

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicině
Studijní obor: Experimentální chirurgie



MUDr. Radim Kaňa

**Histomorfologické změny v normálních, patologicky změněných a
transplantovaných lidských chrupavkových tkáních**

**Histomorphological changes in normal, injured and transplanted human
cartilage tissues**

Disertační práce

Školitel: Prof.MUDr.Emanuel Nečas, DrSc.
Konzultant: Prof.MUDr.Ctibor Povýšil, DrSc.

Praha 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 3.3.2011

Radim Kaňa

Podpis

Identifikační záznam:

KAŇA, Radim. Histomorfologické změny chrupavkových tkání za patologických stavů i po transplantaci u lidí a v experimentu (Histomorphological changes in normal and pathological cartilage tissues and after their experimental and clinical transplantation). Praha. 2011.150 s. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze. 1. lékařská fakulta. Ústav patofyziologie 1.LF UK. Školitel Prof. MUDr. Emanuel Nečas, DrSc.

Poděkování

Prof. MUDr. Emanuelu Nečasovi, DrSc. – Ústav patofyziologie 1.LF UK jako školiteli

Prof. MUDr.Ctiborovi Povýšilovi, DrSc. – Ústav patologie 1.LF UK jako konzultantovi

As.MUDr. Luděkovi Šefcovi, CSc. - Ústav patofyziologie 1.LF UK

Prof.MUDr. Jiřímu Mazánkovi, DrSc. – Stomatologická klinika 1.LF UK

MUDr.Petru Lesnému, PhD. – Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.

MUDr.Petru Janouškovi, PhD.- Klinika ušní, nosní a krční UK 2.LF a FN v Motole

Seznam použitých zkratek, symbolů a pojmů

ACI	autologous chondrocyte implantation – autologní implantace chondrocytů
ACT	autologous chondrocyte transplantation – autologní transplantace chondrocytů
α -SKA	Alpha-skeletal actin - alfa-skeletální aktin
α -SMA	Alfa-smooth muscle actin – alfa-hladkosvalový aktin
α -CAA	Alfa-cardial actin – alfa-kardiální aktin
γ -SMA	Gama-smooth muscle actin – gama-hladkosvalový aktin
bp	Base pairs
BMP	Bone morphogenetic protein – kostní morfogenní protein
CTFG	Connective tissue growth factor – růstový faktor pojivové tkáně
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Minimum Essential Medium
ECM	Extracellular matrix - extracelulární matrix
FGF	Fibroblast growth factor - fibroblastový růstový faktor
GAG	Glycosaminoglycans – Glykosaminoglykany
GFAP	Glial fibrillar acidic protein - gliální fibrilární protein
HA	Hyaluronic acid - kyselina hyaluronová
IGF	Insulin-like growth factor - inzulínu podobný růstový faktor
PDGF	Platelet derived growth factor - růstový faktor derivovaný z trombocytů
PLA	Poly(lactic acid) - kyselina polyléčná
PLLA	Poly(L-lactid) - kyselina L-polyléčná
PDLLA	Poly(D,L-lactid) - kyselina DL-polyléčná
PGA	Polyglycolid – kyselina polyglykolová
PLGA	Poly(lactid-co-glycolid)
SPF	Specific Pathogen-Free - laboratorní zvířata chovaná v aseptických podmínkách, testovaná na nepřítomnost specifických patogenních bakterií, virů, plísní a parazitů
TGF- β	Transforming growth factor beta - transformující růstový faktor beta

OBSAH

Abstrakt	8
Abstract	10
1. Úvod do problematiky	12
1.1 Typy chrupavkové tkáně	16
1.2 Možnosti rekonstrukce nosního skeletu různými typy chrupavkové tkáně	19
1.3 Příprava chrupavkových implantátů metodami tkáňového inženýrství	23
2. Vymezení cílů práce	34
3. Materiál a metody	36
3.1 Experimentální zvířata	36
3.1.1 Myši.....	36
3.1.2 Králíci.....	36
3.2 Tkáně.....	37
3.2.1 Ušní chrupavka.....	37
3.2.1.1 Normální netransplantovaná lidská ušní chrupavka.....	38
3.2.1.2 Patologicky změněná lidská ušní chrupavka.....	38
3.2.1.3 Transplantovaná ušní chrupavka.....	38
3.2.1.3.1 Vzorky autologní ušní chrupavky odebrané při revizních operacích nosu	38
3.2.1.3.2 Lidská ušní chrupavka transplantovaná imunodeficitním myším.....	38
3.2.1.3.2.1 Příprava štěpů z lidské ušní chrupavky před transplantací myším.....	38
3.2.1.3.2.2 Příprava implantátů ze scaffoldů a tkáňové kultury lidských ušních chondrocytů	40
3.2.1.4 Ušní chrupavka u králíků	41
3.2.1.4.1 Způsoby traumatizace ušní chrupavky v oblasti boltce	41
3.2.1.4.2 Příprava autologních štěpů z ušní chrupavky u králíků	42
3.2.2 Kloubní chrupavka	42
3.2.2.1 Normální a patologicky změněná kloubní chrupavka a novotvořená chrupavka po ATC	42
3.2.2.1.1 Normální kloubní chrupavka.....	42
3.2.2.1.2 Patologicky změněná kloubní chrupavka.....	43
3.2.2.1.3 Novotvořená kloubní chrupavka po ATC	43
3.2.2.2 Tkáňová kultura kloubních chondrocytů.....	43
3.3 Chirurgické postupy u experimentálních zvířat	44
3.3.1 Chirurgické postupy při transplantaci lidské ušní chrupavky a implantaci scaffoldů s kulturami lidských ušních chondrocytů myším	44
3.3.2 Chirurgické postupy u králíků.....	44
3.4 Použité vyšetřovací metody	45
3.4.1 Histologické vyšetření.....	45
3.4.2 Imunohistochemická vyšetření.....	46
3.4.3 RT-PCR analýza.....	46
4. Výsledky	48
4.1 Ušní chrupavka u lidí a experimentálních zvířat.....	48
4.1.1 Histologické, imunohistochemické a molekulárně biologické nálezy v normální lidské ušní chrupavce.....	48
4.1.1.1 Nálezy v ušních boltcích u nedonošených potracených plodů.....	48
4.1.1.2 Nálezy v normálních ušních boltcích u dětí a dospělých.....	48
4.1.1.3 RT-PCR analýza.....	50
4.1.2 Histopatologické nálezy v patologicky změněné lidské ušní chrupavce	51
4.1.2.1 Reaktivní patologické změny ušní chrupavky u lidí.....	51

4.1.2.1.1	Agresivní polychondritida.....	51
4.1.2.1.2	Posttraumatické změny	51
4.1.3	Změny v normální lidské ušní chrupavce transplantované pacientům s deformitami nosního skeletu.....	52
4.1.4	Změny v normální lidské ušní chrupavce po transplantaci myším	53
4.1.5	Změny transplantované ušní chrupavky upravené traumatizací	55
4.1.6	Histopatologické nálezy v normální lidské ušní chrupavce uchovávané před transplantací v kultivačním mediu	59
4.1.7	Implantace nosičů s kulturou lidských ušních chondrocytů myším.....	60
4.1.7.1	Histologie kultury lidských chondrocytů imobilizovaných na želatinovém nosiči před implantací.....	60
4.1.7.2	Vyhodnocení implantované kultury ušních chondrocytů se želatinovým nosičem ..	61
4.1.7.3	Vyhodnocení implantované kultury ušních chondrocytů s různými nosiči z nanovláken.....	61
4.1.8	Změny ušní chrupavky u králíků po traumatizaci v oblasti boltce a po autotransplantaci ušní chrupavky do oblasti dorza	64
4.2	Lidská kloubní chrupavka	64
4.2.1	Základní histologické charakteristiky normální lidské kloubní chrupavky	64
4.2.2	Chrupavka ze spodiny kloubních defektů po traumatu	65
4.2.3	Osteoartrotický změněná kloubní chrupavka	66
4.2.4	Kultura chondrocytů použitá k transplantaci pro léčbu kloubních defektů	66
4.2.5	Nově vytvořená kloubní chrupavka po transplantaci chondrocytů.....	66
4.2.6	RT-PCR analýza.....	69
5.	Diskuze	71
6.	Závěry	95
7.	Využití ušní chrupavky v nosní chirurgii na ORL oddělení VFN v Praze	98
8.	Literatura	100
9.	Obrazová příloha.....	129

Abstrakt

Úvod

Při rekonstrukčních operacích nosního skeletu se používají autologní transplantáty chrupavkové tkáně z ušních boltců. V naší experimentální studii jsme studovali buněčné změny v transplantované lidské ušní chrupavce na zvířecím modelu za různých experimentálních podmínek. Morfologické změny jsme v těchto modelových situacích blíže specifikovali imunohistochemicky se zaměřením na expresi jednotlivých izoform aktinu a S-100 proteinu. Tyto poznatky byly porovnávány s nálezy v normální, artroticky změněné a transplantované lidské kloubní chrupavce.

Cíle

Cílem bylo zjištění reakce chrupavkové tkáně na traumatizaci a přenesení na ektopické místo těla při její transplantaci. Dalším cílem bylo vyšetření histologických změn a exprese chondrocytárních markerů (α -SMA a S-100 proteinu) v intaktní, arteficiálně traumatizované nebo v živném médiu kultivované lidské ušní chrupavce transplantované imunodeficitním myším, jakož i v chrupavce vytvořené po implantaci různých typů trojrozměrných nosičů (scaffoldů) osídlených kultivovanými lidskými ušními chondrocyty myším a v ušní chrupavce transplantované do nosního skeletu pacientů. Cílem bylo i použití zavedených výzkumných postupů k vyšetření normální, artrotické a posttraumaticky změněné kloubní chrupavky a kultury kloubních chondrocytů na nosiči z esteru kyseliny hyaluronové používaných k autologní transplantaci do kloubních defektů u lidí.

Materiál a metody

Vyšetřili jsme celkem 162 vzorků. Jednalo se o 36 vzorků normální a 5 vzorků patologicky změněné lidské ušní chrupavky, 2 vzorky lidské ušní chrupavky původně transplantované do oblasti nosního skeletu a odebrané při reoperaci, 30 vzorků lidské ušní chrupavky transplantované subkutánně do oblasti dorza imunodeficitních myší kmene NOD129S7 (B6) Rag1 a explantované za 12 nebo 16 týdnů (6 vzorků intaktních, 18 vzorků traumatizovaných a 6 vzorků uchovávaných v kultivačním mediu), dále 9 vzorků chrupavky narostlé po 8 týdnech od implantace nosičů osídlených kulturami lidských ušních chondrocytů experimentálním myším, 4 vzorky králičí ušní chrupavky různým způsobem traumatizované v oblasti ušního boltce, 8 vzorků autologních štěpů (4 intaktní a 4 bez perichondria) králičí chrupavky subkutánně transplantované do dorza králíků a za 8 týdnů vyjmuté. Vedle toho jsme vyšetřili 68 vzorků lidské kloubní chrupavky (56 vzorků chrupavky normální nebo patologicky změněné a 12 vzorků chrupavky nově vytvořené po autologní transplantaci chondrocytů (ATC) do kloubních defektů). Histologické vyšetření bylo doplněno imunohistochemickou analýzou, především s protilátkami proti α -SMA, svalově specifickému aktinu, desminu a různým izoformám S-100 proteinu. Ve vybraných případech byla použita metoda RT-PCR s primery pro průkaz mRNA pro jednotlivé izoformy aktinu.

Výsledky

Poprvé jsme podrobně popsali vrstevnaté uspořádání chrupavky ušního boltce v histologickém obraze. Centrální a obě povrchové vrstvy chrupavky se liší množstvím elastických vláken a počtem, tvarem a uspořádáním chondrocytů, v místě záhybů vykazují obě zevní vrstvy odlišné uspořádání. Kromě S-100 proteinu exprimuje velká část ušních chondrocytů α -SMA, a to především v povrchových vrstvách. Přítomnost mRNA α -SMA byla potvrzena metodou RT-PCR. Novým nálezem je průkaz nečetných chondrocytů exprimujících CD-34, které by mohly být blízké buňkám kmenovým.

