

VOJENSKÉ ZDRAVOTNICKÉ LISTY

ROČNÍK LXXII

PROSINEC 2003

ČÍSLO 6

CHONDROGRAFTY NA BÁZI FIBRINOVÉHO LEPIDLA TISSUCOL-KIT IMMUNO® JAKO NOVÁ MOŽNOST LÉČBY DEFEKTŮ KLOUBNÍCH PLOCH – POPIS METODY

¹Jan FOLVARSKÝ, ¹Tomáš DĚDEK, ²Daniel DOBEŠ, ²Martin FRANK, ³Jiří ADLER

¹Traumacentrum Chirurgické kliniky Fakultní nemocnice, Hradec Králové

²Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové

³Tkáňová banka Fakultní nemocnice, Brno-Bohunice

Souhrn

V dnešním dynamickém světě jsou na kloubní chrupavku kladeny vysoké nároky. Neustálé působení tlaku a střihných sil je důvodem vysoké vulnerability kloubní hyalinní chrupavky, především v nosných kloubech. Opakující se mikrotraumata nebo náhle vzniklý defekt větší velikosti společně s neschopností hyalinní chrupavky regenerovat jsou příčinou vzniku chronických obtíží s možností progresu v posttraumatickou osteoartrózu. Léčba těchto obtíží je nesnadná a velmi nákladná. Dnešní trend, především u velkých defektů zátěžových zón zasahujících plnou tloušťku chrupavky, je jejich včasné chirurgické ošetření, ve snaze zabránit následnému vzniku chronických obtíží. Nicméně žádná z metod jdoucích tímto směrem není všeobecně uznávaná pro horší kvalitu novotvořené chrupavky, přestože jejich klinický benefit je nesporný. Výborných dlouhodobých výsledků lze docílit pouze velmi kvalitní novotvořenou chrupavkou, která je svojí morfologií i vlastnostmi podobná chrupavce hyalinní (hyaline like cartilage). Autoři prezentují popis nově vyvinuté metody – aplikace chondrocytů ve fibrinovém lepidle Tissucol-Kit Immuno® ve formě chondrograftu, která je modifikací autologní transplantace chondrocytů (ACT). Chondrocyty odebrané z kloubní chrupavky jsou namnoženy kultivací a zalaty do fibrinového lepidla. Následně je chondrograft aplikován do místa defektu. Viabilita buněk v chondrograftu je neporušená, což prokazují provedené testy.

Klíčová slova: Defekt chrupavky; Chondrograft; Autologní transplantace chondrocytů; ACT.

Chondrografts Based on Tissucol-Kit Immuno® Fibrin Glue – as a New Method of Treatment for Joint Surface Defects – a Description of This Method

Summary

At the present time heavy demands are put on the articular cartilage due to unremitting pressure and shearing forces. Repeated microtraumas or acute large defects in the cartilage, along with the hyaline cartilage's small capacity for regeneration are reasons for the possible progression to a chronic stage and post-traumatic osteoarthritis. Treatment of these complications is difficult and very expensive. The surgical treatment of defects before the progression that leads to the chronic stage, above all full-thickness defects in the load-bearing areas of the large joints, is a recent development. No method of this development trend is permitted in general due to the bad quality of newly-formed cartilage, although these methods have clinical benefits. Excellent and long-term effects of treatment are possible to accomplish only with hyaline-like cartilage of high quality. The authors present a description of a newly developed method – chondrocyte application in

the Tissucol-Kit Immuno® fibrin glue as a chondrograft application. This method is a modification of autologous chondrocyte transplantation (ACT). The chondrocytes obtained from an articular cartilage are cultured. After their multiplication the cells are cast in fibrin glue. Then the chondrograft is applied in the defect's area. The cell's viability in the chondrograft is intact.

Key words: Cartilage defect; Chondrograft; Autologous chondrocyte transplantation; ACT.

