



Histological analysis of autologous chondrocyte implants

Ocena histologiczna przeszczepów autologicznych chondrocytów

© J ORTHOP TRAUMA SURG REL RES 3 (19) 2010

Review article/Artykuł poglądowy

TADEUSZ S. GAŹDZIK, JULIUSZ DEC

Katedra Fizjoterapii Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Sportklinika Żory

Address for correspondence/Adres do korespondencji:

Katedra Fizjoterapii Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
ul. Medyków 12, 40-752 Katowice
tel. (032) 2088712; e-mail: gazdzik@wp.pl

Statistic/Statystyka

Word count/Liczba słów	806/760
Tables/Tabele	0
Figures/Ryciny	1
References/Piśmiennictwo	10

Received: 07.05.2010

Accepted: 04.07.2010

Published: 30.07.2010

The study was supported by N N403 184034 grant

Praca została wykonana w ramach grantu N N403 184034

Summary

The aim of the study was to assess regeneration of hyaline cartilage femoral condylar articular surface lesions after cultured autologous chondrocytes implantation. 42 implantations of autologous chondrocytes were performed. In 5 patients, 15-30 months after the first surgery, repeat knee arthroscopy was performed. During the repeat arthroscopy a microbiopsy from articular surface was taken and histopathologic analysis was performed. In all cases lesion healing was observed and the general appearance as well as cartilage resilience did not differ from the surrounding tissues. In 4 patients the lesion was filled with hyaline-like cartilage while in 1 patient the lesion was filled with hyaline and fibro-hyaline cartilage.

Key words: chondrocyte, implant

Streszczenie

Celem pracy była ocena regeneracji ubytków chrząstki szklistej kłykci kości udowej po przeszczepie hodowanych autologicznych chondrocytów. Wykonano 42 przeszczepy autologicznych chondrocytów. U 5 chorych po upływie 15-30 miesięcy od pierwszego zabiegu operacyjnego przeprowadzono powtórny artroskopię stawu kolanowego. W jej trakcie pobrano mikrobiopat z powierzchni stawowej i wykonano badanie histopatologiczne. We wszystkich przypadkach zaobserwowano wygojenie ubytku, którego wygląd i sprężystość nie różniły się od otaczających tkanek. U 4 chorych wypełniała go chrząstka podobna do szklistej a u 1 chrząstka szklista i włóknisto-szklista.

Słowa kluczowe: chondrocyty, przeszczep

Articular cartilage is a highly specialized type of connective tissue that is neither vascularized nor innervated. It is composed of small number of separately arranged chondrocytes (constituting 1-5% of tissue volume) that produce extracellular matrix. If the articular cartilage is damaged due to injury or inflammatory processes it is never fully regenerated and the lesion is usually filled with fibrocartilage that is characterized with much poorer biomechanical properties than normal cartilage. The described mechanism leads to rapid development of articular degeneration (1).

One of the modern treatment methods for focal articular cartilage damage is cultured autologous chondrocytes implantation. *In vitro* culture of chondrocytes gives the possibility to generate optimal conditions for fast articular cartilage lesion repair.

The aim of the study was to analyze the structure of articular cartilage in cultured autologous chondrocytes implantation site.

MATERIALS

The implantations of autologous chondrocytes cultured in Regional Blood Center Tissue Bank in Katowice were performed in 42 patients with femoral condylar articular surface lesion. Only 5 patients needed repeat surgery that allows taking a microbiopsy from cultured autologous chondrocytes implantation site. Repeat surgery was not performed due to pathologies in cultured autologous chondrocytes implantation site.

The study was performed on the material obtained from 2 females and 3 males aged from 27 to 48 years. The size of femoral condylar articular surface lesion was 1-2 cm². Repeat surgery was performed 15-30 months after chondrocytes implantation. During the surgery hyaline cartilage microbiopsy from femoral autologous chondrocytes implantation site was taken. After fixing in formalin, the slides were stained with hematoxylin-eosin and Masson's stain according to ICRS Histology Endpoint Committee recommendations (2). To assess articular cartilage ICRS (2) and OsScore (3) scales were used.

RESULTS

During repeat arthroscopy no differences in the appearance of chondrocytes implantation site in comparison to the surrounding healthy tissue were observed. Arthroscopic probing did not reveal cartilage separation in the site of implantation. The cartilage resilience was similar to that of surrounding tissue. Histopathologic analysis of microbiopsies taken from the implantation site have shown hyaline-like cartilage (resembling normal cartilage) in 4 patients and hyaline-like cartilage with fibrocartilage in 1 patient (Fig. 1). OsScore analysis gave the following results: 2 patients - 10 points, 2 patients - 9 points and one patient - 8 points. Similar results were obtained using ICRS scale.

