

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**Histomorfologické změny v normálních, patologicky změněných a
transplantovaných lidských chrupavkových tkáních**

Radim Kaňa

Praha 2011

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav patofyziologie 1.LF UK, U nemocnice 5, Praha 2, 128 08

Autor: MUDr. Radim Kaňa

Školitel: Prof. MUDr. Emanuel Nečas, DrSc.

Konzultant: Prof. MUDr. Ctibor Povýšil, DrSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

OBSAH

Abstrakt.....	4
Abstract.....	6
1. Úvod.....	8
2. Hypotézy a cíle práce	10
3. Materiál a metody	11
4. Výsledky	15
5. Diskuze	21
6. Závěry.....	26
7. Použitá literatura.....	28

Abstrakt

Úvod

Při rekonstrukčních operacích nosního skeletu se používají autologní transplantáty chrupavkové tkáně z ušních boltců. V naší experimentální studii jsme studovali buněčné změny v transplantované lidské ušní chrupavce na zvířecím modelu za různých experimentálních podmínek. Morfologické změny jsme v těchto modelových situacích blíže specifikovali imunohistochemicky se zaměřením na expresi jednotlivých izoform aktinu a S-100 proteinu. Tyto poznatky byly porovnávány s nálezy v normální, artroticky změněné a transplantované lidské kloubní chrupavce.

Cíle

Cílem bylo zjištění reakce chrupavkové tkáně na traumatizaci a přenesení na ektopické místo těla při její transplantaci. Dalším cílem bylo vyšetření histologických změn a exprese chondrocytárních markerů (α -SMA a S-100 proteinu) v intaktní, arteficiálně traumatizované nebo v živném médiu kultivované lidské ušní chrupavce transplantované imunodeficitním myším, jakož i v chrupavce vytvořené po implantaci různých typů trojrozměrných nosičů (scaffoldů) osídlených kultivovanými lidskými ušními chondrocyty myším a v ušní chrupavce transplantované do nosního skeletu pacientů. Cílem bylo i použití zavedených výzkumných postupů k vyšetření normální, artrotické a posttraumaticky změněné kloubní chrupavky a kultury kloubních chondrocytů na nosiči z esteru kyseliny hyaluronové používaných k autologní transplantaci do kloubních defektů u lidí.

Materiál a metody

Vyšetřili jsme celkem 162 vzorků. Jednalo se o 36 vzorků normální a 5 vzorků patologicky změněné lidské ušní chrupavky, 2 vzorky lidské ušní chrupavky původně transplantované do oblasti nosního skeletu a odebrané při reoperaci, 30 vzorků lidské ušní chrupavky transplantované subkutánně do oblasti dorza imunodeficitních myší kmene NOD129S7 (B6) Rag1 a explantované za 12 nebo 16 týdnů (6 vzorků intaktních, 18 vzorků traumatizovaných a 6 vzorků uchovávaných v kultivačním mediu), dále 9 vzorků chrupavky narostlé po 8 týdnech od implantace nosičů osídlených kulturami lidských ušních chondrocytů experimentálním myším, 4 vzorky králičí ušní chrupavky různým způsobem traumatizované v oblasti ušního boltce, 8 vzorků autologních štěpů (4 intaktní a 4 bez perichondria) králičí chrupavky subkutánně transplantované do dorza králíků a za 8 týdnů vyjmuté. Vedle toho jsme vyšetřili 68 vzorků lidské kloubní chrupavky (56 vzorků chrupavky normální nebo patologicky změněné a 12 vzorků chrupavky nově vytvořené po autologní transplantaci chondrocytů (ATC) do kloubních defektů). Histologické vyšetření bylo doplněno imunohistochemickou analýzou, především s protilátkami proti α -SMA, svalově specifickému aktinu, desminu a různým izoformám S-100 proteinu. Ve vybraných případech byla použita metoda RT-PCR s primery pro průkaz mRNA pro jednotlivé izoformy aktinu.

Výsledky

Poprvé jsme podrobně popsali vrstevnaté uspořádání chrupavky ušního boltce v histologickém obraze. Centrální a obě povrchové vrstvy chrupavky se liší množstvím elastických vláken a počtem, tvarem a uspořádáním chondrocytů, v místě záhybů vykazují obě zevní vrstvy odlišné uspořádání. Kromě S-100 proteinu exprimuje velká část ušních chondrocytů α -SMA, a to především v povrchových vrstvách. Přítomnost mRNA α -SMA byla potvrzena metodou RT-PCR. Novým nálezem je průkaz nečetných chondrocytů exprimujících CD-34, které by mohly být blízké buňkám kmenovým.

Expresí S-100 proteinu a α -SMA zůstala zachována ve vitálních oblastech patologicky změněné ušní chrupavky, v intaktní, arteficiálně traumatizované nebo v živném médiu kultivované lidské ušní chrupavce transplantované imunodeficitním myším, jakož i v ušní chrupavce autologně transplantované do oblasti deformit nosního skeletu u lidí. Chondrocyty

pocházející z lidské ušní chrupavky byly úspěšně kultivovány na různých typech scaffoldů a následně transplantovány imunodeficitním myším. Po jejich explantaci byla ve většině případů nalezena uzlovitá ložiska chrupavky elastického typu s chondrocyty, které vykazovaly pozitivitu S-100 proteinu α -SMA.

V normální kloubní chrupavce jsme α -SMA pozitivní chondrocyty identifikovali pouze v malém množství v povrchové vrstvě, avšak na rozdíl od ušní chrupavky se jejich množství zvyšovalo při jejím poškození. Většina kloubních chondrocytů exprimovala S-100 protein. Kultura lidských kloubních chondrocytů na nosiči obsahovala nezralé vřetenité buňky, které neměly žádné histologické ani imunohistochemické znaky chondrocytů (neprokázána exprese S-100), ale byly zřetelně α -SMA pozitivní. Po 10 měsících od autologní transplantace výše zmíněné kultury chondrocytů došlo k vytvoření chrupavkové tkáně převážně hyalinního typu místy s ložisky chrupavky vazivové a s pozitivitou S-100 i α -SMA ve většině chondrocytů.

Závěr

Chondrocyty chrupavky ušního boltce, na rozdíl od chrupavky hyalinního typu v kloubech, z větší části exprimují α -SMA, avšak jejich počet se při poškození nezvyšuje. Význam exprese α -SMA, jako jedné z kontraktilních izoform aktinu v buňkách intaktní i různým způsobem poškozené chrupavky, zůstává nejasný. Vrstevnaté uspořádání chondrocytů exprimujících α -SMA v elastické chrupavce ušního boltce se může spolu s elastickými vlákny podílet na neobvyklé elasticitě boltce a jeho schopnosti měnit tvar vlivem mechanických podnětů bez poškození tkáně. Na rozdíl od úspěšné transplantace kultur autologních chondrocytů na nosičích do oblasti kloubních defektů u lidí zůstává příprava arteficiální chrupavky vhodné k rekonstrukci defektů v oblasti hlavy a krku, až na ojedinělé případy, zatím předmětem experimentálních studií, a proto metodou volby je stále transplantace autologní chrupavky.

Klíčová slova: transplantace – implantace - ušní elastická chrupavka – kloubní hyalinní chrupavka – autologní kultura chondrocytů - scaffold - alfa-hladkosvalový aktin – S-100 protein

Abstract

Introduction

Autologous transplants of the cartilage tissue from the pinna is commonly used in reconstructive surgery of the nasal skeleton. The present study used animal models to elucidate responses of the auricular cartilage to its damage or transplantation to ectopic sites. Histomorphological analysis of changes observed in auricular cartilage including immunohistochemical study of different isoforms of actin and S-100 proteins was performed. Human articular cartilage prepared by in vitro cultivation using artificial scaffolds was also studied after its transplantation.

Aims of the study

The aim was to study histological changes and expression of chondrocytic markers (α -SMA and S-100 proteins) in intact, artificially traumatised, or in a human auricular cartilage cultivated in culture medium. An attempt to grow human auricular cartilage chondrocytes implanted in vitro into various types of three dimensional scaffolds aimed at testing chondrocyte survival and phenotype both in the culture and after transplantation to immunodeficient mice. A human auricular cartilage transplanted into the nasal skeleton of patients during a reconstruction surgery should be submitted to a histomorphological examination. Research assumed also comparison of the auricular cartilage responses to a damage, transplantation or in vitro cultivation, to those of normal, arthrotic, and posttraumatically changed articular cartilage, as well as autologous cultures of articular chondrocytes on scaffolds of ester hyaluronic acids. The study focused at the expression of individual isoforms of actin, S-100 proteins, desmin and some other immunohistochemical markers, in an attempt to contribute to better characterization of differences and similarities between the auricular and articular cartilage responses both to in vitro cultivation and transplantation to ectopic sites.

Material and methods

A total of 162 cartilage samples were studied. This included: 36 samples of a normal cartilage; 5 samples of a pathologically changed human auricular cartilage; 2 samples of a human auricular cartilage transplanted into the nasal skeleton and later removed during a correction surgery; 30 samples of a human auricular cartilage transplanted subcutaneously to immunodeficient mice (NOD129S7 (B6) Rag1) and collected after 12 to 16- weeks (6 intact samples, 18 traumatised samples, and 6 samples cultivated in the culture medium); in addition, 9 samples of cartilage developed in immunodeficient mice transplanted with artificial scaffolds implanted with human auricular chondrocytes; 4 samples of a rabbit auricular cartilage from ear cartilage artificially traumatised; 8 samples of autologous grafts (4 intact and 4 without perichondrium) of a rabbit cartilage autotransplanted subcutaneously and collected 8 weeks later'.

In addition we examined 68 samples of a human articular cartilage (56 samples of normal or pathologically changed cartilage and 12 samples of newly formed cartilage after autologous transplantation of chondrocytes (ATC) into articular defects). Histological examinations included immunohistochemical methods using antibodies against α -SMA (α -smooth muscle actin), muscle-specific actin, desmin, and various isoforms of S-100 proteins. In selected cases, RT-PCR was used to examine expression of actin isoforms at mRNA level.

Results

Our research provided, for the first time, a detailed histomorphological description of a layered arrangement of the *auricular* cartilage. The central- and peripheral layers of the auricular cartilage differ in presence and quantity of elastic fibres, as well as in the number, shape and space arrangement of chondrocytes. In addition to S-100 protein, a majority of auricular chondrocytes express α -SMA, particularly in the superficial layer.

Immunohistochemical findings were completed and confirmed by demonstration of the presence of mRNA for α -SMA by RT-PCR. A novel finding was demonstration of rare chondrocytes expressing CD 34, a marker of some adult stem cells.

Expression of S-100 proteins and α -SMA persisted in vital areas of pathologically changed auricular cartilage; in artificially traumatised cartilage; in intact or in vitro cultivated human auricular cartilage transplanted into immunodeficient mice. S-100 proteins and α -SMA were also found in an auricular cartilage which had been autologously transplanted during a reconstruction surgery to replace a missing cartilage in the human nasal skeleton. Human auricular chondrocytes were successfully cultured using various types of an artificial scaffolding. Subsequently, the chondrocyte implants were transplanted into immunodeficient mice to assess viability of the cells and their potential to generate a cartilage-like tissue. In most cases the procedure resulted in a nodular nest of an elastic type cartilage with chondrocytes that were S-100 protein and α -SMA positive.

In a normal *articular* cartilage α -SMA positive chondrocytes were present only scarcely in the superficial layers. In contrast to *auricular* cartilage, they became relatively abundant in cases subjected to a mechanical (surgical) damage. A majority of the articular chondrocytes expressed S-100 protein. A tissue culture of human articular chondrocytes grafted onto scaffolding resulted in presence of immature fusiform cells, which had neither histological nor immunohistochemical signs of chondrocytes (e.g. they did not express S-100). However, they were positive for α -SMA. Ten months following the autologous transplantation of aforementioned cultures of chondrocytes on threedimensional scaffolds, a foremostly hyaline type of cartilaginous tissue was formed with areas of a fibrocartilage. Almost all cells, the chondrocytes, were positive for S-100 and α -SMA.

