



Evaluation of metalloproteinase-1 (MMP1) expression in rabbit medial meniscal knee allograft

Ocena ekspresji MMP-1 w przeszczepach allogennych łąkotki przyśrodkowej u królika

© J ORTHOP TRAUMA SURG REL RES 2 (14) 2009

Original article/Artykuł oryginalny

TOMASZ JACEK ZWIERZCHOWSKI¹, OLGA STASIKOWSKA², MARIAN DANILEWICZ², JAROSŁAW FABIŚ¹

¹ Kliniczny Oddział Artroskopii, Chirurgii Małoinwazyjnej i Traumatologii Sportowej Medyczny Uniwersytet w Łodzi

² Zakład Nefropatologii i Morfometrii Medyczny Uniwersytet w Łodzi

Address for correspondence/Adres do korespondencji:

Tomasz Jacek Zwierzchowski

ul. Piotrkowska 182/338, 90-368 Łódź

tel. 0509508781; e-mail: zwierzchowski.jacek@gmail.com

Statistic/Statystyka

Word count/Liczba słów 2395/2109

Tables/Tabele 1

Figures/Ryciny 1

References/Piśmiennictwo 30

Received: 22.01.2009

Accepted: 30.03.2009

Published: 25.05.2009

Praca finansowana z tematu prac własnych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr 502-17-263

Summary

Introduction. The study presents immunohistological examination of MMP-1 expression in viable knee medial meniscal allografts in rabbits 6 months after surgery.

Material end methods. The experimental study comprised 13 mature male New Zealand white rabbits – 7 allografts were performed using modified technique of Sommerlath and Gilquist and a control group of 6 animals subjected only to arthrotomy. Before implantation the menisci were stored in tissue culture conditions described by Verdonk. Six months after surgery the animals were sacrificed and the menisci were evaluated immunohistochemically for the expression of MMP-1 and then statistically analyzed.

Conclusions. Semiquantitative evaluation showed a strong expression of MMP-1 in allografts compared to the control group ($p < 0,001$). Our results suggest a possibility of degenerative changes of the meniscal allografts.

Key words: meniscal allografts, rabbits, MMP-1

Streszczenie

Wstęp. Przedstawiono immunohistochemiczną ocenę ekspresji metaloproteiny -1 (MMP-1) w allogennych, żywych przeszczepach łąkotki przyśrodkowej u królika. Okres obserwacji wyniósł 6 miesięcy.

Materiał i metody. Materiał badawczy stanowiło 13 dojrzałych królików płci męskiej rasy nowozelandzkiej, u 7 wykonano przeszczep allogenny, u 6 tylko artrotomię (kontrola) przeszczep implantowano zmodyfikowaną techniką opisaną przez Sommerlath i Gilquista. Łąkotki przed implantacją były przechowywane 2 tygodnie w warunkach hodowli tkankowej według metody opisaną przez Verdonka. Po 6 miesiącach zwierzęta uśmiercono i oceniono immunohistochemicznie ekspresję MMP-1, wyniki opracowano statystycznie.

Wnioski. Ocena półilościowa wykazała silną ekspresję MMP-1 w przeszczepach allogennych w porównaniu do kontroli ($p < 0,001$). Nasze wyniki sugerują możliwość zmian degeneracyjnych w allogennych przeszczepach łąkotek

Słowa kluczowe: łąkotka, przeszczep allogenny, metaloproteinaza -1 (MMP-1)

INTRODUCTION

Menisci are an integral part of a knee joint that take part in providing its homeostasis. They provide several integral elements to the knee function such as: load transmission, shock absorption, joint lubrication and friction reduction, joint nutrition, protection from daily joint wear and also knee stability (1).

Loss of meniscus due to meniscal injury results in increased load being transferred by particular knee joint elements and in significant increase of force concentration on articular surface. Then, hyaline cartilage deprived of protection, is subjected to excessive forces with early wear out and in consequence there comes to the development of secondary arthritis (2).

Currently the torn or damaged meniscus can be replaced with a meniscal allograft: frozen, cryopreserved or viable. The latter one was introduced into practice by Verdonk et al., who grew cells of the meniscus in tissue culture. Viable meniscal fibrochondrocytes can then produce extracellular matrix (ECM) elements (2,3).

Experimental studies enabled to get to know the transplant biology, the mechanism of implant ingrowth, to determine the function of allografts and to describe the complications.

Owing to this knowledge the indications for meniscal allografts transplantation were specified (2,3).

Long-term outcomes regarding meniscal allograft transplantation, changes occurring in the allograft, its ageing and the development of possible degenerative changes are still not fully recognized (4).

Extracellular matrix (ECM) with sparse fibrochondrocytes are the basic element of meniscal structure. Its major component are structural proteins, mainly type I collagen, proteoglycans and specialized proteins. Metalloproteinases (MMPs) play an essential role in ECM remodeling and changes, particularly collagenase -1 (MMP-1), the substrate of which is type I collagen and stromelysin 1 (MMP III), the preferred substrates of which are matrix proteoglycans and glycoproteins and basement membrane collagen. In physiological conditions MMPs activity is low and it is inhibited by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) (5).

In literature there are no reports concerning the expression and activity of MMPs in meniscal allografts.

The aim of the study was to demonstrate immunohistochemical expression of MMP-1 in medial meniscal viable allografts in rabbits. The transplant material was stored for 2 weeks in tissue culture conditions prior to the procedure. The 6-month follow-up enabled to demonstrate the dynamics of ECM remodeling as well as possible regressive changes.

WSTĘP

Łąkotki stanowią integralną część stawu kolanowego biorąc udział w zapewnieniu homeostazy stawu kolanowego. Łąkotki biorą aktywny udział w przenoszeniu obciążeń przez kolano, redukują naciski na powierzchnie stawowe, co zapewnia ochronę chrząstce szklistej, rozpraszają maź stawową oraz stabilizują kolano.(1)

Utrata łąkotki powstała w wyniku uszkodzenia skutkuje wzrostem przeciążeń przenoszonych przez poszczególne elementy stawu kolanowego, znaczącego wzrostu nacisków na powierzchnie stawowe. Pozbawiona ochronnego działania chrząstka szklista ulega przedwczesnemu zużyciu, w konsekwencji rozwijają się wczesne, wtórne zmiany zwyrodnieniowe – zniekształcające (2).

