering. Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 1631–1649.
31. Sabolinski, M. L., Alvarez, O., Auletta, M., Mulder, G., and Parenteau, N. L. (1996). *Cultured skin as a 'smart material' for healing wounds: Experience in venous ulcers. Biomaterials* 17, 311–320.
32. Veves, A., Falanga, V., Armstrong, D. G., and Sabolinski, M. L. (2001). *Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of noninfected neuropathic diabetic foot ulcers: A prospective randomized multicenter clinical trial. Diabetes Care* 24, 290–295.
33. Doillon, C. J., Whyne, C. F., Brandwein, S., and Silver, F. H. (1986). *Collagen-based wound dressings: Control of the pore structure and morphology. J. Biomed. Mater. Res.* 20, 1219–1228.
34. Geiger, M., Li, R. H., and Friess, W. (2003). *Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55, 1613–1629.
35. Holy, C.E. et al. *Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period. J. Biomed. Mater. Res.* 2000,51, 376–382.
36. Kim, B.S. et al. *Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices. Biotechnol. Bioeng.* 1998, 57, 46–54.
37. Martin I, Wendt D, Heberer M. *The role of bioreactors in tissue engineering. Trends in Biotechnology* 2004, 22:80-86.
38. Vetsch JR, Muller R, Hofmann S. *The evolution of simulation techniques for dynamic bone tissue engineering in bioreactors. J Tissue Eng Regen Med.* 2013;9: 903-917.
39. Anitua E, Alkhraisat MH, Orive G *Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors. Journal of Controlled Release.* 2012, 157: 29-38.
40. Anitua E. *Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of sites for implants, Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1999, 14: 529–535.
41. Nurden AT, Nurden P, Sanchez M, Andia I, Anitua E. *Platelets and wound healing, Front. Biosci.* 2008,13: 3532–3548.

42. *Krzysztof Ficek, Anna Ficek-Kiesler Platelet Rich Plasma application in a bone loss case. PrzypadkiMedyczne.pl, e-ISSN 2084-2708, 2013; 41:175-178.*