

Ortotopowy przeszczep autologicznych chondrocytów jako metoda leczenia uszkodzeń chrząstki wzrostowej u królików

Orthotopic Autologous Chondrocyte Grafting as a Method of Treatment of Growth Plate Damage in Rabbits

Ryszard Tomaszewski^(A,B,C,D,E,F), Łukasz Wiktor^(A,B,C,D,E,F), Artur Gap^(A,B,C,D,E,F)

Górnośląskie Centrum Zdrowia Dziecka, Oddział Chirurgii Urazowo Ortopedycznej, Katowice, Polska
Upper Silesian Children's Health Centre, Department of Trauma and Orthopaedic Surgery, Katowice, Poland

STRESZCZENIE

Wstęp. Ze względu na stale rozwijające się techniki leczenia uszkodzeń chrząstki stawowej, niektóre systemy klasyfikacyjne wykorzystywane są również do oceny jakości regeneratorów tkanki chrzęstnej. Ocena histologiczna chrząstki stawowej jest bardzo ważnym elementem stopniowania choroby zwyrodnieniowej, a także śledzenia efektów terapeutycznych. Celem pracy była ocena histologiczna regeneratorów chrząstki wzrostowej w hodowli białych królików nowozelandzkich jako element leczenia uszkodzeń chrząstki wzrostowej z wykorzystaniem autologicznych chondrocytów.

Materiał i metody. Grupa badana składała się z 14 białych królików rasy wsobnej w wieku 5 tygodni. Za pomocą igły trepanacyjnej pobieraliśmy chrząstkę wzrostową w zakresie przyśrodkowej 1/4 szerokości piszczeli. Średni czas trwania zabiegu wyniósł 25 minut (12-37 minut). Sumarycznie wykonaliśmy 25 pobrań chrząstki nasadowej. W 21 spośród nich, na okres 22 dni w miejsce ubytku wstawiliśmy dren. Po usunięciu drenu do 14 ubytków wprowadziliśmy konstrukt chrzęstno-włókniasty zawierający namnożone autologiczne chondrocyty. 4 ubytki pozostawiliśmy bez interwencji. 3 chrząstki nasadowe stanowiły nieinterwencyjną kontrolę.

Wyniki. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziliśmy: satysfakcjonującą morfologię przeszczepu oraz integrację przeszczepu; brak reakcji zapalnej; dość dobre odtworzenie architektury chrząstki wzrostowej.

Wnioski. 1. Uszkodzenie chrząstki wzrostowej może prowadzić do powstania deformacji kątowej w następstwie zaburzenia przyrostu kości na długość; 2. Przeszczep autologicznych chondrocytów jest dobrą metodą leczenia uszkodzeń chrząstki wzrostowej; 3. Wada przeszczepiania autologicznych chondrocytów jest stosunkowo długi proces ich namnażania.

Słowa kluczowe: chrząstka wzrostowa, chondrocyty, uraz, system oceny histologicznej

SUMMARY

Background. With the continuous advances in the therapy of joint cartilage injury, some of those classification systems are also being used for evaluating the quality of regenerating cartilage. Histological assessment of joint cartilage is a very important component in the staging of osteoarthritis and tracing therapeutic outcomes. We performed a histological assessment of regenerating growth plate in a group of New Zealand white rabbits as a component of autologous chondrocyte therapy for growth plate damage.

Material and methods. We studied a group of 14 five-week-old in-bred white rabbits. We used a trephine needle to harvest growth plate from the medial fourth of tibial width. The mean duration of the procedure was 25 minutes (range: 12-37 minutes). We conducted a total of 25 growth plate harvesting procedures. In 21 cases, we placed a drainage tube at the site of the defect for 22 days. After removing the tube, we introduced a cartilago-fibrinous construct containing cultured autologous chondrocytes into 14 defects, while 4 defects were left intact. Three growth plates represented non-intervention controls.

Results. Our analysis showed satisfactory graft morphology and integration; absence of inflammatory response and fair restitution of growth plate architecture.

Conclusions. 1. Growth plate damage can lead to the development of an angular deformity as a result of impaired longitudinal bone growth; 2. Autologous chondrocyte grafting is a good method of treatment for growth plate damage; 3. A weakness of autologous chondrocyte grafting is the relatively long time of chondrocyte culturing.

Key words: growth plate, chondrocyte, trauma, histology scoring system

WSTĘP

Istnieje wiele systemów klasyfikacji służących do histologicznej oceny chrząstki. Większość z nich została opracowana dla oceny chrząstki stawowej w chorobie zwyrodnieniowej stawów. Ze względu na stale rozwijające się techniki leczenia uszkodzeń chrząstki stawowej, niektóre systemy klasyfikacyjne wykorzystywane są również do oceny jakości regeneratów tkanki chrzęstnej. Ocena histologiczna chrząstki stawowej jest bardzo ważnym elementem stopniowania choroby zwyrodnieniowej, a także śledzenia efektów terapeutycznych [1].

Pierwszy system mikroskopowej oceny chrząstki w chorobie zwyrodnieniowej stworzył w 1971 roku Mankin, był nim Histological-Histochemical Grading System (HHGS).

MODS (zmodyfikowana skala O'Driscoll) jako pierwsza oceniała jakość przeszczepionej tkanki chrzęstnej (użyto jej do histologicznej oceny chrząstki przeszczepionej u królików). ICRS I to przykład skali zaproponowanej w 2003 roku przez Histological Endpoint Committee do oceny przeszczepów chrząstki stawowej u ludzi. Skala ta obejmowała 6 parametrów oceny histologicznej przeszczepów chrząstki, z których każdy oceniano w systemie 0-3.

W 2009 roku Histology Working Group stworzyła klasyfikację ICRS II, która została potem wykorzystana w dużym prospektywnym randomizowanym badaniu porównującym kliniczne i mikroskopowe efekty leczenia uszkodzeń chrząstki stawowej przy użyciu metody mikrozłamań i ACI (autologous chondrocyte implantation) [2].

ICRS II obejmuje 14 parametrów oceniających mikroskopowo chrząstkę stawową [3].

Każdy parametr jest dodatkowo oceniany za pomocą skali VAS 100 mm (wizualnej skali analogowej), gdzie 0 oznacza słabą jakość chrząstki i 100 wysoką jakość chrząstki.

Przeglądając literaturę nie znaleźliśmy systemu, który oceniałyby parametry histologiczne chrząstki wzrostowej. Płytki wzrostowa, zwana również nasadową, jest wysoce wyspecjalizowaną strukturą odpowiedzialną za przyrost długości kości. Powstaje z komórek mezenchymalnych, pod wpływem czynników transkrypcyjnych rodzin SOX [4,5]. Płytki wzrostowa ma strukturę warstwową opartą o układ chondrocytów i ich morfologię.

