



# Autologous chondrocytes culture

## Hodowla autologicznych chondrocytów

© J ORTHOP TRAUMA SURG REL RES 4 (20) 2010

Original article/Artykuł oryginalny

ALEKSANDRA WYSOCKA-WYCISK<sup>1</sup>, FABIAN KEPSKI<sup>1</sup>, HENRYK BURSIG<sup>1</sup>,  
STANISŁAW DYLAĞ<sup>1</sup>, TADEUSZ S. GAŹDZIK<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa. Bank Tkanek w Katowicach

<sup>2</sup> Katedra Fizjoterapii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Address for correspondence/Adres do korespondencji:

Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa. Bank Tkanek w Katowicach  
ul. Raciborska 15, 40-074 Katowice

tel/fax: 0048 32 20 87 361; e-mail: bank@bank-tkanek.pl

### Statistic/Statystyka

Word count/Liczba słów 1979/1652

Tables/Tabele 1

Figures/Ryciny 0

References/Piśmiennictwo 7

Received: 15.08.2010

Accepted: 20.09.2010

Published: 13.10.2010

The study was supported by MZiOS  
grant no. N N403 184034.

Pracę wykonano w ramach grantu  
MZiOS nr N N403 184034

### Summary

*Aim of the study.* The aim of the study was to develop our own method of chondrocyte culture in tissue adhesive.

*Material and methods.* The authors have established an optimal method of cell culture (preparation method and used media). The authors has shown that the described method of chondrocyte culture and implant preparation enables to obtain the amount of cells needed for implantation into the hyaline cartilage lesion within knee joint.

*Results and conclusions.* Tissue adhesive based on autologous and allogenic fibrinogen prepared in RCKiK in Katowice is a beneficial and easy to use medium for the preparation of implants containing cultured autologous chondrocytes.

**Key words:** Chondrocyte, cell culture

### Streszczenie

*Cel pracy.* W pracy przedstawiono własną metodę hodowli chondrocytów w kleju tkankowym.

*Material i metody.* Ustalono optymalny sposób prowadzenia hodowli biorąc pod uwagę sposób preparatyki oraz zastosowane media. Wykazano, że własna metoda hodowli i przygotowania przeszczepów chondrocytów umożliwia uzyskanie liczby komórek koniecznej do implantacji w miejscu ubytku chrząstki szklistej stawu kolanowego.

*Wyniki i wnioski.* Klej tkankowy oparty na autologicznym i allogenicznym fibrynogenie przygotowywanym w RCKiK w Katowicach stanowi korzystne i wygodne podłoże do przeszczepu wyhodowanych autologicznych chondrocytów.

**Słowa kluczowe:** Chondrocyty, hodowla tkankowa

Joint cartilage has limited ability to regenerate. Degenerated part of cartilage is usually replaced by fibro-hyaline cartilage. Structure and mechanical properties of mixed fibro-hyaline cartilage are different from normal, hyaline cartilage that is present in knee joint. Because of that, the replacement of normal cartilage with mixed type leads to rapid development of osteoarthritis.

Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) is a method used in the treatment of joint cartilage lesions. Chondrocytes are isolated from the piece of cartilage obtained from the unloaded part of knee joint. Next, the cells are being cultured *in vitro* to increase their number and afterwards the cells are implanted into the cartilage lesion site.

The aim of the study was to develop our own method of chondrocytes culture as well as to establish the preparation protocol of chondrocytes in suspension and chondrocytes in tissue adhesive as implants for ACI.

## MATERIAL AND METHOD

20 chondrocyte cultures were performed in Tissue Bank of Regional Centre of Blood Donation and Blood Treatment in Katowice (RCKiK). Cartilage samples were taken from femoral lateral epicondyle during knee joint alloplasty in patients with primary or mechanical gonarthrosis. The examined group of patients consisted of 16 women and 4 men aged from 55 to 79 years (mean age: 68 years).

After obtaining the cartilage, the sample was transferred into transport vial, filled with sterile, cooled physiological saline solution and stored in refrigerator (temperature from +4°C to +8°C). The blood was kept in room temperature, in vertical position.

The serum was prepared by centrifugation (10 minutes, 900 x g) of blood and after isolation aliquoted into vials, filtered and stored at -20°C. Every time only small portion of serum needed to supplement new portion of culture media was defrosted.