Aktualnie dysponujemy możliwością zastąpienia uszkodzonej łąkotki na drodze allogennej, przeszczepu mrożonego, mrożonego konserwowanego i żywego przeszczepu. Ten rodzaj przeszczepu wprowadził do praktyki Verdonk ze wsp. Dzięki przechowywaniu materiału transplantacyjnego w warunkach hodowli tkankowej zachowano żywe fibrochondrocyty łąkotek posiadające zdolności do syntezy elementów macierzy pozakomórkowej. Prace badawcze pozwoliły poznać biologię przeszczepu, mechanizm wgajania się implantu, określono funkcje przeszczepionej łąkotki oraz opisano niepowodzenia. Dzięki tej wiedzy uściślono wskazania do allogennego przeszczepu łąkotki(2,3).

Nadal nie są w pełni znane odległe losy przeszczepionej łąkotki, przemian zachodzącym w przeszczepie, jego starzenia i powstawania ewentualnych zmian zwyrodnieniowych (4).

Zasadniczym elementem budowy łąkotek jest macierz pozakomórkowa, której towarzyszą niezbyt liczne fibrochondrocyty. Jej podstawowym składnikami są białka strukturalne – głównie typ I kolagenu oraz proteoglikany i niewielkie ilości białek wyspecjalizowanych. Zasadniczą rolę w przebudowie i przemianach macierzy pozakomórkowej odgrywają MMP, a wśród nich kolagenaza I (MMP I) dla której substratem jest kolagen I i stromielizyna I (MMP III) której preferowanym substratem są proteoglikany i glikoproteiny macierzy oraz kolagen błony podstawnej. W warunkach fizjologicznych aktywność MMP jest niska i jest hamowana przez tkankowe inhibitory melaoproteinaz(5)

W literaturze brak jest pozycji odnoszących się do ekspresji i aktywności metaloproteina w allogennych przeszczepach łąkotek.

Celem określenie aktywności ekspresji MMP-1 techniką immunohistochemiczną allogennych przeszczepach łąkotki przyśrodkowej stawu kolanowego królika uprzednio przechowywanych przez 2 tygodnie w warunkach hodowli tkankowej w 6 miesięcznym okresie obserwacji co pozwoli na określenie dynamiki przemian macierzy pozakomórkowej i ewentualnych zmian wstecznych

MATERIAL AND METHODS

The study included 13 New Zealand white male rabbits of the same breed, aged 8 months, body weight 3500-5200g. All procedures were carried out with consent of the Local Ethical Committee for Experiments on Animals (NO. Ł/BD/254).

Rabbits were divided into 2 groups:

- Group I – 7 animals with allograft transplantation
- Group II (control) – 6 animals which underwent arthroscopy.

All rabbits were healthy and fit. On the day of surgery the animals were weighed and marked with consecutive numbers on the right ear. Before the procedure fur was removed from the planned site on the left back limb. A venflon was inserted into a marginal ear vein and the rabbits were pre-medicated with dermator in the dose of 0,01 ml/kg b.w. and atropine – 0,05 mg/kg b.w. The total anesthesia was then maintained with intramuscular administration of Bioketan (ketamine) in the dose of 3 mg/kg b.w. Antisedan was administered to wake the animals in the dose of 0,01 ml/kg.

After routine preparation of the surgical site (left knee joint) for aseptic procedure, about 25mm skin incision was performed on medial side. Medial anterior and posterior openings were made in the joint capsule. Lateral patellar dislocation enabled good visualization of the joint. Medial meniscus was excised according to modified Shibuya technique but without cutting the collateral tibial ligament (6). Then, the joint was rinsed with antibiotic and the wound was closed in layers with 3-0 monofilament Dafilon sutures. The animals were administered antibiotic for the next 48 h.

The excised meniscus was placed in tissue culture bottle (Nunk) with Eagle medium (DMEM: Ham F12 (1:1) (Gibco) with the addition of 10% fetal calf serum (Sigma) and 1% penicillin, streptomycin and fungizone (Gibco).

The containers were stored in a thermostat for 15 days, at 37°C, in the atmosphere of 5% CO₂ and 95% of air. Every 3 days the containers and medium were exchanged.

The menisci prepared in this way were implanted into 7 rabbits, taking care that the size of the donor was similar to that of a recipient animal. The medial meniscus was sutured acc. to the modified method described by Sommerlath and Gillquist (7). The implanted meniscus was secured with intercepted suture with non-absorbable 3-0 polypropylene thread (Surgipro). The stitches were placed in the rim of anterior and posterior horn. After opening the knee joint with 1 mm bur drill 2 tunnels were made in tibial bone in the anatomical position of meniscal horns and both sutures were passed using a regular surgical needle. When the meniscus looked balanced and stable the sutures were tied. Additionally 2-3 single sutures were made with 4-0 surgipro to attach the meniscus body in the area of collateral tibial ligament. The joint was closed acc. to earlier described procedure.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto 13 królików białych rasy New Zealand, pochodzących z jednej hodowli płci męskiej, w wieku 8 miesięcy o wadze 3500 – 5200 g po uzyskaniu zgody na badania wydane przez Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach(Numer Ł/BD/254)

Wyróżniono 2 grupy badawcze

- Grupa I obejmująca 7 zwierząt z przeszczepem allogennym
- Grupa II kontrolna 6 zwierzęta u których wykonano artrotomię

Wszystkie zwierzęta były zdrowe i pełnosprawne. W dniu zabiegu zwierzęta warzono oraz oznaczano kolejną cyfrą, markerem umieszczonym na prawym uchu. Przed zabiegiem strzyżono sierść na miejscu planowanego cięcia na tylnej lewej łapie i zakładano venflon do żyły brzeżnej ucha, przez który do premedykacji wstrzykiwano dermator w dawce 0,01 ml/kg masy ciała i 0,05 mg/kg wagi atropiny. W celu podtrzymania znieczulenia podawano domięśniowo Bioketan (ketamina) 3 mg/kg masy ciała. Do wybudzenia używano Antisedan w dawce 0,01 ml/kg.