Cykł życia chondrocytów w obszarze płytka wzrostowej obejmuje proliferację, dojrzewanie, przerost, mineralizację związaną z procesem apoptozy, a następnie kostnienie [4,5].

Strefa spoczynkowa (I – resting zone) – składa się z małych komórek otoczonych obfitą macierzą

BACKGROUND

A number of classification systems are available for histological assessment of cartilage. Most of these have been developed to aid cartilage assessment in osteoarthritic patients. With the continuous advances in the therapy of joint cartilage injury, some of those classification systems are also being used for evaluating the quality of regenerating cartilage. Histological assessment of joint cartilage is a very important component in the staging of osteoarthritis and tracing therapeutic outcomes [1].

The first system for microscopic evaluation of cartilage in osteoarthritis was developed by Mankin in 1971. It was called the Histological-Histochemical Grading System (HHGS).

The MODS (Modified O'Driscoll Scale) was the first system for assessing the quality of grafted cartilage (it was used for histological assessment of grafted cartilage in rabbits). The ICRS I was a system proposed by the Histological Endpoint Committee in 2003 for the evaluation of joint cartilage grafts in humans. Histological evaluation of cartilage grafts involved six parameters, each of which was graded from 0 to 3.

In 2009, the Histology Working Group presented the ICRS II classification, which was subsequently used in a large prospective randomised trial comparing clinical vs. microscopic outcomes of the use of microfractures and ACI (autologous chondrocyte implantation) to treat joint cartilage injury [2].

The ICRS II comprises 14 parameters for microscopic assessment of joint cartilage [3].

Each parameter is additionally scored with a 100 mm VAS (visual analogue scale), where 0 corresponds to poor-quality and 100 to high-quality cartilage.

In a literature query, we could not find a system for the evaluation of histological parameters of growth plate cartilage. The growth plate (or epiphyseal plate) is a highly specialised structure responsible for longitudinal bone growth. It develops from mesenchymal cells in a process mediated by transcription factors of the SOX family [4,5]. The growth plate has a laminar structure based on an arrangement of chondrocytes and their morphology.

The chondrocyte life cycle within the growth plate involves their proliferation, maturation, hypertrophy, apoptosis-associated mineralisation and, finally ossification [4,5].

The resting zone (I) is formed of small cells surrounded by abundant extracellular matrix. The cells are characterised by slow divisions and low proteoglycan and collagen type II synthesis. The proliferating zone (II) is characterised by multiple cell divi-

pozakomórkową. Komórki tej warstwy charakteryzują się wolnymi podziałami oraz niskim poziomem syntezy proteoglikanów i kolagenu typu II. Strefa proliferacji (II – proliferating zone) charakteryzuje się licznymi podziałami komórkowymi oraz dynamicznymi procesami metabolicznymi. Chondrocyty są ulokowane w kolumnach, charakteryzuje je zwiększo- na synteza kolagenu typu II i XI. W strefie przerostowej (III – hypertrophic zone) – objętość chondrocytów wzrasta do 10 razy. Liczne składniki macierzy pozakomórkowej tworzone są w tej warstwie. Synteza fosfatazy alkalicznej jest typowa dla tej warstwy.

Regiony macierzy pozakomórkowej pomiędzy kolumnami chondrocytów ulegają szybkiej mineralizacji, poprzez odkładanie kryształów hydroksyapatytu dostarczanych przez naczynia krwionośne wrastające między kolumny. Strefa degeneracji (IV – degeneration zone) zawiera chondrocyty w różnych stadiach apoptozy. W pierwotnej strefie gąbczastej (V – primary spongiosa zone), chondrocyty ulegające apoptozie zwalniają miejsce dla nowotworzonych pod wpływem VEGF naczyń krwionośnych. W tej strefie macierz pozakomórkowa obejmuje zarówno produkty syntezy chondrocytów, jak i osteoblastów w postaci macierzy kostnej. Proces różnicowania komórek płytki wzrostowej obejmuje 4 stadia: mezenchymalne komórki prekursorowe (MPC); prechondrocyty; chondroblasty; zróżnicowane chondrocyty [4,5].

MATERIAŁ I METODY

Grupa badana składała się z 14 białych królików rasy wsobnej w wieku 5 tygodni. Każdorazowo zabieg operacyjny pobrania chrząstki wzrostowej wykonaliśmy po uzyskaniu dostępu do żyły brzeżnej ucha, w znieczuleniu z użyciem Thiopentalu w dawce 25 mg/kg, monitorując oddech i częstotliwość akcji serca. Po typowym przygotowaniu i obłożeniu pola operacyjnego, wykonywaliśmy ok 1,5 cm cięcie na końcu bliższym kości piszczelowej po stronie przyśrodkowej w rzucie chrząstki nasadowej. Po odparowaniu tkanek miękkich docieraliśmy do chrząstki wzrostowej. Za pomocą igły trepanacyjnej pobieraliśmy chrząstkę wzrostową w zakresie przyśrodkowej 1/4 szerokości piszczeli (każdorazowo zakres pobrania ocenialiśmy pod kontrolą monitora RTG – Siemens type Multix Top, Munich, Germany). Średni czas trwania zabiegu wyniósł 25 minut (12-37 minut). Po każdej z operacji króliki mogły swobodnie chodzić w klatkach. Sumarycznie wykonaliśmy 25 pobrań chrząstki nasadowej. W 21 spośród nich, na okres 22 dni w miejsce ubytku wstawiliśmy dren. Po usunięciu drenu do 14 ubytków wprowadziliśmy konstrukt chrzęstno-włóknikowy zawierający namnożone autologiczne chondrocyty.

sions and dynamic metabolism. Chondrocytes are arranged in columns and produce increased amounts of collagen type II and XI. In the hypertrophic zone (III), the volume of a chondrocyte increases up to 10-fold. Numerous components of extracellular matrix form in this layer. Alkaline phosphatase is typically produced here.

Areas of extracellular matrix outside chondrocyte columns mineralise rapidly by means of deposition of hydroxyapatite crystals supplied by blood vessels growing in between the columns. The degeneration zone (IV) contains chondrocytes at various stages of apoptosis. In the primary spongiosa zone (V), apoptotic chondrocytes free space for new blood vessels whose formation is mediated by VEGF. In this zone, extracellular matrix comprises the products of synthesis of both chondrocytes and osteoblasts in the form of bone matrix. The differentiation of growth plate cells involves the following 4 stages: mesenchymal precursor cells (MPC); prechondrocytes; chondroblasts; differentiated chondrocytes [4,5].