Léčbě hlubokých defektů kloubních ploch v plné tloušťce se věnuje na celém světě velká pozornost. Hyalinní chrupavka má jen malou reparační schopnost. Vznikají synovialitidy s chronickými bolestmi kloubů, které postupně progredují a vedou k osteoartróze (4, 5). Konečným stadiem léčby je implantace TEP postižených kloubů. Renomovaná pracoviště na celém světě hledají nejvhodnější způsob léčby defektů kloubních ploch s cílem minimalizovat obtíže pacientů a předejít nutnosti implantace TEP (1, 2, 3, 7, 8).

Autoři předkládají vlastní metodu léčby hlubokých defektů kloubních ploch s využitím chondrograftu. Chondrografty se zhotovují ze sedimentu suspenze nakultivované buněčné kultury, který je promíchán s fibrinovým lepidlem Tissucol-Kit Immuno (Baxter, Heidelberg, Německo) a je odlit za sterilních podmínek do formy.

Po ztuhnutí lepidla vznikne deska – chondrograft. Ten je po přípravě spodiny plošnou spongializací aplikován do defektu a pomocí nově připraveného fibrinového lepidla Tissucol fixován. Výhodou této metody je konstantní rozvrstvení chondrocytární suspenze nad defektem bez nutnosti přídavné fixace, například periostálním lalokem. Variabilita potřebné výšky aplikovaného chondrograftu je zajištěna, protože je možné použít lepení chondrograftů na sebe. Při posouzení výsledků léčby je retence chondrograftů po vlepení do defektu dobrá, pokud je dodrženo odlehčení končetiny po dobu 2 týdnů od aplikace, než proběhne přihojení graftu granulační tkání ke spodině defektu. Defekty se hojí chrupavkou podobnou hyalinní chrupavce a povrch novotvořené chrupavky je v úrovni s okolní tkání, což bylo prokázáno experimenty na zvířatech (4).

Cílem tohoto sdělení je podání podrobnější informace o zhotovení chondrograftu.

Použití nakultivované chondrocytární suspenze při léčbě hlubokých chondrálních defektů v kombinaci s různými přídavnými fixacemi (periostální a perichondrální lalok, mozaiková plastika) je zvládnutá a dostatečně známá (1–3, 6–8). Největším problémem zůstává dodržení rovnoměrného rozvrstvení chondrocytů v místě defektu chrupavky. Prostě

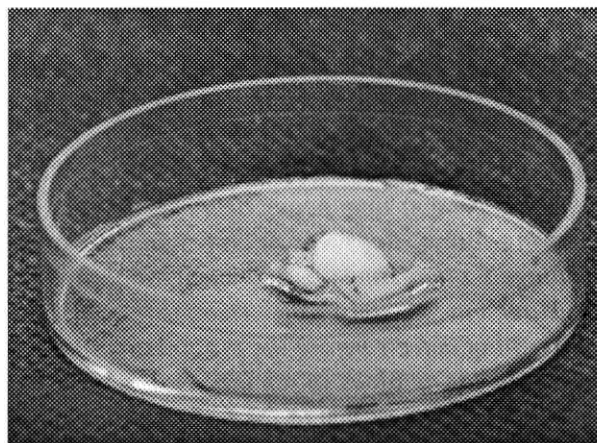
přeští periostálním lalokem nezaručuje optimální podmínky pro udržení tloušťky vrstvy aplikované chondrocytární suspenze v defektu.

Při řešení daného problému jsme se rozhodli pro zhotovení pevné struktury chondrograftu, který bude obsahovat chondrocytární buňky fixované za standardních podmínek v médiu o standardní hustotě buněk. Podmínkou pro zhotovení úspěšného chondrograftu je nutnost zachování životnosti chondrocytárních buněk, zabezpečení jejich fixace, možnost růstu a množení se a tím vytvoření podmínky pro zhojení defektu chrupavky.