Conclusion

In contrast to the hyaline articular cartilage of joints, a majority of chondrocytes in the auricular cartilage express α -SMA, although their number does not increase after a trauma. Functional significance of α -SMA presence in chondrocytes of normal and damaged cartilage remains unclear. The fusiform arrangement of chondrocytes expressing α -SMA in the elastic cartilage of the ear pinna, together with elastic fibres, may confer and underly the unusual elasticity of the pinna as well as to its ability of undergo significant changes in its shape without being damaged by acting mechanical forces. In contrast to successful transplantation of in vitro cultured autologous articular chondrocytes grown in three dimensional scaffolds and transplanted to sites of joint defects in humans, artificially prepared cartilage which could be used in reconstruction of cartilage defects in the head and neck area is still not available and is a subject of experimental studies, of which the present study is a part. Consequently, in clinical practice method of choice is still transplantation of an autologous cartilage, mostly the cartilage auricular.

Key words: transplantation – implantation – auricular elastic cartilage – articular hyaline cartilage – autologous culture of chondrocytes- scaffold - alpha-smooth muscle actin – S-100 protein

1 Úvod

Na Oddělení otorinolaryngologie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze jsou již řadu let prováděny funkční a estetické operace zevního nosu a nosního septa (rinoseptoplastiky), které patří k nejobtížnějším výkonům v oblasti obličejového skeletu. Nejen v rinochirurgii, ale i v rámci chirurgie hlavy a krku obecně se v posledních dvou až třech desetiletích klade velký důraz na co nejpřesnější rekonstrukci nebo náhradu poškozených nebo chybějících tkání především s ohledem na obnovu normální funkce, v případě struktur ovlivňujících vzhled pacienta pak i na co nejlepší kosmetický efekt. Splnění těchto požadavků s sebou obvykle přináší i potřebu dostatečného množství materiálu vhodného k tomuto účelu. Následkem předchozího traumatu, rozsáhlého operačního výkonu nebo na vrozeném podkladě však často tkáně vhodné k rekonstrukci přímo v místě defektu nebo deformity ve větším nebo menším rozsahu chybí. Možnosti jejich náhrady jsou proto v současné době předmětem intenzivního zájmu jak klinické, tak experimentální medicíny.

V chirurgii hlavy a krku patří ke standardním postupům transplantace různých materiálů biologického původu (autologního, allogenního nebo xenogenního) (1, 2, 3, 4) nebo implantace materiálů jiného než biologického původu (v literatuře označované jako alopplastické náhrady) například hydroxyapatitu, různých kovů nebo syntetických materiálů typu silikonu, polytetrafluorethylenu, polyamidu, polyethylenu apod. (2, 4, 5, 6, 7).

Vzhledem k antigenním a mechanickým vlastnostem se jeví využití autologních materiálů, především chrupavky nebo kosti, v nosní chirurgii jako velmi výhodné. Nejvhodnějším zdrojem chrupavčité tkáně je nosní septum. Odběr se provádí ze stávajícího přístupu, nevyžaduje tedy další incizi v jiné anatomické lokalitě, a při správné technice a rozsahu není zatížen komplikacemi. V případech, kdy v důsledku traumatu nebo předchozího operačního výkonu chrupavka nosního septa v různém rozsahu chybí (3, 7, 8), je nutné volit jiné zdroje chrupavčité tkáně, nejčastěji ušní boltec (2, 8, 9, 10, 11) nebo žeburní chrupavka (9, 12). Pro svoji snadnou dostupnost, minimální výskyt komplikací spojených s odběrem, mechanické vlastnosti a tvar je chrupavka ušního boltce k rekonstrukci většiny nosních struktur vhodnější a často využívaná (11, 13, 14, 15).

V posledních letech jsme na ORL oddělení VFN v Praze zavedli do klinické praxe metodu autologní transplantace lidské ušní chrupavky, která nebyla v české otorinolaryngologii, na rozdíl od zahraničí, v této indikaci standardně používána a v české otorinolaryngologické literatuře nebyly zkušenosti s touto metodou dosud publikovány (16, 17, 18). Naše zkušenosti s touto technikou, kterou jsme dosud použili u 48 pacientů jsou předmětem jiného našeho sdělení (Kaňa, 2011 v tisku).

Literární zdroje poskytují velmi málo informací o změnách v transplantované chrupavce a o buněčných reakcích identifikovatelných současnými metodami histologie a imunohistochemie (19, 20, 21, 22).

Provedli jsme proto klinickou studii větší skupiny pacientů (není součástí disertační práce), u kterých byly s úspěchem transplantovány štěpy z ušní chrupavky do oblasti skeletu zevního nosu a nosního septa. S výjimkou dvou případů jsme však neměli možnost, z etických důvodů, histologicky podrobněji ověřit viabilitu těchto štěpů odběrem kontrolního vzorku po transplantaci. Rozhodli jsme se proto patomorfologické změny chrupavčité tkáně po transplantaci studovat na zvířecím modelu v experimentálních podmínkách.

Předmětem výzkumu byly otázky týkající se přežívání chondrocytů jak v normální lidské ušní chrupavce, tak v chrupavce, která byla předoperačně různým způsobem traumatizována nebo kultivována v živném roztoku a následně transplantována imunodeficitním myším přijímajícím lidské tkáně. Součástí experimentu bylo také sledování změn ušní chrupavky u králíků po její traumatizaci přímo v oblasti boltce a po transplantaci autologních štěpů z ušní chrupavky do oblasti dorza.

Před vlastním experimentem na zvířatech a ověřením výsledků transplantace bylo nezbytné nejprve provést podrobnou histologickou a imunohistochemickou studii doplněnou o metody molekulární patologie na normální lidské ušní chrupavce

Transplantace autologní chrupavky v chirurgii hlavy a krku sice poskytuje dlouhodobě dobré a stabilní výsledky, ale s ohledem na omezené zdroje dostupné chrupavkové tkáně, zejména v případech opakovaných rekonstrukčních operací nebo při potřebě transplantátů složitějšího tvaru, a s ohledem na možné komplikace spojené s odběrem chrupavky, se pozornost v posledních dvaceti letech obrací směrem k autologním chrupavkám vytvořeným metodami tkáňového inženýrství. Cílem je vytvoření chrupavkové tkáně požadovaných vlastností v podmínkách *in-vitro*. Implantáty jsou obvykle složeny z kultivovaných vlastních chondrocytů pacienta a biokompatibilního, nejčastěji biodegradovatelného nosiče (scaffoldu), který zajišťuje prostředí pro jejich trojrozměrný růst (24, 25, 26, 27, 28). Metoda se rozvinula především v souvislosti s léčením velkých posttraumatických defektů kloubních chrupavek v ortopedii, kde je již několik let rutinně využívána (30, 31, 32, 33). Naproti tomu jsou transplantace autologních chondrocytárních kultur vázaných na nosiče v oblasti hlavy a krku stále především předmětem experimentálních studií.

Provedli jsme pokusy s autologními kulturami lidských ušních chondrocytů kultivovaných na různých typech nosičů, aniž by byly použity jakékoliv podpurné růstové faktory nebo cytokiny. Zajímalo nás především, zda takováto kultura vytvoří po transplantaci myším elastickou chrupavkovou tkáň a zda se event. nezmění imunofenotyp chondrocytů či složení mezibuněčné hmoty.

Spolupráce s Ortopedickou klinikou FN Bulovka nám umožnila studium normální kloubní chrupavky a strukturálních změn i proměn imunofenotypu kloubní chrupavky u pacientů s pokročilými formami osteoartrózy, včetně nálezů u hemofiliků. Získali jsme i kulturu lidských chondrocytů na nosiči z esteru kyseliny hyaluronové ((Hyalograft® C, FIDIA Advanced Biopolymers, Italy), která byla použita v humánní medicíně při trasplantační léčbě velkých posttraumatických defektů distálního konce femuru na výše zmíněné pražské ortopedické klinice. Bylo možné přitom porovnat vlastnosti kultury kloubních chondrocytů na scaffoldech s chondrocyty nově vytvořené chrupavkové vrstvy kloubní chrupavky odebrané z místa transplantace po 10 měsících. Zároveň jsme zjišťovali osud materiálu použitého jako nosiče především s ohledem na jeho biokompatibilitu a biodegradabilitu v místě transplantačního zákroku. Dosažené výsledky experimentální transplantace autologních kultur lidských ušních chondrocytů na různých typech nosičů jsme porovnávali s kulturou autologních chondrocytů kloubní chrupavky před a po transplantaci pacientům.

V takto nastavených podmínkách pak bylo možno sledovat proměny chrupavkové tkáně jako takové na mikroskopické úrovni za použití imunohistochemických metod, které vycházely z problematiky studované řadu let na Ústavu patologie 1. LF UK a VFN v Praze, která byla zaměřena na výskyt aktin pozitivních chondrocytů (obsahujících v cytoplazmě alfa-hladkosvalový aktin; α -SMA) v kostním nádoru chondroblastomu (34).

2 Hypotézy a cíle práce

1. Analýza základní *histologické struktury normální lidské ušní chrupavkové tkáně* se zaměřením na distribuci chondrocytů i základní komponenty mezibuněčné hmoty tj. elastických vláken a porovnání s nálezy v boltcích u nezralých lidských plodů.
2. Podrobná analýza *imunohistochemických markerů chondrocytů ušní chrupavky* se zaměřením na otázku, zda chondrocyty ušní chrupavky rovněž exprimují aktin hladké svaloviny. V pozitivním případě pátrat po expresi jednotlivých izoform *aktinu a S-100 proteinu* v patologicky nezměněné lidské ušní chrupavce.
3. Histologické a imunohistochemické vyšetření *patologicky změněných ušních boltců* od pacientů, u kterých došlo v této oblasti k traumatickému nebo zánětlivému poškození, vyžadujícímu léčebný chirurgický zákrok.
4. Histologické i imunohistochemické vyšetření vzorků *ušní chrupavky transplantované* pacientům do oblasti *nosního skeletu*, pokud bude prováděna z estetických či funkčních důvodů operační revize, za účelem studia posttransplantačních změn a vitality.
5. Sledování změn exprese nejvýznamnějších markerů v intaktní, předoperačně arteficiálně traumatizované nebo v živném médiu kultivované *lidské ušní chrupavce transplantované* na určitou dobu *imunodeficitním myším*.
6. Histologické ověření výsledků *kultivace chondrocytů lidské ušní chrupavky* na různých typech trojrozměrných *nosičů (scaffoldů)* a následná *implantace experimentálním myším*. Po 8 týdnech implantáty vyjmout a vyšetřit histologicky za současného použití výše uvedených imunohistochemických markerů.
7. Sledování změn ušní chrupavky po její peroperační *traumatizaci* v oblasti boltce a po *transplantaci autologních štěpů ušní chrupavky* subkutánně do oblasti dorza u *králíků*.
8. Analýza exprese jednotlivých izoform aktinu v patologicky nezměněné, osteoartrotické, posttraumaticky změněné *kloubní chrupavce*.
9. Analýza autologní *kultury kloubních chondrocytů na nosiči* z esteru kyseliny hyaluronové (Hyalograft® C, FIDIA Advanced Biopolymers, Italy) před transplantací do kloubních defektů u lidí. Zaměřit se především na hodnocení zastoupení aktin pozitivních chondrocytů a aktivity různých izoform S-100 proteinu.
10 měsíců po transplantaci výše zmíněné autologní kultury chondrocytů provést patomorfologické vyšetření artroskopicky odebraných kontrolních *bioptických vzorků nově vytvořené kloubní chrupavky*.

3 Materiál a metody

Experimentální zvířata

Všechny pokusy na laboratorních zvířatech byly prováděny v centrálním zvířetníku Centra pro experimentální biomodely 1.LF UK Praha. Experimenty byly schváleny Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a byly odsouhlaseny Odbornou komisí pro práci s pokusnými zvířaty 1.LF UK Praha.

Myši

V experimentech byly použity samice imunodeficitních myší NOD.129S7 (B6) Rag1. (Původ: The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA, množeny v Centru pro experimentální biomodely 1.LF UK, Praha, ČR) v SPF kvalitě, stáří 3 měsíce, váha 20 g.

Králíci

K chirurgickým experimentům jsme použili samice outbredních králíků (Chinchilla Bastard, Charles River Deutschland, Germany), stáří 10 týdnů, váha 1800 – 2500g.