MATERIAL AND METHODS

We studied a group of 14 five-week-old in-bred white rabbits. The operative harvesting of growth plate was always performed after securing access to the marginal ear vein under Thiopental 25 mg/kg anaesthesia and with respiratory and heart rate monitoring. Following typical preparation and draping of the operative field, we would make an approx. 1.5 cm medial incision at the proximal end of the tibia at the level of the growth plate. Overlying soft tissue was dissected and the growth plate was exposed. We used a trephine needle to harvest growth plate from the medial fourth of tibial width (the extent of harvesting was assessed fluoroscopically with a Siemens type Multix Top monitor [Munich, Germany] in all animals). The mean duration of the procedure was 25 minutes (range: 12-37 minutes). After the procedure, the rabbits were allowed to move about freely in their cages. We conducted a total of 25 growth plate harvesting procedures. In 21 cases, we placed a drainage tube at the site of the defect for 22 days. After removing the tube, we introduced a cartilago-fibrinous construct containing cultured autologous chondrocytes into 14 defects, while 4 defects were left intact. Three growth plates represent-

Tab. 1. Schemat eksperymentu. /+/- oznacza wykonanie procedury. /-/- oznacza nie wykonanie procedury

Tab. 1. Scheme of the experiment. /+/- indicates rabbits subjected to the procedure. /-/- indicates rabbits not subjected to the procedure

	Pobranie płytka wzrostowej / Excision of growth plate 23.08.2011	Interpozycja drenu / Drainage tube in physis 23.08.2011	Namnażanie chondrocytów / Chondrocyte culture	Przeszczep autologicznych chondrocytów / Transplantation of autologous chondrocytes in physis
1 "L"	+	+	-	-
2 "L"	+	+	-	-
3 "L"	+	+	-	-
4 "L"	+	+	-	-
5 "L"	+	+	-	-
6 "L"	+	+	-	-
7 "L"	+	+	-	-
8 "L"	+	-	-	-
9 "L"	+	-	-	-
10 "L"	+	-	-	-
11 "L"	+	-	-	-
12 "L"	-	-	-	-
13 "L"	-	-	-	-
14 "L"	-	-	-	-
Lewa kość piszczelowa / Left tibia				
	Pobranie płytka wzrostowej / Excision of growth plate 22.08.2011	Interpozycja drenu / Drainage tube in physis 22.08.2011	Namnażanie chondrocytów / Chondrocyte culture 22.08 to 12.09.2011	Przeszczep autologicznych chondrocytów / Transplantation of autologous chondrocytes in physis 12.09.2011
1 "R"	+	+	+	+
2 "R"	+	+	+	+
3 "R"	+	+	+	+
4 "R"	+	+	+	+
5 "R"	+	+	+	+
6 "R"	+	+	+	+
7 "R"	+	+	+	+
8 "R"	+	+	+	+
9 "R"	+	+	+	+
10 "R"	+	+	+	+
11 "R"	+	+	+	+
12 "R"	+	+	+	+
13 "R"	+	+	+	+
14 "R"	+	+	+	+
Prawa kość piszczelowa / Right tibia				

4 ubytki pozostawiliśmy bez interwencji. 3 chrząstki nasadowe stanowiły nieinterwencyjną kontrolę. Zwierzęta zabito po upływie 60 dni licząc od dnia drugiej operacji. Schemat eksperymentu przedstawiono w Tabeli 1.

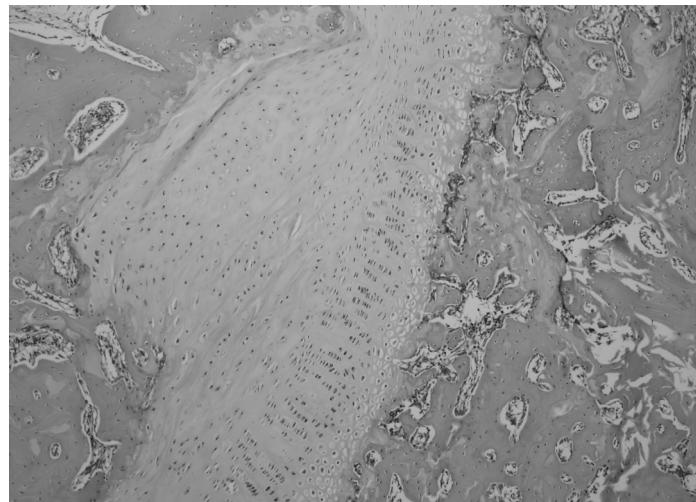
Uzyskane po zabiciu królików preparaty kończyn dolnych utrwalono w 10% Formaldehydzie. Po uprzednim odwapnieniu (preparatem TBD2) i pocięciu materiału zawierającego regeneraty chrząstki nasadowej (5 mikrometrów grubości), preparaty histologiczne zostały wybarwione hematoksyliną i eozyną (Ryc. 1) oraz Safraninem O (Ryc. 2). Preparaty ocenioły niezależnie dwóch patologów (RT; AG) przy użyciu mikroskopu typu Olympus BX51 (Olympus America Inc., Melville, New York). Poszczególne parametry histologiczne oceniano wg skali VAS 0-100. Schemat oceny histologicznej przeszczepów autologicznych chondrocytów zawarto w Tabeli 2.

Hodowla chondrocytów: Pobrany materiał chrząstki wzrostowej wysłaliśmy do Laboratorium Banku

ed non-intervention controls. The rabbits were killed 60 days after the second surgery. A schematic of the experiment is shown in Table 1.

The lower limb specimens obtained after the rabbits had been harvested were preserved in 10% formaldehyde solution. Following TBD2 decalcification, the specimens containing regenerating growth plates were cut into 5 micrometre slices and stained with H & E (Figure 1) and Safranin O (Figure 2). Specimens were assessed independently by two pathologists (RT; AG) using an Olympus BX51 microscope (Olympus America Inc., Melville, New York). The individual histology parameters were assessed using a 0-100 VAS. A schematic of the histological evaluation of the autologous chondrocyte grafts is presented in Table 2.

Chondrocyte culture: The growth plate specimens were sent to a tissue bank laboratory in Katowice. The culturing of chondrocytes took 22 days (22 Aug – 12 Sep).