Při přípravě chondrograftu dodržujeme následující postup, který má 5 základních bodů:

1. odběr chrupavky ke kultivaci
2. izolace a primokultivace chondrocytární suspenze
3. zhotovení chondrograftu
4. kontrola viability buněk
5. aplikace chondrograftu do defektu

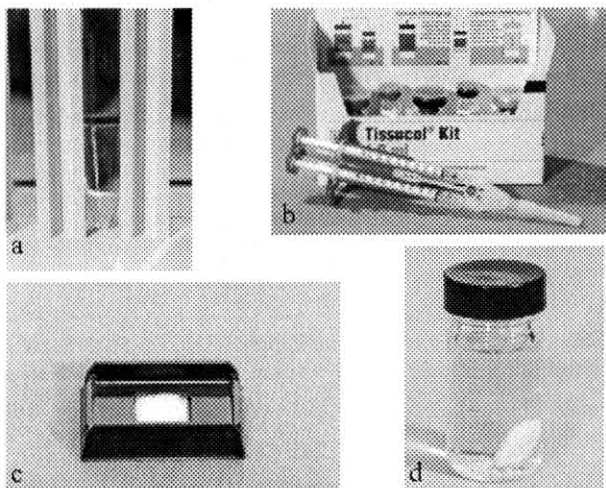
Odběr chrupavky ke kultivaci lze provést otevřenou metodou artrotomií nebo při diagnostické artroskopii odběrem části chrupavky o hmotnosti 0,2–0,4 g z nezářezové zóny. Odebraná chrupavka (obr. 1) je umístěna do sterilního transportního solného roztoku (GBSS – Gey's Balanced Salt Solution) a ihned odeslána k dalšímu zpracování do Tkáňové banky FN v Brně-Bohunicích. Následné zpracování probíhá ve sterilním prostředí laminárního boxu.



Obr. 1: Odebraná chrupavka ke kultivaci

Vlastní izolace se provádí 0,2% roztokem kolagenázy při 37 °C za současného míchání postupně v několika krocích. Obvykle se suspenze uvolněných buněk odebírá nejprve po 30 minutách, další frakce po 90 minutách inkubace. Po odběru frakce se přidá nový roztok kolagenázy. Větší shluky jsou ze suspenze buněk odstraněny krátkou centrifugací při 180 G. Takto získaný supernatant se dále centrifuguje při 600 G. Buněčný sediment se resuspenduje v kultivačním médiu (F 12 s fetálním bovinním sérem a antibiotiky) a nasadí se do kultivačních lahví. Kultivace probíhá při 37 °C v termostatu s 5 % CO₂ při pravidelné výměně média (viz barevná příloha s. IV – horní fotografie). Pasáž se provádí 0,1% roztokem trypsinu s EDTA.

Po nakultivování potřebného množství buněk jsou buňky převedeny do suspenze stejným způsobem jako při pasáži. Po promytí a centrifugaci jsou buňky připraveny k resuspendování v jednotlivých složkách tkáňového lepidla Tissucol. Suspenze buněk v lepidle (5–6krát 10⁶ buněk/ml) se odlije do formy vhodného tvaru a po ztuhnutí je vzniklý chondrograft připraven k aplikaci (obr. 2). Histologická vyšetření prokazují rovnoměrné rozptýlení buněk v chondrograftu.



Obr. 2: Sediment chondrocytárních buněk po centrifugaci (a), sada tkáňového lepidla Tissucol (b), hmota vzniklá smísením chondrocytárních buněk s tkáňovým lepidlem zalitá do formy (c), vytvořený chondrograft v transportním médiu (d)

Kontrola viability chondrocytů je prováděna současně se zhotovením chondrograftu. Část chondrocytární suspenze ve fibrinovém lepidle je po vyplnění formy chondrograftu aplikována do středu sterilní Petriho misky a zalita kultivačním médiem (MAM's F – 12 s fetálním bovinním sérem a antibiotiky). Probíhá kultivace při 37 °C a 5% CO₂. Výměna kultivačního média je prováděna po

48 hodinách. Ve 24hodinových intervalech se metodou mikroskopie ve fázovém kontrastu sleduje dělení a vycestovávání buněčných elementů z chondrograftu do kultivačního média. Po uplynutí 48 hodin vyrůstají z chondrograftu první chondrocytární buňky (viz barevná příloha s. IV – foto vlevo uprostřed), po 18 dnech je patrná hustá síť životných chondrocytárních buněk v okolí chondrograftu (viz barevná příloha s. IV – foto vpravo uprostřed). Při vlastní léčbě defektu kloubní plochy chrupavky je dokonalé odstranění všech neživých částí chrupavky až do zdravé tkáně. Spodinu defektu je nutno upravit plošnou spongializací až na subchondrální kost (viz barevná příloha s. IV – foto vlevo dole). Průvodní krvácení je stavěno kompresí defektu po zalití několika kapkami tissucolu. Pouze dokonale připravená, nekrvácající spodina je předpokladem kvalitního vhojení chondrograftu do defektu.