Tkáně

Ušní chrupavka

A) Netransplantovaná lidská ušní chrupavka

Normální a patologicky změněná lidská ušní chrupavka

Na Ústavu patologie 1.LF UK a VFN v Praze bylo rutinně biopticky vyšetřeno:

- 30 vzorků normální elastické chrupavky ušního boltce odebraných pro různé nádorové léze, dále během plastické operace ušních boltců nebo při odběru štěpu z ušního boltce pro rekonstrukci nosního skeletu Oddělení otorinolaryngologie VFN v Praze
- 6 vzorků ušních boltců od nedonošených a potracených plodů v 20. – 22. týdnu těhotenství, které neměly samostatný pohřební obřad.
- vzorky patologicky změněné lidské ušní chrupavky od 5 pacientů (4 případy traumaticky a 1 případ zánětlivě poškozené ušní chrupavky)

B) Transplantovaná ušní chrupavka

Transplantovaná autologní ušní chrupavka odebraná při revizních operacích nosu

V rámci indikovaných revizních operací nosu bylo nutné u *dvou pacientů* redukovat velikost a upravit tvar štěpu z ušní chrupavky transplantované při předchozí operaci provedené před 13 resp. 67 měsíci. Odstraněné části autotransplantátů jsme vyšetřili histologicky a imunohistochemicky.

Transplantovaná ušní chrupavka v experimentu na zvířatech

Pro experimentální účely jsme využili části normální lidské ušní chrupavky nepoužité během rinoseptoplastiky pro rekonstrukci nosního skeletu nebo fragmenty chrupavky odebrané při plastice ušních boltců.

V *první části experimentu* jsme z chrupavky připravili různé typy štěpů nebo implantátů (nosiče s kulturou lidských ušních chondrocytů), které byly následně transplantovány, resp. implantovány imunodeficitním myším do oblasti dorza. Za 8 až 16 týdnů po transplantaci byly štěpy nebo implantáty vyjmuty a histologicky a imunohistochemicky vyšetřeny.

V druhé části experimentu provedené na králících jsme různým způsobem traumatizovali ušní chrupavku u jednoho zvířete přímo v oblasti obou ušních boltců, u dalších dvou králíků jsme transplantovali autologní štěpy připravené z ušní chrupavky subkutánně do oblasti dorza. Po 8 týdnech byly štěpy odstraněny a vyšetřeny.

1. část experimentu

Lidská ušní chrupavka transplantovaná imunodeficitním myším

Celkem bylo připraveno a následně transplantováno 23 imunodeficitním myším 32 štěpů z lidské ušní chrupavky o velikosti cca 3 – 5 mm x 6 – 10 mm x 2 mm.

1. Příprava chrupavkových štěpů :

- 6 štěpů intaktní ušní chrupavky, perichondrium zachováno na obou stranách štěpu.
- 18 štěpů ušní chrupavky traumatizované níže popsanými způsoby:
 - 3 štěpy - perichondrium zachováno na jedné straně, na druhé straně odstraněno
 - 3 štěpy - perichondrium odstraněno z obou stran
 - 3 štěpy – perichondrium na jedné straně ponecháno, na druhé straně odstraněno a současně provedeny incise chrupavky (cca do poloviny tloušťky) vzdálené od sebe 2 – 3 mm
 - 3 štěpy – perichondrium odstraněno z obou stran, incise na jedné straně
 - 3 štěpy – chrupavka nařezána na drobné fragmenty o velikosti 2 x 2 mm
 - 3 štěpy – chrupavka mírně rozdracena v drtiči
- 8 vzorků ušní chrupavky uchované v živném roztoku.
Vzorky chrupavky byly makroskopicky očištěny od okolních měkkých tkání a perichondria z obou stran. Poté byla chrupavka po dobu 7 – 14 dnů kultivována v živném roztoku Nutrient mixture F12 Ham (Sigma, St. Louis, MO, USA) doplněném o 10% fetální telecí sérum, s 80 µg/ml gentamicinu ve vlhkém inkubátoru při teplotě 37°C s 5% CO₂. Po vyjmutí z media byly vzorky chrupavky promyty ve fosfátovém pufru (PBS, Sigma)) a následně transplantovány.

2. Příprava implantátů ze scaffoldů a tkáňové kultury lidských ušních chondrocytů

Operativně vyjmutá ušní chrupavka byla očištěna od okolních měkkých tkání včetně perichondria, rozkrájena na drobné fragmenty menší než 1 mm v průměru a enzymaticky natrávena kolagenázou II 2mg/ml (Sigma) a 0,1 mg/ml hyaluronidázou (Sigma), které byly rozpuštěny v DMEM mediu (Dulbecco's Modified Eagle's Minimal Essential Medium, Sigma) při teplotě 37°C po dobu 18 hodin. Izolované buňky byly kultivovány v DMEM mediu doplněném o 10% fetální telecí sérum s 80 µg/ml gentamicinu při teplotě 37°C s 5% CO₂ po dobu 7 - 21 dní. Výměna média probíhala každý třetí den kultivace. Scaffoldy ve tvaru plochých disků (6x2 mm) byly nejprve ponořeny do PBS (Sigma), poté do media použitého při kultivaci a osídleny vykultivovanými chondrocyty. Druhý den byly scaffoldy ponořeny do PBS a po vyjmutí byly připraveny k vlastní implantaci.

Bylo připraveno celkem 14 implantátů z různých druhů scaffoldů, které byly implantovány 11 imunodeficitním myším.

Scaffoldy ve formě želatinové pěny:

- 2 kusy z 5% želatinové pěny (Jelita Imagel BP Typ 68 917) v D H₂O

Scaffoldy z nanovláken:

- 2 kusy PCL - polycaprolakton (WAKO Pure Chemical Industries, Japan)
- 2 kusy PLGA – kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové (75/25) (Lakeshore BiomaterialsTM, Birmingham, Alabama, USA)
- 2 kusy PVB – polyvinylbutyrát

- 6 kusů nanovláknů PVA/Chitosan – polyvinyl alkohol (Sloviol M – NCHZ a.s., Nováky, SR)/ Chitosan (Medicol), hmotnostní poměr 89:11

Všechny nosiče byly připraveny v Laboratoři tkáňového inženýrství Ústavu experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.

2.část experimentu

Ušní chrupavka u králíků

1. Způsoby traumatizace ušní chrupavky v oblasti boltce

Chrupavka obou ušních boltců u *jednoho králíka* byla upravena následujícími způsoby:

- odstranění části ušní chrupavky obdélníkového tvaru o velikosti 15 x 20 mm, odstranění perichondria na jedné straně a její opětovné vložení do místa odběru
- transkartilaginózní incize chrupavky v délce 30 mm a její následná sutura
- pět inkompletních incizí přibližně do poloviny tloušťky chrupavky na jedné straně dlouhých 30 mm a vzdálených od sebe 2 mm
- rozdělení části ušní chrupavky na několik drobných fragmentů o velikosti cca 2x2 mm včetně perichondria, jejich uvolnění a ponechání v blízkosti místa odběru

2. Příprava autologních štěpů z ušní chrupavky u králíků

Z chrupavky ušních boltců u *dvou králíků* bylo vytvořeno celkem 8 čtvercových štěpů o velikosti cca 10 x 10 mm. U každého zvířete jsme odebrali celkem čtyři štěpy (dva z pravého a dva z levého ušního boltce), dva z nich jsme zbavili z obou stran perichondria, u dalších dvou jsme perichondrium oboustranně ponechali. Bezprostředně poté následovala autotransplantace štěpů subkutánně do oblasti dorza.

Kloubní chrupavka

Vzorky kloubní chrupavky byly získány během chirurgických zákroků provedených na Ortopedické klinice Nemocnice Na Bulovce. Dále byly vyšetřeny tkáň odebrané v průběhu pitvy.

Kromě toho byla studována kultura chondrocytů použitá k transplantaci (ACT - autologous chondrocyte transplantation) v místě traumatických defektů distálního konce femuru dodaná italskou firmou (Hyalograft® C, FIDIA Advanced Biopolymers, Italy).

Normální, patologicky změněná a nově vytvořená kloubní chrupavka

Bylo vyšetřeno celkem 68 vzorků *normální i patologicky změněné kloubní chrupavky a chrupavky nově vytvořené po transplantaci chondrocytů*. Konkrétně se jednalo o:

- 7 vzorků patologicky nezměněné chrupavky hlavice femuru (nekroptický materiál odebraný během pitvy pro náhlé úmrtí).
- 15 vzorků patologicky nezměněné chrupavky hlavice femuru (bioptický materiál odebraný při operaci fraktury krčku femuru).
- 12 vzorků chrupavky hlavice femuru při osteoartróze (bioptický materiál).
- 7 vzorků tibiální chrupavky hemofiliků (bioptický materiál).
- 15 vzorků z oblasti posttraumatických defektů chrupavky distálního femuru (bioptický materiál).
- 12 vzorků nově vytvořené chrupavky distálního femuru po ATC (bioptický materiál odebraný během kontrolní artroskopie 10 měsíců po transplantaci).

Chirurgické postupy u experimentálních zvířat

- **Chirurgické postupy při transplantaci lidské ušní chrupavky a implantaci scaffoldů s kulturami lidských ušních chondrocytů myším**

Operace probíhala v laminárním boxu s filtrovaným vzduchem v celkové anestézii za sterilních podmínek. Z 2 cm dlouhé kožní incise oblasti dorza ve střední čáře jsme vytvořili buď jednu nebo dvě podkožní kapsy paravertebrálně na jedné nebo obou stranách páteře, do nichž jsme vložili jednotlivé transplantáty. Explantace byla provedena po 8 týdnech v případě scaffoldů a po 12 nebo 16 týdnech v případě ostatních transplantátů.

- **Chirurgické postupy u králíků**

Operační výkony u králíků probíhaly za sterilních podmínek v celkové intravenózní anestézii podáním směsi Ketaminu (Narkamon 5%, Spofa, Česká Republika – 50mg/kg) a Xylazinu (Xylased 2%, Bioveta, Ivanovice na Hané, ČR - 5mg/kg). Experiment se skládal ze dvou částí. V prvním případě (jeden králík) jsme vedli kožní incisi dlouhou 6 – 8 cm na ventrální straně obou boltců a chrupavku jsme traumatizovali výše popsány způsoby in toto. V druhé části pokusu jsme odebrali z obou ušních boltců dvou králíků autologní chrupavčité štěpy velikosti cca 10 x 10 mm, které jsme upravili (viz výše) a transplantovali do čtyř podkožních kapes vytvořených paravertebrálně na obou stranách páteře. Po osmi týdnech jsme v prvním případě resekovali celé boltce, v druhém jsme explantovali autologní chrupavkové štěpy z oblasti dorza.

Použité vyšetřovací metody

- **Histologické vyšetření**

Vzorky obsahující ušní chrupavku odebranou z terapeutických důvodů při operaci pacientů nebo vyjmutou z místa transplantace resp. implantace experimentálním zvířatům byly zpracovány způsobem obvyklým při běžném biotickém histologickém vyšetření.

Hlavice femuru byly po fixaci v 10% formolovém roztoku nařezány na plátky šíře 3-5mm. Z periferie a centra povrchu kloubní hlavice jsme odebrali vzorky obsahující kloubní chrupavku i přilehlou kostěnou tkáň. Kromě toho byly z povrchu hlavice odebrány vzorky tvořené pouze chrupavkou. Vzorky obsahující i kostěnou tkáň byly fixovány v 10% pufrovaném formolu a dekalifikovány v roztoku EDTA při 40 °C. Vzorky tvořené pouze chrupavkou byly zpracovány bez odvápnění.

Kultury chondrocytů vázané na nosiče jsme zpracovali identickým způsobem jako biotické vzorky, tj. po zalití do parafinu.

Parafinové bloky se zalitými vzorky vyšetřovaných tkání byly krájeny na mikrotomu a po odparafinování barveny hematoxylinem-eozinem, PASem a to i po natrávení amylázou, dále pak Safraninem O, alcianovou modří a za použití metody dle Massona doplněné o barvení na elastiku.

- **Imunohistochemické vyšetření**

Imunohistochemická vyšetření byla provedena na 3-4 μ m silných řezech montovaných na skla krytá poly-L-lyzinem. Použili jsme standardní avidin-biotin peroxidázovou metodu. Jako chromogen byl využit diaminobenzidin, jako enzym křenuvát peroxidáza.