The cartilage was repeatedly washed and next stored for one day in +2-8°C in Ham'sF12 medium supplemented with 50 ̑g/ml gentamicin and 2 ̑g/ml amfotericin. On the next day the cartilage was cut into small pieces (approximately 0.5 mm diameter) and digested in 37°C for 6 hours in Ham'sF12 medium supplemented with 0.1% of type II collagenase, gentamicin and amfotericin.

The digested tissue was filtered through nylon mesh (pore diameter 70 or 100 ̑m) and centrifugated (5 minutes, 100 x g). The pellet was washed with Ham'sF12 medium supplemented with gentamicin and amfotericin. The cells were seeded onto FALCON PRIMARIA plates in DMEM/Ham'sF12 medium supplemented with 20% serum, 50 ̑g/ml gentamicin, 2 ̑g/ml amfotericin, 50 ̑g/ml vitamin C. Culture media were supplemented with 10% serum. Cells were cultured in 5.5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The medium was replaced every 48 hours. After achieving of 80% of confluence the cells were trypsinized. Cell viability was measured using trypan blue staining as well as using automatic Cell Counter.

Chrzęstka stawowa posiada niewielkie zdolności do regeneracji, a w miejscu jej uszkodzenia pojawia się zazwyczaj chrzęstka włóknisto-szklista. Ma ona inną budowę i właściwości mechaniczne niż chrzęstka szklista normalnie występująca w stawie kolanowym, co prowadzi do szybkiego rozwoju choroby zwyrodnieniowej.

Jednym ze sposobów leczenia ubytków chrzęstki stawowej jest autologiczny przeszczep chondrocytów (*Autologous Chondrocyte Implantation - ACI*). Chondrocyty są izolowane z fragmentu chrzęstki pobranej z nieobciążonej części stawu kolanowego, namnożone *in vitro*, a następnie wszczepiane w miejsce uszkodzenia chrzęstki.

Celem naszej pracy było opracowanie własnego sposobu hodowli chondrocytów oraz przygotowywania przeszczepów w zawieszynie i w kleju tkankowym.

## MATERIAŁ I METODA

W Banku Tkanek Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Katowicach wykonano 20 hodowli chondrocytów. Fragmenty chrzęstki stawowej z kłykcia bocznej kości udowej pozyskano podczas protezoplastyki stawu kolanowego wykonanej u chorych z pierwotną lub uwarunkowaną mechanicznie gonartrozą. Wśród nich było 16 kobiet i 4 mężczyzn w wieku od 55 do 79 lat (średnio 68 lat).

Chrzęstkę, po pobraniu, przekładano do sterylnej probówki transportowej, zalewano sterylną, schłodzoną solą fizjologiczną i przechowywano w lodówce w temperaturze od +4°C do +8°C. Krew przechowywano w temperaturze pokojowej w pozycji pionowej.

Surowicę przygotowywano wirując probówki z odstanną krwią pacjenta 10 minut przy 900 x g, przenoszono do probówek, filtrowano i przechowywano w temperaturze -20°C. Rozmrażano tylko wymaganą porcję do zmiany medium hodowlanego.

Chrzęstkę wielokrotnie płukano i przechowywano do następnego dnia w temperaturze od +2 do +8°C w pożywce Ham'sF12 zawierającej 50mg/ml gentamycyny, 2mg/ml amfoterycyny. Kolejnego dnia chrzęstkę krojono na małe fragmenty o wielkości 0,5mm i trawiono przez 6 godzin 0,1% kolagenazą typu II w pożywce Ham'sF12 z gentamycyną i amfoterycyną, w temperaturze 37°C.

Strawioną chrzęstkę filtrowano przez filtr nylonowy o wielkości porów 70mm lub 100̑m i wirowano 5 minut przy 100 x g. Peletkę komórek płukano w pożywce Ham'sF12 zawierającej gentamycynę i amfoterycynę. Komórki wysiewano na płytki typu FALCON PRIMARIA w pożywce DMEM/Ham'sF12 suplementowanej 20% surowicą, 50mg/ml gentamycyny, 2mg/ml amfoterycyny, 50mg/ml witaminy C. W dalszej hodowli stosowano surowicę o stężeniu 10%. Hodowlę chondrocytów prowadzono w inkubatorze w temperaturze +37°C w atmosferze 5,5% CO<sub>2</sub>. Pożywkę zmieniano co 48 godzin. Gdy komórki osiągały 80% konfluencję były trypsynizowane. Żywołność komórek sprawdzano za pomocą barwienia błękitem trypanu, oraz przy użyciu automatycznego licznika komórek Cell Counter.