Expresce S-100 proteinu a α -SMA zůstala zachována ve vitálních oblastech patologicky změněné ušní chrupavky, v intaktní, arteficiálně traumatizované nebo v živném médiu kultivované lidské ušní chrupavce transplantované imunodeficitním myším, jakož i v ušní chrupavce autologně transplantované do oblasti deformit nosního skeletu u lidí. Chondrocyty

pocházející z lidské ušní chrupavky byly úspěšně kultivovány na různých typech scaffoldů a následně transplantovány imunodeficitním myším. Po jejich explantaci byla ve většině případů nalezena uzlovitá ložiska chrupavky elastického typu s chondrocyty, které vykazovali pozitivitu S-100 proteinu α -SMA.

V normální kloubní chrupavce jsme α -SMA pozitivní chondrocyty identifikovali pouze v malém množství v povrchové vrstvě, avšak na rozdíl od ušní chrupavky se jejich množství zvyšovalo při jejím poškození. Většina kloubních chondrocytů exprimovala S-100 protein. Kultura lidských kloubních chondrocytů na nosiči obsahovala nezralé vřetenité buňky, které neměly žádné histologické ani imunohistochemické znaky chondrocytů (neprokázána exprese S-100), ale byly zřetelně α -SMA pozitivní. Po 10 měsících od autologní transplantace výše zmíněné kultury chondrocytů došlo k vytvoření chrupavkové tkáně převážně hyalinního typu místy s ložisky chrupavky vazivové a s pozitivitou S-100 i α -SMA ve většině chondrocytů.

Závěr

Chondrocyty chrupavky ušního boltce, na rozdíl od chrupavky hyalinního typu v kloubech, z větší části exprimují α -SMA, avšak jejich počet se při poškození nezvyšuje. Význam exprese α -SMA, jako jedné z kontraktilních izoform aktinu v buňkách intaktní i různým způsobem poškozené chrupavky, zůstává nejasný. Vrstevnaté uspořádání chondrocytů exprimujících α -SMA v elastické chrupavce ušního boltce se může spolu s elastickými vlákny podílet na neobvyklé elasticitě boltce a jeho schopnosti měnit tvar vlivem mechanických podnětů bez poškození tkáně. Na rozdíl od úspěšné transplantace kultur autologních chondrocytů na nosičích do oblasti kloubních defektů u lidí zůstává příprava arteficiální chrupavky vhodné k rekonstrukci defektů v oblasti hlavy a krku, až na ojedinělé případy, zatím předmětem experimentálních studií, a proto metodou volby je stále transplantace autologní chrupavky.

Klíčová slova: transplantace – implantace - ušní elastická chrupavka – kloubní hyalinní chrupavka – autologní kultura chondrocytů - scaffold - alfa-hladkosvalový aktin – S-100 protein

Abstract

Introduction

Autologous transplants of the cartilage tissue from the pinna is commonly used in reconstructive surgery of the nasal skeleton. The present study used animal models to elucidate responses of the auricular cartilage to its damage or transplantation to ectopic sites. Histomorphological analysis of changes observed in auricular cartilage including immunohistochemical study of different isoforms of actin and S-100 proteins was performed. Human articular cartilage prepared by in vitro cultivation using artificial scaffolds was also studied after its transplantation.

Aims of the study

The aim was to study histological changes and expression of chondrocytic markers (α -SMA and S-100 proteins) in intact, artificially traumatised, or in a human auricular cartilage cultivated in culture medium. An attempt to grow human auricular cartilage chondrocytes implanted in vitro into various types of three dimensional scaffolds aimed at testing chondrocyte survival and phenotype both in the culture and after transplantation to immunodeficient mice. A human auricular cartilage transplanted into the nasal skeleton of patients during a reconstruction surgery should be submitted to a histomorphological examination. Research assumed also comparison of the auricular cartilage responses to a damage, transplantation or in vitro cultivation, to those of normal, arthrotic, and posttraumatically changed articular cartilage, as well as autologous cultures of articular chondrocytes on scaffolds of ester hyaluronic acids. The study focused at the expression of individual isoforms of actin, S-100 proteins, desmin and some other immunohistochemical markers, in an attempt to contribute to better characterization of differences and similarities between the auricular and articular cartilage responses both to in vitro cultivation and transplantation to ectopic sites.

Material and methods

A total of 162 cartilage samples were studied. This included: 36 samples of a normal cartilage; 5 samples of a pathologically changed human auricular cartilage; 2 samples of a human auricular cartilage transplanted into the nasal skeleton and later removed during a correction surgery; 30 samples of a human auricular cartilage transplanted subcutaneously to immunodeficient mice (NOD129S7 (B6) Rag1) and collected after 12 to 16- weeks (6 intact samples, 18 traumatised samples, and 6 samples cultivated in the culture medium); in addition, 9 samples of cartilage developed in immunodeficient mice transplanted with artificial scaffolds implanted with human auricular chondrocytes; 4 samples of a rabbit auricular cartilage from ear cartilage artificially traumatised; 8 samples of autologous grafts (4 intact and 4 without perichondrium) of a rabbit cartilage autotransplanted subcutaneously and collected 8 weeks later'.

In addition we examined 68 samples of a human articular cartilage (56 samples of normal or pathologically changed cartilage and 12 samples of newly formed cartilage after autologous transplantation of chondrocytes (ATC) into articular defects). Histological examinations included immunohistochemical methods using antibodies against α -SMA (α -smooth muscle actin), muscle-specific actin, desmin, and various isoforms of S-100 proteins. In selected cases, RT-PCR was used to examine expression of actin isoforms at mRNA level.

Results

Our research provided, for the first time, a detailed histomorphological description of a layered arrangement of the *auricular* cartilage. The central- and peripheral layers of the auricular cartilage differ in presence and quantity of elastic fibres, as well as in the number, shape and space arrangement of chondrocytes. In addition to S-100 protein, a majority of auricular chondrocytes express α -SMA, particularly in the superficial layer.

Immunohistochemical findings were completed and confirmed by demonstration of the presence of mRNA for α -SMA by RT-PCR. A novel finding was demonstration of rare chondrocytes expressing CD 34, a marker of some adult stem cells.

Expression of S-100 proteins and α -SMA persisted in vital areas of pathologically changed auricular cartilage; in artificially traumatised cartilage; in intact or in vitro cultivated human auricular cartilage transplanted into immunodeficient mice. S-100 proteins and α -SMA were also found in an auricular cartilage which had been autologously transplanted during a reconstruction surgery to replace a missing cartilage in the human nasal skeleton. Human auricular chondrocytes were successfully cultured using various types of an artificial scaffolding. Subsequently, the chondrocyte implants were transplanted into immunodeficient mice to assess viability of the cells and their potential to generate a cartilage-like tissue. In most cases the procedure resulted in a nodular nest of an elastic type cartilage with chondrocytes that were S-100 protein and α -SMA positive.

In a normal *articular* cartilage α -SMA positive chondrocytes were present only scarcely in the superficial layers. In contrast to *auricular* cartilage, they became relatively abundant in cases subjected to a mechanical (surgical) damage. A majority of the articular chondrocytes expressed S-100 protein. A tissue culture of human articular chondrocytes grafted onto scaffolding resulted in presence of immature fusiform cells, which had neither histological nor immunohistochemical signs of chondrocytes (e.g. they did not express S-100). However, they were positive for α -SMA. Ten months following the autologous transplantation of aforementioned cultures of chondrocytes on three-dimensional scaffolds, a foremostly hyaline type of cartilaginous tissue was formed with areas of a fibrocartilage. Almost all cells, the chondrocytes, were positive for S-100 and α -SMA.

Conclusion

In contrast to the hyaline articular cartilage of joints, a majority of chondrocytes in the auricular cartilage express α -SMA, although their number does not increase after a trauma. Functional significance of α -SMA presence in chondrocytes of normal and damaged cartilage remains unclear. The fusiform arrangement of chondrocytes expressing α -SMA in the elastic cartilage of the ear pinna, together with elastic fibres, may confer and underly the unusual elasticity of the pinna as well as to its ability of undergo significant changes in its shape without being damaged by acting mechanical forces. In contrast to successful transplantation of in vitro cultured autologous articular chondrocytes grown in three dimensional scaffolds and transplanted to sites of joint defects in humans, artificially prepared cartilage which could be used in reconstruction of cartilage defects in the head and neck area is still not available and is a subject of experimental studies, of which the present study is a part. Consequently, in clinical practice method of choice is still transplantation of an autologous cartilage, mostly the cartilage auricular.

Key words: transplantation – implantation – auricular elastic cartilage – articular hyaline cartilage – autologous culture of chondrocytes- scaffold - alpha-smooth muscle actin – S-100 protein

1 Úvod do problematiky

Na Oddělení otorinolaryngologie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze jsou již řadu let prováděny funkční a estetické operace zevního nosu a nosního septa (rinoseptoplastiky), které patří k nejobtížnějším výkonům v oblasti obličejového skeletu. Nejen v rinochirurgii, ale i v rámci chirurgie hlavy a krku obecně se v posledních dvou až třech desetiletích klade velký důraz na co nejpřesnější rekonstrukci nebo náhradu poškozených nebo chybějících tkání především s ohledem na obnovu normální funkce, v případě struktur ovlivňujících vzhled pacienta pak i na co nejlepší kosmetický efekt. Splnění těchto požadavků s sebou obvykle přináší i potřebu dostatečného množství materiálu vhodného k tomuto účelu. Následkem předchozího traumatu, rozsáhlého operačního výkonu nebo na vrozeném podkladě však často tkáně vhodné k rekonstrukci přímo v místě defektu nebo deformity ve větším nebo menším rozsahu chybí. Možnosti jejich náhrady jsou proto v současné době předmětem intenzivního zájmu jak klinické, tak experimentální medicíny.

V chirurgii hlavy a krku patří ke standardním postupům transplantace různých materiálů biologického původu (autologního, allogenního nebo xenogenního) (Boccieri et Marianetti 2010, Huizing et de Groot 2003, Mackay 2005, Nassif 2005, Sajjadian et al. 2010, Válka 2003) nebo implantace materiálů jiného než biologického původu (v literatuře označované jako aloplastické náhrady) například hydroxyapatitu, různých kovů nebo syntetických materiálů typu silikonu, polytetrafluorethylenu, polyamidu, polyethylenu apod. (Conrad et Gillman 1998, Dresner et Hilger 2008, Huizing et de Groot 2003, Krause 1975, Lohuis et al. 2001, Mass et al. 1998, Mackay 1983, Stelter et al. 2007, Stucker 1982, Válka 2003).

Vzhledem k antigenním a mechanickým vlastnostem se jeví využití autologních materiálů, především chrupavky nebo kosti, v nosní chirurgii jako velmi výhodné. Nejvhodnějším zdrojem chrupavkové tkáně je nosní septum. Odběr se provádí ze stávajícího přístupu, nevyžaduje tedy další incizi v jiné anatomické lokalitě, a při správné technice a rozsahu není zatížen komplikacemi. V případech, kdy v důsledku traumatu nebo předchozího operačního výkonu chrupavka nosního septa v různém rozsahu chybí (Becker et Becker 2003, Boccieri et Macro 2006, Foda 2008, Sajjadian et al. 2010, Stelter et al. 2007), je nutné volit jiné zdroje chrupavčité tkáně, nejčastěji ušní boltec (Boccieri et Macro 2006, Fischer et Gubisch 2006, Huizing et de Groot 2005, Murell 2004, Kim et Gurney 2006, Nolst Trenité 2005) nebo žební chrupavka (Cakmak et Ergin 2002, De Fatta et Williams 2008, Fischer et

Gubisch 2006, Shubailat 2003). Pro svoji snadnou dostupnost, minimální výskyt komplikací spojených s odběrem, mechanické vlastnosti a tvar je chrupavka ušního boltce k rekonstrukci většiny nosních struktur vhodnější a často využívaná (Ansari et al. 2008, Araco et al. 2006, Ballert et Park 2008, Becker et Becker 2003, Gruber 2003, Menick 1999, Nassif 2005, Nolst Trenité 2005, Huizing et de Groot 2003, Perkins 2004, Válka 2003).