Po operacyjnym umyciu kończyny i jałowym obłożeniu do lewego stawu kolanowego dochodzono z cięcia skórno-piętowego po stronie przyśrodkowej długości około 25 mm. Torebkę otwierano w dwóch miejscach przyśrodkowo-przednim i przyśrodkowo-tylnym. Boczne zwłoczenie rzepek dawało dobry wgląd do stawu. Łątkę przyśrodkową wycinano według zmodyfikowanej techniki opisanej przez Shibuya'ę ale bez przecinania więzadła pobocznego piszczelowego(6)

Następnie po przepłukaniu antybiotykiem stawu zamknięto warstwowo ranę pooperacyjną przy użyciu monofilamentowej nici Dafilon 3-0. po zabiegu zwierzęta otrzymywały przez dwie doby profilaktycznie antybiotyki.

Pobrany łątkę umieszczano w butelce do hodowli tkankowej (firmy Nunk) zawierająca Eagle medium (DNEM:Ham F12 (1:1) (Gibco) z dodatkiem 10% ciełej surowicy płodowej (Sigma) i 1% penicyliny i streptomycyny oraz fungizone(Gibco)

Pojemniki przez 15 dni przechowywano w cieplarni 37 st C w atmosferze 5%Co2 i 95 %powietrza. Co 3 dni wymieniano butelki i medium.

Tak przygotowane łątki 7 królikom – przeszczep allogenny, starając się by wielkość zwierząt dawcy i biorcy była zbliżona.

Łątkę przyśrodkową wszyszano wg zmodyfikowanej techniki opisanej przez Sommerlath i Gillquista (7)

Na przeszczepianą łątkę zakładano w formie lejców 2 szwy w obrębie rogu przedniego i tylnego z niewchłaniającej nici 3-0 z polipropylenu (Surgipro)po otwarciu stawu kolanowego przy pomocy 1 mm wiertła dentystrycznego wytwarzano 2 kanały w kości piszczelowej w miejscu położenia anatomicznego rogów łątki, przez które prostą igłą bosą przeprowadzano obie nici. Po sprawdzeniu położenia i stabilności łątki nici związywano ze sobą. Dodatkowo zakładano 2-3 pojedyncze

During surgery particular attention was paid to avoid injury of collateral tibial ligament, crucial ligaments and articular cartilage. Antibiotic was administered for prophylactic purposes (Zinacef 10 mg/kg) for 3 days following the surgery. The rabbits were not immobilized but allowed to move freely in standard cages.

After 6 months the animals were euthanized administering a lethal dose of orbital into a marginal ear vein. When the muscles were removed, the joint was opened and the placement, appearance and stability of the meniscus as well as the condition of articular cartilage were assessed. Then, medial meniscus was excised with carefully and placed in a container filled with 10% buffered formalin.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Immunohistochemical reactions were performed on 2 μ m paraffin sections. Then, the sections were deparaffinized in xylene, dehydrated through alcohols and rinsed thoroughly in several changes of distilled water. To regain tissue antigenicity and to open the way for antibodies, the sections were heated in EDTA buffer of pH 9,0 (Dako Cytomation, Target Retrieval Solution) in a microwave at the following power levels: 360 W (2 x 5 min.), 180 W (2 x 5 min.), 90 W (2 x 5 min.). After cooking, the sections were rinsed twice in 0,05 M TRIS buffer (TBS, Dako Cytomation) of pH 7,6 for 5 min. and then incubated for 30 min. in 0,3% solution of hydrogen peroxide (H_2O_2) to block endogenous peroxidase activity. Next, the sections were incubated over-night with primary antibody directed against mouse antigen MMP-1 (Chemicon Int., clone 41-1E5, dilution 1:200). The primary antibodies were diluted in a diluent with background reducing component (Dako Cytomation; Antibody Diluent with Background Reducing Components). Incubation was performed in humid chamber at 4°C. After incubation the sections were rinsed twice in TBS buffer to visualize the reaction antigen-antibody. Visualization system: En Vision + Systems – HRP (Dako Cytomation, Denmark) was used. After incubation of the sections with horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies, an enzymatic reaction was performed using a substrate for peroxidase-3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (DAB). After immunohistochemical reaction cell nuclei were stained with hematoxylin acc. to Meyer (2 min.) and then dehydrated through a series of graded alcohol concentrations, cleared in xylene and coverslipped using DPX glue.

Applying the above described immunohistochemical procedure, the sections in which primary antibody was replaced by TBS buffer were the negative control.

A semiquantitative method was used to evaluate MMP-1 immunoexpression (8). Dependently on the size of the specimens 3 to 7 visual areas magnified 400x were analysed. The intensification of immunoexpression was evaluated according to the following principles:

szwy z surgipro 4-0 przytwierdzające trzon łątki w okolicy więzadła pobocznego piszczelowego. Staw zamknięto wg uprzednio opisanej procedury. W czasie zabiegu zwracano szczególną uwagę, aby nie uszkodzić więzadła pobocznego piszczelowego, więzadeł krzyżowych i chrząstki stawowej. profilaktycznie podawano antybiotyk (Zinacef 10 mg/kg) przez 3 doby. Nie stosowano unieruchomienia gipsowego operowanej kończyny a zwierzęta miały pełną swobodę poruszania się w standardowych klatkach.