Všechny vzorky, s výjimkou ušní chrupavky králíků, byly vyšetřeny s protilátkou proti α -SMA (monoklonální, klon 1A4, 1:100, Dako, Glostrup, Denmark) a svalově specifickému aktinu (monoklonální, klon HHF35, 1:100, Dako), což je protilátka reagující se všemi třemi izotypy α -aktinu (kosterního, srdečního a hladkého svalstva) a s γ -hladkosvalovým aktinem.

V jednotlivých analyzovaných skupinách byla dále provedena vyšetření s protilátkami proti desminu (1:200, Dako), h-caldesmonu (1:50, Dako), vimentinu (1:300, Bio-Genex), CD68 (klon KP1, 1:20, Dako), myogeninu (1:50, Dako), myoD1 (1:50, Dako).. Dále byly použity protilátky proti GFAP a polyklonální protilátka proti S-100 proteinu (1:1600, Dako) a jeho různým izoformám (S-100 A1, A2, A4, A6, P a A10). Proliferační aktivita chondrocytů chrupavky boltce byla testována za pomoci protilátky Ki67 (klon MIB 1; 1:50, Dako). Vybrané vzorky lidské ušní a kloubní chrupavky byly vyšetřeny s protilátkou proti CD 34 (1:200, Immunotech S.A., Marseille, France).

- **RT-PCR analýza**

Ve vybraných případech byla u vybraných vzorků ušní a kloubní chrupavkové tkáně použita metoda RT-PCR s využitím primerů pro všechny známé izoformy aktinu a desminu. Použili jsme deparafinované vzorky tvořené pouze chrupavčitou tkání. Celkem jsme touto metodou analyzovali 17 vzorků. Izolace celkové RNA, syntéza cDNA a RT-PCR analýza byly provedeny podle standardních postupů (35).

4 Výsledky

Ušní chrupavka u lidí a experimentálních zvířat

1. Histologické, imunohistochemické a molekulárně biologické nálezy v normální lidské ušní chrupavce

- **Nálezy v ušních boltcích u nedonošených potracených plodů**

Vyšetření prokázalo, že ušní chrupavkový základ je tvořen nezralými mezenchymovými buňkami, které neexprimují S100 protein ani α -aktin hladké svaloviny. Počínající produkce elastických vláken byla prokazatelná pouze v některých oblastech ušní chrupavky. Dalším rozdílem oproti ušní chrupavce dospělých bylo zjištění vysoké proliferační aktivity chrupavkových buněk znázorněné protilátkou proti Ki67.

- **Nálezy v normálních ušních boltcích u dětí a dospělých**

Ve všech 30 vyšetřených případech byla nalezena normální ušní chrupavka elastického typu s komůrkovými buňkami uloženými v lakunách obklopených mezibuněčnou hmotou bohatou na proteoglykany s četnými elastickými vlákny. Při histologickém a imunohistochemickém vyšetření jsme učinili několik nálezů, které většinou nebyly, pokud je nám známo, dosud v písemnictví zaznamenány.

Hustota elastických vláken, ale také hustota a tvar chrupavkových buněk se měnily podle toho, zda se jednalo o zevní vrstvu v oblasti konkavity (scapha, fossa anthelialis) nebo zevní vrstvu na konvexní straně (helix, eminentia scaphae, anthelix). Zevní vrstva konkávní strany byla méně buněčná, chondrocyty měly oválný tvar a mezi nimi byla hojnější elastická vlákna, zatímco povrchová vrstva konvexní strany obsahovala větší koncentraci buněk vřetenitého a protáhlého tvaru, které byly obklopeny málo početnými elastickými vlákny.

Při imunohistochemickém vyšetření jsme vedle pozitivitu S-100 proteinu v řadě chondrocytů zjistili dosud nepopsanou **pozitivitu alfa aktinu hladké svaloviny**, dále jen aktin (36). Tyto aktin pozitivní chondrocyty tvořily zhruba 60% buněčné populace ušní chrupavky a převažovaly v periferních oblastech, zatímco centrální zóna obsahovala především aktin negativní chondrocyty.

Dalším neobvyklým a dosud nepopsaným nálezem byl výskyt **CD 34 pozitivních buněk** v oblasti perichondria. U 20% vyšetřených vzorků, přičemž se jednalo o ojedinělé buňky, jejichž distribuce byla zcela nepravidelná. Jejich příslušnost k chondrocytům potvrzovala pozitivní reakce s protilátkou proti S-100 proteinu.

Analýza exprese různých izoform **S-100 proteinu** ukázala v některých případech pozitivitu ve všech vrstvách ušní chrupavky. Týkalo se to S-100 proteinu prokazovaného za pomoci polyklonální protilátky a izoform A1, A6, B2 a P. Naproti tomu při použití protilátek proti izoformám S-100 proteinu A2 a A10 byly výsledky pozitivní především v chondrocytech obou periferních zón nacházejících se v blízkosti perichondria. Protilátka proti izoformě A4 S-100 proteinu dávala jen slabě pozitivní výsledky ve všech vrstvách. Proliferační aktivita chondrocytů stanovená za pomoci protilátky proti Ki 67 byla kompletně negativní.

RT-PCR analýza v souladu s výsledky imunohistochemického vyšetření potvrdila přítomnost mRNA α -SMA v ušních chondrocytech ve všech 5 vyšetřených vzorcích. Přítomnost mRNA dalších tkáňově specifických izoform aktinu nebyla zjištěna stejně jako průkaz mRNA desminu a CD 34.

2. Histopatologické nálezy v patologicky změněné lidské ušní chrupavce

- **Agresivní polychondritida**

Destrukce postihovala jednu ze zevních vrstev ušní chrupavky. Místo defektu vyplňovala cévnatá granulační tkáň s minimální zánětlivou celulizací. V zachované chrupavkové tkáni jsme neprokázali žádné regresivní změny. Chondrocyty exprimovaly jak S-100 protein, tak α -SMA.

- **Posttraumatické změny**

Zaznamenali jsme občasný výskyt drobných ložisek jizevnatého charakteru (většinou v periferních částech chrupavky) ve formě mikroskopických okrsků tvořených pouze vazivovou tkání bez chondrocytů a elastických vláken (3 případy). Expres S-100 proteinu ani aktinu nebyla u vitálních chondrocytů v sousedství těchto ložisek nijak narušena.

V ušní chrupavce pacienta se zápasnickou minulostí jsme pozorovali neobvyklé posttraumatické změny komplexního charakteru zahrnující rozsáhlou nekrózu části ušní chrupavky bez jakékoliv zánětlivé odezvy, rozsáhlé i drobné vazivové jizvy, drobné fragmenty vitální chrupavky s chondrocyty bez známek regresivních změn v okolním vazivu s „vroubkovaným“ povrchem chrupavky, výskyt drobných proliferátů nově vytvořené chrupavky, které vytvářely prominující výrůstky na povrchu chrupavky a svojí základní strukturou připomínaly chrupavku vazivovou a chondrocyty exprimovaly S-100 protein i α -SMA.

3. Transplantovaná ušní chrupavka

- **Změny v normální lidské ušní chrupavce po transplantaci do nosního skeletu**

Byly nalezeny různě velké fragmenty transplantované ušní chrupavky s elastickými vlákny, která ji odlišovala od původní nosní chrupavky hyalinního typu, jejíž drobné části byly ojediněle ve vzorcích zastíženy. Transplantovaná ušní chrupavka byla z větší části vitální, převažovaly buňky s barvitelnými jádry. Vedle toho se však nacházely i prázdné lakuny bez jakýchkoliv zbytků po původních buňkách, chyběla jakákoliv buněčná reakce. Reakce k průkazu S-100 proteinu byla většinou pozitivní. Naproti tomu pozitivitu α -SMA jsme zjistili jen ojediněle v periferní zóně. CD 34 pozitivní buňky jsme vůbec neprokázali.

- **Změny lidské ušní chrupavky po transplantaci myším**

- A) Intaktní ušní chrupavka**

Ve všech případech se štěpy dobře ujaly a vhojily bez rejekční či zánětlivé reakce. Transplantát byl obvykle obklopen tenkým vazivovým pouzdrém, přičemž vazivová tkáň byla ložiskovitě ve zvýšené míře buněčná. Základní struktura chrupavky zůstala zachována, včetně sítě elastických vláken a nevláknité mezibuněčné hmoty a v některých vzorcích zůstalo zachováno i tzv. vrstevnaté uspořádání, jak je popsáno výše. Nekrotické chondrocyty, identifikovatelné jako eosinofilní útvary uvnitř lakun se zachovanou konturou jaderných struktur, avšak bez barvící se jaderné bazofilní DNA, jsme ve vzorcích vyšetřených před transplantací zaznamenali pouze výjimečně, po transplantaci pak tvořily přibližně 4% buněčné populace transplantátu. Zánětlivou reakci v okolí nekrotických chondrocytů jsme nezaznamenali. Apoptoticky změněné chondrocyty nebyly přítomny.

Imunohistochemické vyšetření k zjištění proliferální aktivity chondrocytů s protilátkou proti Ki67 bylo u vitálních vzorků negativní. Větší část chondrocytů exprimovala α -SMA stejně jako ve vzorcích vyšetřených před transplantací. U části zvířat však byla exprese aktinu patrná pouze v úzké zóně chondrocytů uložených v periferních částech implantátu. Expresi polyklonálního S-100 proteinu, byla z hlediska intenzity i topografických vztahů vyjádřena identickým způsobem jako v kontrolních vzorcích. O vitalitě transplantovaných vzorků svědčily i pozitivní nálezy exprese různých izoform S-100 proteinu.

- B) Chrupavka upravená traumatizací**

Odstranění perichondria z jedné nebo obou stran před transplantací vitalitu štěpů neovlivnilo, ale v těsném sousedství defektu část chondrocytů zanikla.

Incize vzorků skalpelem z jedné strany, částečné rozdrčení v drtiči ani rozdělení chrupavky na drobné fragmenty nevedlo k významné ztrátě vitality, zvýšené proliferaci nebo vzniku vazivového spojení sousedních okrajů tkáně chrupavky. U některých vzorků jsme však zaznamenali ojedinělé drobné ložiskové nekrózy postihující většinou jen jednotlivé chondrocyty nebo chondrocyty v povrchové vrstvě transplantátu (laminární nekróza).

Drobné fragmenty chrupavky mechanicky traumatizované zůstaly z větší části vitální obklopené původní tukově vazivovou tkání.

Do arteficiálně vytvořených trhlin vrostla cévnatá vazivová tkáň charakteru granulační tkáně. Převážně v blízkosti řezu jsme místy nacházeli drobné ložiskové nekrózy jednotlivých chondrocytů a prázdné lakuny bez chondrocytů. Ve vitálních oblastech transplantované chrupavky chondrocyty exprimovaly jak S-100, tak i α -SMA.

- C) Normální ušní chrupavka uchovávaná v kultivačním mediu**

Většina chondrocytů byla vitálních s dobře zachovanými cytologickými detaily, včetně dobře barvitelných jader. Ojediněle jsme našli drobné ložiskové nekrózy jednotlivých chondrocytů. V okolní tkáni jsme nezaznamenali rejekční reakci. Imunohistochemické vyšetření opět prokázalo expresi S-100 proteinu i α -SMA.

4. Implantace nosičů s kulturou lidských ušních chondrocytů myším

- **Histologie kultury lidských chondrocytů imobilizovaných na želatinovém nosiči před implantací**

Ve všech případech jsme v prostorách mezi septy nosiče zaznamenali drobné skupinky málo diferencovaných buněk oválného tvaru, které byly pozitivní na S100 protein, což svědčí pro jejich příbuznost s chondrocyty. Expresi α -SMA jsme nezjistili. Buněk bylo jen malé množství a vyskytovaly se pouze v drobných skupinkách bez známek produkce mezibuněčné hmoty.