During cell culture cell duplication ratio was calculated using the following formula:

$$\text{Number of duplicated cells} = \text{Log}_{10}(N/N_0) \times 3.33$$

N – number of cells at the end of culture; N<sub>0</sub> – number of cells at the beginning of culture.

After achieving the required number of cells, chondrocyte implant was prepared either in suspension or in tissue adhesive. Chondrocytes were trypsinized and washed twice with DMEM/Ham'sF12 supplemented with 10% of serum, 50 mg/ml gentamicin, 2 mg/ml amphotericin. Next, the cells were counted and their vitality was tested. The centrifuged cells were next used for implant preparation.

The preparation of chondrocytes in suspension ready to implantation sufficient to fill 1 cm<sup>2</sup> of lesion require 0.6-3.3 x 10<sup>6</sup> of cells. To prepare the implant, chondrocyte pellet was suspended in 200 µl of Ham'sF12 supplemented with 20% of serum.

During the preparation of implant in tissue adhesive allogenic fibrinogen was isolated in Regional Centre of Blood Donation and Blood Treatment in Katowice from donated blood. 600 ml of blood plasma was obtained via automatic plasmapheresis using Hemonetic MCS+ separator. Subsequently, the plasma was frozen at -80 and defrosted at +4 (in water bath) twice. Condensed fibrinogen precipitate was centrifugated at +4 (1000 x g, 15 minutes) using Haereus Cryofuge. Supernatant was removed using a press manufactured by Melco Engineering. The remaining steps were performed on fibrinogen precipitate.

Cell pellet was mixed with fibrinogen and aprotinin in one vial, while in the other vial thrombin was mixed with 10% calcium chloride. The mould designed specifically for this purpose was filled first with cells mixed with fibrinogen and next aprotinin and thrombin with calcium chloride. The mixtures were pipetted rapidly. Up to the moment of solidification, the product was tightened in the mould to obtain required thickness (less than 2-3 mm). To obtain the implant measuring 20 mm in diameter and 2-3 mm thickness approximately 600 µl of cell mixture in tissue adhesive was used. Preparation of implant consisting of chondrocytes in tissue adhesive requires 5-10x10<sup>6</sup> cells for 1 ml of tissue adhesive.

## RESULTS

We have optimized digestion conditions using type II collagenases manufactured either by SIGMA or Worthington. Various digestion times (from 4 to 18 hours) as well as enzyme concentrations (from 0.04 to 0.12%) were compared. We have experimentally determined accurate cartilage digestion time to obtain high percentage of digested tissue without cell damage.

Podczas hodowli obliczano współczynnik podwajania komórek posługując się wzorem:

$$\text{Liczba podwajanych komórek} = \text{Log}_{10}(N/N_0) \times 3,33$$

N – liczba komórek na końcu hodowli; N<sub>0</sub> – liczba komórek na początku hodowli

Po osiągnięciu żądanej liczby komórek przygotowywano przeszczep chondrocytów w zawieszynie lub kleju tkankowym. Chondrocyty trypsynizowano i płukano dwukrotnie w pożywce DMEM/Ham'sF12 suplementowanej 10% surowicą, 50mg/ml gentamycyny, 2mg/ml amfoterycyny. Następnie komórki liczone i sprawdzano ich żywotność. Uzyskane w wyniku wirowania komórki wykorzystywano do przygotowania przeszczepu.

W przypadku przygotowania przeszczepu chondrocytów w zawieszynie do wypełnienia 1cm<sup>2</sup> ubytku chrzęstnego w stawie pacjenta należy wyhodować od 0,6 do 3,3mln komórek.

Do przygotowania przeszczepu chondrocytów w zawieszynie peletkę komórek zawieszano w 200µl pożywki Ham'sF12 z 20% surowicą.