Rekonstrukční operace v oblasti nosního skeletu s využitím chrupavky nosního septa provádíme na ORL oddělení VFN v Praze řadu let s velmi dobrými výsledky. V souvislosti s rozšiřováním indikací k těmto výkonům bylo nutné zajistit dostatečné množství materiálu vhodného k rekonstrukci deformovaných nebo chybějících tkání zevního nosu a nosního septa. Z tohoto důvodu jsme zavedli do klinické praxe metodu autologní transplantace lidské ušní chrupavky, která nebyla v české otorinolaryngologii, na rozdíl od zahraničí, v této indikaci standardně používána a v české otorinolaryngologické literatuře nebyly zkušenosti s touto metodou dosud publikovány (Betka 2005, Hybášek 1999, Markalous et al. 2009). Naše zkušenosti s touto technikou, kterou jsme dosud použili u 48 pacientů, jsou předmětem jiného našeho sdělení (Kaňa, 2011 v tisku).

Pozitivní zkušenosti a hlubší studium této problematiky nás přivedly k úvaze, jakými změnami prochází různé chrupavkové tkáně po transplantaci nebo jak ovlivňují rozličné způsoby traumatizace nebo uchovávání chrupavky před transplantací její strukturu nebo expresi určitých markerů po transplantaci. Zajímalo nás také, zda existují možnosti, jak zlepšit vitalitu a tím i přežívání chrupavkové tkáně po transplantaci a jaké jsou současné možnosti vytvoření arteficiální chrupavkové tkáně pomocí metod tkáňového inženýrství.

Literární zdroje poskytují velmi málo informací o změnách v transplantované chrupavce a o buněčných reakcích identifikovatelných současnými metodami histologie a imunohistochemie (Ale de Souza et al. 2008, Bönisch et Mink 2000, Bönisch et al. 2007, Cakmak et Buyuklu 2007, Calvert et al. 2006, Coskun et al. 2005, Kazikdas et al. 2007).

Provedli jsme proto klinickou studii větší skupiny pacientů (není součástí disertační práce), u kterých byly s úspěchem transplantovány štěpy z ušní chrupavky do oblasti skeletu zevního nosu a nosního septa. S výjimkou dvou případů jsme však neměli možnost, z etických důvodů, histologicky podrobněji ověřit viabilitu těchto štěpů odběrem kontrolního vzorku po transplantaci. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli patomorfologické změny chrupavkové tkáně po transplantaci studovat na zvířecím modelu v experimentálních podmínkách.

Předmětem výzkumu byly otázky týkající se přežívání chondrocytů jak v normální lidské ušní chrupavce, tak v chrupavce, která byla předoperačně různým způsobem

traumatizována nebo kultivována v živném roztoku a následně transplantována imunodeficitním myším přijímajícím lidské tkáň. Součástí experimentu bylo také sledování změn ušní chrupavky u králíků po její traumatizaci přímo v oblasti boltce a po transplantaci autologních štěpů z ušní chrupavky do oblasti dorza.

Před vlastním experimentem na zvířatech a ověřením výsledků transplantace bylo nezbytné nejprve provést podrobnou histologickou a imunohistochemickou studii doplněnou o metody molekulární patologie na normální lidské ušní chrupavce. Na jejím základě bylo možné studovat změny lidské ušní chrupavky transplantované in toto myším přijímajícím lidské tkáň za různých pokusných podmínek nebo přímo získané z transplantátů, které určitou dobu přežily v oblasti skeletu zevního nosu, ale bylo třeba je z kosmetických nebo jiných důvodů odstranit.

Transplantace autologní chrupavky v chirurgii hlavy a krku sice poskytuje dlouhodobě dobré a stabilní výsledky, ale s ohledem na omezené zdroje dostupné chrupavkové tkáň, zejména v případech opakovaných rekonstrukčních operací nebo při potřebě transplantátů složitějšího tvaru, a s ohledem na možné komplikace spojené s odběrem chrupavky, se pozornost v posledních dvaceti letech obrací směrem k autologním chrupavkám vytvořeným metodami tkáňového inženýrství. Cílem je vytvoření chrupavkové tkáň požadovaných vlastností v podmínkách *in-vitro*. Implantáty jsou obvykle složeny z kultivovaných vlastních chondrocytů pacienta a biokompatibilního, nejčastěji biodegradovatelného nosiče (scaffoldu), který zajišťuje prostředí pro jejich trojrozměrný růst (Bücheler et Haisch 2003, Chung et Park 2007, Haisch et al. 2002, Kabelka et al. 2005, Sterodimas et al. 2009, Vacanti et al. 1991, Zhang et al. 2009). Metoda se rozvinula především v souvislosti s léčením velkých posttraumatických defektů kloubních chrupavek v ortopedii, kde je již několik let rutinně využívána (Grigolo et al. 2002, Handl et al. 2006, Podškubka et al. 2006, Pavesio et al. 2003, Visna et al. 2004). Naproti tomu jsou v oblasti hlavy a krku transplantace autologních chondrocytárních kultur vázaných na nosiče stále především předmětem experimentálních studií.

Provedli jsme pokusy s autologními kulturami lidských ušních chondrocytů kultivovaných na různých typech nosičů, aniž by byly použity jakékoliv podpůrné růstové faktory nebo cytokiny. Zajímalo nás především, zda takováto kultura vytvoří po transplantaci myším elastickou chrupavkovou tkáň a zda se event. nezmění imunofenotyp chondrocytů či složení mezibuněčné hmoty.

Spolupráce s Ortopedickou klinikou FN Bulovka nám umožnila studium normální kloubní chrupavky a strukturálních změn i proměn imunofenotypu kloubní chrupavky u

pacientů s pokročilými formami osteoartrózy, včetně nálezů u hemofiliků. Získali jsme i kulturu lidských chondrocytů na nosiči z esteru kyseliny hyaluronové ((Hyalograft® C, FIDIA Advanced Biopolymers, Italy), která byla použita při trasplantační léčbě velkých posttraumatických defektů distálního konce femuru na výše zmíněné pražské ortopedické klinice. Bylo možné přitom porovnat vlastnosti kultury kloubních chondrocytů na scaffoldech s chondrocyty nově vytvořené vrstvy kloubní chrupavky odebrané z místa transplantace po 10 měsících. Zároveň jsme zjišťovali osud materiálu použitého jako nosiče především s ohledem na jeho biokompatibilitu a biodegradabilitu v místě trasplantačního zákroku.

Dosažené výsledky experimentální trasplantace autologních kultur lidských ušních chondrocytů na různých typech nosičů jsme porovnávali s kulturou autologních chondrocytů kloubní chrupavky před a po trasplantaci pacientům.

V takto nastavených podmínkách pak bylo možno sledovat proměny chrupavkové tkáně jako takové na mikroskopické úrovni za použití imunohistochemických metod, které vycházely z problematiky studované řadu let na Ústavu patologie 1. LF UK a VFN v Praze.

V roce 1997 Povýšil a spol. poprvé popsali u benigního kostního nádoru chondroblastomu výskyt chrupavkových buněk obsahujících ve své cytoplazmě aktinová filamenta, jak potvrdilo imunohistochemické a elektronmikroskopické vyšetření. Konkrétně se jednalo o alfa-hladkosvalový aktin (α -SMA), jednu ze známých izoform aktinu. Na rozdíl od myofibroblastů tyto buňky byly pozitivní v reakci k průkazu S-100 proteinu, čímž byla doložena jejich příslušnost k buňkám chrupavky. Přítomnost aktinových filament byla v této práci zároveň prokázána i na úrovni ultrastruktury. Autoři tohoto sdělení tehdy pro tyto buňky navrhli označení myochondroblasty a myochondrocyty, což bylo některými americkými autory akceptováno a zároveň se tyto nálezy staly stimulem pro jejich hledání u dalších kostních nádorů i v nenádorových mezenchymových tkáních (Clement et al. 2007, Chaponnier et Gabbiani 2004, Hinz et al. 2003).

Od té doby se této problematice věnovala větší pozornost, neboť tyto nálezy poprvé prokázaly, že samotná exprese α -SMA není dokladem hladkosvalové, myofibroblastické, myoepiteliální či pericytární diferenciace jak se dosud předpokládalo. Toto zjištění bylo potvrzeno i dalšími autory a exprese α -SMA byla v následujících letech popsána v chondroidních buňkách psího menisku (Mueller et al 1999), v hojících se defektech psí kloubní chrupavky (Wang et al. 2000), v intervertebrální ploténce (Schneider et al. 1999), v chondrocytech lidské chrupavky s osteoartrotickými změnami (Kim et Spector 2000), v osteocytech a osteoblastech (Kinner et Spector 2002), ve fibroblastech šlach a ligament (Spector 2001) a v chondromyxoidním fibromu (Nielsen et al. 1999). Dále byla

prokázána exprese α -SMA v kultuře lidských mezenchymálních kmenových buněk a bylo zjištěno, že při diferenciaci v chondrocyty pod vlivem TGF- β 1 se koncentrace této izoformy aktinu zvyšuje (Hung et al. 2006).

V souvislosti s výše uvedenými poznatky jsme zaměřili pozornost tímto směrem i v případě normální, artroticky změněné i transplantované kloubní chrupavkové tkáně. Výzkum jsme rozšířili i na elastickou chrupavku ucha. Zjišťovali jsme, zda se imunofenotyp ušní elastické chrupavky nemění po experimentální transplantaci..

Hlavním opodstatněním pro naši studii byly tedy dvě skutečnosti. V první řadě otázkám zmíněným v předchozím textu dosud nebyla věnována pozornost nebo zůstávají nezodpovězeny. Na druhé straně tato problematika má úzkou návaznost na klinickou medicínu, především na oblast týkající se nemocí hlavy a krku.

1.1 Typy chrupavkové tkáně

Chrupavka je bezcévná podpůrná pojivová tkáň bez vlastního nervového zásobení. U dospělých jedinců je součástí řady orgánů a pokrývá kloubní povrchy. Skládá se z buněk, chondrocytů, a mezibuněčné hmoty pevné konzistence, která tvoří většinu objemu chrupavkové tkáně.

Chondrocyty syntetizují a secernují obě složky *mezibuněčné hmoty*, vláknitou (fibrilární) a amorfní. Podle charakteru chondrocytů a s ohledem na složení mezibuněčné hmoty jsou rozlišovány 3 typy chrupavkové tkáně, a sice chrupavka hyalinní, elastická a vazivová.

Vzhledem k tomu, že chrupavka neobsahuje cévy, dostávají se živiny a kyslík k chondrocytům difúzí z cév jejího vazivového obalu, perichondria, nebo ze synoviální tekutiny. Z tohoto důvodu je tloušťka chrupavky omezená. Z důvodu tlaku kyslíku získávají chondrocyty většinu své energie cestou anaerobní glykolýzy, jejímž konečným produktem je kyselina mléčná.

Schopnost *regenerace* chrupavky, například po traumatu, je díky relativně malému množství chondrocytů velmi omezená. S výjimkou malých dětí regeneruje poškozená chrupavka jen obtížně a často neúplně. K regeneraci dochází z perichondria, kdy kmenové buňky pronikají do defektu a diferencují se v chondrocyty. Převážně se však defekty ve chrupavce hojí vazivovou jizvou (Silver et Glasgow 1995, Konrádová et al. 2000). Díky své malé náročnosti na výživu je chrupavka značně odolná vůči nekróze, a proto je oblíbeným rekonstrukčním materiálem (Kabelka et al. 2005).

Hyalinní chrupavka je nejrozšířenějším typem chrupavky. Makroskopicky má homogenní, lehce namodralý vzhled. V mikroskopickém obraze převažuje amorfni základní hmota (proteoglykany) maskující kolagenní vlákna.

Chondrocyty mají odlišný tvar v závislosti na lokalizaci ve strukturách kloubní chrupavky. Vřetenitý tvar mají těsně u povrchu, jejich dlouhá osa je paralelní s povrchem chrupavky. Při přechodu do hlubších vrstev chrupavky se tvar buněk mění na polokulovitý až kulovitý. Jsou uloženy v tzv. lakunách, které zcela vyplňují.

Vláknitá složka mezibuněčné hmoty se skládá z plsti velmi tenkých kolagenních fibril (10 – 20 nm), které nejsou agregovány do svazků. Jsou tvořeny kolagenem typu II, který je pro chrupavku specifický (Oakes 2004). Při histologickém vyšetření nejsou fibrily v hyalinní chrupavce patrné díky submikroskopickým rozměrům, refrakční index fibril je téměř stejný jako u základní hmoty, ve které jsou zalaty. Kolagen poskytuje chrupavce pevnost v tahu.

Hlavní součástí *amorfni složky* jsou glykosaminoglykany (kyselina hyaluronová, chondroitinsulfát a keratansulfát), proteoglykany a strukturální glykoproteiny.