Následuje úprava tvaru chondrograftu podle defektu, vyplnění defektu tissucolem a vlepení chondrograftu. Při jeho aplikaci je nutná šetrná komprese celé transplantované plochy, aby došlo k jeho správné fixaci na celé ploše. Tím se předejde dalším komplikacím, jako je vycestování chondrograftu, zvlnění jeho povrchu atd. Výsledek aplikace chondrograftu demonstruje snímek na barevné příloze (s. IV – foto vpravo dole).

Závěrem autoři konstatují, že jimi zhotovený chondrograft zabezpečí při léčbě hlubokých defektů kloubních ploch rovnoměrné rozvrstvení chondrocytárních buněk nad transplantovanou plochou, což umožní zhojení celého defektu v úrovni okolní chrupavky. Chondrograft je lehce upravovatelný, má vynikající konturující vlastnosti, neomezuje životnost buněk a umožňuje jejich migraci na povrch a následné dělení. V kloubech nepůsobí toxicky, nepůsobí synovialitidy.

Jedinou nevýhodu vyvinutého chondrograftu spatřujeme v jeho relativní křehkosti, která neumožní použití resorbovatelných pinů pro jeho lepší fixaci. Autoři si jsou této nevýhody vědomi a pokračují v jeho zdokonalování s cílem vytvořit modifikaci graftu, u kterého bude tato nevýhoda odstraněna. Nový chondrograft bude umožňovat fixaci piny a o jeho stavbě a složení podáme informace po ukončení experimentu. Vyhodnocení celé experimentální práce bude prezentováno v souhrnném sdělení.