Do przygotowania przeszczepu w kleju tkankowym wykorzystywano fibrynogen allogeniczny przygotowywany w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolечnictwa w Katowicach od dawców honorowych. Osocze pobierano metodą plazmaferezy automatycznej o objętości 600 ml na separatorze Hemonetics MCS+, następnie dwukrotnie zamrażano do minus 80°C i rozmrażano w temperaturze +4°C w łaźni wodnej. Zagęszczony precipitat fibrynogenu wirowano w temperaturze +4°C przy 1000 x g przez 15 minut w wirówce Haereus Cryofuge. Supernatant usuwano przy użyciu prasy Melco Engineering, a do dalszych prac wykorzystywano precipitat Fbg.

Peletkę komórek mieszano z fibrynogenem i aprotyniną w jednej probówce, w drugiej probówce trombinę z 10% chlorkiem wapna. Do specjalnie utworzonej formy nakładano kolejno mieszaninę fibrynogenu z komórkami i aprotyniną oraz trombinę z chlorkiem wapnia, szybko mieszając dół-góra. Produkt do czasu zastygnięcia zaciskano w specjalnej formie z dwóch stron, tak aby jego grubość wynosiła nie więcej niż 2-3mm. Dla uzyskania przeszczepu o średnicy 20mm i grubości 2-3mm wykorzystywano 600 µl mieszaniny komórek w kleju tkankowym. W przypadku przygotowywania przeszczepów chondrocytów w kleju tkankowym należy przeszczepić 5-10mln komórek na 1 ml kleju tkankowego.

## WYNIKI

Przeprowadzono optymalizację warunków trawienia z wykorzystaniem kolagenazy typu II firmy SIGMA i Worthington. Porównano czas trawienia od 4 do 18 godzin, przy stężeniach enzymu od 0,04% do 0,12%. Określono dokładne stężenie enzymu i czas trawienia chrząstki tak, aby uzyskać wysoki procent strawionej chrząstki, a jednocześnie nie uszkadzać komórek.

Optimal digestion conditions were the following: digestion time - 6-8 hours, in Ham'sF12 medium supplemented with 0.1% collagenase manufactured by Worthington. On average, digestion of 1 mg of cartilage led to obtaining of 3450 cells. The lowest number of cells isolated from 1 mg of cartilage was 1240, whereas the highest number was 4450. No relationship between cartilage mass and number of obtained cells was observed.

Isolated cells were seeded into culture dishes made by various manufacturers: NUNC, FALCON, and SARSTEDT. The best rate of cell adhesion was observed on FALCON PRIMARIA culture dish. Within a few hours after seeding the cells adhered into the bottom of the culture dish, and after approximately 3 days the cells started to proliferate. The cells adhered in varied way - some of them needed only an hour, while the others required between ten and twenty hours. Initially the adhering cells were round and after a few days they started to spread. At the end of the culture cells took a „stretched” shape.

At the first passage various culture dishes were tested (NUNC, FALCON and SARSTEDT). The subsequent culture was performed using NUNC culture dishes. Cell culture time varied between 30 and 35 days (on average 33 days). Cell culture was maintained in atmosphere enriched with 5.5% CO<sub>2</sub>. During the culture the cells were passaged 3-7 times (5 times on average) (Table I).

During every trypsinization as well as during the final implant preparation cell viability was tested and cell duplication ratio was counted.

Additionally, we have checked whether the chondrocytes can be stored in room temperature or in the refrigerator up to 48 hours after the preparation. It is important to determine the transport conditions and implant storage time. It was shown that after implant preparation the chondrocytes can be stored up to 48 hours in +4°C-8°C. Cells storage in room temperature led to lesser viability and higher aggregation rate. Cell proliferation rate differed between patients. In the majority of cases we have managed to obtain the required cell number; however, it was impossible to determine the time needed for cell culture.

The presented study involved repeated attempts to prepare chondrocyte implants in tissue adhesive and sterile implant packaging. During the experiments we have used allogenic fibrinogen obtained from blood donors' plasma in RCKiK in Katowice in various concentrations (30-60 mg/ml). In our observation, lower Fbg concentration influenced gel consistency of implant, its plasticity and adhesivity.