Glykosaminoglykany (GAG) jsou tvořeny repetitivními disacharidovými jednotkami složenými z uronové kyseliny a aminocukru. Kovalentní vazbou glykosaminoglykanů na tzv. centrální (osový) protein vznikají proteoglykany. Na jeden protein může být navázáno velké množství GAGů. Zvláštní formou GAG je *hyaluronová kyselina* (HA – hyaluronic acid), která nemá proteinovou kostru a je tvořená pouze glukuronovou kyselinou a beta N-acetyl-d-glukosaminem. Je ze všech GAGů největší a je hlavní komponentou extracelulární matrix v embryonálních tkáních, ale také například ve zralé chrupavce. Proteoglykany se mohou vyskytovat samostatně, často se však spojují nekovalentní vazbou prostřednictvím vazebných proteinů s dlouhými molekulami kyseliny hyaluronové za vzniku velkých agregátů schopných vázat, díky silnému negativnímu náboji, velké množství molekul vody. To má význam například u kloubních chrupavek, které tak jsou schopny absorbovat tlak vznikající třením při pohybu kloubu. Proteoglykany tak propůjčují chrupavce pružnost. Největším známým proteoglykanem je aggrecan chrupavky, který při agregaci s kyselinou hyaluronovou dosahuje délky až 4 μm . Proteoglykanové agregáty jsou vázány prostřednictvím elektrostatických vazeb s kolagenními vlákny, tato vazba podmiňuje pevnou, gelovitou konzistenci chrupavky. Mezi další funkce proteoglykanů patří například vazba signálních molekul jako jsou růstové faktory (TGF β – transformující růstový faktor beta, FGF – fibroblastový růstový faktor aj.).

Glykoproteiny (multiadhezní proteiny matrix - spojovací protein, fibronektin a chondronektin) jsou důležité pro vzájemnou vazbu různých součástí ECM a adhezi chondrocytů ke strukturám mezibuněčné hmoty. S věkem se v chrupavce snižuje množství proteoglykanů a dochází k ukládání solí kalcia.

Během vývoje jedince tvoří hyalinní chrupavka dočasný chrupavčitý skelet, který je postupně nahrazen kostní tkání. U dětí tvoří epifyzodiafyzární ploténky a u dospělého člověka nacházíme hyalinní chrupavku ve skeletu nosu, trachey, bronchů, skeletu hrtanu, dále tvoří chrupavky žeberní a kloubní.

Elastická chrupavka obsahuje v základní hmotě kromě fibril z kolagenu typu II především hojná vlákna elastická tvořící velmi hustou síť, která může základní amorfní hmotu zakrývat. Jde o vlákna s výraznou autofluorescencí a izotropií. Lze je znázornit různými metodami k průkazu elasticity.

Chondrocyty jsou v elastické chrupavce rovnoměrně rozptýleny, netvoří výrazné izogenetické skupiny. Jádra chondrocytů bývají mírně excentricky uložena.

V čerstvém stavu je elastická chrupavka makroskopicky zabarvená dožluta. V organismu ji nacházíme v ušním boltci, chrupavčité části zevního zvukovodu, ve stěně Eustachovy tuby, tvoří některé laryngeální chrupavky (epiglottis, cartilago cuneiformis a corinuculata, processus vocalis cart. arytenoideae), někdy se podílí na tvorbě skeletu malých bronchů.

Vyznačuje se značnou ohebností a elasticitou. Přítomnost elastických vláken činí elastickou chrupavku ve srovnání s hyalinní chrupavkou odolnější k degenerativním změnám.

Vazivová chrupavka obsahuje v základní hmotě velmi málo amorfní hmoty a buněk. Převažuje vláknitá složka tvořená kromě kolagenních fibril (kolagen typu II) silnými kolagenními vlákny (kolagen typu I). Amorfní hmoty je velmi málo.

Chondrocyty jsou málo početné, uloženy izolovaně nebo v malých skupinách mezi svazky kolagenních fibril. Vazivová chrupavka je vždy spojena s hustým vazivem, přechod mezi oběma tkáněmi je postupný.

Je hlavním stavebním materiálem meziobratlových plotének, nitrokloubních disků (např. čelistního kloubu) a menisků, z větší části tvoří sponu stydkou, vyskytuje se i v místě úponu některých vazů

1.2 Možnosti rekonstrukce nosního skeletu různými typy chrupavkové tkáně

V současné době se korekce deformit nosního septa a skeletu zevního nosu provádí až na výjimky v rámci jednoho výkonu, tj. funkční a estetické rinoseptoplastiky (Boccieri et Macro 2006, Doležal 2007, Huizing 2003, Kováč 2006, Nolst Trenité 2005). Hlavním cílem je skloubení funkční a estetické složky operace do jednoho celku s důrazem jak na precizní rekonstrukci jednotlivých anatomických struktur nosního skeletu, tak na obnovu normální funkce nosu. Deviace nebo deformita nosní pyramidy je totiž téměř vždy spojena s určitým patologickým nálezem na nosním septu, které slouží především jako opora nosního dorza, ale i nosní špičky (Foda 2008), a proto je její úspěšná repozice nebo rekonstrukce podmíněna dokonalou mobilizací a repozicí nebo rekonstrukcí nosního septa (Beeson 1987, Boccieri et Macro 2006, Doležal 1997, Gunter 1988, Huizing et de Groot 2003, Toriumi et Ries 1993).

Snaha o co nejdokonalejší anatomickou rekonstrukci poškozených nebo chybějících tkání, případně o zpevnění a zlepšení stability stávajících anatomických struktur nebo o vyplnění různých defektů, s sebou přinesla i větší potřebu materiálu (nejčastěji autologní chrupavky) vhodného k těmto účelům (Menick 1999, Nassif 2005, Sajjadian et al. 2010).

Přestože nejsou názory na ideální materiál pro rekonstrukci nosního skeletu jednotné, přiklání se většina autorů v současné době k použití *autologních materiálů*, z nichž je za nejvhodnější, díky mechanickým a antigenním vlastnostem, považována *autologní chrupavka* nosního septa, ušního boltce, tragu a žebra (Araco et al. 2006, Bateman et Jones 2000, Cárdenas-Camarena et Guerrero 1999, Huizing et de Groot 2003, Murrell 2004, Nolst Trenité 2005, Kováč 2006, Obtulovič et Sičák 2000, Pirsig et al. 2004, Quatela et Jacono 2002). Je pružná, pevná a dobře tvarovatelná. Pokud není traumatizovaná, k její resorpci nedochází buď vůbec, nebo jen zřídka, nenastává rejekce, nevyvolává imunitní odpověď, infekční komplikace se vyskytují minimálně (Bateman et al. 2000, Boccieri et Macro 2006, Cakmak et al. 2005, Parker Porter 2000, Tardy 1997). Pro přípravu štěpů se používá buď intaktní, netraumatizovaná chrupavka nebo chrupavka různým způsobem upravená, většinou incisemi nebo drcením (Boccieri et Macro 2006, Cakmak et Buyuklu 2007, Huiznig et de Groot 2003, Kováč 2006). U takto traumatizované chrupavky je však nutno počítat s větší resorpcí, přičemž její stupeň závisí na rozsahu traumatizace při drcení (Cakmak et al. 2005, Huizing et de Groot 2003).

Zdrojem chrupavky používané k rekonstrukci bývá na prvním místě *nosní septum* (Boccieri et Macro 2006, 2005, Dressner et Hilger 2008, Goessler et al. 2007, Huizing et de Groot 2003, Murrell 2008, Nolst Trenité 2005, Sajjadian et al. 2010, Tardy 1997, Vuyk et Zijlker 2005). Septální chrupavka však po úrazech a zejména po provedených operacích nosu, zvláště po submukózních resekcích nosního septa podle Killiana (1904), velmi často v menším či větším rozsahu chybí (Becker et Becker 2003, Boccieri et Macro 2006, Dresner et Hilger 2008, Murrell 2008, Sajjadian et al. 2010). Při rozsáhlejších rekonstrukčních výkonech je proto nutné využít další zdroje chrupavky.

Chrupavka ušního boltce nebo tragu bývá většinou materiálem „druhé volby“ (Boccieri et Macro 2006, Foda 2008, Murrell 2004, Nassif 2005, Sajjadian et al. 2010). Ušní chrupavka se vyznačuje značnou elasticitou a ohebností. Pro rekonstrukci nebo náhradu některých struktur (např. alárních chrupavek), případně ke korekci sedlovitých deformit nosního dorza má velmi vhodný tvar (Ansari et al. 2008, Araco et al. 2006, Ballert et Park 2008, Becker et Becker 2003, Gruber 2003, Menick 1999, Nassif 2005, Nolst Trenité 2005, Huiznig et de Groot 2003, Perkins 2004, Válka 2003). Větší poddajnost ušní chrupavky (zejména u žen) a zvýšená fragilita u starších pacientů mohou být nevýhodné v případech se zvýšenými nároky na mechanickou stabilitu a pevnost štěpu a ztěžují úpravu štěpu do požadovaného tvaru (Allcroft et al. 1994, Murrell 2004, Lovice et al. 1999, Sajjadian et al. 2010, Tardy et al. 1985, Toriumi 2000, Válka 2003).

Boltec je rovněž vhodným zdrojem *kompozitních štěpů* využívaných při rekonstrukcích jizevnatých stenóz nosního vestibula a nosní chlopně (Becker et Boom 2008, Constantian 2002, Fedok 2008, Nolst Trenité 2005, Sičák 2007, Singh et Bartlett 2007, Tardy et al. 1985, Valvoda et Vacková 1993, Walter 2005).

Díky *absenci větší rovné plochy* je ušní chrupavka méně vhodná pro rekonstrukci nosního septa (Araco et al. 2006, Doležal 1999, Sajjadian et al. 2010). Alespoň částečného vyrovnání lze dosáhnout incisemi na konkávní ploše chrupavky (Murrell 2004), ale takto upravený štěp je možné použít především jako „výplň“ mezi slizniční listy do míst bez nároků na mechanickou stabilitu, například při uzavěru perforace septa (Kováč 2006). V případech rekonstrukce ventrokaudální části nosního septa, které zajišťuje oporu nosnímu dorzu a špičce, jsou k zajištění větší stability a mechanické odolnosti doporučovány různé typy speciálních stehů (Boccieri et Macro 2004), sutura s dalšími typy chrupavkových štěpů, rozdělení ušní chrupavky na dvě poloviny a jejich vzájemná sutura (Pirsig et al. 2004, Fischer et Gubisch 2006, Foda 2008). Menší fragmenty chrupavky je možné stabilizovat sešitím s ploténkou kosti z lamina perpendicularis (Gubisch 2006, Huiznig et de Groot 2003, Kováč

2006) nebo s komerčně vyráběnou PDS folii vyrobené ze syntetického, biokompatibilního a biodegradovatelného materiálu polydioxanonu (Bönisch et Mink 2000, Bönisch et Nolst Trenité 2005, Kováč 2007), která se při tloušťce 0,15 mm v organizmu zcela rozkládá hydrolýzou během 25 týdnů

Odběr ušní chrupavky se provádí buď z řezu na *zadní* ploše boltce (posteriorní přístup), jehož výhodou je nenápadná jizva, ale je technicky obtížnější (Ansari et al. 2008, Boccieri et Macro 2006, Boccieri et Marano 2007, Faris et al. 2006, Gruber et al. 2003, Han et al. 2008, Nolst Trenité 2005, Válka 2003). Jednodušší je přístup z *přední* plochy boltce (anteriorní, anterolaterální), který se hodí pro odběr kompozitních štěpů, ale nevýhodou může být v některých případech viditelná jizva těsně pod valem anthelixu (Fedok 2008, Foda 2008, Huizing et de Groot 2005, Murrell 2004, Pirsig et al. 2004, Tardy et al. 1985, Wright et al. 2007). Ušní chrupavka se odebírá v rozsahu potřebném k přípravě konkrétního typu štěpu, maximálně však v *rozsahu cavum a cymba conchae, crus helicis* se z estetických důvodů zachovává (Boccieri et Macro 2006). Jako prevence vzniku hematomu se používá komprese kůže boltce prošívanými tampony nebo vazelínovou gázou (Boccieri et Macro 2006, Murrell 2004, Nolst Trenité 2005, Válka 2003). Hojení je většinou bezproblémové. Při správné technice je riziko pooperačních komplikací, jako je infekce, hematom, pokles a deformity boltce nebo jizevnaté změny kůže, minimální (Sajjadian et al. 2010, Murrell 2004). V případě potřeby je možné odebrat chrupavku z obou ušních boltců (Boccieri et Marano 2007, Murrell 2004, Pirsig et al. 2004).