Ryc. 1. Obraz mikroskopowy przeszczepu po wybarwieniu H&E

Fig. 1. Microscopic view of graft after H&E staining

Tab. 2. Schemat oceny histologicznej przeszczepów

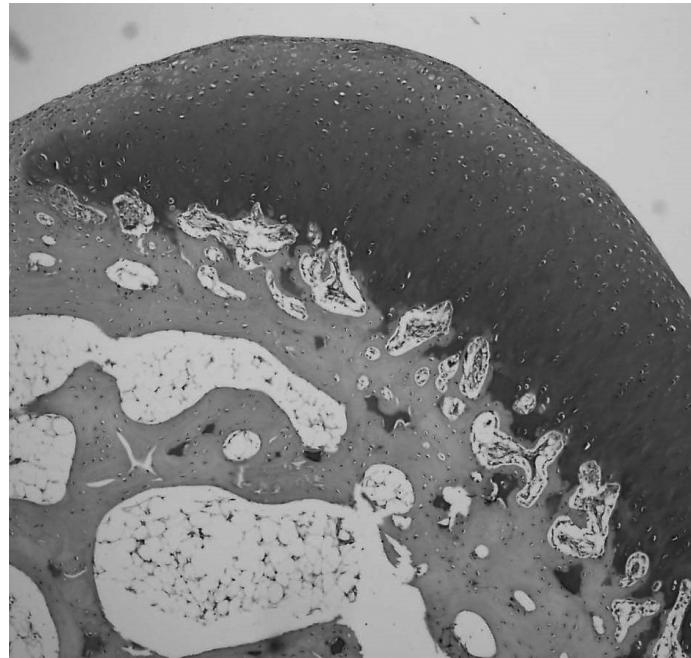
Tab. 2. Scheme of evaluation of the histological grafts

1.	Morfologia przeszczepu w porównaniu do płytka wzrostowej/Graft morphology compared to growth plate (pod mikroskopem polaryzacyjnym/viewed under polarized light)	0%: Tkanka włóknista/Fibrous tissue 100%: Prawidłowa chrząstka wzrostowa/Normal growth plate
2.	Metachromazja macierzy/Matrix staining	0%: Brak barwienia/No staining 100%: Pełna metachromazja/Full metachromasia
3.	Morfologia komórek/Cell morphology	0%: Komórki wrzecionowate/Elongated and spindle shaped cells; 100%: Typowe komórki/Typical cells.
4.	Struktura warstwowa graftu/Growth plate architecture (laminar structure)	0%: Brak struktury warstwowej/Lack of laminar structure 100%: Struktura warstwowa/Laminar structure
5.	Integracja z podłożem/Basal integration	0%: Brak integracji/No integration 100%: Pełna integracja/Complete integration
6.	Zapalenie/Inflammation	0%: Obecne/Present 100%: Nieobecne/Absent
7.	Ogólna ocena/Overall assessment	0%: Zła(tkanka włóknista)/Bad (fibrous tissue) 100%: Dobra (prawidłowa chrząstka wzrostowa)/Good (epiphyseal growth plate)

Tkanek w Katowicach. Proces proliferacji chondrocytów trwał 22 dni (22.08 - 12.09).

Materiał chrząstki wzrostowej umieszczono w jałowej probówce zawierającej pożywkę HAM F12 (Mediatech Inc., Herndon, Virginia) z dodatkiem 50 g/ml Gentamycyny (PAA, Linz, Austria) oraz 2 g/ml Amfotericyny B (PAA). Następnego dnia wszystkie próbki opracowano oraz pocięto na mniejsze fragmenty. Tak opracowany materiał pozostawiono w pożywce HAM F12 uzupełnionej o 0.1% kolagenazą typu II (Worthington, Lakewood, New Jersey). Po upływie 6-7 godzin zawiesinę komórkową jednokrotnie przepłukano w pożywce HAM F12 (Mediatech), następnie umieszczono w kolbie z pożywką DMEM/HAMF12 (PAA) zawierającą 10% Newborn Calf Serum (PAA)

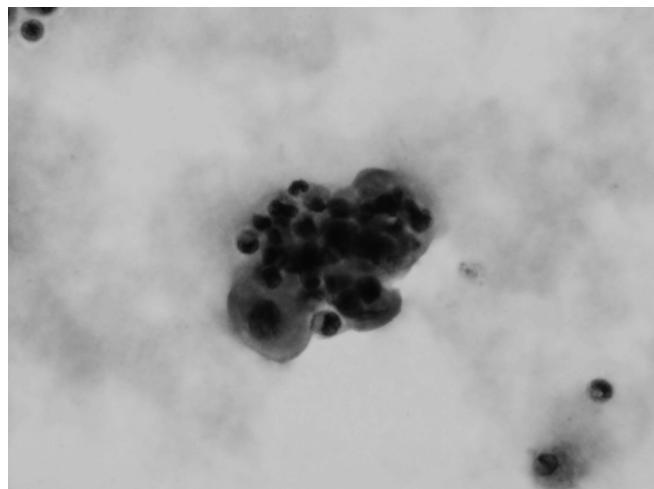
Growth plate material was placed in a sterile test tube with the HAM F12 nutrient mixture (Mediatech Inc., Herndon, Virginia), to which were added 50 g/ml Gentamycin (PAA, Linz, Austria) and 2 g/ml Amfotericin B (PAA). The following day, all samples were processed and cut into smaller fragments. These were left in the HAM F12 medium with an addition of 0.1% collagenase type II (Worthington, Lakewood, New Jersey). After 6-7 hours, the cellular suspension was washed once in the HAM F12 medium (Mediatech) and then placed in a flask with the DMEM/HAMF12 medium (PAA) containing 10% Newborn Calf Serum (PAA) with an addition of 50 g/ml Gentamycin (PAA, Linz, Austria), 2 g/ml Amfotericin B (PAA) and 50 g/ml L-ascorbic acid (PLIVA, Kraków,