Chrząstka stawowa jest wysoce wyspecjalizowanym rodzajem tkanki łącznej, który pozbawiony jest ukrwienia i unerwienia. Budując ją nieliczne chondrocyty, stanowiące 1-5 % jej objętości produkują macierz zewnątrzkomórkową i nie kontaktują się ze sobą. Po uszkodzeniu chrząstki stawowej w wyniku urazu lub procesów zapalnych nigdy nie dochodzi do jej pełnej regeneracji a ubytek zazwyczaj wypełniany zostaje tkanką włóknisto-chrzęstną charakteryzującą się o wiele gorszymi właściwościami biomechanicznymi. Prowadzi to do szybkiego rozwoju zmian zwyrodnieniowych [1].

Jednym z nowoczesnych sposobów leczenia ogniskowych uszkodzeń chrząstki stawowej jest przeszczepianie hodowanych autologicznych chondrocytów. Ich namnożenie w warunkach *in vitro* ma na celu stworzenie optymalnych warunków umożliwiających szybkie gojenie się ubytku powierzchni stawowej.

Celem naszej pracy była ocena struktury chrząstki stawowej w miejscu gdzie uprzednio przeszczepiono autologiczne chondrocyty.

MATERIAŁ

Przeszczepy autologicznych chondrocytów, wyhodowanych w Banku Tkanek Regionalnego Centrum Krwiotdawstwa w Katowicach, wykonane zostały u 42 chorych z ubytkami powierzchni stawowej kłykcia kości udowej. Jedynie u 5 leczonych zaistniała konieczność przeprowadzenia powtórnego zabiegu operacyjnego, co umożliwiło pobranie mikrobiopatu chrząstki w miejscu przeszczepu. Powtórny zabieg operacyjny nigdy nie był wykonywany z powodu patologii w miejscu przeszczepionych chondrocytów.

Badania zostały wykonane u 2 kobiet i 3 mężczyzn w wieku od 27 do 48 lat. Wielkość ubytku chrząstki powierzchni stawowej kłykcia kości udowej wynosiła 1-2 cm². Powtórny zabieg operacyjny przeprowadzono po upływie 15-30 miesięcy od przeszczepu chondrocytów. W jego trakcie pobrano mikrobiopsję chrząstki szklistej z miejsca przeszczepu autologicznych chondrocytów. Po utrwaleniu w formalinie skrawki materiału barwiono hematoksyliną-eozyną oraz metodą Massona co zaleca ICRS Histology Endpoint Committee [2]. Dla oceny chrząstki stawowej posłużono się skalami ICRS [2] i OsScore [3].

WYNIKI

W czasie powtórnego badania artroskopowego nie zaobserwowano różnic w wyglądzie pomiędzy miejscem wykonanego przeszczepu chondrocytów, a otaczającą go zdrową chrząstką. Podczas oceny próbnikiem chrząstka w miejscu przeszczepu nie oddzielała się od sąsiadujących tkanek i posiadała podobną do nich sprężystość. W badaniu histopatologicznym mikrobiopiatów pobranych z miejsca przeszczepu zaobserwowano podobną do prawidłowej chrząstkę szklistą u 4 chorych oraz chrząstkę podobną do szklistej i chrzęstno-włóknistą u 1 chorego (Ryc. 1). W skali OsScore w 2 przypadkach uzyska-

There are two ways to induce reparation of articular cartilage: chondrocyte metabolism stimulation or implantation of cells able to repair the damaged tissue. To achieve that goal arthroscopic drilling or microfractures of the damaged articular surfaces are performed. Next, bone marrow is implanted to the prepared surfaces. Unfortunately, this type of surgery leads to the generation of fibrocartilage that improves clinical state for approximately 4 years. The results of periosteum and perichondrium implantation with bone marrow cavity opening are not always satisfactory, because the graft calcification is observed. In case of mosaicplasty or osteochondral grafting good clinical results are usually maintained up to 5 years. This is why in selected group of patients with articular surface damage cultured autologous chondrocytes implantations seems to be a promising solution (4).

In physiological conditions chondrocytes exist in G0 phase of cell cycle. After their isolation during cell culture the chondrocytes enter cell cycle again. Owing to that the cells grow forming monolayer cell culture. However, the cells differentiate during the culture. Initially round cells become flat and discoid, similar to fibroblasts. Moreover, the cells start to produce embryonic markers and type I collagen instead of typical for articular cartilage type II collagen (4, 5, 6).

