

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.

Expresce 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 vykazovali 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