Po okresie 6 miesięcy zwierzęta usypiano podając do żyły brzeżnej ucha śmiertelną dawkę Morbitalu. Po oczyszczeniu łapy z mięśni otwierano staw oceniając wygląd, umiejscowienie i stabilność łątki, i stan chrząstki stawowej. Następnie ze szczególną ostrożnością pobierano łątkę przyśrodkową i umieszczano je w pojemniku ze zbuforowaną 10 % formaliną

METODYKA BADAŃ IMMUNOHISTOCHEMICZNYCH

Odczyny immunohistochemiczne przeprowadzono na skrawkach parafinowych o grubości 2 μ m. Po odparafinowaniu w szeregu ksylenów i odwodnieniu w szeregu alkoholi skrawki płukano w kilku zmianach wody destylowanej. W celu odzyskania antygenowości tkanek oraz otwarcia drogi dla przeciwciał skrawki gotowano w buforze EDTA o pH 9,0 (Dako Cytomation, Target Retrieval Solution) w kuchence mikrofalowej przy następujących poziomach mocy 360W (2x5 minut), 180W (2x5minut), 90W (2x5 minutes). Po wystudzeniu, skrawki płukano dwukrotnie w 0,05M buforze TRIS (TBS, Dako Cytomation) o pH 7,6 przez 5 minut i inkubowano przez 30 minut w 0,3% roztworze nadtlenu wodoru (H_2O_2) celem zablokowania aktywności endogennej peroksydazy. Następnie poddano je całonocnej inkubacji z pierwotnym przeciwciałem skierowanymi przeciwko mysiemu antygenowi MMP-1 (Chemicon Int, clone 41-1E5, rozcieńczenie 1:200). Przeciwciała pierwotne rozpuszczono w rozcieńczalniku zawierającym komponentę blokującą tło (Dako Cytomation; Antibody Diluent with Background Reducing Components). Inkubację przeprowadzono w komorze wilgotnej w temperaturze 4°C. Po inkubacji, skrawki dwukrotnie płukano w buforze TBS a następnie, aby uwidocznić reakcje antygen-przeciwciała zastosowano system wizualizacyjny: EnVision+Systems-HRP (DakoCytomation, Denmark). Po inkubacji skrawków z użyciem wtórnych przeciwciał znakowanych peroksydazą chrzanową przeprowadzono reakcję enzymatyczną stosując substrat dla peroksydazy - tetrachlorek 3,3 diaminobenzydyny (DAB). Po zakończeniu reakcji immunohistochemicznej jądra komórkowe podbarwiano hematoksyliną wg. Meyera (2min) a następnie odwadniano w szeregu alkoholi o rosnących stężeniach, przeprowadzono przez szereg ksylenów i zaklejano DPX.

Stosując powyżej opisaną procedurę immunohistochemiczną, kontrolę negatywną stanowiły skrawki, w których pierwotne przeciwciała zastąpiono buforem TBS.

Ocenę nasilenia immunoekspresji MMP-1 wykonano metodą półilościową (8). W zależności od wielkości

- 0 – no immunoeexpression
 1 – low immunoeexpression
 2 – moderate immunoeexpression
 3 – strong immunoeexpression.

Next, arithmetical mean was calculated from all areas for each case.

STATISTICAL ANALYSIS

The results were presented as arithmetical means \pm standard deviation ($X \pm SD$). Non-parametric U Mann-Whitney test was used to estimate the differences between the groups. The accepted level of significance was $p < 0,05$.

RESULTS

The obtained results indicate that MMP-1 immunoeexpression was statistically significantly stronger in the group of meniscal allograft transplantations ($p < 0,001$) than in the menisci of control animals.

wycinków analizowano od 3do 7 pól widzenia pod powiększeniem 400 x. Nasilenie immunoeekspresji oceniano według następujących zasad:

- 0 – brak immunoeekspresji
 1 – słaba immunoeekspresja
 2 – średnia immunoeekspresja
 3 – silna immunoeekspresja

Następnie obliczono średnią arytmetyczną ze wszystkich pól dla każdego przypadku.

ANALIZA STATYSTYCZNA

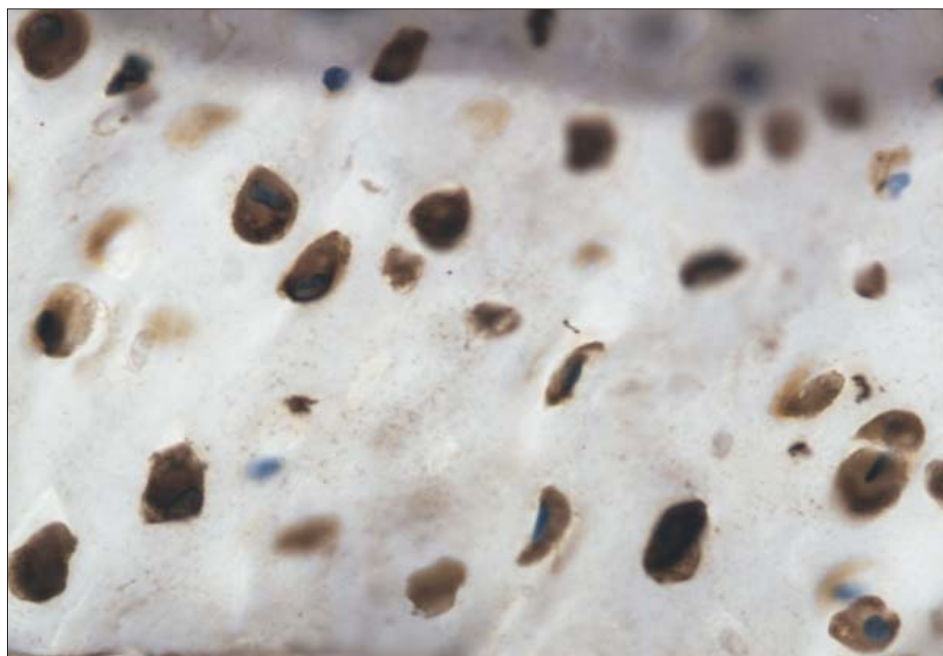
Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm odchylenie standardowe ($X \pm SD$). Do oceny różnic między grupami zastosowano nieparametryczny test U Manna-Whitney'a. Przyjęto poziom istotności $p < 0,05$.

WYNIKI

Uzyskane wyniki wskazują, że immunoeekspresja MMP-1 w grupie przeszczepów łąkotec allogennyh jest istotnie statycznie większa ($p < 0,001$) niż w łąkotecach zwierząt kontrolnych.

Fig. 1. Allograft transplant of medial meniscus - strong immunoeexpression of MMP-1. Magnification 400x.

