

AUTOPRZESZCZEP WIÓR CHRZĘSTNO-KOSTNYCH Z WY- KORZYSTANIEM KOLAGENOWEJ BŁONY ZAPOROWEJ – BADANIA PILOTAŻOWE NAD GOJENIEM UBYTKÓW CHRZĄSTKI STAWOWEJ

EWA KARUGA*, BOGUSŁAWA ŻYWICKA, STANISŁAW PIELKA

AKADEMIA MEDYCZNA IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU,
ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW
UL. Ks. J. PONIATOWSKIEGO 2, 50-326 WROCŁAW, POLSKA
*MAILTO: EKARUGA@HOTMAIL.COM

Streszczenie

Urazy chrząstki stawowej stanowią trudny problem terapeutyczny. Poznanie budowy oraz fizjologii chrząstki pozwala zrozumieć jej funkcję oraz patomechanizm odpowiedzialny za jej niszczenie w przebiegu urazów, chorób zwyrodnieniowych oraz chorób autoimmunologicznych. Aktualnie badania nad gojeniem uszkodzeń chrząstki stawowej koncentrują się na inżynierii tkankowej, modyfikacji metod chirurgicznych oraz wykorzystaniu biomateriałów.

Badania pilotażowe przeprowadzone w Zakładzie Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów miały na celu sprawdzenie możliwości odbudowy uszkodzonej chrząstki stawowej z zastosowaniem autoprzeszczepu wiór chrzęstno-kostnych i dwuwarstwowej błony kolagenowej.

Wstępne badania w 8 i 10 tygodniu nad autoprzeszczepem wiór chrzęstno-kostnych wykazywały przewagę procesów regeneracyjnych nad reparacyjnymi.

Słowa kluczowe: procesy reparacji i regeneracji chrząstki, ubytek chrząstki stawowej, wióry chrzęstno-kostne, błona kolagenowa

[Inżynieria Biomateriałów, 99101, (2010), 76-79]

Wprowadzenie

Dane literaturowe jak i kliniczna praktyka wykazały że ubytki chrząstki stawowej ograniczające się jedynie do warstwy nieunaczynionej chrząstki nie ulegają procesowi reparaacji z uwagi na brak wystąpienia krwawienia. Uszkodzenia penetrujące do unaczynionej kości podchrzęstnej powodują powstanie krwawienia i w konsekwencji dobrotycznego skrzepu, który staje się rusztowaniem dla nowopowstającej tkanki. Tkanka wypełniająca ubytek to włóknista bliznowata tkanka łączna lub szklitopodobna o innych parametrach wytrzymałościowych niż oczekiwane.

W odróżnieniu do przeszczepów chrząstki, przeszczepy kości wykonywane są z powodzeniem. Jest to możliwe ponieważ kość ma własne naczynia krwionośne i uzyskuje ukrwienie od otaczających tkanek przez co może wgoić się w miejscu biorczym.

Od lat prowadzone badania nad autoprzeszczepem chrząstki. W większości badania te kończą się niepowodzeniem z uwagi na wykorzystanie w przeszczepie jedynie warstwy chrząstki stawowej która z czasem ulega martwicy. W badaniu wykorzystano wióry chrzęstno-kostne, zawierające fragmenty kości, które mogą uzyskać unaczynienie

AUTOTRANSPLANTATION OF CARTILAGE-BONE CHIPS USING A COLLAGEN BARRIER MEMBRANE - A PILOT STUDY OF CARTILAGE DEFECTS HEALING

EWA KARUGA*, BOGUSŁAWA ŻYWICKA, STANISŁAW PIELKA

WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY, DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL
SURGERY AND BIOMATERIALS RESEARCH
2 J.PONIATOWSKIEGO STR., 50-326 WROCLAW, POLAND
MAILTO: EKARUGA@HOTMAIL.COM

Abstract

Articular cartilage injuries are a difficult therapeutic problem. Acquiring the knowledge of the structure and physiology of cartilage is a key to understanding its function and the pathogenesis responsible for its destruction in the course of injury, degenerative diseases and autoimmune disorders. Currently, research on the articular cartilage healing focus on tissue engineering, modification of surgical methods and the use of biomaterials.

Pilot studies conducted at the Department of Experimental Surgery and Biomaterials Research aimed to explore the possibilities of rebuilding the damaged cartilage using autograft cartilage-bone chips and double-layer collagen membrane.