- **Vyhodnocení implantované kultury ušních chondrocytů se želatinovým nosičem**

Po 8 týdnech byl transplantát vyjmut a bylo zjištěno, že in vivo nedošlo k resorpci nosiče. V prostorách mezi septy nosiče jsme zaznamenali ostrůvky chrupavkové tkáně a tkáň tukově vazivovou. Ostrůvky chrupavky sestávaly z lakunárních chondrocytů s jemnou sítí elastických vláken, jak jsme si ověřili příslušným barvením.

Chondrocyty vykazovaly pozitivní reakci na S-100 protein i proti jeho různým izoformám, ale pro podrobnější hodnocení exprese těchto izoform nebylo množství materiálu dostatečné. V řadě chondrocytů byl prokázán α -SMA. V okolí nosiče byla patrná obrovskobuněčná reakce typu z cizích těles.

- **Vyhodnocení implantované kultury ušních chondrocytů s různými nosiči z nanovláken**

Resorpci celého implantátu jsme zaznamenali v 5 případech. Vždy se jednalo o nosič z PVA/Chitosanu (89:11). V jednom případě byly nalezeny vazivově opouzdřené volné uzlíky chrupavky bez nosiče.

Výsledky u nalezených implantátů byly podobné jako u předchozí skupiny. Ve strukturách myxoidní tkáně se nacházely pruhy buněk nejasného původu, pravděpodobně fibroblastů, a kompaktní ostrůvky chrupavkové tkáně. Nově narostlá chrupavková tkáň vytvářela ostře ohraničená uzlovitá ložiska s diskrétními elastickými vlákny a chondrocyty exprimovaly α -SMA i S-100 protein. V okolí jednoho nosiče z PCL byla patrná obrovskobuněčná reakce typu z cizích těles.

5. Změny ušní chrupavky u králíků po traumatizaci v oblasti boltce a po autotransplantaci ušní chrupavky do oblastí dorza

Odstraněný štěp ušní chrupavky zbavený perichondria z jedné strany a vložený zpět do místa odběru se vhojil, aniž by vznikly nějaké regresivní změny chondrocytů.

Kompletní rozdělení ušní chrupavky transverzální incizí s následnou suturou nevedlo ke zvýšení proliferační aktivity chondrocytů. Oba konce zůstaly odděleny a spojily se pouze vazivovou tkání. Inkompletní incize chrupavky způsobila zvýšenou proliferaci chrupavkové tkáně v místě řezu.

Cíleně oddělené drobné fragmenty ušní chrupavky přežívaly ve formě malých implantátů v měkkých tkání ucha bez jakýkoliv známek regresivních změn.

Štěpy ušní chrupavky transplantované pod kůži zad králíků se vhojily bez jakékoliv rejekční reakce a bez prokazatelných regresivních změn chondrocytů.

Lidská kloubní chrupavka

- **Základní histologické charakteristiky normální lidské kloubní chrupavky**

Normální kloubní chrupavka měla ve všech případech charakter typické chrupavky hyalinní. U větší části chondrocytů jsme prokázali expresi S-100 proteinu. Malé množství chondrocytů exprimujících α -SMA bylo nalezeno ve všech vrstvách chrupavky, jejich distribuce v hlubokých vrstvách se však v jednotlivých případech lišila. Shodným rysem ve všech případech byla exprese α -SMA asi ve 20% chondrocytů povrchové vrstvy chrupavky.

- **Chrupavka ze spodiny kloubních defektů po traumatu**

Chondrocyty exprimující α -SMA a S-100 protein tvořily většinu buněčné populace ve všech vzorcích odebraných z oblasti traumatických defektů. V jednom případě byla v chondrocytech současně nalezena exprese desminu.

- **Osteoartroticky změněná kloubní chrupavka**

V preparátech barvených hematoxylin-eozinem byly zřetelné degenerativní změny chrupavky s fragmentací tkáně, superficiální fibrilací a snížením výšky chrupavčité tkáně. V některých oblastech byly patrné reparativní změny s tvorbou chrupavky fibrózního typu, jinde převažovaly oblasti s tzv. klonální proliferací chondrocytů. V oblastech nahrazených fibrózní chrupavkou se v mezibuněčné hmotě nacházely nepravidelně orientované snopce kolagenního vaziva. Buňky exprimující α -SMA se vyskytovaly hlavně v oblastech tzv. klonální proliferace a v místech, kde při reparativních procesech vznikla chrupavčitá tkáň fibrózního typu. V oblastech se strukturou podobnou normální chrupavce byla exprese α -SMA v nečetných chondrocytech nepravidelná ve všech zónách a počet pozitivních buněk se lišil případ od případu. Většina aktin pozitivních buněk současně exprimovala S-100 protein. Expresi desminu ani CD34 jsme v žádném ze vzorků nenalezli

- **Kultura chondrocytů použitá k transplantaci pro léčbu kloubních defektů**

Ve vyšetřované kultuře buněk (Hyalograft® C) převažovaly vřetenité elementy exprimující α -SMA bez současné exprese S-100 proteinu, které připomínaly fibroblasty event. myofibroblasty. Všechny buňky byly přibližně stejně vyztřelé, známky diferenciaci směrem k chondrocytům jsme nepozorovali.

- **Nově vytvořená kloubní chrupavka po transplantaci chondrocytů**

Ve vzorcích odebraných z nově vytvořené chrupavky 10 měsíců po autologní transplantaci chondrocytů měla tkáň charakter hyalinní chrupavky s příměsí chrupavčité tkáně fibrózního typu. Distribuce chondrocytů v matrix byla iregulární. Zóna kalcifikované chrupavčité tkáně byla neúplná. Tento nález svědčil pro inkompletní maturaci nově vytvořené chrupavky. Všechny buňky byly vitální. V subchondrální kostěné tkáni byly známky remodelace. Většina chondrocytů exprimovala α -SMA a většinou simultánně i S-100 protein. Průkaz desminu a CD34 vyzněl negativně. V dřevných prostorách subchondrální kosti se nacházely makrofágy s fagocytovaným materiálem nosiče.

- **RT-PCR analýza**

Ve všech vyšetřených vzorcích kloubní chrupavky jsme prokázali přítomnost mRNA α -SMA a β - a γ -cytoplazmatického aktinu. V jednom vzorku odebraném z místa defektu chrupavky po traumatu byla prokázána přítomnost mRNA desminu (jednalo se o vzorek, ve kterém byla exprese desminu prokázána rovněž imunohistochemicky).

Tabulka 9. Souhrnné výsledky analýzy exprese α -hladkosvalového aktinu v různých typech chrupavky.

Typ chrupavkové tkáně			Počet případů	Věk (roky)	α -SMA pozitivní chondrocyty	
					superficiální vrstva	hluboké oblasti
Ušní	lidská ušní chrupavka	potracené a nedonošené plody	6	20-22 týdnů	-	-
		normální chrupavka ušního boltce	30	6- 82	60%	<10%
		traumatizovaná u lidí	5	25-51	60%	<10%
		transplantovaná u lidí	2	33 a 37	<10%	-
	lidská ušní chrupavka transplantovaná myším	intaktní	6	27-45	60%	<10%
		traumatizovaná	18	23-41	60%	<10%
		uchovávaná v médiu	6	26-38	60%	<10%
		nově narostlá na nosičích	9	9-35	60%	<10%
Kloubní	normální	normální hlavice femuru (náhlé úmrtí – nekroptický materiál)	7	19-46	18 %	10 %
		normální hlavice femuru (po fraktuře krčku)	15	55-72	22 %	15 %
	patologicky změněná	hlavice femuru při osteoartróze	12	52-70	100 % buněk v oblastech klonálního seskupení 80 % ve fibrokartilaginózní tkáni	
		tibiální chrupavka u hemofiliků	7	23-42	80 % ve fibrokartilaginózní tkáni	
		posttraumatické defekty distálního femuru	15	21-35	-	80 %
	chrupavka po autologní transplantaci chondrocytů	chrupavka distálního femuru po transplantaci chondrocytů	12	23-35	80 %	80 %
Celkem			150			

5 Diskuze

Normální netransplantovaná lidská ušní chrupavka – histologie a porovnání imunohistochemických nálezů s transplantovanou ušní a kloubní chrupavkou

Histologické a imunohistochemické vyšetření *normálních lidských ušních chrupavek* přineslo některé poznatky, které dosud nebyly publikovány (37, 38). Obě povrchové vrstvy ušní chrupavky se v některých oblastech liší hustotou elastických vláken a tvarem a hustotou chondrocytů. V oblasti konvexit byla v povrchové vrstvě ušní chrupavky elastická vlákna méně četná a chondrocyty byly většinou tvaru a početnější. V konkávních oblastech obsahovala povrchová vrstva méně chondrocytů oválného tvaru, elastická vlákna byla hojnější. Tento *fenomén vrstvení* chrupavkové tkáně pravděpodobně ovlivňuje nebo přímo určuje mechanické vlastnosti ušní chrupavky. Lze uvažovat, že odlišnosti ve struktuře povrchových vrstev chrupavky ušního boltce se mohou uplatňovat při formování jeho reliéfu s četnými konvexitami a konkavitami.

Nález *CD34 pozitivních buněk* v blízkosti perichondria ukazuje, že tyto buňky mohou být blízké mezenchymovým buňkám kmenovým, pro něž je CD34 pozitivita typickým znakem. Tyto elementy by mohly představovat rezervoár buněk s proliferačními schopnostmi proliferace, které se uplatňují při regenerativních pochodech a zatím nebyly blíže objasněny.

Reakce k průkazu Ki67 byla v ušních chrupavkách dospělých *negativní* na rozdíl od chrupavek boltců nedonošených plodů. Toto zjištění demonstruje, že s přibývajícím věkem se ve vyzrálé elastické chrupavce buněčný cyklus ušních chondrocytů pravděpodobně prodlužuje.

Při sledování *exprese S-100 proteinu v chondrocytech ušní chrupavky* se ukázalo, že aktivita S 100 proteinu v chondrocytech je určitým způsobem modifikována v závislosti na jejich uložení v jednotlivých zónách ušní chrupavky. Protilátky proti S-100 A2 a A10 prokázaly aktivitu pouze v zevních vrstvách ušní chrupavky, zatímco v centrální části byla reakce chondrocytů negativní nebo slabá. Tyto nálezy by mohly svědčit pro hypotézu, že metabolicky neaktivnější jsou pravděpodobně chondrocyty obou zevních vrstev v sousedství perichondria.

U *transplantovaných různých typů štěpů lidské ušní chrupavky* imunodeficitním myším jsme ložiskovitě aktivitu S-100 proteinu vůbec neprokázali, což ukazuje na změnu jejich metabolické a biologické aktivity. V případě kultury ušních chondrocytů na želatinovém nosiči před implantací a u nově narostlé chrupavky na různých typech nosičů po jejich implantaci myším jsme reakci k průkazu polyklonálního S-100 proteinu využili k potvrzení jejich chondrogenního původu. Expresí jednotlivých izoform S-100 proteinu nebyla blíže studována. Celá otázka aktivity různých izoform S-100 proteinu v chondrocytech je zatím nejasná a čeká na další objasnění (39, 40, 41).

V naší studii poprvé informujeme o *aktin pozitivních chondrocytech*, které tvořily až 60% celkové buněčné populace a vyskytovaly se převážně v obou povrchových vrstvách *normální ušní chrupavky* (36). Aktin pozitivní buňky, které v identických vzorcích měly také příslušnou mRNA prokázanou metodou RT-PCR, měly charakter typických chondrocytů, což bylo ověřeno i pozitivitou v reakci k průkazu S-100 proteinu. Ojedinele buňky tohoto typu vykazovaly pozitivitu v reakci se svalově specifickým aktinem a s protilátkou proti CD 34.

V naší práci jsme potvrdili přítomnost *exprese α -SMA v osteoartroticky změněné kloubní chrupavce* zejména v oblastech tzv. klonální proliferace a v místech, kde v rámci reparativních procesů vznikla chrupavčitá tkáň fibrózního typu (39). Dále jsme prokázali *expresi α -SMA* i v některých *chondrocytech normální kloubní chrupavky*, což dosud nebylo popsáno. V normální kloubní chrupavce byla exprese α -SMA vyjádřena nejvýrazněji ve většině chondrocytech povrchové první zóny. Dále jsme prokázali *expresi α -SMA* v

defektní kloubní chrupavce po traumatu, v nově vytvořené kloubní chrupavce po transplantaci a v kulturách buněk použitých k transplantaci. V kultuře chrupavkových buněk (Hyalograft[®] C) převažovaly vřetenité buňky exprimující α -SMA bez současné exprese S-100 proteinu. V jednom případě jsme ve vzorku chrupavky odebraném ze spodiny defektu po traumatu kromě α -SMA prokázali i expresi desminu (42).