Největší množství materiálu poskytuje *žeberní chrupavka*. Hodí se pro korekci rozsáhlých sedlovitých deformit chrupavčitého i kostěného nosního dorza nebo nosního septa (Cakmak et Ergin 2002, De Fatta et Williams 2008, Fischer et Gubisch 2006, Shubailat 2003). Má ovšem největší tendenci k dislokaci a ke změně tvaru (ohnutí, zkroucení), proto se používá z celé tloušťky chrupavky pouze centrální segment, který by měl být z hlediska udržení tvaru nejstabilnější (Doležal 1999, Huizing et de Groot 2003, Kim et Gurney 2006). U starších osob bývá žeberní chrupavka často kalcifikovaná, proto je její opracování do vhodného tvaru obtížnější (Marin et al. 2008).

Odběr chrupavky ze žebra je ve srovnání s odběrem ušní chrupavky zatížen podstatně většími komplikacemi, z nichž nejzávažnější je vznik pneumotoraxu (Mackay 2005, Marin et 2008, Sherris et Kern 1998). Riziko poranění pleury je větší při odběru chrupavky z 5. – 7. žebra, proto je doporučován odběr z 10. – 11. žebra (Gentile et Cerveli 2009, Shubailat 2003). Rovněž velikost jizvy, zvláště u žen, nebo dokonce deformita hrudní stěny může být pro některé pacienty obtížně akceptovatelná (Bracaglia et al. 2005, Baran et al.

2005). Bolest v místě odběru je výrazně větší a trvá déle ve srovnání s odběrem štěpu z boltce. Z těchto důvodů je žeburní chrupavka využívána většinou operatérů jen v případech, kdy není možné získat dostatek materiálu z jiných zdrojů (Fischer et Gubisch 2006, Huizing et de Groot 2003, Kim et Gurney 2006, Marin et al 2008, Perkins 2004, Shubailat 2003).

V některých zemích je oblíbená *prezervovaná allogenní chrupavka* (Foda 2008). Důvody jsou stejné jako u alloplastických materiálů, tzn. snadná dostupnost v dostatečném množství, bez nutnosti odběru vlastní tkáně (Demirkan et al.2003). Nevýhodou je sklon k fibrotizaci a kalcifikaci (Gibson et Davis 1977) a podle některých autorů i větší stupeň resorpce ve srovnání s autologní chrupavkou (Doležal 1999, Kridel et Konior 1993). Pro odběr, zpracování a uchovávání existují přísná pravidla. Při procesu zpracování musí docházet k likvidaci nejen bakterií a virů, ale i prionů. Vzhledem k tomu, že riziko přenosu nemocí nelze zcela vyloučit, je v některých zemích její používání zakázáno (Huizing et de Groot 2003).

Štěpy jsou obvykle děleny podle funkce na dvě základní skupiny:

A) *Strukturální* - slouží k náhradě chybějících nebo rekonstrukci případně zpevnění poškozených anatomických struktur.

B) *Kamuflážní* - zakrývají deformitu, vyplňují defekty různého rozsahu (sedlovitá deformita nosního dorza, fissury, dehiscence, drobné vklesliny apod.), případně zvýrazňují některé struktury (nosní špička), aniž by došlo ke změně tvaru nebo postavení původní anatomické struktury a tím k ovlivnění funkce. Mají tedy význam především estetický.

Podle charakteru deformity se používají štěpy z různých materiálů a zdrojů. Podle potřeby se současně kombinují štěpy strukturální a kamuflážní. Existuje velké množství různých typů štěpů, jejich názvosloví ale není zcela jednotné, pro stejný typ štěpu může existovat i více názvů (Bocchieri et Macro 2006, Nolst Trenité 2005, Huizing et de Groot 2003, Perkins 2004, Vuyk et Zijlker 2005).

Velkou pozornost je třeba věnovat *precizní úpravě štěpu*, která má velký vliv na výsledek operace. Povrch štěpu by měl být co nejhladší, okraje seříznuté, zaoblené nebo změkčené, neměl by mít žádné ostré hrany. Jakákoliv nerovnost může být později, zvláště u jedinců s tenkou kůží, velmi nápadná (Dresner et Hilger 2008, Gruber 2003, Huiznig et de Groot 2003, Mackay 2005, Murrell 2008, Sajjadian et al. 2010, Sičák 2007, Tardy et al.1985). S chrupavkou je nutné při úpravě do požadovaného tvaru manipulovat velmi jemně tak, aby nedocházelo ke zbytečné traumatizaci a nezvyšovala se tak pravděpodobnost resorpce štěpu. S tou je nutno počítat zejména u drcené chrupavky, u níž může být navíc resorpce nepravidelná a způsobovat nerovnosti na povrchu štěpu (Sičák 2007).

V případě potřeby, zejména pro augmentaci sedlovitých deformit nosního dorza, lze použít *vícevrstevné („sendvičové“)* štěpy složené z několika vzájemně sešitých vrstev chrupavky (Bocchieri et Marano 2007, Han et al. 2008, Huizing et de Groot 2003, Sajjadian et al. 2010), přičemž lze kombinovat chrupavky z různých zdrojů, nejčastěji septální a ušní (Murrell 2008). Jednotlivé vrstvy (obvykle dvě až tři) musí být v co nejtěsnějším kontaktu a okraje musí být dokonale upraveny (Allcroft et al. 1994, Bocchieri et Marano 2007, Pirsig et al. 2004, Sajjadian et al. 2020, Tardy et al. 1985).

Velikost a tvar štěpu by měl být přiměřený defektu, extrémně velké štěpy mohou vést k nekróze a infekci, případně dislokaci a extruzi (Dresner et Hilger 2008, Sičák 2007). Dokonalá anatomická rekonstrukce poškozených nebo chybějících struktur zásadně přispívá k obnovení normální funkce a vzhledu, ale současně také snižuje potřebu použití různých typů kamuflážních štěpů (Menick 1999).

Štěpy jsou *fixovány* k původním strukturám pomocí vstřebatelných nebo nevstřebatelných stehů, případně fibrinového lepidla nebo mikrošrouby v případě kostních transplantátů (Bocchieri et Macro 2006, Huizing et de Groot 2003, Nolst Trenité 2005, Shubailat 2003, Válka 2003). V některých případech fixace štěpů není nutná, vkládají se do předem precizně připravené podkožní „kapsy“, která musí co nejpřesněji odpovídat velikosti štěpu, aby nedošlo k jeho dislokaci (Cakmak et Buyuklu 2007, Mackay 2005, Murrell 2008, Perkins 2004, Sykes 2008, Tardy et al. 1985). Preparace má probíhat co nejtěsněji ke stávajícím strukturám nosního skeletem, aby byla zachována co nejsilnější vrstva měkkých tkání nad štěpem (Murrell 2008). Správné umístění štěpu může usnadnit i využití vodícího vlákna, využívané většinou při zavřené technice (Huizing et de Groot 2003, Murrell 2004, Mackay 2005, Murrell 2008, Perkins 2004).

1.3 Příprava chrupavkových implantátů metodami tkáňového inženýrství

Nedostatek orgánů vhodných pro transplantaci nebo tkání potřebných k náhradě velkých pooperačních nebo posttraumatických defektů vedl v osmdesátých letech dvacátého století ke vzniku interdisciplinárního oboru nazvaného tkáňové inženýrství. Jeho základním cílem je vývoj a vytváření umělých, v laboratoři připravených tkání a orgánů sloužících k obnově, zachování nebo zlepšení funkcí poškozených tkání nebo náhradě chybějících částí lidského organismu. Nové tkáně nebo i celé orgány lze získat kultivací buněk na vhodném biokompatibilním nosiči (scaffoldu), který vytváří podpůrnou konstrukci pro růst buněk a celých tkání. Tímto způsobem již byly v experimentálních podmínkách připraveny nejrůznější

lidské tkáně, například chrupavka, kost, kůže, šlachy, svaly, močová trubice a měchýř, tkáně pohlavních orgánů, ledviny, rohovky apod., z nichž některé již našly uplatnění v klinické medicíně (Narins et al. 2003, Jackson 2001, Koduri et al. 2006). Většímu rozšíření však zatím brání poměrně dlouhá doba mezi přípravou tkáně v laboratoři a jejím uvedením do klinické praxe, která trvá obvykle 10-20 let.

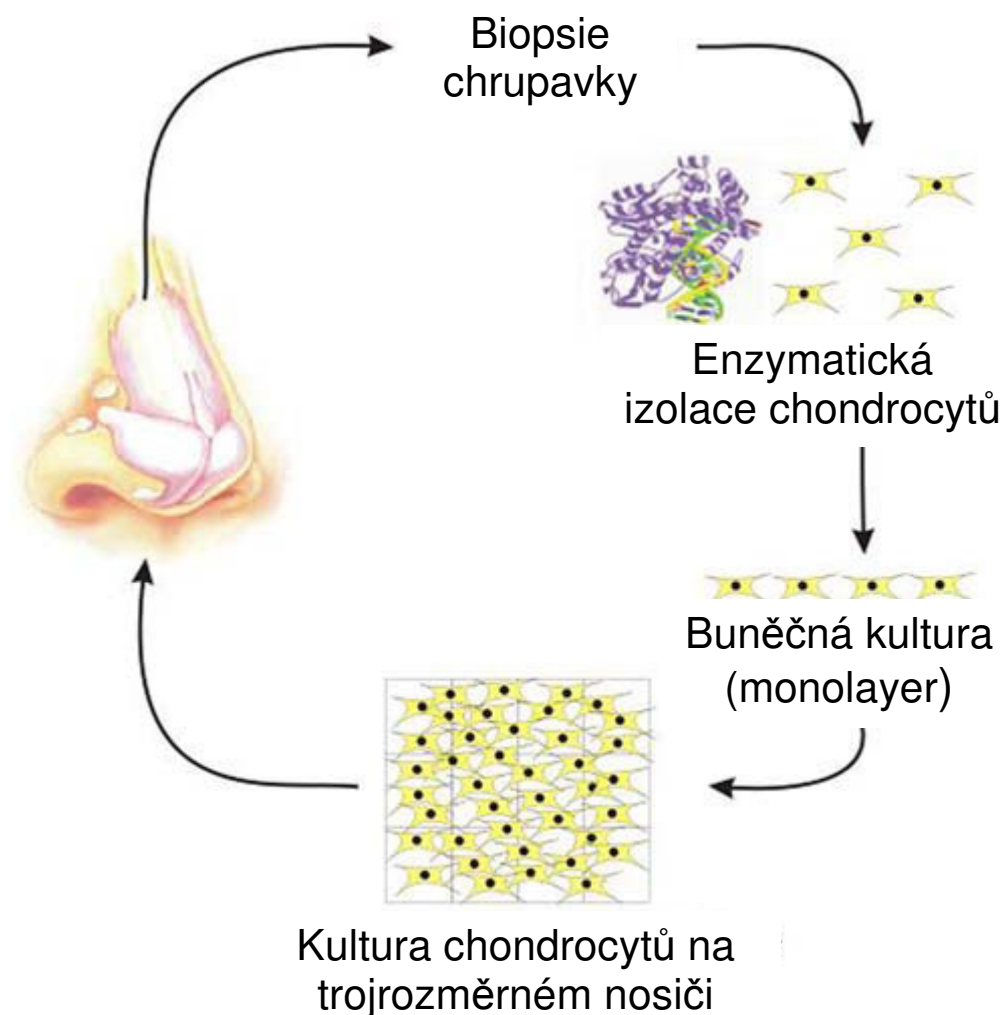
V oblasti hlavy a krku je autologní chrupavka hojně vyžívaným rekonstrukčním materiálem. Zdroje autologních chrupavek jsou však omezené a problémy nastávají zejména při opakovaných odběrech tkáně (Rotter et al. 2005). Jako vhodná alternativa se proto jeví autologní chrupavka připravená pomocí metod tkáňového inženýrství.