Ryc. 2. Obraz mikroskopowy przeszczepu po wybarwieniu Safraninem O
Fig. 2. Microscopic view of graft after Safranin O staining

z dodatkiem 50 g/ml Gentamycyny (PAA, Linz, Austria), 2 g/ml Amfoterycyny B (PAA) oraz 50 g/ml kwasu L-askorbinowego (PLIVA, Kraków, Poland). Komórki hodowano w inkubatorze w temperaturze 37°C, w środowisku 5,5% CO₂. Komórki rozpoczęły podziały po około 3 dniach. Pożywkę wymieniano co 48 godzin. Proliferację komórkową monitorowano za pomocą mikroskopu odwróconego (Carl Zeiss, Oberkochen, Niemcy). Dzień przed wtórnym zabiegiem zawiesinę komórkową pasażowano do probówek hodowlanych zawierających ludzki fibrynogen pozyskany od dawców Regionalnego Centrum Krwiobawstwa w Katowicach. Zamrożone do temperatury -80°C osocze rozmrożono w łaźni wodnej. Skoncentrowany fibrynogen w temperaturze 4°C odwirowano przy 1000 x g w Heraeus Cryofuge (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware) przez 15 minut. Supernatant odrzucono, a uzyskany koncentrat fibrynogenu wykorzystano do wytworzenia kleju fibrynowego. Każdorazowo krew dawcy badano na obecność HIV, HBV, HCV oraz krętków kiły. Przed zabiegiem zawiesinę chondrocytów mieszano z klejem fibrynowym celem uformowania fibrograftu. Oddziennie dla każdego preparatu potwierdziliśmy obecność chondrocytów (immunohistochemicznie wykrywając antigen S-100 z wykorzystaniem poliklonalnego przeciwciała króliczego przeciwko S-100; Ryc. 3). Każdy przeszczep przed implantacją kontrolowano celem potwierdzenia numeracji przeszczepu i zwierzęcia. Tak przygotowany fibrografit każdorazowo dopasowano do

Poland). Cells were incubated at 37°C in a 5.5% CO₂ environment. Cell divisions began after approximately 3 days. The nutrient medium was replaced every 48 hours. The proliferating cells were monitored with an inverted microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). One day before the second surgery, the cell suspension was passaged into culture tubes containing human fibrinogen obtained from donors attending the Regional Blood Donation Centre in Katowice. Plasma, stored at -80°C, was defrosted in a water bath. The concentrated fibrinogen at 4°C was centrifuged at 1000 x g in a Heraeus Cryofuge (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware) for 15 minutes. The supernatant was discarded and the resulting fibrinogen concentrate was used to produce fibrin glue. Donor blood was always tested for the presence of HIV, HBV, HCV and *T. pallidum*. Before the implantation procedure, the chondrocyte suspension was mixed with the fibrin glue to produce a fibrograft. The presence of chondrocytes was confirmed individually for each preparation by immunohistochemical detection of antigen S-100 with an anti-S-100 polyclonal rabbit antibody; Figure 3). Before implantation, each graft was inspected to confirm the graft's ID number and the animal's ID number. Following this preparation, each fibrograft was fitted to match the growth plate defect it was filling, following which the periosteum was sutured gently with PDS 4-0 threads (Ethicon) without any graft fixation. Graft stability was confirmed before the skin was sutured.



Ryc. 3. Immunohistochemicznie wybarwione antygeny S-100

Fig. 3. Histological examination of S-100 antigens of cultured chondrocytes (x 400)

ubytku płytka wzrostowej, a następnie, bez mocowania graftu, delikatnie zamykano okostną stosując nici PDS 4-0 (Ethicon). Przed zaszyciem skóry potwierdzano stabilność wprowadzonego graftu.

WYNIKI

Ocena histologiczna

Prawa kość piszczelowa (próbki 1-14 „R”).

W preparatach 1-6, 11, 13 stwierdzono obecność chrząstki wzrostowej o regularnym kształcie oraz strukturze warstwowej. Chondrocyty odtworzyły układ kolumn w strefie proliferacyjnej, obecna była również warstwa chondrocytów hipertroficznych poniżej. W warstwie degeneracyjnej obecne były chondrocyty w różnych stadiach apoptozy oraz pojedyncze naczynia krwionośne. Na każdym poziomie przeszczepu stwierdzono właściwy dla prawidłowej chrząstki wzrostowej stosunek elementów komórkowych do mącrizy zewnętrzkomórkowej. Preparaty 7-9 przedstawiały nieregularny kształt chrząstki wzrostowej z obecnością pojedynczych ląkun, ale z zachowaniem zróżnicowania morfologicznego typowego dla poszczególnych warstw prawidłowej chrząstki wzrostowej. Nie stwierdziliśmy obecności mostków kostnych. W preparacie 14 doszło do utworzenia mostka kostnego po stronie przyśrodkowej regeneratu (w przybliżeniu 15% szerokości), pozostała część graftu wykazywała nieregularne utkanie z obecnością ląkun. Reakcji zapalnej na przeszczep nie obserwowano w żadnym z preparatów po stronie prawej.

Lewa kość piszczelowa (próbki 1-14 „L”).

W preparatach 1-11 doszło do uformowania tkanki włóknistej i kostnej mostującej nasadę i przynasa-

RESULTS

Histological findings

Right tibia (samples 1-14 “R”).

Preparations 1-6, 11 and 13 demonstrated the presence of growth plates of regular shape and laminar structure. The chondrocytes had reproduced the columnar arrangement in the proliferating zone and a layer of hypertrophic chondrocytes was present below. The degeneration zone contained chondrocytes at various stages of apoptosis and isolated blood vessels. The ratio of cellular elements to extracellular matrix was typical of normal growth plate at all levels of the grafts. Preparations 7-9 demonstrated irregularly shaped growth plates with isolated lacunas while showing normal morphological differentiation typically seen in the individual layers of a normal growth plate. No bony bridges were found. Preparation 14 showed a medial bony bridge (occupying approximately 15% of the width of the regenerating growth plate), while the remaining part of the graft showed irregular histology with lacunas. Inflammatory response to the graft was not seen in any preparation on the right side.

Left tibia (samples 1-14 “L”).

Preparations 1-11 demonstrated the formation of fibrous and bony tissue bridging the epiphysis and

dę na poziomie płytka wzrostowej. Nie stwierdziliśmy tendencji do regeneracji pozostawionej chrząstki wzrostowej, dobocznie w kierunku ubytku. W preparatach 12-14 (bez operacji) nie wykazaliśmy żadnych zmian w obrębie płytka wzrostowej (chrząstka wzrostowa o prawidłowej strukturze histologicznej).

Króliki oznaczone numerem 10 i 12 padły podczas eksperymentu, a uzyskane preparaty histologiczne zostały wyłączone z oceny końcowej.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu systemu 12,5 Statistica (Tabela 3, 4). Dla celów analizy statystycznej założyliśmy następującą gradację wyników: słaby wynik – VAS 0-20; średni wynik – VAS 20-40; dość dobry wynik – VAS 40-60; dobry wynik – VAS 60-80; bardzo dobry wynik – VAS

metaphysis at the level of growth plate. We found no tendency to regeneration of native growth plate left in place laterally towards the defect. Preparations 12-14 (no surgery) presented no growth plate abnormalities (normal histology of growth plate cartilage).

Rabbits 10 and 12 died during the experiment and the respective histological preparations were excluded from the final evaluation.