Ryc. 1. Allogenny przeszczep łąkoci przysrodkowej - silna immunoeekspresja MMP-1. Pow. 400x.



Tab. 1. The values of MMP-1 immunoeexpression in the group of allograft transplants and in control animals (arthrotomy)

| | Allograft transplants n-7 | Control group n-6 |
|------------|---------------------------|-------------------|
| 1 | 1,83 | 0,16 |
| 2 | 2,85 | 0,40 |
| 3 | 2,20 | 0,00 |
| 4 | 2,80 | 0,16 |
| 5 | 2,75 | 0,00 |
| 6 | 2,00 | 0,20 |
| 7 | 1,30 | — |
| X \pm SD | 2.45 \pm 0.58 | 0.15 \pm 0.14 |
| p value | p < 0,001 | |

Tab. 1. Wartości immunoeekspresji MMP-1 w grupie przeszczepów allogennyh i u zwierząt porównawczyh (artrotomia)

| | Przeszczepy allogenne n-7 | Grupa porównawcza n-6 |
|------------|---------------------------|-----------------------|
| 1 | 1,83 | 0,16 |
| 2 | 2,85 | 0,40 |
| 3 | 2,20 | 0,00 |
| 4 | 2,80 | 0,16 |
| 5 | 2,75 | 0,00 |
| 6 | 2,00 | 0,20 |
| 7 | 1,30 | — |
| X \pm SD | 2.45 \pm 0.58 | 0.15 \pm 0.14 |
| Wartość p | p < 0,001 | |

DISCUSSION

The significance of metalloproteinases in extracellular matrix remodeling induced the interest in their role in different areas of orthopedics. Attempts were made to explain their role in intervertebral disk degeneration (9).

Numerous publications have been devoted to various aspects of degenerative changes in knee joint with emphasis on the role of MMPs in the process of matrix degeneration. MMPs became specific markers of degenerative changes in joints. In physiological conditions the level of MMPs expression is low and it is frequently inhibited by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP). However, it increases significantly in the cases of knee joint degenerative changes (4).

Connective tissue cells, including meniscal cells, demonstrate great potential for active proteases synthesis, particularly those from MMP family which affect tissue remodeling. These enzymes are considered to be the basic catalysts of ECM remodeling (5,9,10).

Enzymes from the group of metalloproteinases belong to the suprafamily of zinc proteases which, beside catalytic domain containing zinc ion, have non-catalytic domains. These enzymes are synthesized in non-active form – as the result of activation processes, after disconnection of N-terminal amino group, they transform into active forms (10).

Menisci and hyaline cartilage demonstrate numerous common features and meniscal cells – fibrochondrocytes, as regards phenotype, present features of cartilage chondrocytes and connective tissue fibrocytes. That is why, there are several analogies between hyaline cartilage and menisci. Similar analogies are found between knee menisci, intervertebral discs and mandibular joint menisci composed of fibrous connective tissue.

Collagenase 1 (MMP-1), collagenase 2 (MMP-8), collagenase 3 (MMP-13) and stromelysin (MMP-3) play the most important role, from among 23 metalloproteinases, in cartilage metabolism. Wu et al. determined that most probably MMP-1 and MMP-13 are the most important effectors of type II collagen lysis in cartilage, which is observed in deeper layers of joint cartilage in degenerative changes and which is not observed in natural processes of cartilage ageing (11). Enomoto et al. observed that the addition of VEGF (vascular endothelial growth factor) into a cartilage with degenerative changes intensifies MMP-1 and MMP-3 production (12). Tsuzaki et al. suggested, on the basis of their studies, that MMP-3 degrades small proteoglycans connected with collagen which enables MMP-1 lysis of collagen fibrils (13). Weiler et al., studying vertebral discs, noticed that MMP-1, MMP-2 and MMP-3 activity is significantly higher in older than younger subjects, which suggests that MMPs take part in degradation and resorption of intervertebral disc and probably also of meniscus owing to the same histological structure (9).

DYSKUSJA

Znaczenie metaloproteinaz w przemianach macierzy pozakomórkowej skłoniło do zainteresowania ich rolą w różnych dziedzinach ortopedii min podjęto próby wyjaśnienia ich roli w degeneracji krążka międzykręgowego (9).

Znaczna liczba publikacji poświęcona jest różnym aspektom zmian zwyrodnieniowych stawu kolanowego ze szczególnym podkreśleniem roli MMP w procesie degeneracji macierzy, MMP stają się swoistymi markerami zmian zwyrodnieniowych stawów. W warunkach fizjologicznych ich poziom ekspresji i aktywności jest niski, często hamowany przez tkankowe inhibitory metaloproteinaz, a znacząco wzrasta w przypadkach zmian zwyrodnieniowych stawu kolanowego.

Komórki tkanki łącznej w tym łąkotek posiadają duży potencjał syntetyzujący czynne proteazy, zwłaszcza z rodziny metaloproteinaz (MMP), wpływających na przebudowę tkanki. Enzymy te są uważane za podstawowe katalizatory przemian MPK tkanki łącznej (5, 9).

Enzymy z grupy metaloproteinaz należą do nadrodziny proteaz cynkowych, które oprócz domeny katalitycznej, zawierającej jon cynkowy, posiadają domeny niekataliczne. Enzymy te są syntezowane w postaci nieaktywnej – wskutek procesów aktywacji po odłączeniu N-końcowej grupy aminowej przechodzą w formy czynne (10).

Łąkotki i chrząstka szklista stawowa wykazują liczne cechy wspólne, a komórki łąkotek fibrochondrocyty pod względem fenotypowym posiadają cechy zarówno chondrocytów) chrząstki jak fibrocytów tkanki łącznej. Dlatego pomiędzy chrząstką szklistą i łąkotkami istnieje szereg analogii. Podobne podobieństwa stwierdza się pomiędzy łąkotkami i krążkami międzykręgowymi i łąkotką stawu zuchwowego zbudowanymi z tkanki łącznej włóknistej.