Preliminary studies in 8 and 10 week of observation showed superiority over reparative regenerative processes.

Keywords: reparations processes and regeneration of cartilage, cartilage damage, cartilage-bone chips, articular cartilage, collagen membrane

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 76-79]

Introduction

Literature data and clinical practice have shown that articular cartilage lesions confined only to the layer of cartilage disable of blood vessels are not able to start the repair process because of the lack of bleeding. Damage penetrating to the vascular subchondral bone may give rise to bleeding and, consequently, beneficial blood clot, which becomes a scaffold for the newly-tissue. Tissue filling the defect is fibrous scar tissue, or hyaline-like tissue with other biomechanical properties than expected.

In contrast to transplants of cartilage, bone transplants are performed successfully. This is possible because the bone has its own blood vessels and blood supply is obtained from the surrounding tissues and thus transplant will be able to ingrow in deposit place.

For years, studies cartilage transplantation are conducted. In most of these tests fail because of using only a layer of cartilage which frequently became necrotic. The study used cartilage-bone chips containing bone fragments, which can get a vascularisation from exposed subchondral bone at this point, and thus ensure the nourishment and survival of cartilage fragments. A collagen membrane, which was used in the study, had to prevent the movement of deposits chips and was developed to stabilize the clot rich in recruited

w miejscu biórczym od odsłoniętej w tym miejscu kości, a tym samym zapewnić odżywianie i przeżycie fragmentem znajdującą się na niej chrząstki. Wykorzystana w badaniu błona kolagenowa miała na celu zapobieganie przemieszczaniu się zdeponowanych w miejsce ubytku wiór oraz miała stabilizować powstały skrzep bogaty w rekrutowane ze szpiku kostnego komórki pluripotencjalne.

Cel

Badania miały na celu sprawdzenie możliwości wgojenia wiór chrzęstno-kostnych zaopatrzonych błoną kolagenową w ubytek chrząstki stawowej.

W projekcie wykorzystano zmodyfikowaną metodę chirurgicznego zaopatrywania ubytku, łącząc ją z wykorzystaniem błony zaporowej.

Materiał i metody badań

Badania doświadczalne przeprowadzono na królikach rasy Nowozelandzkiej.

I Lokalna Komisja Etyczna ds. Doświadczeń na Zwierzętach uznała wszystkie zaplanowane w ramach tego projektu badania na zwierzętach za dopuszczalne.

Operacje

Króliki znieczulano podając domięśniowo Ksylazynę w dawce 5mg / kg.m.c. (preparat: Rometar 2%, Spofa, Praha, Czechy) oraz Ketaminę w dawce 15mg / kg.m.c. (preparat: Bioketan, Vetoquinol Biovet S..A, Francja).

Po uzyskaniu pełnej analgezji otworzono lewy staw kolanowy. Ubytek o powierzchni około 5x2 mm wykonywano na kłycku przyśrodkowym nasady dalszej kości udowej. (RYC.1) Ubytek penetrował do kości podchrzęstnej co wyznaczano krwawieniem z podłoża ubytku.

W warunkach aseptycznych rozdrobiono pobrany z ubytku materiał, aż do uzyskania postaci wiór. Kolejnym etapem było wykonanie autoprzeszczepu pozyskanych wiór w miejsce ubytku. Autoprzeszczep został przykryty błoną kolagenową OsseoGuard (prod.Biomed 3i USA)(RYC.2), którą przymocowano do powierzchni chrząstki za pomocą szwów wchłanianych oraz resorbowalnych pinów (Resor-Pin, prod. Geistlich, Switzerland). Torebkę stawową zamykano pojedynczym szwem nićmi wchłaniającymi Dexon 3-0 (prod. Syneture, UK), a skórę szwami niewchłaniającymi Amifil M (prod. SIMPO, Polska). W kończynie prawej w analogiczny sposób przeprowadzono otwarcie stawu i wykonanie w nim ubytku który pozostawiano bez zaopatrzenia – kontrola. Po operacji królikom nie stabilizowano stawów kolanowych.



RYC.1. ubytek penetrujący do kości podchrzęstnej
FIG.1. Lesion penetrated to the subchondral bone

from bone marrow pluripotent cells.

Objective

The study aimed to explore the possibilities of cartilage-bone chips ingrowing in articular cartilage defect using collagen membrane. The project used a modified surgical method of cartilage defect treatment and combining it with the use of barrier collagen membrane.