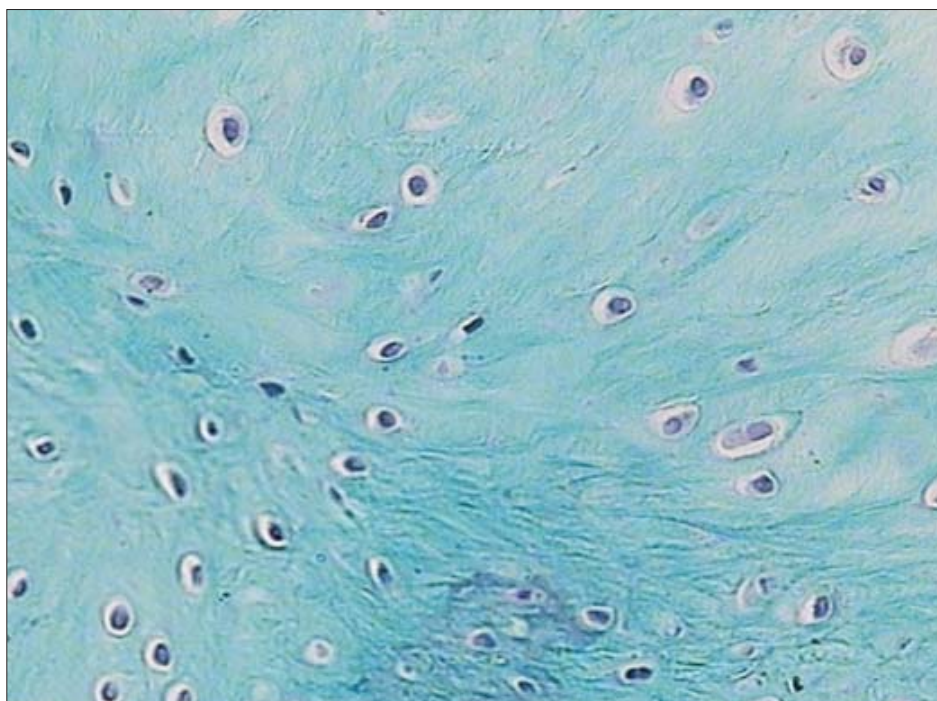
no wynik 10, w dwóch 9 a w jednym 8. Podobne rezultaty otrzymano w skali ICRS.

Aby doprowadzić do odbudowy chrząstki stawowej należy pobudzić metabolizm chondrocytów lub dostarczyć do uszkodzonego miejsca komórki, które posiadają zdolności do odbudowy uszkodzonej tkanki. W tym celu wykonuje się nawiercanie lub mikrozłamania uszkodzonych powierzchni stawowych oraz miejscowo podaje się szpik kostny. Niestety po tego typu operacjach w miejscu uszkodzenia pojawia się tkanka włóknisto-chrząstna, co umożliwia uzyskanie poprawy stanu klinicznego stawu przez około 4 lata. Wyniki po przeszczepach okostnej i ochrząstnej połączonych z otwarciem jamy szpikowej nie zawsze są zadowalające, bowiem dochodzi do wapnienia przeszczepu. W przypadku plastyki mozaikowej lub przeszczepów kostno-chrząstnych dobre wyniki kliniczne utrzymują się zwykle do 5 lat. Dlatego w niektórych uszkodzeniach powierzchni stawowej obiecującym rozwiązaniem wydaje się stosowanie przeszczepów hodowanych autologicznych chondrocytów [4].

Chondrocyty w warunkach fizjologicznych pozostają w fazie G0. Po ich izolacji w czasie hodowli ponownie wchodzi w cykl przemian komórkowych. Pozwala to na ich wzrost w postaci jednowarstwowej kultury tkankowej. W czasie hodowli ulegają one jednak odróżnianiu. Morfologicznie z okrągłych stają się płaskie i dyskowate, co upodabnia je do fibroblastów. Ponadto zaczynają produkować kolagen typu I a nie typowy dla chrząstki stawowej kolagen typu II oraz markery embryonalne [4, 5, 6].

Fig. 1. Histopathologic analysis of biopsy specimens taken from cultured autologous chondrocytes implantation site 30 days after the surgery. Masson's staining

Ryc. 1. Badanie histopatologiczne biopsatu pobranego w miejscu przeszczepu hodowanych autologicznych chondrocytów po upływie 30 miesięcy od operacji. Barwienie metodą Massona



After the implantation of cultured autologous chondrocytes into the articular cavity the cells should again differentiate into normal articular cartilage chondrocytes. The process is induced by periosteum that was initially used to fill articular surface lesions. Nowadays it is considered that collagen scaffolds possess similar properties. Cultured autologous chondrocytes adhere to the bone and cartilage in close proximity to the site of implantation and the tissues induce cells differentiation into normal cartilage chondrocytes [7, 8, 9].