Spośród 23 metaloproteinaz największą rolę w metabolizmie chrząstki odgrywają kolagenoza 1 (MMP-1), kolagenoza 2 (MMP-8), kolagenoza 3 (MMP-13) i stromielizyna (MMP-3). Wu i wsp. określili, że prawdopodobnie MMP-1 i MMP-13 są najważniejszymi efektorami lizy kolagenu typu II w chrząstce, co obserwuje się w głębszych warstwach chrząstki stawowej w zmianach zwyrodnieniowych, czego nie obserwuje się w naturalnych procesach starzenia się chrząstki (11), Enomoto i wsp. stwierdzili, że dodanie VEGF (vascular endothelial growth factor) do chrząstki ze zmianami zwyrodnieniowymi nasila wytwarzanie przez nią MMP-1 i MMP-3 (12). Tsuzaki i wsp. na podstawie swoich badań zasugerowali, że MMP-3 prawdopodobnie degraduje Małe proteoglikany związane z kolagenem, co umożliwia MMP-1 lizę pęczków kolagenu. (13). Weiler i wsp. badając krążki międzykręgowo zauważyli, że aktywność MMP-1, MMP-2, MMP-3 jest zdecydowanie większa u osobników starszych niż młodszych, co sugeruje że MMP uczestniczą w degradacji i resorpcji tkanki krążka międzykręgowego, a prawdopodobnie też łąkotki, z uwagi na te samą budowę histologiczną (9).

Helio le Graverand et al., in the studies on rabbit knee joint, found increased expression of mRNA MMP-13 and MMP-13 alone in synovial membrane, collateral ligament and meniscus after induced anterior crucial ligament injury as a model of knee joint degenerative changes (14).

Takahasi et al., investigating a similar experimental model, observed that MMP-3 plays a significant role in stimulating knee joint degenerative changes (15).

Hsieh et al. noticed that human knee joint arthritis correlates with increased activity of MMP-2 and MMP-9 in collected samples of synovium, cartilage and meniscus (16).

Duer et al., studying human joint cartilage, detected increased gene expression for MMP-2 in the cases of osteoarthritis. Furthermore, they noticed that the activity of MMP-2 in degenerated and normal cartilages is similar. This suggests a significant role of metalloproteinases in the metabolism of not affected cartilage (17).

Similar role of MMP-12 was confirmed by Wang et al. on chemical model of osteoarthritis. They observed increased destruction of cartilage after stimulation of MMP-12 (18).

Extracellular matrix metalloproteinases play a key role in degenerative process of articular cartilage and menisci. Metalloproteinase-9 is synthesized and secreted by macrophages as unstable, inactive pro-MMP-9 which activates under a cascading effect of MMP-13 and MMP-14. pro-MMP-9 can also be activated by MMP-3 which undergoes autocatalytic processing resulting in activation of MMP-9 induced by serine proteases. These two alternative ways of MMP-9 activation are only observed in tissues with degenerative changes, never in normal ones (19).

Moreover, metalloproteinases take part in complex interactions with cytokines and inflammatory process mediators. Qiu et al. observed on experimental model of degenerative changes, the effect of intra-articular administration of hyaluronic acid sodium salt on the level of MMP-3 expression and activity in knee tissues. Hyaluronate decreased MMP-3 expression in cartilage but not in synovial membrane (20).

Lazoya and Flores considered MMP-3 to be an important marker of knee degeneration (21). Bluteau et al., basing on own studies, indicated the major role of MMP-1, MMP-3 and MMP-13 in normal and degenerated menisci. However, the same enzymes are activated in different way in physiological and pathological conditions (22).

Lohmander et al. pointed to the important role of MMP-3 in knee trauma. Its level increases significantly in patients with meniscal tear (23).

Assessing the effect of female hormones on mandibular menisci, Naqui et al. discovered the increase of MMP-1 and MMP-3 activity (24).

MMPs activity is controlled by four tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). Both, MMPs and TIMPs are in balance, disturbance of which results in the increase of MMPs activity (10).

Helio le Graverand i wsp. w badaniach na stawach kolanowych królika stwierdzili wzrost ekspresji mRNA MMP-13 i samej MMP-13 w błonie maziowej, więzadło pobocznym i łąkotce po wyidukowanym uszkodzeniu więzadła krzyżowego przedniego, jako modelu zmian zwyrodnieniowych stawu kolanowego (14).

Takahasi i wsp. badając podobny model doświadczalny stwierdzili, że MMP-3 odgrywa znaczącą rolę w stymulowaniu zmian zwyrodnieniowych stawu kolanowego (15).

Hsieh i wsp. zauważyli, że zmiany zwyrodnieniowe stawu kolanowego u człowieka są skorelowane z podwyższoną aktywnością MMP-2 i MMP-9 w pobranych próbkach maziówki, chrząstki i łąkotki (16).

Duer i wsp. badając ludzka chrząstkę stawowa stwierdzili podwyższoną ekspresję genów dla MMP-2 w przypadkach zwyrodniałej chrząstki. Zauważyli ponadto, że aktywność MMP-2 w chrząstce zwyrodniałej i zdrowej jest podobna. Sugeruje to doniosłą rolę metalloproteinaz w metabolizmie chrząstki nie objętej procesami degeneracyjnymi (17).

Potwierdzono również podobną rolę MMP-12. Wang i wsp. na chemicznym modelu gonartrozy zauważyli większą destrukcję chrząstki po stymulacji MMP-12 (18).

Metalloproteinazy macierzy pozakomórkowej odgrywają kluczową rolę w procesach degeneracyjnych chrząstki stawowej i łąkotek. Metalloproteinaza 9 jest syntezowana i uwalniana przez makrofagi jako niestabilna, nieaktywna forma pro-MMP-9, która pod wpływem działania kaskadowego MMP-13 i MMP-14 ulega aktywacji. Podobny proces jest możliwy na drodze uaktywnienia przez MMP-3, która sama ulega autokatalicznym przekształceniom, poprzez proteazy serynowe uaktywnia MMP-9. Te 2 alternatywne drogi aktywacji MMP-9 obserwuje się tylko w tkankach ze zmianami zwyrodnieniowymi, nigdy z zdrowych tkankach (19).