To check the time of implant degeneration the prepared implants were stored in incubator in DMEM/Ham'sF12 medium supplemented with 10% serum, gentamicin (50 µg/ml), amphotericin (2 µg/ml), vitamin C (50 µg/ml). The observation has shown that tissue adhesive was completely absorbed after 2-3 weeks since implant preparation. It was too short for chondrocytes to produ-

Ustalono, że najdogodniejsze warunki trawienia to 6-8 godzin w podłożu Ham'sF12 zawierającym kolagenazę firmy Worthington o stężeniu 0,1%. Podczas trawienia macierzy chrząstki izolowano komórki w liczbie średnio 3450 komórek na 1 mg chrząstki. Najmniejsza liczba wyizolowanych komórek z 1 mg chrząstki to 1240 a najwyższa 4450. W badaniach nie stwierdzono współzależności między masą chrząstki, a liczbą uzyskiwanych komórek.

Wyizolowane komórki wysiewano na naczynia hodowlane różnych firm: NUNC, FALCON, SARSTEDT. Zaobserwowano, że komórki najliczniej i najlepiej osiadają na butelkach hodowlanych typu FALCON PRIMARIA. W ciągu kilku godzin od wysiania komórki przylegały do dna butelki hodowlanej, a po około 3 dobach zaczynały się dzielić. Komórki przywierały w bardzo zróżnicowany sposób, jedne osiadały już po godzinie, inne potrzebowały kilkunastu godzin. Osiadające komórki często były zaokrąglone, po kilku dniach uzyskiwały nowy kształt bardziej rozplaszczony, by pod koniec hodowli przybrać już kształt bardzo rozciągnięty.

Po pierwszym pasażu testowano naczynia hodowlane typu NUNC, FALCON i SARSTEDT. Do dalszej hodowli wybrano butelki typu NUNC. Hodowlę prowadzono od 30 do 35 dni (średnio 33 dni) w inkubatorze do hodowli komórek z atmosferą CO<sub>2</sub> 5,5%. Komórki pasażowano 3 do 7 razy (średnio 5 razy) w trakcie okresu hodowli (Tabela I).

Każdorazowo podczas trypsynizacji oraz podczas końcowego przygotowania przeszczepu oceniano żywotność wyhodowanych komórek, oraz obliczano współczynnik podwajania komórek.

Dodatkowo sprawdzano możliwość przechowywania chondrocytów w warunkach temperatury pokojowej i w lodówce do 48 godzin po przygotowaniu, co miało znaczenie dla określenia warunków transportu i czasu przechowywania przeszczepu. Stwierdzono, że chondrocyty po przygotowaniu przeszczepu można przechowywać do 48 godzin w temperaturze od +4°C do +8°C. Przechowywanie komórek w temperaturze pokojowej powoduje wyższą ich śmiertelność i agregację. Podczas hodowli komórki proliferowały w zróżnicowany sposób u każdego z pacjentów. W większości przypadków udało się uzyskać wymaganą liczbę komórek, choć nigdy nie dało się z góry określić dokładnego czasu co do jej uzyskania.

Podczas prowadzonych badań wykonywano wielokrotne próby przygotowywania przeszczepów chondrocytów w kleju tkankowym oraz sterylnej pakowania przeszczepu. Do doświadczeń wykorzystywano allogeniczny fibrynogen honorowych dawców RCKiK w Katowicach w różnych stężeniach (od 30 do 60 mg/ml). Okazało się, że niższe stężenie Fbg wpływało na żelową konsystencję przeszczepu, jego dużą plastyczność i adhezyjność.

Przygotowywane przeszczepy przechowywano w inkubatorze w podłożu DMEM/Ham'sF12 suplementowanym 10% surowicą, gentamycyną (50mg/ml), amfoterycyną (2mg/ml), witaminą C (50mg/ml), aby sprawdzić ich

ce matrix in knee joint. Because of that we have increased the concentration of antifibrinolytic factor, aprotinin, from 3000 KIU into 5000 KIU. In consequence, we extended degradation time to 4-5 weeks.

czas rozpadu. Stwierdzono, że klej tkankowy rozkładał się w ciągu 2-3 tygodni od momentu przygotowania przeszczepu. Był to zbyt krótki czas dla chondrocytów na wytworzenie macierzy w stawie kolanowym. Zmniejszono więc stężenie aprotyniny – czynnika antyfibrynolitycznego z 3000 KIU do 5000 KIU, wydłużając tym samym czas degradacji do 4-5 tygodni.