Statistical analysis

Statistical analysis used Statistica 12.5 (Table 3, 4). The following gradation of outcomes was assumed for the purposes of the statistical analysis: poor = VAS 0-20; mediocre = VAS 20-40; fair = VAS 40-60; good = VAS 60-80; excellent = VAS 80-100. A significance level of 0.05 was assumed for all analyses.

Table 3. Analiza statystyczna

Tab. 3. Statistical analysis

	Średnia/ Mean	Median/ Median	Minimum	Maximum	Odchylenie standardowe// Standard deviation
Morfologia przeszczepu w porównaniu do płytka wzrostowej / Graft morphology compared to growth plate	85,75	86,50	66,00	100,00	8,51
Metachromazja macierzy / Matrix staining (metachromasia)	74,75	80,00	46,00	91,00	12,95
Morfologia komórek / Cell morphology	66,08	67,00	35,00	93,00	16,78
Struktura warstwowa graftu / Growth plate architecture (laminar structure)	65,54	65,00	38,00	85,00	14,04
Integracja z podłożem / Basal integration	85,54	86,50	68,00	100,00	7,73
Zapalenie / Inflammation	89,04	90,00	78,00	96,00	4,97
Ogólna ocena / Overall assessment	79,96	80,00	72,00	87,00	4,75
Średnia / Mean	80,61	81,46	76,21	84,50	3,10

Tab. 4. Analiza statystyczna (c.d.)

Tab. 4. Statistical analysis (cont.)

	Średnia/ Mean	Odchylenie Standardowe /Standard deviation	Punkt odniesienia / Reference point	t	df	p
Morfologia przeszczepu w porównaniu do płytka wzrostowej / Graft morphology compared to growth plate	85,75	8,51	80,00	3,31	23	0,003
Metachromazja macierzy / Matrix staining (metachromasia)	74,75	12,95	60,00	5,58	23	0,00001
Morfologia komórek / Cell morphology	66,08	16,78	60,00	1,78	23	0,089
Struktura warstwowa graftu / Growth plate architecture (laminar structure)	65,54	14,04	60,00	1,93	23	0,066
Integracja z podłożem / Basal integration	85,54	7,73	80,00	3,51	23	0,002
Zapalenie / Inflammation	89,04	4,97	80,00	8,91	23	0,000001
Ogólna ocena / Overall assessment	79,96	4,75	60,00	20,58	23	0,000001
Średnia / Mean	80,61	3,10	60,00	32,59	23	0,000001

t – test t Studenta/Student's t-test

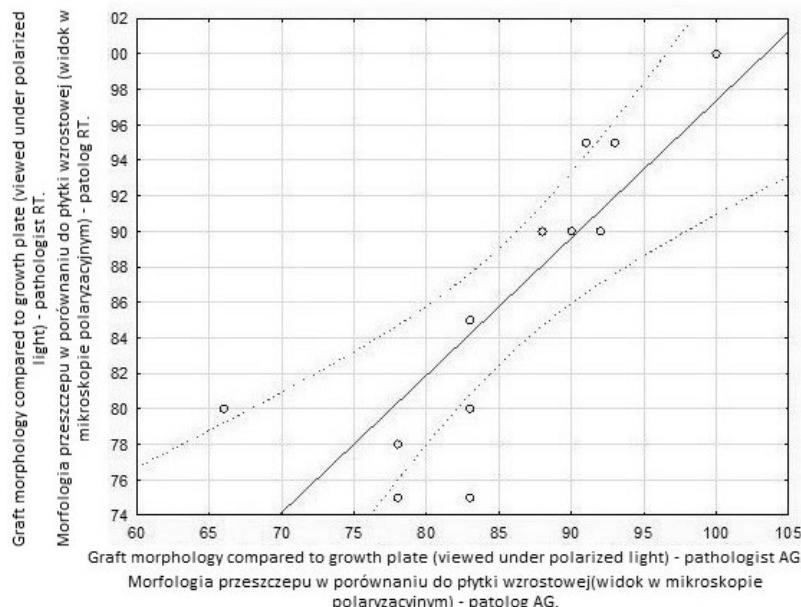
df – stopnie swobody/degrees of freedom

p – prawdopodobieństwo/probability value

80-100. Dla wszystkich analiz przyjęto poziom istotności równy 0,05.

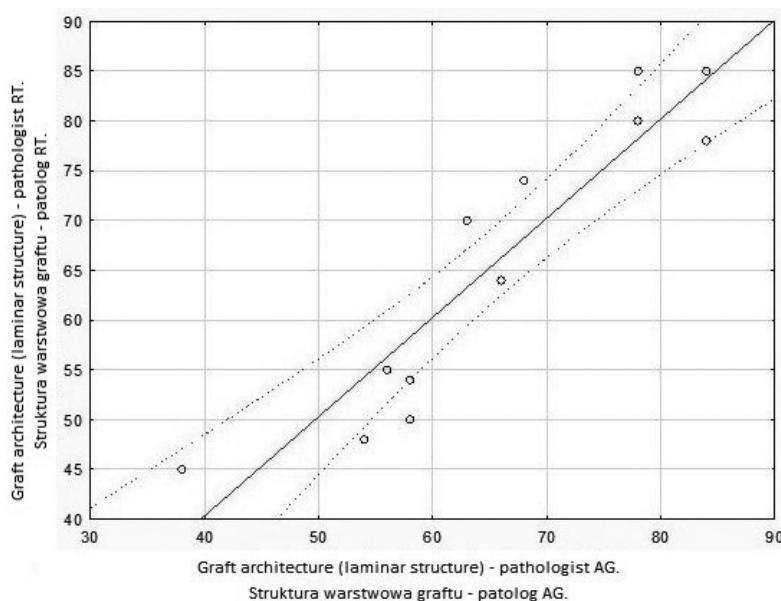
Opierając się na uzyskanych wynikach stwierdzono: bardzo dobrą morfologię przeszczepu (medianą równą 86,50), bardzo dobrą integrację z podłożem (medianą równą 86,50), brak reakcji zapalnej na prze-

On the basis of our results, we found: excellent graft morphology (median of 86.50), excellent basal integration (median of 86.50), no inflammatory response to the graft (median of 90.00) and good graft architecture (median of 65.00).