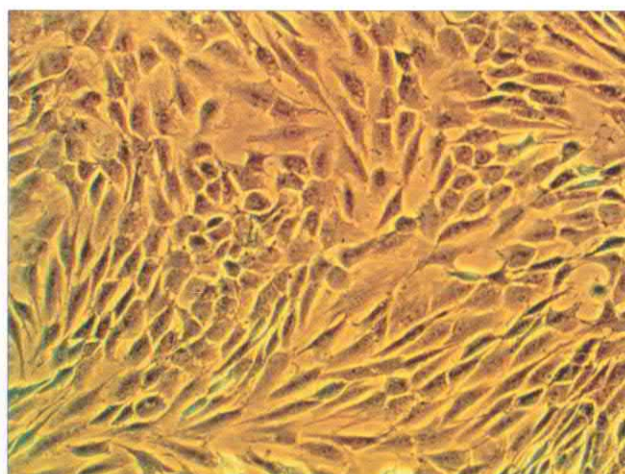
Literatura

1. AMIEL, D. – COUTTS, RD. – ABEL, M., et al. Rib Perichondrial Grafts for the Repair of Full-Thickness Articu-

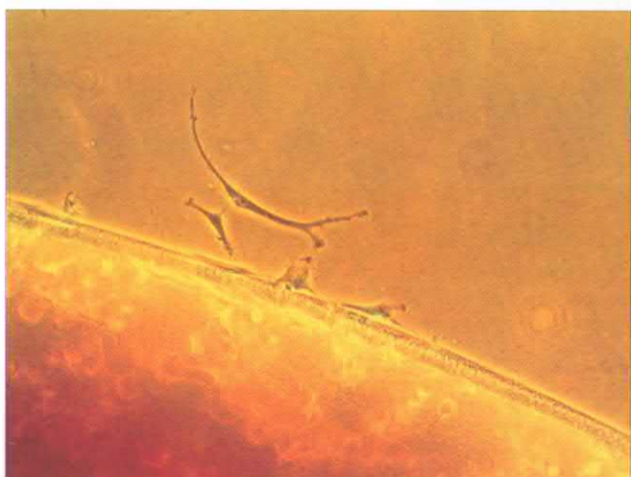
- lar-Cartilage Defects. *J. Bone joint Surg.*, 1985, 67-A, no. 6, p. 911–920.
2. BRITTEBERG, M. – LINDAHL, A. – NILSSON, A., et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New Engl. J. Med.*, 1994, vol. 331, no. 14, p. 889–895.
 3. ENKVIST, O. – OHLSÉN, L. Reconstruction of Articular Cartilage with Free Autologous Perichondrial Grafts. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.*, 1979, vol. 13, p. 269–274.
 4. FOLVÁRSKÝ, J. – DEDEK, T. – POCEPCOV, I., et al. Animal experiment – Treatment of acute defects of articular cartilage in a load-bearing areas using chondrograft transplantation. *Eur. J. Trauma*, 2002, vol. 28, Suppl. no. 1, p. 170–171.
 5. FOLVÁRSKÝ, J. – DEDEK, T. – POCEPCOV, I., et al. Our experiences with treatment of large defects of articular cartilage with autologous chondrograft transplantation. *Eur. J. Trauma*, 2002, vol. 28, Suppl. no. 1, p. 19–20.
 6. O'DRISCOLL, SW. – SALTER, RB. The Repair of Major Osteochondral Defects in Joint Surfaces by Neochondrogenesis with Autogenous Osteoperiosteal Grafts Stimulated by Continuous Passive Motion. *Clin. Orthop. Related Res.*, 1986, vol. 208, p. 131–140.
 7. URBAN, K. – FOUKAL, T. Reparační kloubní chrupavky biologickým materiálem. *Acta Chir. orthop. Traumatol. Cech.*, 1995, roč. 62, s. 40–46.
 8. VIŠŇA, P. – ADLER, J. – POKORNÝ, V., aj. Řešení hlubokých chondrálních defektů kolene mozaikovou plastikou – první zkušenosti. *Acta Chir. orthop. Traumatol. Cech.*, 1999, roč. 65, s. 266–271.
- Korespondence: MUDr. Jan Folvárský
Chirurgická klinika
Fakultní nemocnice
Sokolská 408
500 05 Hradec Králové
email: folvarsky.j@seznam.cz
- Do redakce došlo 8. 4. 2003
-



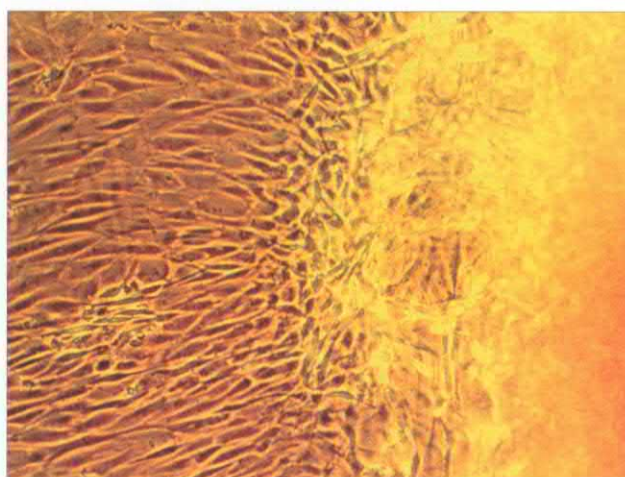
Snímek chondrocytární kultury 4 dny od začátku kultivace



Snímek chondrocytární kultury 18 dnů od začátku kultivace



Kontrola viability chondrocytů v chondrograftu za 48 hodin



*Kontrola viability chondrocytů v chondrograftu za 18 dnů
(souvislá síť chondrocytárních buněk v okolí chondrograftu)*



*Výtvorení modelového defektu chrupavky v zátěžové zóně
kolenního kloubu*



*Výtvoreň model defektu chrupavky v zátěžové zóně kolenního
kloubu s aplikovaným chondrograftem*