**Tab. 1.** Number of chondrocytes isolated from 100 mg of cartilage, number of passages and time of culture

	Number of isolated cells (10 <sup>6</sup> /100 mg)	Number of cells at the end of culture (10 <sup>6</sup> )	Log10(N/N0) x 3,33	Passages	Time of culture
1	0,32	30,05	6,6	7	30
2	0,29	17,50	5,8	6	30
3	0,23	1,3	2,5	3	31
4	0,17	26,4	7,2	7	32
5	0,18	8,5	5,6	6	35
6	0,21	6,48	4,9	6	35
7	0,24	9,15	5,3	6	35
8	0,26	21,5	6,3	6	31
9	0,24	3,23	3,7	5	30
10	0,27	11,2	5,8	6	31
11	0,14	1,08	2,9	4	33
12	0,25	1,4	2,5	4	30
13	0,12	3,52	4,8	5	35
14	0,26	12,9	5,6	6	35
15	0,45	23,48	5,7	6	35
16	0,23	21,6	6,5	7	35
17	0,18	9,39	5,6	5	35
18	0,43	17,88	5,3	7	35
19	0,37	4,16	3,5	5	32
20	0,33	4,73	3,8	4	35
<b>Mean</b>	0,26	11,8	4,9	5	33
<b>Minimum</b>	0,14	1,3	2,5	3	30
<b>Maximum</b>	0,33	30,05	7,2	7	35

**Tab. 1.** Liczba wyizolowanych chondrocytów ze 100 mg chrząstki, liczba pasaży i czas hodowli

	L. wyizolowanych komórek (mln/100mg)	L. komórek na końcu hodowli (mln)	Log10(N/N0) x 3,33	Pasaże	Czas hodowli
1	0,32	30,05	6,6	7	30
2	0,29	17,50	5,8	6	30
3	0,23	1,3	2,5	3	31
4	0,17	26,4	7,2	7	32
5	0,18	8,5	5,6	6	35
6	0,21	6,48	4,9	6	35
7	0,24	9,15	5,3	6	35
8	0,26	21,5	6,3	6	31
9	0,24	3,23	3,7	5	30
10	0,27	11,2	5,8	6	31
11	0,14	1,08	2,9	4	33
12	0,25	1,4	2,5	4	30
13	0,12	3,52	4,8	5	35
14	0,26	12,9	5,6	6	35
15	0,45	23,48	5,7	6	35
16	0,23	21,6	6,5	7	35
17	0,18	9,39	5,6	5	35
18	0,43	17,88	5,3	7	35
19	0,37	4,16	3,5	5	32
20	0,33	4,73	3,8	4	35
<b>Średnio</b>	0,26	11,8	4,9	5	33
<b>Minimum</b>	0,14	1,3	2,5	3	30
<b>Maximum</b>	0,33	30,05	7,2	7	35



## DISCUSSION

Autologous chondrocyte implantation into articular cartilage lesion alleviates pain and postpones the need of alloplasty. In vitro cultured chondrocytes are able to produce cartilage matrix that is morphologically, biochemically and biomechanically similar to hyaline cartilage matrix. Number of cells needed for the particular patient is determined individually on the basis of cell proliferation rate and the size of articular lesion site. In the majority of patient number of implanted cells varies between  $0.64$  and  $3.3 \times 10^6$  per  $1 \text{ cm}^2$  of lesion (2,3).

To establish chondrocyte culture, the cells have to be released from the surrounding matrix (a mixture of type II, IX, XI collagen, proteoglycans and hyaluronic acid). Tissues surrounding the cartilage are removed. The cartilage is next washed repeatedly, cut into small pieces and subsequently digested to remove extracellular matrix. Isolated cells are then seeded into culture dish in appropriate media containing nutrients (vitamins, amino acids, glucose). In addition, the media are supplemented with 10-20% serum containing hormones and adhesion molecules stimulating cell proliferation. Culture media are also supplemented with antibiotics and antimycotics to protect the culture from bacterial and fungal infections. The cells are maintained in the atmosphere enriched with  $\text{CO}_2$ . After achieving 80-90% of confluence the cells are passaged into another culture dish (bottle). Regular observations and viability testing using reverse microscope enable to assess cell number as well as to choose implantation time (5). If duplication rate is more than 6-8, cell passaging is not recommended. This is because in such a moment cells' chondrogenic potential is very low and the cells have lower ability to produce extracellular matrix.

Prepared implant must be sterile, and cell viability should be more than 80%. Cell culture should be fully documented.