Ponadto metalloproteinazy biorą udział z złożonych interakcjach cytokinami i mediatorami procesu zapalnego. Qiu wraz ze wsp. obserwowali na modelu doświadczalnym zmian zwyrodnieniowych wpływ dostawowego podania soli sodowej kwasu hialuronowego na poziom ekspresji i aktywności metalloprotein w tkankach kolana. Hialuronian zmniejszał ekspresję MMP-3 w chrząstce, nie zmieniając aktywności tej metalloproteinazy w próbkach błony maziowej (20).

Lozova i Flores podają MMP-3 jako ważniejszy marker zmian zwyrodnieniowych kolana. Bluteau ze wsp. podają na podstawie własnych badań widącą rolę MMP-1, MMP-3 i MMP-13 zarówno w przemianach zdrowej jak i w zmian zwyrodnieniowych łąkotek przy czym te same enzymy są w warunkach fizjologicznych i patologicznych odmienne aktywowane (21).

Z kolei Lohmander i wsp. wskazują na wiodącą rolę MMP-3 w urazach stawu kolanowego której poziom znacznie wzrasta u pacjentów z uszkodzeniem łąkotki (22).

Oceniając wpływ hormonów żeńskich na spoiwość łąkotki stawu zuchwowego Naqui ze wsp. zauważył wzrost aktywności MMP-1 i MMP-3 (23).

So far, there have not been reports on the level of MMP expression in meniscal allografts. Earlier publications did not explain in full long-term outcomes of meniscal allograft transplantation including meniscal extracellular matrix remodeling, ageing and degeneration.

Verdonk et al., in a 10-year follow-up of 100 viable meniscal allografts obtained 70% of successful results and 21 cases of failure (3).

Felix and Paulos reported, basing on arthroscopic studies, 36% of failures connected with shrinkage and tear of grafts (25). Rodeo et al., analysing meniscal and synovial samples in the course of control arthroscopy demonstrated the presence of immunological response epitopes. MMP activity is frequently associated with inflammatory process mediators (26).

Experimental studies of Szomor et al. on sheep, Rijk et al. and Cummings et al. on rabbits, showed protective effect of meniscus in relation to articular cartilage although not full. It could result from structural divergences and graft composition (27,28,29).

Jackson et al., transplanting viable and frozen menisci in goats, detected elevated level of water and uronic acid in transplants suggesting degenerative changes (30).

Own studies based on semiquantitative immunohistochemical analysis demonstrated significantly increased MMP-1 expression in viable allograft transplantations of rabbit knee medial menisci with statistical difference $p < 0,001$ in relation to the control. Increased MMP-1 expression in our studies points to possible degenerative changes in extracellular matrix of meniscal allograft transplants, confirms the observation of Jackson et al. and is a potential possibility of using MMP inhibitors for graft protection.

Aktywność metaloproteinaz jest kontrolowana przez 4 tkankowe inhibitory metaloproteina (TIMP), a MMP i TIMP znajdują się w stanie równowagi. Jej zaburzenie ma wpływ na zwiększenie aktywności metaloproteinaz (10)

Dotychczas brak jest doniesień w piśmiennictwie nt poziomu ekspresji i aktywności MMP w allogennych przeszczepach łąkotek, a wcześniejsze publikacje nie w pełni wyjaśniały odległe losy transplantu, w tym przemian macierzy pozakomórkowej łąkotek, ich starzenia i ewentualnego zwyrodnienia, choć niektóre z nich sugerowały takie możliwości.

Verdonk i wsp w 10 letnim okresie obserwacji 100 przeszczepianych żywych łąkotek uzyskali 70 procent wyników dobrych przy 21 przypadkach niepowodzeń (3).

Obserwacje Felix i Paulosa oparte na badaniach artroskopowych pokazują częste (36 %) niepowodzeń związane obkurczaniem się graftów i następnie ich uszkodzeniem (25). Z kolei Rodeo i wsp analizując próbki łąkotek i maziówki w trakcie kontrolnej artroskopii wykazali obecność epitopów komórek odpowiedzi immunologicznej, aktywność MMP często jest powiązana z mediatorami procesu zapalnego (26).

Badania doświadczalne Szomora i wsp na owcach, Rijka i wsp oraz Cummingsa i wsp na królikach wykazały efekt ochronny łąkotki w stosunku do chrząstki stawowej, choć nie pełny, mogący wynikać z pewnych odmienności budowy i składu przeszczepu (27,28,29).

Jackson i wsp. przeszczepiając świeże i mrożone łąkotki u kóz wykrył zwiększoną zawartość wody i kwasu uronowego w przeszczepach, sugerujące zmiany zwyrodnieniowe (30).

Własne badania oparte na półilościowej analizie immunohistochemicznej (8) wykazały znacznie podwyższone ekspresje MMP1 w allogennych żywych przeszczepach łąkotki przyśrodkowej stawu kolanowego królika z różnicą statystyczną $p < 0,001$ w stosunku do kontroli. Zwiększona ekspresja MMP-1 w naszych badaniach wskazuje na możliwość przemian degeneracyjnych macierzy pozakomórkowej allogennych przeszczepów łąkotek i potwierdza obserwacji Jacksona i wsp. oraz stanowi potencjalne możliwości zastosowania inhibitorów MMP celem ochrony graftu.