V roce 1990 Vacanti a spol. prokázali, že lze vytvořit chrupavkovou tkáň na vhodném biodegradovatelném nosiči. Od té doby probíhá v tomto směru intenzivní výzkum zaměřený na vytvoření chrupavky prakticky použitelné v humánní medicíně. Transplantace, resp. implantace autologních kultur kloubních chondrocytů (ACT - autologous chondrocyte transplantation; ACI – autologous chondrocyte implantation) vázaných na nosiče z kyseliny hyaluronové (Grigolo et al. 2002, Marcacci et al. 2005, Pavesio et al. 2003, Podškubka et al. 2006) nebo jako suspenze buněk ve fibrinovém lepidle (Handl et al. 2006, Visna et al. 2004) jsou v ortopedii již roky rutinně využívány především v léčbě velkých posttraumatických defektů kloubních chrupavek (Brittberg et al. 1994). Nosiče ve formě homogenních gelů umožňují poměrně snadné vyplnění defektu kloubní chrupavky různého tvaru. Oproti tomu jsou požadavky na vlastnosti chrupavky pro využití v oblasti hlavy a krku poněkud odlišné. Implantáty musí vykazovat především dostatečnou mechanickou stabilitu nutnou k udržení požadovaného tvaru, protože funkce chrupavek v této oblasti je zejména podpurná a stabilizující. Tomu musí odpovídat i struktura a složení použitého nosiče.

Klinické aplikace arteficiálně připravené autologní chrupavky v ORL oblasti byly dosud pouze ojedinělé (Yanaga et al. 2004, Yanaga et al. 2006, Yanaga et al. 2009) a výsledky zatím nesplnily očekávání (Bücheler et Haisch 2003, Peiseler 2001, Rotter et al. 2005). Na rozdíl od ortopedických indikací, kdy je nosič osídlený chondrocyty umístěn do tzv. imunoprivilegované oblasti kloubu (Brittberg et al. 1994), vede subkutánní pozice implantátu v oblasti hlavy a krku u imunokompetentních jedinců k zánětlivé reakci a jeho následné resorpci (Rotter et al. 2005). Přes dosažený pokrok tak zůstává využití chrupavkové tkáně vytvořené pomocí metod tkáňového inženýrství v oblasti hlavy a krku především předmětem experimentálních studií zaměřených na její budoucí aplikaci při rekonstrukčních operacích nosního skeletu (Kamil et al. 2003, Puelacher et al. 1994, Zhang et al. 2009), ušních boltců (Cao et al. 1997, Haisch et al. 2002, Shieh et al. 2004, Sterodimas et al. 2009), ušního

bubínku (Kabelka a spol. 2005) nebo tracheálních prstenců (Vacanti et al. 1994, Kim et al. 2010, Klein et al. 2005, Komura et al. 2008).

Základním principem přípravy chrupavky nebo jakékoliv jiné tkáně metodami tkáňového inženýrství je osídlení vhodného nosiče vlastními buňkami pacienta připravenými v dostatečném množství a následné přenesení takto vzniklého implantátu na místo určení v těle pacienta (Obr.I). Celý proces se pak skládá z několika částí: 1) odběr vzorku tkáně, 2) izolace buněk a jejich pomnožení v kultivačním mediu, 3) přenesení kultury buněk na scaffold a kultivace buněk ve scaffoldu, 4) implantace novotvořené tkáně do organismu. V posledních letech se sice rozvíjejí i metody přípravy tkání bez použití scaffoldů, jsou však zatím podstatně méně rozšířeny ve srovnání s metodami využívajícími nosiče buněk (Furukawa et al. 2008, Gilpin et al. 2010, Naumann et al. 2004, Tani et al. 2010, Yanaga et al. 2006).



Obrázek I. Schéma přípravy chrupavky pomocí metod tkáňového inženýrství. Chondrocyty získány biopsií chrupavky nosního septa při septoplastice. Převzato z Goessler et al. (2007)

1) Odběr vzorku tkáně

Pro přípravu arteficiální chrupavky se používají nejčastěji autologní chondrocyty, jejichž zdrojem je v ORL oblasti obvykle nosní septum nebo ušní boltec (Homicz et al. 2003). Odběr lze provést buď excizí malého vzorku chrupavky nebo jehlovou biopsií. Touto cestou se získá vzorek o velikosti do 1mm³, který je většinou dostačující pro následnou kultivaci (Megerian et al. 2000). Pro pacienta je tento postup minimálně zatěžující a lze ho bez problémů opakovat. Další možností je použití multipotentních mezenchymových kmenových buněk získaných z kostní dřeně (BMSCs – bone marrow mesenchymal stem cells) a izolovaných standardizovanými postupy (Chen et al. 2005, Han et al. 2008, Lee et al. 2004, Liu et al. 2008, Park et al. 2009, Zhang et al. 2009), případně mezenchymových kmenových buněk získaných z tukové tkáně (AMSCs – adipose tissue-derived mesenchymal stem cells) (Huang et al. 2004, Lee et al. 2004). Za vhodných podmínek jsou tyto buňky schopny se diferencovat na různé buněčné typy, např. osteoblasty, chondrocyty, adipocyty apod. (Goessler et al. 2007, Johnstone et al. 1998, Li et al. 2010, Peltari et al. 2008, Pittenger et al. 1999, Reyes et al. 2001).

2) Izolace a kultivace buněk v kultivačním médiu

Ze získaného vzorku tkáně je pod mikroskopem mechanicky odděleno perichondrium a chrupavka je rozdělena skalpelem na fragmenty o velikosti přibližně 1 x 1 mm. Takto připravené fragmenty chrupavky jsou inkubovány v roztoku, který obsahuje enzymy (nejčastěji bakteriální kolagenázy, dále hyaluronidázu, trypsin, papain apod.) rozkládající mezibuněčnou hmotu (Bos et al. 2002, Bücheler et Haisch 2003). Suspenze buněk získaná odstraněním rozpuštěných složek extracelulární matrix je poté kultivována in vitro ve standardních kultivačních médiích (DMEM nebo F12 Ham's) obohacených o antibiotika, lidské nebo fetální telecí sérum (Badrul et al. 2004, Yanaga 2004), růstové faktory (Gassmaier et al. 2008, Chung et Park 2007, Shieh et al. 2004) a některé další složky bránící dediferenciaci chondrocytů, například kyselinu askorbovou (Freyria et al. 1999) nebo kortikosteroidy (Wang et al. 2004). Z 1 mm³ chrupavky lze izolovat 1.10³ až 1.10⁴ chondrocytů, jejichž viabilita se pohybuje okolo 80 – 90% (Jakob et al. 2003, Kabelka et al. 2005). Během 8 týdenní kultivace se jejich počet zvýší sto až stotisíckrát (Sittinger et al. 1997).

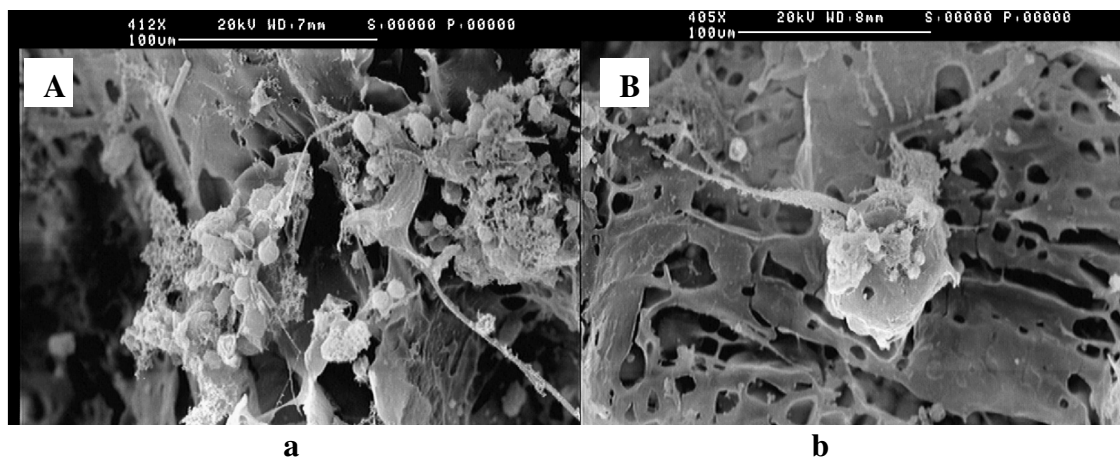
V prostředí *in vitro* rostou buňky nejčastěji ve dvojrozměrné kultuře (monolayer). Do svého okolí ukládají jen malé množství syntetizované extracelulární matrix (ECM), zbytek je odplaven do kultivačního média. Během proliferace v monolayeru dochází k postupné změně fenotypu kultivovaných buněk. Chondrocyty ztrácí svůj původní okrouhlý tvar a mění se na buňky vřetenovitého tvaru podobné fibroblastům, dochází k jejich *dediferenciaci* (Homicz et al. 2003, Schnabel et al. 2002, van Osch et al. 2004)). Současně s tím ustává v buňkách syntéza kolagenu typu II, který je pro chrupavku specifický (Von der Mark et al. 1977) a místo toho buňky vytváří kolagen typu I a III (Aulthouse et al. 1989, Castagnola et al. 1988, Lefebvre et al. 1990). Na základě imunohistochemického vyšetření a ultrastrukturální analýzy provedených v některých studiích však nekoreluje tvar buněk s expresí fenotypu chondrocytů (Grigolo et al. 2002, Horton et Hassel 1986, Li et al. 2006, Malleim-Gerin et al. 1990).

Rediferenciace buněk, kdy buňky získávají zpět původní tvar a začínají znovu syntetizovat kolagen II. typu a proteoglykany, lze dosáhnout jednak jejich umístěním na trojrozměrný nosič vhodného složení a struktury (Aulthouse et al. 1989, Dai et al. 2010, Martin et al. 1999, Grigolo et al. 2002), jednak přidáním vhodných růstových faktorů do kultivačního media, případně jejich inkorporací do struktury nosiče.

Růstové faktory stimulují růst, proliferaci a diferenciaci chondrocytů *in vitro* i *in vivo* a zvyšují produkci extracelulární matrix (Gaissmaier et al. 2008, Trippel 1995). Největší pozornost je věnována těmto růstovým faktorům: transformujícímu růstovému faktoru beta - TGF- β (Transforming Growth Factor beta) (Grimaud et al. 2002) a jeho izoformám TGF β 1 (Chung et Park 2007, Park et al. 2009), TGF β 2 (Filová et al. 2008, Shieh et al. 2004) a TGF β 3 (Han et al. 2008, Lee et al. 2004, Maher et al. 2010), dále pak fibroblastovému růstovému faktoru - FGF (Fibroblast Growth Factor) (Kato et al. 1983, Isogai et al. 2005, Zou et al. 2006), růstovému faktoru derivovanému z trombocytů - PDGF (platelet-derived growth factor) (Gaissmaier et al. 2005, Chen et Mooney 2003), kostním morfogenním proteinům – BMPs (Bone morphogenetic proteins) (Gaissmaier et al. 2008, Melrose et al. 2008) a inzulínu podobnému růstovému faktoru – IGF-1 (Insulin Like Growth Factor-1) (Loeser et al. 2003, Posever et al. 1985). Diferenciaci a růst ušních chondrocytů podporuje růstový faktor pojivové tkáně – CTGF (connective tissue growth factor) (Fujisawa et al. 2008). Používání růstových faktorů specifických pro chrupavky v klinické praxi však zatím nebylo schváleno, zejména z důvodu problematické kontroly kvality, neznalosti všech jejich biologických funkcí a v neposlední řadě pro vysokou cenu základní suroviny (Stoop 2008).

3) Osídlení a kultivace buněk ve scaffoldu

Po dosažení požadovaného množství buněk, řádově $10^6 - 10^7$ v 1 cm^3 , se buňky přenesou na *trojrozměrný nosič* vhodného složení, tvaru a vnitřní struktury (například při použití hydrogelů nebo polylaktidových vláken) (Obr.II), případně se smísí s materiálem scaffoldu (u nosičů na bázi fibrinového lepidla). K adhezi buněk k vnitřnímu povrchu scaffoldu dochází během prvních 6 – 12 hodin, zdvojnásobení počtu buněk nastává přibližně za 23 hodin (Favaretto et al. 1989). Vazba buněk může být zprostředkována například vhodnými funkčními skupinami (Jeschke et al. 2002) nebo povrchovým nábojem (Qiu et al. 1998, Lesný a spol. 2005). Chondrocyty rostoucí v nosiči vytvářejí extracelulární matrix, která postupně vyplňuje jejich okolí.