Ryc. 4. Wykres przedstawiający podobieństwo wyników uzyskanych przez patologów niezależnie oceniających morfologię przeszczepu. Współczynniki korelacji rang Spearmana: patolog RT /os 0X/; patolog AG /os 0Y/

Fig. 4. Diagram showing similarity of the results obtained by the pathologists independently evaluating the morphology of the graft. Spearman's rank correlation coefficient: pathologist RT /axis 0X/; pathologist AG /axis 0Y/



Ryc. 5. Wykres przedstawiający podobieństwo wyników uzyskanych przez patologów niezależnie oceniających architekturę przeszczepu. Współczynniki korelacji rang Spearmana: patolog RT /os 0X/; patolog AG /os 0Y/

Fig. 5. Diagram showing similarity of the results obtained by the pathologists independently evaluating the graft architecture. Spearman's rank correlation coefficient: pathologist RT /axis 0X/; pathologist AG /axis 0Y/

szczep (mediana równa 90,00), dość dobrą architekturę przeszczepu (mediana równa 65,00).

Na podstawie współczynnika korelacji rang Spearmana i testu U Manna-Whitneya potwierdzono podobieństwo wyników uzyskanych przez niezależnych patologów (Ryc. 4-5).

DYSKUSJA

Przeglądając literaturę znaleziono wiele systemów klasyfikacji oceniających chrząstkę stawową. Zostały one stworzone dla celów oceny chrząstki stawowej w chorobie zwyrodnieniowej oraz dla oceny przeszczepów/regeneratów chrząstki. Nie znaleźliśmy klasyfikacji oceniającej chrząstkę wzrostową. Uszkodzenie chrząstki wzrostowej może prowadzić do wytworzenia mostu kostnego między nasadą i przynasadą, a w konsekwencji tego do powstania deformacji kątowej w następstwie zaburzenia przyrostu kości na długość po stronie mostu. Istnieje wiele przyczyn uszkodzeń płytka wzrostowej. Statystycznie najczęstszą przyczyną są urazy [7,10,12-14]. Gdy uszkodzeniu ulega obwodowa część chrząstki wzrostowej, pozostała nieuszkodzona część chrząstki wzrostowa nie regeneruje ekscentrycznie w kierunku ubytku, konsekwencją czego jest formowanie blizny łącznotkankowej podlegającej z czasem kostnieniu [15,16,17]. Gdy blok kostny płytka wzrostowej zlokalizowany jest obwodowo, pozostała nieuszkodzona część chrząstki, kontynuując przyrost kości, wytwarza deformację kątową kończyny. Różnorodne techniki zostały opracowane do leczenia uszkodzeń płytka wzrostowej. Technika Langenskiöld'a obejmuje resekcję mostu kostnego oraz wypełnienie ubytku materiałem sztucznym, aby uniknąć formowania się nowego mostu łączącego nasadę i przynasadę [12,15,18,19]. Materiał interponujący może być: biologiczny (thuszcz, autologiczne żebro, chrząstka stawowa) lub sztuczny (silikon, guma, metakrylan metylu). Epifizjoliza dystrakcyjna jest procedurą chirurgiczną stosowaną do rozerwania mostu kostnego [14]. Komórki macierzyste były również stosowane jako materiał wypełniający ubytek w płycie wzrostowej [7,20,21]. W literaturze znaleziono prace opisujące auto – lub allogeniczne przeszczepy chondrocytów w miejsce uszkodzonej chrząstki wzrostowej [16,17,20,22,23]. W naszej pracy zastosowaliśmy autologiczne chondrocyty. Zaletą przeszczepu autologicznego jest brak reakcji immunologicznej na graft. Wadą tej metody jest stosunkowo długi proces namnażania chondrocytów z niewielkiej puli komórek pobranych ze zdrowej płytki wzrostowej. W naszej opinii, stale rozwijające się techniki leczenia, głównie dotyczące zmian pourazowych chrząstki wzrostowej, w tym przy użyciu autologicznych chondrocytów,

The similarity of scores obtained by independent pathologists was confirmed on the basis of the values of Spearman's rank correlation coefficient and the Mann-Whitney U test statistic (Figure 4-5).

DISCUSSION

During our literature review, we found a number of scoring systems for the assessment of joint cartilage. These systems were developed to enable evaluation of joint cartilage in osteoarthritis and evaluation of cartilage grafts/regenerating cartilage. We could not find a classification for assessing growth plate cartilage. Growth plate cartilage injury may lead to the formation of a bony bridge between the epiphysis and metaphysis and, consequently, to the development of an angular deformity as a result of impaired longitudinal bone growth on the side of the bridge. Statistically, physical injury is the most common cause [7, 10,12-14]. If a circumferential part of a growth plate becomes damaged, the remaining intact growth plate does not regenerate eccentrically towards the defect and a soft tissue scar forms that later becomes ossified [15,16,17]. When the osseous block of a growth plate is located peripherally, the remaining intact part of the growth plate continues bone growth, producing an angular deformity of the limb. Diverse techniques have been elaborated to treat growth plate defects. Langenskiöld's technique involves resection of the bony bridge and filling the defect with artificial material to prevent the formation of a new bridge between the epiphysis and metaphysis [12,15,18,19]. The interpositional material may be biological (fat, autologous rib, joint cartilage) or artificial (silicone, gum, methyl methacrylate). Distraction epiphysiodesis is a surgical procedure performed to rupture a bony bridge [14]. Stem cells have also been used to fill growth plate defects [7,20,21]. We found papers describing auto – or allogenous chondrocyte grafting to replace the damaged growth plate [16,17,20,22,23]. In our study, we used autologous chondrocytes. An advantage of autologous grafting is the absence of an immune response to the graft. A weakness of this method is the relatively long duration of the culturing of chondrocytes from the small pool harvested from the intact part of the growth plate. In our opinion, the continued development of treatment techniques, mainly in the area of traumatic lesions of the growth plate, including the use of autologous chondrocytes, is in need of reliable clinical, radiographic and histological assessment to enable monitoring and predicting treatment outcomes. Based on our own cli-

wymagają wiarygodnej oceny klinicznej, radiologicznej i histologicznej, w celu monitorowania i przewidywania efektów leczenia. Bazując na własnym doświadczeniu klinicznym nabytym w trakcie leczenia urazów płytka wzrostowej, a także podczas oceny preparatów histologicznych prawidłowej i uszkodzonej chrząstki wzrostowej w oparciu o nowoczesne systemy klasyfikacji histologicznej chrząstki stawowej, stworzyliśmy własny protokół oceny mikroskopowej chrząstki wzrostowej. W naszej pracy ocenialiśmy: fenotyp płytka wzrostowej (morfologia komórek, barwienie macierzy), strukturę warstwową płytka wzrostowej (architektura płytka), integrację przeszczepu. Zastosowanie klasyfikacji VAS dla oceny każdego parametru wydaje się być mocną stroną naszego systemu, pozwala to minimalizować różnice powstałe przy ocenie poszczególnych parametrów przez różnych patologów. Podsumowując, przeszczepianie autologicznych chondrocytów stanowi jedną z opcji leczenia uszkodzeń chrząstki wzrostowej. Technika ta wymaga jednak dalszego rozwoju oraz obserwacji.