Materials and methods

Experimental studies conducted on White New Zealand rabbits. The Local Ethical Commission to Animal found all planned animal tests to be admissible.

Surgical procedures

Rabbits were anesthetized by intramuscular administration of Xylazine in dose of 5mg / kg.mc (Rometar 2% Spofa, Praha, Czech Republic) and Ketamine at a dose of 15mg / kg.mc (Bioketan, Vétouinol Biovet S. A, France).

After obtaining full analgesia the left knee joint were opened. Lesion of approximately 5x2 mm were performed on the medial condylus of femur. (FIG.1) Defect penetrated the subchondral bone was determined at the ground bleeding from the cavity.

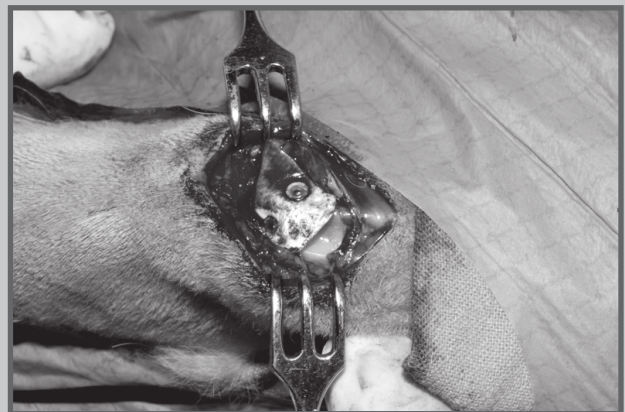
The aseptically crushed material downloaded from the loss, until a chip. The next step was the performance of autograft in place of chips obtained loss. Autotransplat was covered with collagen membrane OsseoGuard (3i prod. Biomed USA) (FIG.2), which was fixed to the surface of the cartilage with absorbable sutures and absorbable pins (Resor-Pin, man. Geistlich, Switzerland). Joint capsule were closed with a single suture absorbable threads Dexon 3-0 (prod. Syneture, UK), and skin sutures unabsorbable Amifil M (prod. SIMPO, Poland). The right limp was carried out in a similar way to open the joint and the execution of a defect, lesion has been left without supplies - check. After the operation, rabbits knee joints were not stabilized.

Postoperative observation

After the operation the rabbits showed a mild depression that provides the discomfort after surgery. This condition disappeared after one day, then the animals showed normal activity. The wound healed properly. After 10 days the skin sutures were removed.

Macroscopic and histological studies

At 8 and 10 weeks, euthanasia was performed by intravenous administration of pentobarbital (Morbital, producer



RYC.2 ubytek przykryty błoną kolagenową
FIG.2 Autotransplat covered with collagen membrane

Obserwacja pooperacyjna

Po operacji króliki wykazywały lekką osowiałość świadcząca o dyskomforcie zwierzęcia po wykonanym zabiegu. Stan ten ustąpił po jednym dniu, następnie zwierzęta wykazywały prawidłową aktywność. Rana po operacyjna goiła się prawidłowo. W 10 dniu obserwacji wszystkim królikom usunięto szwy skórne.

Badania sekcyjne i histologiczne

W 8 i 10 tygodniach wykonano eutanazję królików poprzez dożylnie podanie pentobarbitalu (preparat: Morbital, producent Biowet, Puławy), w maksymalnej dawce do 80mg/kg. m.c. W trakcie wykonywanych sekcji, w pierwszej kolejności oceniano makroskopowo ranę pooperacyjną oraz wygląd stawu kolanowego. Następnie pobierano badane stawy wraz z otaczającymi je tkankami do dalszych badań histologicznych.

Preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną (HE) oraz metodą Van Gieson (VG)

Wyniki

Badania sekcyjne makroskopowe

W 8 tygodni po operacji widoczne było pogrubienie torebki stawowej. Miejsce ubytku pokryte było białawą twardo-sprężystą tkanką.

W 10 tygodniu stwierdzono pogrubienie torebki stawowej. Ubytek pokrywała błyszcząca biaława warstwa.