Layered structure of the articular cartilage is a major problem for the process of chondrocytes taking. The surface layer consists of flat, discoid cells producing proteoglycans, middle layer consists of chondrocytes producing type II collagen, aggrecan and characteristic proteins while deep layer consists of cells producing type X collagen and alkaline phosphatase. Moreover, the cells obtained from various cartilage layers differ phenotypically. Hence, the determination of the most suitable type of cultured cells is essential to assure the desired course of regeneration processes.

We realize that the presented study material is not large; however, the patients with good clinical results of cultured autologous chondrocytes implantation did not require repeat surgery. Other authors presented histopathologic analysis of cartilage biopsy materials obtained from 46 patients. In this study, hyaline-like cartilage was found in 80% of cases (10). Nevertheless, the authors did not assess remodeling of implanted autologous chondrocytes on the tissue glue.

Po wszczepieniu hodowanych autologicznych chondrocytów do jamy stawowej powinny one ulec ponownie zróżnicowaniu do prawidłowych komórek chrząstki stawowej. Proces ten jest indukowany przez okostną, którą początkowo zamykano ubytki powierzchni stawowej. Obecnie uważa się, że podobne własności mają nośniki zbudowane z kolagenu. Hodowane autologiczne chondrocyty przyklejają się do sąsiadującej z miejscem przeszczepu kości i chrząstki, które ukierunkowują ich dalszy rozwój do prawidłowych komórek chrzęstnych [7, 8, 9].

Istotny problem w czasie pobierania chondrocytów do hodowli stwarza warstwowa budowa chrząstki stawowej. W warstwie powierzchniowej znajdują się płaskie, dyskowate komórki wytwarzające proteoglikany, w warstwie środkowej chondrocyty produkują kolagen typu II, agrekan oraz charakterystyczne dla tej warstwy białka, w warstwie głębokiej wytwarzany jest kolagen typu X i fosfataza zasadowa. Ponadto komórki pobrane z różnych warstw chrząstki różnią się fenotypowo. Z tego powodu dla zapewnienia prawidłowego przebiegu procesu regeneracji istotne było by określenie, które z nich są najbardziej odpowiednie do hodowli [10].

Zdajemy sobie sprawę, że prezentowany przez nas materiał badawczy nie jest zbyt liczny, lecz u chorych, u których uzyskano dobry wynik kliniczny po zastosowaniu przeszczepu hodowanych autologicznych chondrocytów nie było wskazań do wykonania powtórnego zabiegu operacyjnego. Inni autorzy badania histopatologiczne biopatów chrząstki po przeszczepie chondrocytów wykonali u 46 chorych. W 80% przypadków stwierdzili obecność tkanki podobnej do chrząstki szklistej [10]. Nie oceniali oni jednak przebudowy przeszczepianych autologicznych chondrocytów osadzanych w kleju tkankowym.

References/Piśmiennictwo:

1. Mow VC, Atesian GA, Spilker R: *Biomechanics of diarthrodial joints: a review of twenty years of progress*. *J Biomech Eng* 1993; 115: 460-467.
2. Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M i wsp.: *Histological assessment of cartilage repair: A report by the histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS)*. *J Bone Jt Surg* 2003; 85-A: 45-57.
3. Roberts S, McCall IW, Darby AJ i wsp.: *Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology*. *Arthritis Research and Therapy* 2003; 5: R60-R73.
4. Temenoff JS, Mikos AG: *Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage*. *Biomaterials* 2000; 21: 431-440.
5. Schnabel M, Marlovitis S i wsp.: *Differentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture*. *Osteoarthritis. Cartilage* 2002; 10: 62-70.
6. Richardson JB, Caterson B: *Repair of human articular cartilage after implantation of autologous chondrocytes*. *J Bone Jt Surg* 1999; 81: 1064-1068.
7. Brittberg M, Nilsson M i wsp.: *Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes*. *Clin Orthop* 1996; 326: 270-283.
8. Haddo O, Mahroof S i wsp.: *The use of chondrogide membrane in autologous chondrocyte implantation*. *Knee* 2004; 11: 51-55.
9. Wang H, Kandel RA: *Chondrocytes attach to hyaline or calcified cartilage and bone*. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: 56-64.
10. Peterson L: *ACI surgical technique and results at 2-10 years. (w) Basic science, clinical repair and reconstruction of articular cartilage defects: current status and prospects (pod red) Zanasi S, Brittberg M, Marcasi M. Timeo, Bologna, 2006*.