Imunohistochemické vyšetření chrupavky ušního boltce a kloubní chrupavky za normálních i patologických okolností znovu otevřelo otázku výskytu a významu α -aktinu hladké svaloviny v chondrocytech různých chrupavkových tkání. Ukázalo se, že za normálních okolností v ušní chrupavce aktin pozitivní chondrocyty převažují, zatímco v chrupavce kloubní se tyto buňky vyskytují pouze v povrchové vrstvě a k jejich zmnožení dochází za různých patologických stavů nebo po transplantaci kultury chondrocytů.

V roce 1997 Povýšil (34) a spol. poprvé popsali u benigního chondroblastomu výskyt chrupavkových buněk obsahujících ve své cytoplazmě aktinová filamenta, jak potvrdilo imunohistochemické a elektronmikroskopické vyšetření. Jednalo se o alfa-hladkosvalový aktin (α -SMA), jednu ze známých izoform aktinu. Autoři tehdy pro tyto buňky navrhli označení myochondroblasty a myochondrocyty, což bylo některými americkými autory akceptováno a zároveň se tyto nálezy staly stimulem pro jejich hledání u dalších kostních nádorů i v nenádorových mezenchymových tkáních (43, 44, 45). Od té doby se této problematice věnovala větší pozornost, neboť tyto nálezy poprvé prokázaly, že samotná exprese α -SMA není dokladem hladkosvalové, myofibroblastické, myoepiteliální či pericytární diference, jak se dosud předpokládalo.

Aktiny jsou ubikvitní eukaryotické proteiny vyskytující se v buňkách svalových a v dalších elementech různé histogeneze. Uplatňují se při různých buněčných funkcích včetně svalové kontrakce, buněčné motility, buněčného transportu, buněčné adhezivity, fagocytózy, dělení a udržování tvaru a integrity buňky (46, 47). Expresе jednotlivých izoform se během vývoje v některých tkáních mění, což zatím zůstává nevysvětlené.

Alfa- a γ - hladkosvalový aktin se typicky vyskytují především v buňkách hladké svaloviny se schopností kontrakce. Alfa- hladkosvalový aktin (α -SMA) je dominantní izoformou v hladké svalovině cév, naopak v hladké svalovině zažívacího traktu převažuje γ - hladkosvalový aktin (47). α -SMA je během embryonálního vývoje přechodně exprimován také v příčně pruhovaném kosterním svalstvu a v myokardu (48). α -SMA se vyskytuje také v myofibroblastech, myoepiteliích a pericytech (44, 45, 49, 50). Na rozdíl od hladké svaloviny však ani jedna z těchto buněk neobsahuje h-caldesmon.

Význam exprese α -SMA jako jedné z kontraktilních izoform aktinu v buňkách normální i různým způsobem poškozené chrupavky zůstává nejasný. Jeho úloha může být v přenosu intracelulární tenze do extracelulární matrix, což může ovlivňovat kromě jiného i tkáňově specifické uspořádání této matrix (51, 52). V případě elastické chrupavky ušního boltce se mohou chondrocyty exprimující α -SMA podílet spolu s elastickými vlákny na neobvyklé elasticitě této chrupavky a její schopnosti měnit tvar pod vlivem mechanických podnětů bez poškození tkáně (36). Naše histologické nálezy tzv. vrstevnatého uspořádání některých oblastí ušní chrupavky zároveň naznačují, že aktin pozitivní chondrocyty mohou pravděpodobně podstatnou měrou přispívat spolu s rozvrstvením elastických vláken k udržení fixního reliéfu ušního boltce.

Z literatury není jasné, zda je exprese α -SMA v chondrocytech elastické ušní a hyalinní kloubní chrupavky přítomna trvale, či jde o výsledek patologického procesu nebo mechanické zátěže. Ukazuje se však, že exprese α -SMA v buňkách kloubní chrupavky i menisku může být regulována určitými růstovými faktory, jako je např. TGF- β 1, který expresi α -SMA v těchto buňkách zvyšuje, či PDGF, který expresi α -SMA naopak snižuje (53). Výsledky naší studie ukázaly, že určité procento chondrocytů exprimujících α -SMA je přítomno jak v normální ušní chrupavce, tak v patologicky nezměněné chrupavce kloubní.

V kloubní chrupavce se nicméně jejich *množství v případě poškození* v rámci osteoartrózy nebo posttraumatických změn *zvyšuje*. Na rozdíl od hyalinní kloubní chrupavky jsme u *transplantované ušní chrupavky* jak v experimentu u myší, tak u dvou pacientů s deformitami nosního skeletu *nárůst aktin pozitivních chondrocytů v souvislosti s poškozením nepozorovali*.

Transplantovaná lidská ušní chrupavka u lidí a imunodeficitních myší

Výsledky našich pokusů na experimentálních myších stejně jako vyšetření transplantované autologní ušní chrupavky do nosního skeletu u lidí potvrdily, že ušní chrupavka je biologickým materiálem, který je vhodný pro transplantaci do oblastí deformit nosního skeletu různé etiologie. Nezaznamenali jsme *žádné rejekční změny* v místě *experimentálních transplantátů ani implantátů u myší*. Valná část buněk ušní chrupavky zůstala vitální, jak jsme si mohli ověřit při histologickém a imunohistochemickém vyšetření, včetně vyšetření aktivity různých izoform S-100 proteinu..

Podobné výsledky jsme mohli potvrdit i ve vzorcích *transplantátů* odebraných z terapeutických důvodů v oblasti nosního dorza dvou z našich *pacientů*.

Při *transplantaci štěpů z normální, netraumatizované elastické lidské ušní chrupavky imunodeficitním myším* nedošlo k narušení základní sítě elastických vláken. Je však nutno počítat s možností vzniku drobných vazivových jizev mikroskopického rozměru.

Traumatizace ušní chrupavky před vlastním transplantačním výkonem nevedla ke zvýšení proliferační aktivity, jak jsme mohli ověřit při použití protilátky proti Ki67. Ušní chrupavka se tedy neliší od ostatních typů chrupavkové tkáně svojí extrémně nízkou proliferační aktivitou. V případě nedonošených plodů potracených kolem 22. týdne těhotenství je naopak proliferační aktivita zřetelná a týká se přibližně 20% buněk.

V souvislosti s traumatizací ušní chrupavky (oddělení perichondria, rozdrčení) jsme nepozorovali významnou ztrátu vitality nebo známky zvýšené resorpce. Některé literární prameny uvádějí, že za určitých okolností může dojít ke spojení oddělených fragmentů septální chrupavky novotvořenou chrupavkovou tkání.(20). V našem experimentu s ušní chrupavkou do štěrbin po incisi nebo mezi oddělené fragmenty chrupavky vrostla cévnatá granulační tkáň, která ale viabilitu chrupavky podstatným způsobem nenarušila.

Na základě našich zkušeností lze konstatovat, že *uchování štěpů z lidské ušní chrupavky* po určitou dobu před vlastní transplantací v *kultivačním médiu* při teplotě 37°C sice neovlivnilo ve většině případů podstatným způsobem vitalitu chrupavky, ale ani nepřineslo pro výsledky transplantace žádné výhody, naopak mohlo zvýšit riziko kontaminace štěpu a jeho následné nekrózy a rezorpce

Ušní chrupavka u králíků – změny po traumatizaci v oblasti ušního boltce a po autologní transplantaci

U *králíků* jsme v místech po provedené inkompletní incisi zaznamenali zvýšenou proliferaci chrupavkové tkáně s následným rozvojem uzlovitého ztlustění tvořeného zčásti nově vytvořenou chrupavkou. Obdobné změny, ovšem u drcené králíčí ušní chrupavky, popisují Cakmak et al. 2005 (54). Potvrdili jsme, že v případě chrupavky rozdělené kompletní incizí a následně sešité dochází ke srůstu pouze vazivovou tkání (55). Znamky zvýšené proliferační aktivity chondrocytů a tendenci ke srůstu novotvořenou chrupavkovou tkání jsme nepozorovali.

Implantace nosičů s kulturou lidských ušních chondrocytů imunodeficitním myším

V části práce, ve které jsme testovali možnosti *kultivace ušních chondrocytů ve tkáňové kultuře* jsme potvrdili, že autologní kulturu lze vypěstovat a přenést na vhodný nosič. Při histologickém vyšetření autologní kultury chondrocytů na želatinových nosičích jsme ve všech případech v prostorách mezi septy nosiče zaznamenali zcela drobné skupinky málo

diferencovaných buněk oválného tvaru bez známek produkce mezibuněčné hmoty, které byly pozitivní v reakci k průkazu S100 proteinu, což svědčí pro jejich příbuznost s chondrocyty. Expresi α -SMA jsme nezjistili.

U nalezených a vyšetřených scaffoldů ze želatiny i z nanovláken z různých materiálů jsme ve většině případů zaznamenali vznik ložisek chrupavkové tkáně se všemi charakteristikami elastické chrupavky. Buňky byly pozitivní v reakci k průkazu S-100 proteinu a některé byly i α -SMA pozitivní. Navíc mezibuněčná hmota obsahovala prokazatelná elastická vlákna. Po osmi týdnech od implantace nebyl materiál nosičů ze želatiny ve větší míře rezorbován. U nanovláken nebylo možno resorpci blíže posoudit pro jejich obtížnou identifikovatelnost. V okolí nosičů ze želatiny, ale i tří nosičů z nanovláken z různých polymerů (PCL, PVB i PLGA) byla v okolí patrná obrovskobuněčná reakce typu z cizích těles, která je v literatuře běžně popisována (56, 71). U části vzorků jsme zaznamenali, podobně jako jiní autoři (26, 58) i vznik vazivového pouzdra kolem implantátu.

V některých prostorách mezi strukturami nosiče však vyrostla i tkáň tukově vazivová nebo málo diferencovaná tkáň mezenchymová. Tento fenomén je možno vysvětlit v souladu se současnými představami o kmenových buňkách (60) dvojitým způsobem. Buď byly při přípravě tkáňové kultury získány kmenové mezenchymové buňky schopné diferenciaci do několika buněčných typů, nebo se nově vzniklá tkáň vyvinula ze dvou či tří typů unipotentních kmenových buněk s omezenou jednosměrnou potencií diferenciaci, pocházejících z buněk, které osídlily implantát společně s ušními chondrocyty nebo mohly migrovat do implantátu z okolní pojivové tkáně příjemce (58). Nepozorovali jsme žádné podstatné rozdíly z hlediska vlivu jednotlivých typů nosičů na novotvorbu chrupavkové tkáně.

Jedinou klinickou aplikací jsou zatím transplantace, resp. implantace autologních kultur kloubních chondrocytů vázaných na nosiče z kyseliny hyaluronové (30, 32) nebo jako suspenze buněk ve fibrinovém lepidle (31, 33) do oblasti velkých posttraumatických defektů kloubních (zejména kolenních) chrupavek.

Oproti tomu je klinická aplikace arteficiálně připravené chrupavkové tkáně v oblasti hlavy a krku zatím zcela výjimečná (61, 62) a díky řadě dosud nevyřešených otázek tak zůstává stále předmětem experimentálních studií. Na rozdíl od ortopedických indikací, kdy je nosič osídlený chondrocyty umístěn do tzv. imunoprivilegované oblasti kloubu (63), vede subkutánní pozice implantátu v oblasti hlavy a krku u imunokompetentních jedinců k zánětlivé reakci a jeho následné rezorpci (24, 57).

Hlavním předmětem této části naší práce bylo studium buněčných změn kultur lidských ušních chondrocytů, ke kterým dochází po implantaci s různými typy nosičů. Nezabývali jsme se proto blíže dalšími aspekty tkáňového inženýrství, například podrobnějším zkoumáním vlivu složení, struktury a vlastností jednotlivých scaffoldů na novotvorbu chrupavkové tkáně, mechanickými vlastnostmi novotvořené chrupavkové tkáně nebo sledováním změn tvaru implantátů apod.