Until recently, cultured chondrocytes were seeded only under periosteal patch sutured in the cartilage lesion site. Nowadays it is more and more commonly replaced by collagen membrane consisting of type I and III collagen. In second generation ACI the cells are seeded into membranes, while in third generation ACI, the cells are seeded on 3D scaffolds. In case of 3D structures, the cell culture is extended to 5-6 weeks. The most important advantage of scaffolds used during the preparation of ACI is that they do not need any periosteal patch, hence the patient do not require extensive surgical procedure. The polymers used in the production of scaffolds enable to adjust implant shape to the lesion site. Moreover, the implant is mechanically stable and is suitable for arthroscopic surgery (1,3).

Fibrinogen isolation methods, involving the use of blood plasma obtained from many donors, carry the risk of infectious diseases transmission. To reduce the risk we have developed a method of fibrinogen isolation from a single donor. This approach allows detailed donor iden-

## DYSKUSJA

Przeszczep autologicznych chondrocytów w miejsce ubytku chrząstki stawowej powoduje złagodzenie dolegliwości bólowych oraz opóźnia konieczność wykonywania alloplastyki. Namnożone in vitro chondrocyty wykazują zdolność tworzenia macierzy chrzęstnej o właściwościach morfologicznych, biochemicznych i biomechanicznych zbliżonych do macierzy chrząstki szklistej. Liczba komórek potrzebna dla chorego jest indywidualnie ustalana na podstawie możliwości proliferacyjnych komórek oraz wielkości ubytku powierzchni stawowej. U większości pacjentów przeszczepia się od 0,64 do 3,3 mln komórek w zawiesinie na  $\text{cm}^2$  uszkodzonej powierzchni (2,3).

Aby uzyskać hodowlę chondrocytów należy uwolnić komórki z otaczającej je macierzy będącej mieszaniną kolagenu typu II, IX, XI, proteoglikanów i hialuronianu. Chrząstkę oczyszcza się z przyległych tkanek, kilkakrotnie płucze, kroi na małe fragmenty, następnie poddaje trawieniu enzymatycznemu w celu usunięcia macierzy międzykomórkowej. Wyizolowane komórki wysiewa się na naczynia hodowlane w odpowiednich pożywkach zawierających substancje odżywcze (witaminy, aminokwasy, glukozę). Dodatkowo stosuje się surowicę w stężeniu 10-20% zawierającą hormony i czynniki adhezyjne stymulujące wzrost komórek. Pożywki hodowlane uzupełnia się również antybiotykami celem zapobiegania infekcjom bakteryjnym, oraz środkiem zapobiegającym infekcjom grzybiczym. Hodowlę prowadzi się w inkubatorze w atmosferze  $\text{CO}_2$ . Po osiągnięciu konfluencji 80-90% komórki są pasażowane na kolejne butelki. Obserwacja i sprawdzanie żywotności w mikroskopie odwróconym pozwala na ocenę liczby komórek i wybór czasu transplantacji (5). Nie należy pasażować komórek jeśli współczynnik podwajania wynosił powyżej 6-8; po tym czasie ich potencjał chondrogeniczny jest bardzo niski, jak również maleje ich zdolność do tworzenia macierzy zewnątrzkomórkowej.

Wydany przeszczep komórek musi być sterylny, a żywotność komórek zachowana powyżej 80%. Podczas hodowli należy prowadzić pełną dokumentację procesu hodowli.

Do niedawna wyhodowane chondrocyty przeszczepiano tylko pod łąkę okostnej przyszywaną w miejscu ubytku chrząstki. Obecnie coraz częściej jest ona zastępowana błoną kolagenową składającą się z kolagenu typu I i III. Druga generacja ACI polega na wysiewaniu komórek na błonach, a trzecia na hodowli 3D na matrycach (skafoldach). W tym ostatnim przypadku hodowla trwa dłużej około 5-6 tygodni. Najważniejszą zaletą stosowania skafoldów w przypadku ACI jest brak potrzeby używania łąki okostnej, co ogranicza rozległość zabiegu operacyjnego. Stosowanie polimerów zapewnia, że wytworzony przeszczep jest dobrze dopasowany do kształtu ubytku, jest stabilny mechanicznie oraz pozwala na przeprowadzenie operacji techniką artroskopową (1,3).