Obrázek II. Chondrocyty na povrchu (A) a uvnitř (B) scaffoldu z PLLA (elektronmikroskopicky). Převzato z Gong et al. (2008)

Scaffoldy - struktura, složení a vlastnosti

V předchozím textu již bylo zmíněno, že jedním z nejdůležitějších předpokladů pro dosažení rediferenciace kultivovaných chondrocytů a produkce mezibuněčné hmoty je použití trojrozměrného nosiče vhodného tvaru, složení a vnitřní struktury umožňující rovnoměrné prostorové uspořádání chondrocytů (Hutmacher 2000, Bücheler et Haisch 2003).

Pro přípravu nosičů se používají *materiály přírodního původu* nebo *materiály syntetické* event. jejich kombinace. Základním požadavkem, který musí materiál nosiče splňovat, je jeho biokompatibilita – nesmí vyvolávat nepříznivou jak lokální, tak celkovou reakci organismu, musí být netoxický, neantigenní, nepyrogeenní, netrombogenní, nemutagenní, nekancerogenní a neteratogenní (Stoop 2008). Dále by měl ulehčovat migraci,

adhezi a proliferaci buněk a současně by měl být dostatečně mechanicky odolný a lehce sterilizovatelný (Mikos et al.2000, Tuli et al. 2003).

Biomateriály se podle chování po implantaci dále dělí na *nebiodegradovatelné* a *biodegradovatelné*. Nedegradovatelný (stabilní) nosič nemění po osídlení buňkami své parametry a zůstává tak v nezměněné formě v organismu. Nevýhodou je přítomnost cizího materiálu, který může bránit vzniku plnohodnotné tkáně. Biodegradovatelné nosiče jsou po implantaci postupně hydrolyticky nebo proteolyticky rozkládány a jejich součásti jsou vyplavovány z organismu (Piskin 2002, Lesný 2005). Materiál biodegradovatelného nosiče je postupně nahrazen novou tkání. Do té doby by měl nosič zajišťovat dostatečnou mechanickou oporu. Rychlost degradace by tedy v ideálním případě měla odpovídat rychlosti formování nové tkáně (Chung et Park 2007, Gong et al. 2007, Rotter et al. 2005). Produkty degradace nesmí být lokálně ani systémově toxické ani nesmí vyvolávat zánět in vivo (Edwards 2003, Sterodimas et al. 2009). Nevýhodou biodegradovatelných nosičů může být malá mechanická pevnost a zvýšené vrůstání cév a vaziva (Britt et Park 1998), nestejněměrná tvorba extracelulární matrix v nosiči (Gong et al. 2007), nerovnoměrné uvolňování nebo hromadění štěpných produktů s nežádoucími účinky.

Materiály přírodního původu jsou používány k výrobě scaffoldů především pro jejich dobrou biokompatibilitu, biodegradabilitu a schopnost plnit četné biologické funkce, výhodou je například existence přirozených vazebných míst pro buňky. Nevýhodou je zejména obtížné dosažení přesné reprodukovatelnosti jejich vlastností při opakované přípravě, menší mechanická odolnost (Glowatzki et al 2008, Liao et al. 2007) a riziko přenosu některých chorob (Stoop 2008). Mezi nejčastěji používané přírodní polymery v oblasti tkáňového inženýrství patří kolagen (Koduri et al. 2006, Matthews et al. 2002, Pieper et al. 2002), fibrin (Hominga et al. 1993), alginát (Perets et al. 2003, Rowley et al. 1999), deriváty kyseliny hyaluronové (Aigner et al. 1997, Leach et al. 2003, Milella et al. 2002) nebo biosyntetické polymery jako je želatina (Chang et al. 2003) a chitosan (Bhattarai et al. 2005, Jeon et al. 2007, Subramanian et al. 2005).

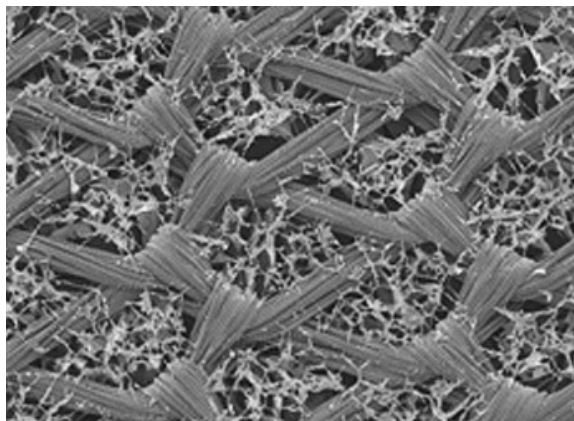
Syntetické nosiče jsou často preferovány pro velký výběr biodegradabilních polymerních materiálů, přesně definovaného tvaru, složení a vlastností, které je možné během výroby ovlivnit podle požadavků na konkrétní aplikaci. (Peter et al. 1998, Chung et Park 2007). Nejvýznamnější skupinou syntetických biodegradabilních polymerů jsou polyestery, z nichž se velké oblibě těší zejména poly(α -hydroxyestery) polymléčná kyselina – PLA (polylactic acid) a její formy, kyselina L-polymléčná – PLLA [poly (L- lactid)] a kyselina DL-polymléčná – PDLLA, [poly (D,L- lactid)], polyglykolová kyselina-PGA

(polyglycolid) a jejich kopolymer – PLGA [poly (lactid-co-glycolid)] (Gunatillake et Adhikari 2003, Shi et al. 2002). Další úpravy vlastností scaffoldů je možné dosáhnout syntézou vhodných kopolymerů. V závislosti na poměrném zastoupení jednotlivých složek kopolymeru lze ovlivnit rychlost degradace nebo mechanické vlastnosti podle konkrétních požadavků. Například polymer ve složení 90% PGA a 10% PLLA byl vyvinut firmou Ethicon jako absorbovatelný šicí materiál pod názvem Vicryl®. Tyto polymery degradují nespécifickým hydrolytickým štěpením svých esterových vazeb. Při hydrolytické degradaci PLLA vzniká kyselina mléčná (laktát), která je typická pro anaerobní metabolismus, produktem degradace kyseliny polyglokolové je netoxická kyselina glykolová. Tvorba kyselých degradačních produktů těchto polymerů může však v důsledku poklesu pH negativně ovlivňovat adhezi a růst buněk (Athanasίου et al.1995, Baek et Ko 2006, Kim et al. 2007, Lu et al. 1999, Rotter et al. 1999). Tuto nevýhodu nemají jiné biodegradabilní hydrogely jako je polyethylen glykol (PEG), který vytváří příznivé a dobře kontrolovatelné prostředí pro růst a diferenciaci buněk, ale na druhou stranu nemá dobré adhezivní a transportní vlastnosti (Williams et al. 2003). Pro výrobu chirurgického šicího materiálu, nosičů léčiv nebo implantátů je využíván semikrystalický polyester, polykaprolakton (PCL), rozkládající se hydrolýzou esterové vazby i při fyziologických podmínkách (Huang et al. 2003). Nevýhodou PCL je velmi pomalá degradace in vivo. Proto byly připraveny kopolymery poly (lactid-co-caprolacton) (PLC), poly (glycolid-co- caprolacton) (PGC) (Nair et al. 2007) nebo semikrystalický diblok kopolymer poly(ϵ -caprolacton)-block-poly (L-lactid) (PCL-b-PLLA) (He et al. 2009). Ve vodě rozpustné polymery jako je polyethylen oxid (PEO) nebo polyvinyl alkohol (PVA) jsou vhodné například pro výrobu nanovlákných nosičů nebo hydrogelů (Schmedlen et al. 2002, Chung et Park 2007). K novějším slibným biodegradabilním materiálům vhodným patří polyesterové elastomery Poly (Octanediol-co-Citrat) (POC) a Poly (Glycerol-co-Sebacat) (PGS) jejichž hydrolytickým rozkladem vznikají netoxické a přirozené metabolické degradační produkty (Jeong et Hollister 2010).

Pevné *scaffolds* se vyrábějí různými technologiemi ve formě gelu, hydrogelu, porézních houbových nebo pěnových struktur, mikrosfér, permeabilní plsti nebo vaty s různou hustotou vláken apod. Mezi *netextilní techniky* patří například vymývání částic, formování taveniny, zpěňování plynem, sušení za mrazu, heterofázová separace, rychlé modelování apod. (Harris et al. 1998, Moroni et al. 2008, Wnek 2004, Woodfield et al. 2004, Yang et al. 2002, Yoon et Park 2001). *Textilními technikami* se připravují *tkané* (pletení, tkaní) a *netkané textilie* (elektrostatické zvláknování, foukání taveniny apod.), dnes často s využitím moderních technologií umožňujících přípravu nanovláken (Obr.VI) (Aigner 1998,

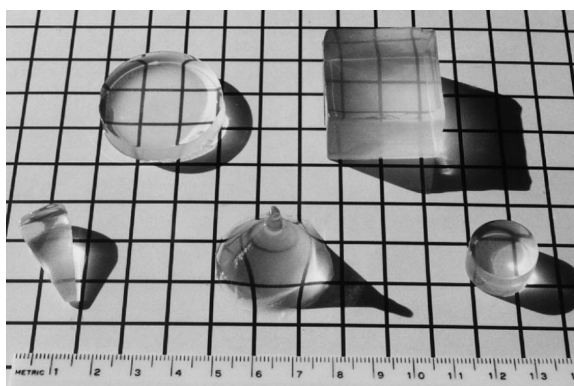
Freed 1997, Greiner et al. 2007, He et al. 2009, Li et al 2002, Ma et al. 2005, Matthews et al. 2002, Müller 2006, Nam et al.. 2000, Wise et al. 2009, Yen et al. 2009).

Kombinací netextilních technik s textilními a různých druhů materiálů, přírodního i syntetického původu, vznikají tzv. *kompozitní nosiče* (Obr.III). Cílem je dosažení výhodnějších vlastností, které jsou dány synergickým působením jednotlivých druhů použitých materiálů a lepším strukturním uspořádáním (Caterson et al. 2001, Chen et al. 2003, Dai et al. 2010, Schagemann et al. 2010). V experimentu byly s dobrými výsledky testovány scaffoldy tvořené kombinací různých přirozených



Obrázek III. Hybridní scaffold z PLGA/collagen (elektronmikroskopicky).
Převzato z (Dai et al. 2010)

polymerů, například hyaluronanu, kolagenu typu I a fibrinu (Filová et al. 2008).



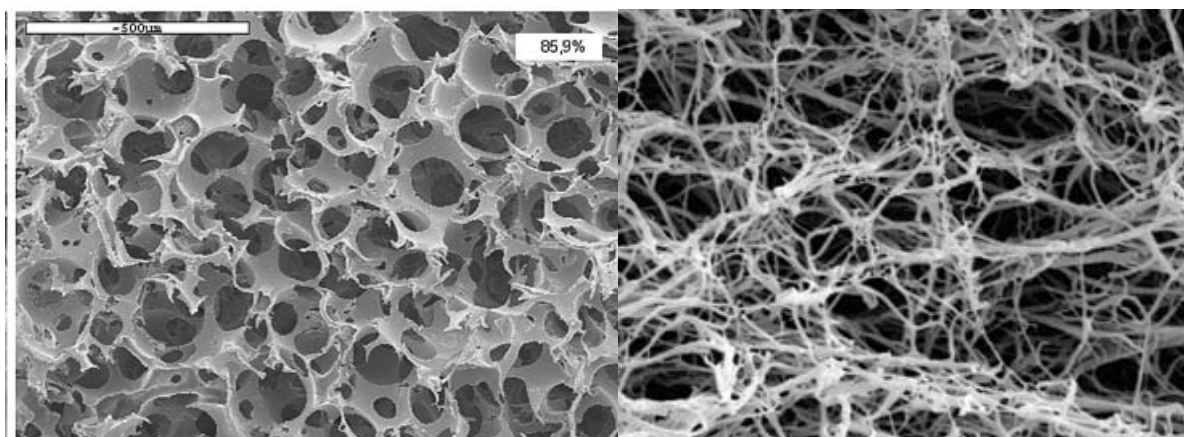
Obrázek IV. Různé typy alginátových hydrogelů.