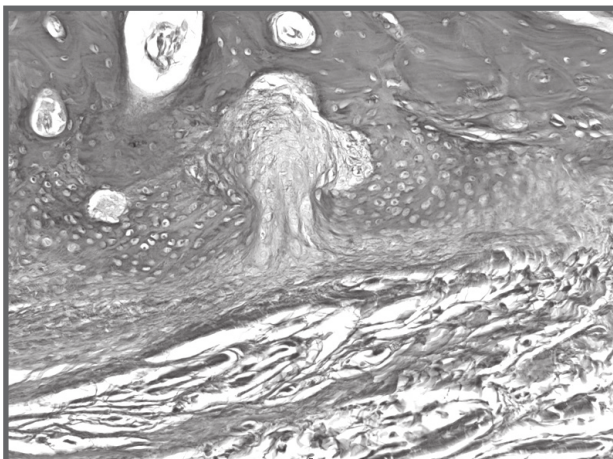
W obu terminach sekcyjnych nie udało się makroskopowo zlokalizować błony kolagenowej. Widoczne były natomiast niezresorbowane piny mocujące.

Badania mikroskopowe

W 8 tygodniu po zabiegu ubytek wypełniony był od zewnątrz błoną kolagenową, w dnie widoczna była resorpcja kości, miejscami stwierdzono obecność tkanki chrzęstnej.

Na granicy faz błona kolagenowa a tkanka kostna widoczne były pasma tkanki chrzęstnej, które wnikały w przebudowującą się tkankę kostną (RYC.3). U podstawy widoczne były komórki pluripotencjalne oraz ogniska chrzęstnienia. W bezpośrednim sąsiedztwie kości widoczna była wysoka aktywność osteoblastów. W miejscu bezpośredniego kontaktu błony kolagenowej z tkanką kostną, bez warstwy pośredniej – wiór chrzęstno-kostnych, widoczna była aktywność osteoklastów (RYC.4)

W 10 tygodniu po implantacji miejsce ubytku wypełnione było tkanką chrzęstną z wyspami tkanki kostnej splotowatej z aktywnymi osteoblastami. Powierzchnię kłykcia pokrywała



RYC.3 ognisko chrzęstnienia 8tyg.
FIG.3 Band of cartilage penetrated to the rebuilding bone 8 weeks (40x VG)

Biowet, Puławy), in maximum dose of 80mg/kg. During autopsy the surgical wound was assessed macroscopically and appearance of the knee were observed. Subsequently, the knee joints with the surrounding tissue for further histology were taken.

Preparations were stained with hematoxylin and eosin (HE) and by Van Gieson method (VG).

Results

Macroscopic post-mortem examination

At 8 weeks after surgery was evident thickening of the articular capsule. Place of the defect was covered with a whitish, elastic hard tissue.

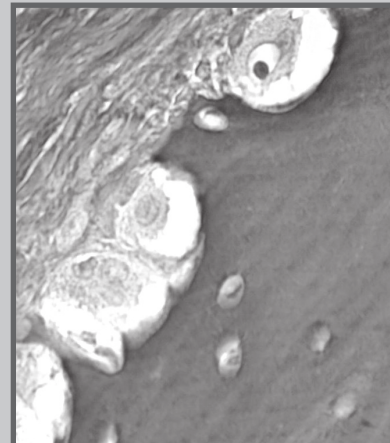
In the 10th week was thickening of the articular capsule. Loss covered with shiny whitish layer. In both periods autopsy failed to locate the macroscopic collagen membrane.

Microscopic investigations

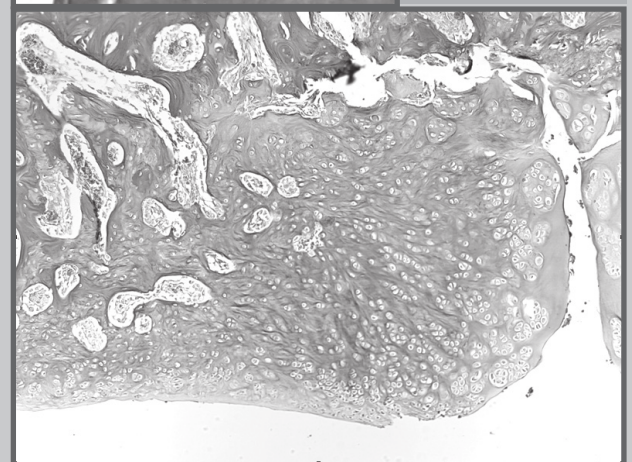
At 8 weeks after surgery defect was filled with collagen membrane on the outside, the bottom was visible bone resorption, cartilage were found in places.

At the interface collagen membrane and bone tissue, there was a band of cartilage which penetrated to the rebuilding bone (FIG.3). Pluripotent cells were visible at the base of the cartilage creating focuses. In the immediate vicinity of the bone there was a visible high activity of osteoblast. In place of direct contact of collagen membrane and the bone tissue, there was a visible activity of osteoclasts (FIG.4).