Tkáňová kultura lidských kloubních chondrocytů před a po autologní transplantaci

Význam prekurzorových buněk chondrogenní řady exprimujících α -SMA (viz úvodní část diskuze) by mohly dokumentovat i nálezy v autologní kultuře kloubních chondrocytů transplantované do oblasti posttraumatických defektů kloubní chrupavky. V této kultuře dominovaly vřetenité buňky zřetelně exprimující α -SMA, které daly vzniknout po 10 měsících od její transplantace nové kloubní chrupavce obsahující velké množství chondrocytů exprimujících α -SMA a S-100 protein. Lze tedy předpokládat, že buňky exprimující α -SMA na jedné straně představují mladší elementy blízké buňkám prekurzorovým a snad i elementům vazivové chrupavky. Pro tuto domněnku by svědčily i nálezy nádorových chrupavkových buněk exprimujících α -SMA blízkých chondroblastům v kostních nádorech charakteru benigního chondroblastomu a chondromyxoidního fibromu (34). Na druhé straně

se jedná o buňky, které budou mít pravděpodobně schopnost značné proliferace, samozřejmě též pod vlivem účinku místních faktorů. Nově narostlá kloubní chrupavka byla tvořena u části pacientů převážně chrupavkou hyalinní nebo směsí chrupavky hyalinního a fibrózního typu (39). S postupem „dozrávání“ nově narostlé kloubní chrupavky by však velmi pravděpodobně došlo k její přestavbě v chrupavku čistě hyalinního typu.

Materiál nosiče (ester kyseliny hyaluronové - Hyalograft[®] C) byl v podstatě dobře rezorbovatelný, i když jsme zaznamenali jeho zbytky ve formě hematoxylinem se barvícího materiálu v cytoplazmě makrofágů kostní dřeni a ojediněle též v nečetných chondrocytech nově vytvořené kloubní chrupavky. Výsledky vyšetření omezeného počtu pacientů ukazují, že použitá autologní kultura kloubních chondrocytů na výše zmíněném nosiči dává z morfologického hlediska a s ohledem na klinické nálezy velice dobré výsledky.

Přes intenzivně probíhající výzkum a dosažený pokrok ve tkáňovém inženýrství zůstává vytvoření chrupavkové tkáně, která by byla svojí strukturou a vlastnostmi srovnatelná s nativní chrupavkou a rutinně využitelná v rekonstrukční chirurgii v oblasti hlavy a krku, ještě relativně vzdáleným cílem (64). Je pravděpodobné, že v budoucnu budou v tkáňovém inženýrství využívány především lidské adultní nebo embryonální kmenové buňky. Nicméně klinické využití výsledků vědeckého pokroku v této oblasti zůstává spojeno také s vyřešením některých dosud nezodpovězených etických otázek.

6 Závěry

1. Histologické vyšetření normální lidské ušní chrupavky přineslo některá nová zjištění, která dosud nebyla v odborné literatuře zaznamenána.

Jedná se o tkáň s *minimální proliferací aktivitou*, jak bylo ověřeno s protilátkou proti Ki67. S tím kontrastovala *vysoká proliferací aktivita v ušní chrupavce u nedonošených plodů*. Proces vyzrání této tkáně je tedy spojen s výrazným úbytkem její proliferací aktivity. .

Poprvé jsme podrobně popsali *vrstevnaté uspořádání chrupavky ušního boltce* v histologickém obraze. Centrální a obě povrchové vrstvy chrupavky se liší množstvím elastických vláken, počtem, tvarem a uspořádáním chondrocytů, v místě záhybů vykazují obě zevní vrstvy odlišné uspořádání

2. Poprvé jsme prokázali přítomnost α -aktinu hladké svaloviny v chondrocytech ušní chrupavky, především v obou periferních vrstvách uložených v blízkosti perichondria. Tento nový imunohistochemický náález byl ověřen i metodou RT-PCR, která zároveň vyloučila přítomnost dalších izoform aktinu s výjimkou beta a gama izoformy, které však jsou ubikvitní. Pozitivní expresi některých izoform S-100 proteinu (A1, A6, B2 a P) jsme našli ve všech vrstvách ušní chrupavky, zatímco pozitivita izoform A2 a A10 byla zaznamenána pouze v chondrocytech obou periferních zón.

Poprvé jsme také prokázali, že u části vyšetřených vzorků se v blízkosti perichondria vyskytují drobné skupiny **CD 34 pozitivních chondrocytů** blízkých mezenchymovým kmenovým buňkám, které současně exprimují S-100 protein.

Vrstevnaté uspořádání chondrocytů exprimujících α -SMA v elastické chrupavce ušního boltce se může spolu s elastickými vlákny podílet na neobvyklé elasticitě boltce a jeho schopnosti měnit tvar vlivem mechanických podnětů bez poškození tkáně.

3. Patologické změny lidské ušní chrupavky zánětlivého (agresivní polychondritida) nebo traumatického původu vedly v závislosti na rozsahu poškození ke vzniku ložisek jizevnatého charakteru, případně až k nekróze a destrukci menších či větších oblastí chrupavky. *Expres jak S-100 proteinu, tak α -SMA* ve vitálních chondrocytech zachované chrupavky *nebyla nijak narušena*.

Na rozdíl od kloubní chrupavky jsme u patologicky změněné lidské ušní chrupavky *nezaznamenali nárůst aktin pozitivních chondrocytů v souvislosti s poškozením*.

4. Histologickým vyšetřením vzorků ušní chrupavky transplantované lidem do oblasti nosního skeletu (2 pozorování) jsme ověřili, že tkáň zůstává z valné většiny vitální. Reakce k průkazu *S-100 proteinu* byla většinou zřetelně *pozitivní*, oproti tomu byla *pozitivita α -SMA* zjištěna jen *ojediněle* v periferní zóně chrupavky.

5. U štěpů z lidské ušní chrupavky transplantovaných imunodeficitním myším jsme zjistili pouze určité změny, které transplantaci mohou provázet, ale nenarušují zásadním způsobem funkci a strukturu transplantátů.

A) Transplantace štěpů z **normální, netraumatizované ušní chrupavky** nenarušila základní síť elastických vláken, je však nutno počítat s možností vzniku drobných mikroskopických jizev. Vitalita transplantované chrupavky byla přitom natolik zachována, že *chondrocyty exprimovaly prakticky všechny izoformy S-100 proteinu i α -SMA*.

B) **Traumatizace ušní chrupavky** nevedla k významné ztrátě vitality nebo zvýšené resorpci. Do štěrbin rozlomené nebo incizí narušené struktury ušní chrupavkové tkáně vrostla cévnatá granulační tkáň. Rozdrcení chrupavky nevedlo (až na dvě výjimky) k zániku chondrocytů v drobných fragmentech, které přežívaly obklopené vazivovou tkání. Ve vitálních oblastech transplantované chrupavky *chondrocyty exprimovaly jak S-100, tak i α -SMA*.

C) **Uchování ušní chrupavky v kultivačním médiu** po určitou dobu před vlastní transplantací nepřineslo pro výsledek transplantace žádné podstatné výhody. Chondrocyty vitálních vzorků *exprimovaly* jak *S-100*, tak *α-SMA*.

6. Vyšetření **kultury lidských ušních chondrocytů na nosičích ze želatiny před implantací** prokázalo přítomnost drobných skupinek málo diferencovaných oválných buněk mezi septy nosiče, které byly *pozitivní v reakci k průkazu S-100 proteinu*, což nejspíše svědčí pro jejich příbuznost s chondrocyty. *Expresi α-SMA jsme nezaznamenali*.

Implantace trojrozměrných nosičů s kulturou lidských ušních chondrocytů ze želatiny nebo z **nanovláken** z různých polymerních materiálů vedlo ve většině případů ke vzniku uzlovitých ložisek chrupavky elastického typu v potřebné lokalizaci. Chondrocyty vykazovaly *pozitivní* výsledek reakce k průkazu *S-100 proteinu* i *α-SMA*.

7. Histologické změny **traumatizované ušní chrupavky u králíků** byly obdobné jako u traumatizované lidské ušní chrupavky transplantované imunodeficitním myším. Jediným rozdílem byla zvýšená proliferace a novotvorba chrupavkové tkáně v místech inkompletních incizí. Po autologní transplantaci ušní chrupavky do dorza jsme nezaznamenali resorpci nebo rejekci štěpů ani zvýšenou fibroprodukcí v jejich okolí.

8. Značný teoretický význam by mohly mít nálezy **chondrocytů exprimujících α-SMA v kloubní chrupavce**. Prokázali jsme, že u *patologicky nezměněné kloubní chrupavky* lze tyto buňky identifikovat převážně jen v *povrchové vrstvě*, která nejspíše hraje roli v procesu regenerace i reparace, a vřetenité chondrocyty pravděpodobně představují jakousi záložní jednotku. Jejich růstová potence však zatím nebyla spolehlivě ověřena.

Množství buněk exprimujících *α-SMA* často narůstá v kloubních chrupavkách s artrotickými změnami, pravděpodobně v souvislosti se změnami při hojení kloubních defektů, kdy je původní tkáň nahrazena tkání s charakteristikami chrupavky vazivové. V místech fibrilace povrchu kloubní chrupavky s tzv. klonálními změnami se však obvykle nacházejí lakunární buňky s identickým fenotypem a tak lze předpokládat, že vysvětlení může být komplikovanější. Význam této transformace není blíže objasněn, jsou však prokázány určité změny genotypu chondrocytů artrotické chrupavky, které by mohly být příčinou změny jejich imunofenotypu.

9. Vyšetření **kultury lidských kloubních chondrocytů na nosiči z kyseliny hyaluronové (Hyalograft®C)** prokázalo přítomnost nezralých vřetenitých buněk exprimujících *α-SMA*, které neměly žádné histologické ani imunohistochemické znaky chondrocytů (reakce k *průkazu S-100 proteinu* byla *negativní*).

Výsledky **autologní transplantace chondrocytů (ATC)** do defektů kloubní chrupavky s využitím výše uvedené kultury ověřené na 10 pacientech přitom byly po 10 měsících výborné. Nově vytvořená kloubní chrupavka v místě defektů měla všechny znaky chrupavky hyalinní avšak někde ložiskovitě promíchané okrsky vazivové chrupavky. Lze přitom předpokládat, že po delší době by došlo k postupné přestavbě v chrupavku hyalinní. Většina chondrocytů *exprimovala α-SMA* a *S-100 protein*.