Metody pozyskiwania fibrynogenu polegające na mieszanii osocza pozyskiwanego od wielu dawców niosą za sobą ryzyko przeniesienia chorób zakaźnych. Z tego

tification and eliminates the risk of viral disease transmission.

The study involved the use of tissue adhesive. Although tissue adhesive is not a 3D scaffold, it is an interesting and nowadays quite popular alternative for cell suspension injection (4,6,7). The novelty was the use of autologous fibrinogen to the preparation of implant. To our knowledge no references regarding the method of autologous chondrocyte implantation in autologous fibrinogen in human exist.

The study has shown, that fibrinogen prepared in RCKiK in combination with cells gave very plastic implants, easy to reshape and adhere in the lesion site. These features enabled easy and fast implantation. Commercially available tissue adhesive, Tissucol, did not have the described set of features. The implants containing cells and Tissucol were very cohesive, but not plastic as a gel. Because of that the implants poorly adhered into cartilage lesion site.

## CONCLUSIONS

1. The described method of chondrocyte culture and implant preparation enables to obtain the amount of cells needed for implantation into the hyaline cartilage lesion within knee joint.
2. Tissue adhesive based on autologous and allogenic fibrinogen prepared in RCKiK in Katowice is a beneficial and easy to use medium for the preparation of implants containing cultured autologous chondrocytes.

powodu w naszym ośrodku opracowano metodę pozyskiwania fibrynogenu od pojedynczego dawcy, co pozwala na dokładną jego identyfikację i eliminuje ryzyko przeniesienia choroby wirusowej.

W pracy użyto kleju tkankowego, który choć nie jest scaffoldem to stanowi ciekawą i dość popularną ostatnio alternatywę dla iniekcji komórek (4,6,7). Nowością było użycie autologicznego fibrynogenu do przeszczepu komórek. Metodę połączenia autologicznych chondrocytów z autologicznym fibrynogenem u człowieka nie znaleziono w piśmiennictwie.

W trakcie prowadzonych badań okazało się, że fibrynogen przygotowywany w RCKiK w połączeniu z komórkami tworzył przeszczepy o dużej plastyczności, możliwości odkształcania i adhezji w miejscu ubytku. Wiązało się to z łatwiejszą i szybszą implantacją. Wyżej opisanych cech nie posiadał handlowy klej tkankowy – Tissucol. Przeszczepy powstałe po zmieszaniu komórek z Tissucolem były silnie spójne, bez cech plastycznego żelu co wpływało na ich słabą adhezję w miejscu ubytku chrząstki.

## WNIOSKI

1. Opracowana metoda hodowli i przygotowania przeszczepów chondrocytów umożliwia uzyskanie liczby komórek koniecznej do implantacji w miejscu ubytku chrząstki szklistej stawu kolanowego
2. Klej tkankowy oparty na autologicznym i allogenicznym fibrynogenie przygotowywanym w RCKiK w Katowicach stanowi korzystne i wygodne podłoże do przeszczepu wyhodowanych autologicznych chondrocytów.

---

## References/Piśmiennictwo:

1. Coutts RD, Healey RM, Ostrander R, Sah RL, Goomer R, Amiel D. Matrices for cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2001 Oct;(391 Suppl):S271-9
2. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1994 Oct 6;331(14):889-95
3. Brittberg M. Autologous chondrocyte implantation—technique and long-term follow-up. *Injury.* 2008 Apr;39 Suppl 1:S40-9
4. Meinhart J, Fussenegger M, Höbling W. Stabilization of fibrin-chondrocyte constructs for cartilage reconstruction. *Ann Plast Surg.* 1999 Jun;42(6):673-8
5. Strzelczyk P, Benke G, Górecki J. Zasady izolacji i hodowli ludzkich chondrocytów - wstęp do autogennych przeszczepów komórkowych *Ortopedia, traumatologia, rehabilitacja* 2001; 3(2):213-215
6. Visna P, Adler J, Pasa L, Kocis J, Cizmar I, Horkey D. Autologous chondrocyte transplantation for the treatment of articular defects of the knee
7. Višna, L. Paša, I. Čiz-már, R. Hart, J. Hoch Treatment of Deep Cartilage Defects of the Knee Using Autologous Chondrograft Transplantation and by Abrasive Techniques – A Randomized Controlled Study *P. Acta chir belg,* 2004, 104, 709-714