At 10-week post-implantation observation the loss was filled with islands of cartilage and spongy bone tissue with



RYC.4 Granica między błoną kolagenową a tkanką kostną – widoczne aktywne osteoklasty 8tyg.
FIG.4 of direct contact of collagen membrane and the bone tissue – osteoclasts 8 weeks (400x VG)



RYC.5 bogata w naczynia tkanka kostna, widoczna tkanka chrzęstna 10tyg.
FIG.5 Condyle surface covered with regenerating cartilage 10 weeks (100x VG)

regenerująca się tkanka chrzęstna lub włóknista tkanka łączna(RYC.5). W sąsiadującej tkance kostnej widoczne były liczne naczynia krwionośne świadczące o procesach przebudowy.

W ubytku do 10 tygodnia obserwacji stwierdzano procesy naprawcze z przewagą procesów regeneracyjnych prowadzących do wytworzenia tkanki chrzęstnej oraz mniej liczne procesy reparacyjne.

Podsumowanie

Przeprowadzone badania pilotażowe pozwoliły stwierdzić że zastosowane procedury operacyjne nie prowadziły do upośledzenia ruchowego zwierząt.

Podczas obserwacji pooperacyjnej, trwającej odpowiednio 8 oraz 10 tygodni, nie obserwowano objawów bólowych u operowanych królików.

Histologicznie stwierdzono obecność procesu chrzęstnienia na wszystkich możliwych podłożach z niewielkim udziałem procesów reparacyjnych.

Dla potwierdzenia uzyskanych wyników należałoby wydłużyć okres obserwacji na reprezentatywnej liczbie zwierząt oraz wykonać badania uzupełniające.

active osteoblasts. Condyle surface was covered with regenerating cartilage or fibrous tissue (FIG.5). In the adjacent bone numerous blood vessels were seen what were demonstrating the processes of reconstruction

After 10 weeks of observation the loss was showing a predominance of regenerative processes over repair processes which led to the generation of cartilage and smaller reparations processes.

Summary

Pilot studies allowed us to state that the used procedures do not lead to motor impairment of animals.

During the postoperative follow-up, lasting respectively 8 and 10 weeks, there were no symptoms of pain in the operated rabbits.

The presence of histologically cartilagecreating processes was noticed at all possible substrates with a minor contribution reparation processes.

To confirm the results is necessary to extend the period of observation of a representative number of animals and perform additional tests.

Piśmiennictwo

- [1]. Ciszek B. Morfologia I funkcja chrząstki stawowe. Acta Clinica 2010 Tom1, Numer1 10-14
- [2]. Malejczyk J. Budowa i immunologia tkanki chrzęstnej. Acta Clinica 2001 Tom 1, Numer 1 15-22
- [3]. Dziak A. Zespół przedwczesnego zużywania I zużycia chrząstki stawowej. Acta Clinica 2001 Tom 1, Numer 1 5-8
- [4]. Buckwalter JA. Articular cartilage: injures and potencial for Halin. J Orthop Sports Phys Ther 1998 28:192-202
- [5]. Galle J, Bader A, Hepp P, Grill W, Fuchs B, Käs JA, Krinner A, Marquaß B, Müller K, Schiller J, Schulz RM, von Buttlar M, von der Burg E, Zscharnack M, Löffler M. Mesenchymal Stem Cells in Cartilage Repair: State of the Art and Methods to monitor Cell Growth, Differentiation and Cartilage Regeneration. Curr Med Chem. 2010 May [Epub ahead of print]

References

- [6]. Hunter W., Of structure and diseases of articular cartilages. Philosophical Transactions R Soc London B Biol Sci 1743, 9:267
- [7]. Redfern P. On the healing of wounds and auricular cartilage. Monthly Journal of Medical science 1851 1:201
- [8]. Hjertquist SO, Lemberg R: Histologic audiographic and microchemical studies with spontaneously healing osteochondral articular defects in adult rabbits. Calcium and Tissue Research 1971, 8:5
- [9]. Mitchell N, Shepard N: Resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations of the subchondral bone. J Bone Joint Surg Am 1976, 58:230
- [10]. Nehrer S, Vavken P, Doroška R. Biomaterials in cartilage repair. ICRS 7th World Congress Abstractbook : 111-112. Warsaw, 2007, www.cartilage.org