References/Piśmiennictwo:

- Rijk P.C.: Meniscal allograft transplantation- paart I: background, results, graft selection and preservation and surgical consideration. *Arthroscopy* 2004;20(7): 728-743.
- Veltri D.M., Warren R.F., Wickiewicz T.L., O'Brien S.J.: Current Status of allograft meniscal transplantation. *Clin Orthop Related Res* 1994; 303: 44-55
- Verdonk P.C.V., Demurie A., Almqvist K.F., Veys E.M., Verbruggen G., Verdonk R.: Transplantation of viable meniscal allografts. Survivorship analysis and clinical outcome of one hundred cases. *J. Bone Jt Surg.* 2005; 87-A(4): 715- 724
- Hervig J., Egner E., Buddecke E.: Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. *Ann Rheumatic Disease.* 1984;43:635-640.
- Liotta L.A.: Tumor invasion and metastases- role of the extracellular matrix. *Cancer Res* 1986;46: 1-7
- Shibuya S.: Meniscal Transplantation using a cryopreserved allograft. Histological and ultrastructural study of the transplanted meniscus. *J Orthop Sci* 1999;4 ; 135-141
- Sommerlath K., Gillquist J.: The effect of an Artificial meniscus substitute in a knee joint with resected anterior cruciate ligament. An experimental study in rabbits. *Clin Orthop Related Res* 1993; 289: 276-284
- Ball S.T., Goomer R.S., Ostrander R.V., Tontz W.L., Williams S.K., Amiel D.: Preincubation of tissue engineered constructs enhances donor cell retention. *Clin orthop* 2004; 420: 276-285.
- Weiler C., Nerlich A.G., Zipperer J., Bachmeier B.E.: Expression of major matrix metalloproteinase in associated with intervertebral disc degeneration and resorption. *Eur Spine J.* 2002; 11: 308-32
- Nagase H., Visse R. : structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* 2006; 69: 562-573.
- Wu W., Billinghurst R.C., Pidoux I., Antoniou J., Zukor D., Tancer M., Poole A.R.: Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in ageing and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13. *Arthritis Rheum.* 2002; 46: 2087-2094
- Enomoto H., Inoki I., Komiya K., Shiomi T., Ikeda E., Ohichi E., Matsumoto E., Toyama Y., Okada Y.: Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage. *Am. J. Pathol.* 2003; 162: 171-181
- Tsuzaki M., Guyton G., Garret W., Archambault J.M., Herzog W., Almelingers L., Bynum D., Yang X., Banejo A.J.: Il-1 beta induced COX2, MMP-1,3 and 13, ADAMTS-4, Il-1 beta and Il-6 in human tendon cells. *J. Orthop. Res.* 2003; 21: 256-264
- Hellio Le Graverand M.P., Eggerer J., Sciore P., Reno C., Vignon E., Otterness I., Hart D.A.: Matrix metalloproteinase-13 expression in rabbits knee joint connective tissues: influence of maturation and response to injury. *Matrix Biol.* 2000; 19 (5): 431-441.
- Takahashi K., Goomer R.S., Harwood F., Kubo T., Hirasawa Y., Amiel D. : The effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase -3 (MMP-3) interleukin - 1 beta (Il-1beta) and tissue inhibitor of metalloproteinase -1 (TIMP-1) gene expression during the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999; 7 (2): 182- 190
- Hsieh Y.S., Yang S.F., Chu S.C., Chen P.N., Chou M.C., Hsu M.C., Lu K.H. : Expression changes of gelatinases in human osteoarthritic knee and arthroscopic debridement. *Arthroscopy* 2004; 20 (5): 482- 488
- Duerr S., Stremme S., Soeder S., Bau B., Aigner T.: MMP-2/ gelatinase A is a product of human adult articular chondrocytes and is increased in osteoarthritic cartilage. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2004; 22 (5): 603-608
- Wang X., Liang J., Koike T, Sun H., Ichikawa T., Kitajima S., Morimoto M., Shikama H., Watanabe T., Sasaguri Y., Fan J.: Overexpression of human matrix metalloproteinase -12 enhances the development of inflammatory arthritis in transgenic rabbits. *Am.J. pathol.* 2004; 165 (4): 1375-1383
- Dreier R., Grassel S., Fuchs S., Schaumburger J., Bruckner P.: Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or MT1-MMP/MMP-13 cascade. *Exp Cell Res.* 2004; 297 (2): 303- 312
- Qiu B., Liu S.Q., Peng H., Wang H.B.: The effects of sodium hyaluronate on mRNA expression of matrix metalloproteinase -1, -3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in cartilage and synovium of traumatic osteoarthritis model. *Chin. J. Traumat.* 2005; 8 (10): 8-12
- Lozoya K.A., Flores J.B.: A novel rat osteoarthritis model to assess apoptosis and matrix degradation. *Pathol. Res. Pract.* 2000; 196 (11): 729-745
- Bluteau G., Conrozier T., Mathieu P., Vignon F., Herbage D., Mallcin- Gerin F.: Matrix metalloproteinase-1,-3,-13 and aggrecanase-1 and -2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis. *Biochim. Biophys. Acta* 200; 1526 92): 147-158
- Lohmander L.S., Atley L.M., Pietka T.A., Eyre D.R.: The release of crosslinked peptides from type II collagen in human synovial fluid is increased soon after joint injury and in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2003; 48 (11): 3130-3139
- Naqui T., Duong T.T., Hashem G., Shiga M., Zhang Q., Kapila S.: Raloxin's induction of metalloproteinases is associated with the loss of collagen and glycoaminoglycans in synovial joint fibrocartilaginous explants. *Arthritis Res. Ther.* 2005; 7 (1): R1- R11
- Felix N.A., Paulos L.E.: Current status of meniscal transplantation. *Knee* 2003; 10: 13-17
- Rodeo S.A., Senerviratne A., Suzuki K., Felker K., Wickiewicz T.L., Warren R.F.: Histological analysis of human meniscal allografts. A preliminary report. *J Bone Jt Surg* 2000; 82-A (8): 1071-1082.
- Szomor Z.L., Martin T.E., Bonar F., Murtell G.A.C.: The protective effects of meniscal transplantation on cartilage. An experimental study in sheep. *J Bone Jt Surg* 2000; 82-A (1): 80-88.
- Rijk P.C., Tigchelaar-Gutter W., Bernoski F.P., Van Noorden C.J.F.: Histologic changes in articular cartilage after medial meniscus replacement in rabbits *Arthroscopy* 2004; 20 (9): 911-917.
- Cummins J.F., Mansour J.N., Howe Z., Allan D.G.: Meniscal transplantation and degenerative articular changes ; an experimental study in the rabbits *Arthroscopy* 1997; 13(4): 485-491.
- Jackson D.W., McDewitt C.A., Simon T.M., Arnoczky S.P., Atwell E.A., Silvino M.J.: Meniscal transplantation using fresh and cryopreserved allografts. An experimental study in goats *Am J Sports Med* 1992; 20 : 644-656