WNIOSKI

1. Uszkodzenie chrząstki wzrostowej może prowadzić do powstania deformacji kątowej w następstwie zaburzenia przyrostu kości na długość.
2. Przeszczep autologicznych chondrocytów jest dobrą metodą leczenia uszkodzeń chrząstki wzrostowej.
3. Wadą przeszczepiania autologicznych chondrocytów jest stosunkowo długi proces ich namnażania.

PIŚMIENIĘTWO / REFERENCES

1. Rutgers M, van Pelt MJ, Dhert WJ, Creemers LB, Saris DB. Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 2010; 18: 12-23.
2. Saris DB, Vanlaue J, Victor J, et al. Characterized chondrocyte implantation results in better structural repair when treating symptomatic cartilage defects of the knee in a randomized controlled trial versus microfracture. *Am J Sports Med* 2008; 36: 235-46.
3. Mainil-Varlet P, Van Damme B, Nesic D, Knutsen G, Kandel R, Roberts S. A New Histology Scoring System for the Assessment of the Quality of Human Cartilage Repair: ICRS II. *Am J Sports Med* 2010; 38: 880-90.
4. Burdan F, Szumi J, Korobowicz A, et al. Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. *Folia Histochem Cytophiol* 2009; 47: 5-16.
5. Ballock RT, O'Keefe RJ. The Biology of the Growth Plate. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85: 715-26.
6. Ohlsson C, Nilsson A, Isaksson O, Lindahl A. Growth hormone induces multiplication of the slowly cycling germinal cells of the rat tibial growth plate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 9826-30.
7. Ogden JA. The evaluation and treatment of partial physeal arrest. *J Bone Joint Surg Am* 1987; 69: 1297-302.
8. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nillson A, Sjögren-Jansson E, Lindahl A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res* 2000; 374: 212-34.
9. Wysocka A, Mann K, Bursig H, Dec J, Gaździk TS. Chondrocyte suspension in fibrin glue. *Cell Tissue Bank* 2010; 11: 209-15.
10. Martiana K, Low CK, Tan SK, Pang MW. Comparison of various interpositional materials in the prevention of transphyseal bone bridge formation. *Clin Orthop Relat Res* 1996; 325: 218-24.
11. Foster BK, Hansen AL, Gibson GJ, Hopwood JJ, Binns GF, Wiebkin OW. Reimplantation of growth plate chondrocytes into growth plate defects in sheep. *J Orthop Res* 1990; 8: 555-64.
12. Osterman K. Healing of large surgical defects of the epiphyseal plate: an experimental study. *Clin Orthop Relat Res* 1994; 300: 264-8.
13. McCarty RC, Xian CJ, Gronthos S, Zannettino AC, Foster BK. Application of Autologous Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells to an Ovine Model of Growth Plate Cartilage Injury. *Open Orthop J* 2010; 4: 204-10.
14. Son SM, Park IH, Oh CW, et al. A histomorphometric study of cellular layers after hemiepiphysal stapling on the physis plate in rabbits. *J Orthop Sci* 2013; 8: 152-8.

nical experience in treating growth plate damage and assessing histology specimens of normal and damaged growth plate utilising modern growth plate histology scoring systems, we developed an original protocol for the microscopic evaluation of growth plate. In our work, we assessed the growth plate phenotype (cell morphology, matrix staining), laminar structure of the growth plate (growth plate architecture) and graft integration. The use of a VAS scale for scoring individual parameters emerges as a strength of our system as this allows for minimising differences between different pathologists scoring the same parameters. In summary, the grafting of autologous chondrocytes is an option for the treatment of growth plate injury. However, this technique needs to be further developed and monitored.

CONCLUSIONS

1. Growth plate damage can lead to the development of an angular deformity as a result of impaired longitudinal bone growth;
2. Autologous chondrocyte grafting is a good method of treatment for growth plate damage;
3. A weakness of autologous chondrocyte grafting is the relatively long time of chondrocyte culturing.

15. Chung R, Foster BK, Xian CJ. Preclinical studies on mesenchymal stem cell-based therapy for growth plate cartilage injury repair. *Stem Cells Int* 2011;570125.
16. Bright RW. Operative correction of partial epiphyseal plate closure by osseous bridge resection and silicone-rubber implant. *J Bone Joint Surg Am* 1974; 56: 655-64.
17. Canadell J, de Pablos J. Correction of angular deformities by physeal distraction. *Clin Orthop Relat Res* 1992; 283: 98-105.
18. Langenskiold A. An operation for partial closure of an epiphyseal plate in children, and its experimental basis. *J Bone Joint Surg Br* 1975; 57: 325-30.
19. Gottfried Y, Yaremchuk MJ, Randolph MA, Weiland AJ. Histological characteristics of acute rejection in vascularized allografts of bone. *J Bone Joint Surg Am* 1987; 69: 410-25.
20. Campbell CJ, Grisolia A, Zanconato G. The effects produced in the cartilaginous epiphyseal plate of immature dogs by experimental surgical traumata. *J Bone Joint Surg Am* 1959; 41: 1221-42.
21. Broughton NS, Dickens DRY, Cole WG, Menelaus MB. Epiphyseolysis for partial growth plate arrest: results after four years at maturity. *J Bone Joint Surg Br* 1989; 71: 13-6.
22. Lee EH, Chen F, Chan J, Bose K. Treatment of growth arrest by transfer of cultured chondrocytes into physeal defects. *J Pediatr Orthop* 1998; 18: 155-60.
23. Tomaszewski R, Bohosiewicz J, Gap A, Bursig H, Wysocka A. Autogenous cultured growth plate chondrocyte transplantation in the treatment of physeal injury in rabbits. *Bone Joint Res* 2014; 3: 310-6.

Liczba słów/Word count: 5193

Tabele/Tables: 4

Ryciny/Figures: 5

Piśmiennictwo/References: 23

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Łukasz Wiktor

Górnośląskie Centrum Zdrowia Dziecka, Oddział urazowo-ortopedyczny
Katowice, ul. Medyków 16, tel. 32 2071808, e-mail: wiktort.ort@gmail.com

Otrzymano / Received

Zaakceptowano / Accepted

26.01.2016 r.

31.08.2016 r.