7 Použitá literatura

1. Boccieri, A., Marianetti, T.: Perichondrium graft: harvesting and indications in nasal surgery. *J. Craniofac. Surg.* 2010; 21: 41-44.
2. Huizing, E.H., de Groot, J.A.M.: *Functional Reconstructive Nasal Surgery*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2003, 386. ISBN 3-13-129411-6 (GTV)
3. Sajjadian, A., Rubinstein, R., Naghshineh, N.: Current status of grafts and implants in rhinoplasty: Part I. Autologous grafts. *Plast. Reconstr. Surg.* 2010; 125: 40e-49e.
4. Válka, J. a kol.: *Korektivní operace nosu*. Vydání první, Praha, Grada Publishing a.s., 2003: 154 s. ISBN 80-247-0458-7.
5. Lohuis, P.J., Watts, S.J., Vuyk, H.D.: Augmentation of the nasal dorsum using Gore-Tex: Intermediate results of a retrospective analysis of experience in 66 patients. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 2001; 26: 214-217.
6. Mackay, I.S., Bull, T.R.: The fate of Silastic in the management of saddle deformity of the nose. *J. Laryngol. Otol.* 1983; 97: 43 – 47.
7. Stelter, K., Strieth, S., Berghaus, A.: Porous polyethylene implants in revision rhinoplasty: chances and risks. *Rhinology.* 2007, 45: 325-331.
8. Boccieri, A., Macro, C.: Septal considerations in revision rhinoplasty. *Facial Plast. Surg. Clin. N. Am.* 2006; 14: 357-371.
9. Fischer, H., Gubisch, W.: Nasal valves-importance and surgical procedures. *Facial Plast. Surg.* 2006; 22: 266-280.
10. Murrell, G.L.: Auricular cartilage graft and nasal surgery. *Laryngoscope.* 2004;114: 2092 – 2102.
11. Nolst Trenité, G.J. *Rhinoplasty. A practical guide to functional and aesthetic surgery of the nose*. 3rd ed.. The Hague, Kugler Publications, 2005, 414. ISBN 90 6299 206 4
12. DeFatta, R.J., Williams III, E.F.: The decision process in choosing costal cartilage for use in revision rhinoplasty. *Facial Plast. Surg.* 2008; 24: 365-371.
13. Ansari, K. et al.: Grafts and implants in rhinoplasty – Techniques and long-term results. *Operative Techniques in Otolaryngology.* 2008;19: 42 – 58.
14. Perkins, S.W.: The evolution of the combined use of endonasal and external columellar approaches to rhinoplasty. *Facial Plast. Surg. Clin. N. Am.* 2004; 12: 35 – 50.
15. Gruber, R.P., Pardun, J., Wall, S.: Grafting the nasal dorsum with tandem ear cartilage. *Plast. Reconstr. Surg.* 2003; 112: 1110-1122.
16. Betka, J., Černý, E.: *Atlas chirurgie hlavy a krku*. První vydání, Praha, Triton. 251 s.
17. Hybášek, I.: *Ušní, nosní a krční lékařství*. První vydání, Praha, Galén. 1999, 220s.
18. Markalous, B., Charvát, F., Nejedlý, J., Zýková, E.: *Rinosinusitidy, sinusitidy a nosní polypy*. První vydání, Praha/Kroměříž, Triton, 2009, 405s.
19. Ale de Souza, M.M. et al.: Study of rabbit septal cartilage grafts placed on the nasal dorsum. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2008; 10: 250-254.
20. Bönisch, M., Hajas, T., Nolst Trenité, G.J.: Morphological and histological findings after typical surgical manipulations on growing septal cartilage in rabbits. *Facial Plast. Surg.* 2007; 23:231-238.
21. Cakmak, O., Buyuklu, F.: Crushed cartilage grafts concealing irregularities in rhinoplasty. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2007; 9: 352-357.
22. Calvert, J.W. et al.: Histological analysis of human diced cartilage. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006; 118: 230-236.
23. Kazikdas, K.C. et al.: Viability of crushed and diced cartilage grafts wrapped in oxidized regenerated cellulose and esterified hyaluronic acid: an experimental study. *Laryngoscope*, 2007; 117: 1728-1734.

24. Bücheler, M., Haisch, A.: Tissue engineering in otorhinolaryngology. *DNA Cell Biol.* 2003; 22: 549-564.
25. Chung, H.J., Park, T.G.: Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. 2007; 59:249-262.
26. Haisch, A. et al.: A tissue-engineering model for the manufacture of auricular-shaped cartilage implants. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 2002; 259:316–321
27. Kabelka, Z., Rypáček, F., Lesný, P.: Náhrada defektů v ORL oblasti in vitro připravenými implantáty z autologní chrupavky. *Choroby hlavy a krku (Head and Neck Diseases)*. 2005, 2, 34–39.
28. Sterodimas, A. et al.: Tissue engineering and auricular reconstruction: a review. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 2009; 62: 447-452.
29. Vacanti, C. A. et al.: Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast. Reconstr. Surg.* 1991; 88:753-759.
30. Grigolo, B. et al.: Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAFFs11): molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials.* 2002; 23:1187–1195
31. Handl, M. et al.: Léčba hlubokých chondrálních defektů pately transplantací kultivovaných autologních chondrocytů. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.* 2006;73: 373-379.
32. Podškubka, A. et al.: Ošetření hlubokých defektů chrupavky kolena transplantací autologních chondrocytů fixovaných na nosiči z esteru kyseliny hyaluronové (Hyalograft C). *Acta Chir. orthop. Traum. čech.* 2006;73: 251-263.
33. Visna, P. et al.: Treatment of deep cartilage defects of the knee using autologous chondrograft transplantation and by abrasive techniques--a randomized controlled study. *Acta Chir. Belg.* 2004; 104:709-714.
34. Povýšil, C., Tomanová, R., Matějovský, Z.: Muscle-specific actin expression in chondroblastoma. *Hum. Pathol.* 1997; 28: 316-320.
35. Tvrdlík, D. et al.: Molecular diagnosis of synovial sarcoma: detection of SYT-SSX1/2 fusion transcripts by RT-PCR in paraffin-embedded tissue. *Med. Sci. Monit.* 2005; 11: MT1-7.
36. Kaňa, R. et al.: Expression of actin isoforms in human auricular cartilage. *Folia Biol.(Praha)*. 2006; 52: 167-172.
37. Gnepp, D.R.: *Diagnostic surgical pathology of the head and neck*. 2nd ed. Saunders Elsevier; 2009.
38. Sternberg, S.S.: *Histology for pathologists*. 2nd ed. Lippincott Williams and Wilkins; 1997.
39. Povýšil, C., Kaňa, R., Horák, M.: Expres S-100 proteinu v osteogenních nádorech a tumoriformních osteoplastických lézích. *Čes.-slov. Patol.* 2008; 44: 59-61.
40. Cross, S.S., Hamdy, F.C., Deloulme, J.C., Rechman, I.: Expression of S-100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are overexpressed in common cancers. *Histopathology.* 2005; 46: 256-269.
41. Donato, R.: Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999; 1450:191-231.
42. Povýšil, C. et al.: Desmin-positive and alpha-smooth muscle actin positive chondrocytes in human defective articular cartilage - preliminary report. *Čes.-slov. Patol.*: 2005; 4: 133 – 136.
43. Clement, S. et al.: Expression and function of α -smooth muscle actin during embryonic-stem-cell-derived cardiomyocyte differentiation. *J. Cell Science.* 2007; 120: 229-238.

44. Chapponier, C., Gabbiani, G.: Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *J. Pathol.* 2004, 204: 386-395.
45. Hinz, B. et al.: Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol. Biol. Cell* 2003; 14: 2508-2519.
46. Ramaekers, F.C.S., Bosman, F.T. The cytoskeleton and disease. *J. Pathol.* 2004; 204: 351-354.
47. Vandekerckhove, J., Weber, K.: Actin typing on total cellular extracts. *Eur. J. Biochem.* 1981; 113: 595-603.
48. Woodcock-Mitchell, J. et al.: α -Smooth muscle actin is transiently expressed in embryonic rat cardiac and skeletal muscles. *Differentiation* 1988, 39: 161-166.
49. DeNofrio, D., Hooch, T.C., Herman, I.M.: Functional sorting of actin isoforms in microvascular pericytes. *J. Cell Biol.* 1989; 109: 191-202.
50. Schmitt-Gräff, A., Desmoulière, A., Gabbiani G.: Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch.* 1994; 425:3-24.
51. Kim, A.C., Spector, M.: Distribution of chondrocytes containing alpha-smooth muscle actin in human articular cartilage. *J. Orthop. Res.* 2000; 18: 749-755.
52. Kinner, B., Spector, M.: Expression of smooth muscle actin in osteoblast in human bone. *J. Orthop. Res.* 2002; 20: 622-632.
53. Zaleskas, J.M. et al.: Growth factor regulation of smooth muscle actin expression and contraction of human articular chondrocytes and meniscal cells in a collagen-GAG matrix. *Exp. Cell Res.* 2001; 270: 21-31.
54. Cakmak, O. et al.: Viability of crushed and diced cartilage grafts: A study in rabbits. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2005; 7: 21-26.
55. Silver, F. H., Glasgold, A. I.: Cartilage wound healing. An overview, *Otolaryngol.Clin. North. Am.* 1995; 28: 847-864.
56. Haisch, A. et al.: Creating artificial perichondrium by polymer complex membrane macroencapsulation: immune protection and stabilization of subcutaneously transplanted tissue-engineered cartilage. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 2005; 262: 338-344.
57. Rotter, N.: Role for interleukin 1alpha in the inhibition of chondrogenesis in autologous implants using polyglycolic acid-polylactic acid scaffolds. *Tissue Eng.* 2005; 11: 192-200.
58. Christophel, J.J., Chang, J.S., Park, S.S.: Transplanted tissue-engineered cartilage. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2006; 8: 117-122.
59. Shieh, S.J., Terada, S., Vacanti, J.P.: Tissue engineering auricular reconstruction: in vitro and in vivo studies. *Biomaterials.* 2004; 1545-1557.
60. Alison, M., R., Islam, S.: Attributes of adult stem cells . *J. Pathol.* 2009; 217: 144-160.
61. Yanaga, H. et al.: Clinical application of cultured autologous human auricular chondrocytes with autologous serum for craniofacial or nasal augmentation and repair. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006;117: 2019-2030.
62. Yanaga, H. et al.: Generating ears from cultured autologous auricular chondrocytes by using two-stage implantation in treatment of midrotioa. *Plast. Reconstr. Surg.* 2009; 124: 817-825.
63. Brittberg, M. et al: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 1994; 331: 889-895.
64. Stoop, R.: Smart biomaterials for tissue engineering of cartilage. *Injury, Int. J. Care Injured.* 2008; 39S1: S77-S87.

SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA

1. Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

a) publikace s IF

1. Kaňa, R., Dundr, P., Tvrđík, D., Nečas, E., Povýřil, C.: Expression of actin isoforms in human auricular cartilage. *Folia Biol. (Praha)*. 2006; 52: 167-72. (IF 0,387)
2. Povýřil, C., Kaňa, R., Dundr, P., Tvrđík, D., Horák, M., Vaculík, J., Podřkubka, A., Kubeř, R.: Distribution of chondrocytes containing α -smooth muscle actin in human normal, osteoarthrotic and transplanted articular cartilage. *Pathol. Res. Pract.* 2008; 204: 883-890. (IF 1,080)

b) publikace bez IF

1. Povýřil, C., Dundr, P., Tvrđík, D., Podřkubka, A., Kaňa, R., Horák, M.: Desmin-positive and alpha-smooth muscle actin positive chondrocytes in human defective articular cartilage - preliminary report. *Čes.-slov. Patol.* 2005; 41: 133-6.
2. Povýřil, C., Kaňa, R., Horák, M.: Expres S-100 proteinu v osteogenních nádorech a tumoriformních osteoplastických lézích. *Čes.-slov. Patol.* 2008; 44: 59-61.

Přednášky související s disertací:

1. Povýřil, C., Podřkubka, A., Kaňa, R., Dundr, P., Tvrđík, D.: Histologie a patomorfologie normální, osteoarthrotické a transplantované kloubní chrupavky. 13. Sjezd českých a slovenských patologů s mezinárodní účastí. Rožnov pod Radhoštěm 14.-16.9.2005
2. Kaňa R.: Funkční a estetická rinoseptoplastika v otorinolaryngologii. Měsíční schůze České společnosti otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku. Praha 3.11.2005
3. Kaňa R.: Rekonstrukce nosního skeletu ušní chrupavkou. 71. kongres České společnosti otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku. Olomouc 10. – 12. 9.2008.

Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace:

a) publikace s IF:

1. Vlckova, I., Navratil, P., Kana, R., Pavlicek, P., Chrbolka, P., Djupesland, P.G.: Effective treatment of mild-to-moderate nasal polyposis with fluticasone delivered by a novel device. *Rhinology*. 2009; 47: 419 – 426. (IF 2,182)

b) publikace bez IF:

1. Klozar J., Taudy M., Betka J., Kaňa R., Skřivan J.: Laryngeal Papilloma - Precancerous Condition?, *Acta Oto-Laryngologica (Slovenia)*, 1997; Suppl. 527:100-102
2. Valvoda, J., Klozar, J., Kaňa, R., Tachezy, R.: Současné poznatky o etiologii a klasifikaci laryngeální papilomatózy. *Choroby hlavy a krku - Head and neck diseases*. 1997; 2: 20-26.

3. Valvoda, J. Kaňa R., Haas, T.: Analogová a digitální sluchadla. Část 1. Hodnocení přínosu sluchadla pacientem. Otorinolaryng. a Foniatic. /Prague/. 2001; 50: 219-226.
4. Valvoda, J. Kaňa R., Haas, T.: Analogová a digitální sluchadla. Část 2. Audiometrické nálezy a vztah k subjektivnímu hodnocení sluchadel. Otorinolaryng. a Foniatic. /Prague/. 2002; 51: 8-13.