Pro přípravu chrupavkových implantátů se nejčastěji používají různé homogenní gely event. hydrogely (Obr.4) (Drury et Mooney 2003, Nguyen et West 2002) nebo tzv. makroporézní nosiče (Baek et Ko 2006).

Nejjednodušší skupinou nosičů jsou homogenní gely na bázi kolagenu, kyseliny hyaluronové, fibrinu a jejich kombinace. Poskytují dostatečnou oporu pro růst buněk, extracelulární matrix vytvářená buňkami je zadržována v jejich okolí podobně jako v normální tkáni. V klinické praxi se nejčastěji používá suspenze běžného fibrinového lepidla (Tissucol® apod.) s autologními kloubními chondrocyty. Vzhledem k tomu, že fibrinové sítě neplní v organismu roli dlouhodobě stabilních podpůrných struktur (Haisch et al. 2002), jsou nosiče na bázi fibrinu vhodné spíše pro vyplňování různých kloubních defektů v ortopedii (Handl et al.2006, Rotter et al. 2005, Visna et al. 2004).

Vysoce porézní struktura tzv. *makroporézních nosičů* (existují i nosiče mikroporézní) s dostatečně velkými, vzájemně komunikujícími póry (Obr.V a VI) a vysokým poměrem mezi povrchem a objemem zajišťují rovnoměrné osídlení vnitřního povrchu, dostatečnou adhezi a proliferaci kultivovaných chondrocytů a poskytují odpovídající prostor

pro produkci mezibuněčné hmoty (Buma et al. 2004, Rotter et al. 2005). Póry nesmí být ani příliš velké, protože by docházelo k difúzi molekul novotvořené mezibuněčné hmoty do kultivačního média, ani příliš malé, protože by působily jako překážka pro homogenní distribuci buněk a depozici mezibuněčné hmoty (Aigner et al. 1998, Peter et al. 1998). Struktura scaffoldu musí být dostatečně permeabilní, nesmí působit jako bariéra pro metabolické procesy, protože přísun živin a kyslíku jsou v chrupavce zajišťovány pouze difúzí (Bücheler et Haisch 2003). Pro klinické využití v oblasti hlavy a krku by měly implantáty vykazovat dlouhodobě dostatečnou mechanickou stabilitu, která by měla co nejvíce odpovídat mechanickým vlastnostem zdravé tkáně (Duda et al. 2000).



Obrázek V. Scaffold z PCL (elektronmikroskopicky).
Převzato z (Lebourg et al. 2008)

Obrázek VI. Nanovláknenný scaffold z PLLA (elektronmikroskopicky).
Převzato z (He et al. 2009)

Zvláštní skupinu tvoří injikovatelné biomateriály, které je možné aplikovat do místa defektu pomocí injekční jehly. Jako příklad lze uvést termosenzitivní injikovatelné hydrogely (Stile et al. 1999), fotochemicky síťované hydrogely (Williams et al. 2003), neporézní či vysoce porézní mikrosféry (Chun et al. 2004, Mercier et al. 2004, Kang et al. 2005, Kim et al. 2006, Thissen et al. 2006) nebo *in-situ* zformované scaffoldy využívající schopnost samoorganizace (self-assembly) syntetických polypeptidů (Holmes 2002, Kisiday et al. 2002,).

Struktura biodegradabilních polymerních scaffoldů s dobře komunikujícími póry je základním předpokladem pro osídlení a růst buněk v nosiči. Povrchové charakteristiky, určené chemickým složením materiálu, z něhož je nosič vyroben, však nemusí vyhovovat dalším požadavkům, zejména na zajištění selektivní adheze, migrace a proliferace buněk. Ve většině případů jsou k vytvoření určitého typu tkáně nutné specifické buněčné interakce s molekulami mezibuněčné hmoty.

Vnitřní povrchy nosičů (především ze syntetických polymerů) jsou z těchto důvodů různým způsobem *upravovány* fyzikální adsorpcí nebo chemickou modifikací, která díky kovalentním vazbám zajišťuje vytvoření stabilnější adhezivní vrstvy pro navázání buněk. Jedná se například o zavedení funkčních skupin nespecificky podporujících adhezi buněk, například adsorpci poly-L-lysinu (Rotter et al. 1998) nebo kopolymerů s aminovými nebo karboxylátovými skupinami, adsorpci nebo chemickou vazbu vybraných makromolekul extracelulární matrix a jejich derivátů (kolagen,želatina, fibronectin, laminin, vitronectin, acylované deriváty kyseliny hyaluronové) (Ma et al. 2005, Nuttelman et al. 2001, Bhati et al. 2001). Byly také provedeny modifikace syntetickými kopolymery obsahující peptidické strukturní motivy odvozené od proteinů extracelulární matrix (například RGD –arginin-lysin-kyselina asparágová), specificky podporující interakci s buňkami (Kubies et al. 2000, Hersel et al. 2003).

Pro indukci tvorby chrupavky i ostatních tkání jsou někdy využívány přítomny růstové faktory, které jsou různými způsoby inkorporovány do struktury nosičů, odkud jsou postupně uvolňovány (Lutolf et Hubbell 2005, Sohler et al. 2008). Růstové faktory mohou být také nejprve navázaný na mikrosféry a následně zabudovány do struktury scaffoldu (Fan et al. 2006, Isogai et al. 2005, Lee et al. 2004). Nicméně i tyto postupy mají své nevýhody, k nimž patří narušení stability proteinů během výroby scaffoldu a krátký poločas po uvolnění do tělesných tekutin (Chen et Mooney 2003).

Jako slibná se proto jeví transfekce genů kódujících růstové faktory do cílových buněk zajišťující kontinuální expresi a uvolňování růstových faktorů. Do struktury nosiče je inkorporována DNA kódující geny pro růstové faktory ve formě plazmidu, nověji v podobě nanočásticových polyplexů nebo polykationtových kondenzačních činidel nebo mikrosfér. Tímto způsobem je účinně zajištěna transfekce a kontinuální exprese genů a uvolňování růstových faktorů (Nof et Shea 2002, Park et al. 2006, Sylvaya et Shea 2006, Jang et al. 2006, Guo et al. 2006).

Přes intenzivní úsilí není otázka optimálního strukturálního uspořádání a materiálového složení scaffoldu zatím zodpovězena a zůstává tak předmětem dalšího výzkumu.

2 Vymezení cílů práce

Výchozím bodem práce bylo studium základní histologické struktury a imunofenotypu chondrocytů normální lidské ušní chrupavky, kterým nebyla z pohledu některých aspektů moderní histochemie a imunohistochemie dosud věnována dostatečná pozornost. Zaměřili jsme se především na studium výskytu jednotlivých izoform aktinu v normální, patologicky změněné a transplantované elastické a kloubní hyalinní chrupavkové tkáni. Soustředili jsme se na imunohistochemickou analýzu exprese aktinu na úrovni proteinu, ve vybraných případech jsme se však zabývali analýzou jednotlivých izoform aktinu i na úrovni transkribované mRNA. Další oblastí zájmu byla exprese různých izoform S-100 proteinu a CD 34 i proliferační aktivita chondrocytů.

První výsledky přinesly některá zjištění, která podstatnou měrou ovlivnila směr našeho dalšího výzkumu, neboť se podařilo identifikovat dosud neznámé složky imunofenotypu chondrocytů elastické chrupavky, které jsme neočekávali, a které bylo současně možno sledovat i v lidské kloubní chrupavce.

Dílčí cíle práce lze shrnout do následujících bodů:

1. Analýza základní *histologické struktury normální lidské ušní chrupavkové tkáně* se zaměřením na distribuci chondrocytů i základní komponenty mezibuněčné hmoty tj. elastických vláken a porovnání s nálezy v boltcích u nezralých lidských plodů.
2. Podrobná analýza *imunohistochemických* markerů chondrocytů ušní chrupavky se zaměřením na otázku, zda chondrocyty ušní chrupavky rovněž exprimují aktin hladké svaloviny. V pozitivním případě pátrat po expresi jednotlivých izoform *aktinu a S-100 proteinu* v patologicky nezměněné lidské ušní chrupavce.
3. Histologické a imunohistochemické vyšetření *patologicky změněných* ušních boltců od pacientů, u kterých došlo v této oblasti k traumatickému nebo zánětlivému poškození, vyžadujícímu léčebný chirurgický zákrok.
4. Histologické i imunohistochemické vyšetření vzorků *ušní chrupavky transplantované* pacientům do oblasti *nosního skeletu*, pokud bude prováděna z estetických či funkčních důvodů operační revize, za účelem studia posttransplantačních změn a vitality transplantované tkáně.

5. Sledování změn exprese nejvýznamnějších markerů v intaktní, předoperačně arteficiálně traumatizované nebo v živném médiu kultivované *lidské ušní chrupavce transplantované* na určitou dobu *imunodeficitním myším*.
6. Histologické ověření výsledků *kultivace chondrocytů lidské ušní chrupavky* na různých typech trojrozměrných *nosičů* (scaffoldů) a následná *implantace experimentálním myším*. Po 8 týdnech implantáty vyjmout a vyšetřit histologicky za současného použití výše uvedených imunohistochemických markerů.
7. Sledování změn ušní chrupavky po její peroperační *traumatizaci* v oblasti boltce a po *transplantaci autologních štěpů ušní chrupavky* subkutánně do oblasti dorza u *králíků*.
8. Analýza exprese jednotlivých izoform aktinu v patologicky nezměněné, osteoartrotické a posttraumaticky změněné *kloubní chrupavce*.
9. Analýza autologní *kultury kloubních chondrocytů na nosiči* z esteru kyseliny hyaluronové (Hyalograft® C, FIDIA Advanced Biopolymers, Italy) před transplantací do kloubních defektů u lidí. Zaměřit se především na hodnocení zastoupení aktin pozitivních chondrocytů a aktivity různých izoform S-100 proteinu.

10 měsíců po transplantaci výše zmíněné autologní kultury chondrocytů provést patomorfologické vyšetření artroskopicky odebraných kontrolních *bioptických vzorků nově vytvořené kloubní chrupavky*.

3 Materiál a metody

3.1 Experimentální zvířata

Všechny pokusy na laboratorních zvířatech byly prováděny v centrálním zvířetníku Centra pro experimentální biomodely 1.LF UK Praha. Experimenty byly schváleny Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a byly odsouhlaseny Odbornou komisí pro práci s pokusnými zvířaty 1.LF UK Praha.

3.1.1 Myši

V experimentech byly použity samice imunodeficitních myší NOD.129S7 (B6) Rag1. (Původ: The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA, množeny v Centru pro experimentální biomodely 1.LF UK, Praha, ČR). Myši byly dodány v SPF kvalitě (Specific Pathogen Free), stáří 3 měsíce, váha 20 g. Byly chovány a ustájeny po 5 v individuálně ventilovaných boxech z polykarbonátu za sterilních podmínek. Krmeny byly dietou St-1 (Velaz s.r.o., Praha, ČR), teplota ve zvířinci byla podle vyhlášky 207/2004 Sb. 20 - 24°C a doba svícení 12 hodin.

3.1.2 Králíci

K chirurgickým experimentům jsme použili samice outbredních králíků (Chinchilla Bastard, Charles River Deutschland, Germany), stáří 10 týdnů, váha 1800 – 2500g. Zvířata byla dodána firmou AnLab s.r.o.. Králíci byli chováni v oddělených koticích. Krmeni byli kompletní krmnou směsí pro králíky v laboratorních chovech KO 16 (Velaz s.r.o., Praha, ČR).

3.2 Tkáně

3.2.1 Ušní chrupavka

Vyšetřované vzorky *lidské ušní chrupavky* jsme získali během indikovaných chirurgických zákroků (plastika ušních boltců, odběr štěpu ušní chrupavky pro rekonstrukci nosního skeletu, revizní operace po augmentační rinoseptoplastice s transplantací ušní chrupavky, plastika ušního bubínku, resekce části boltce pro různé nádorové léze apod..) provedených na Oddělení otorinolaryngologie VFN a tyto vzorky byly rutinně biopticky vyšetřeny na Ústavu patologie 1. LF UK a VFN v Praze. Většina výkonů byla provedena autorem této práce.

Dále jsme v rámci studie vyšetřili také části boltců od nedonošených, potracených plodů pitvaných na výše zmíněném ústavu.

Pro experimentální účely jsme využili části normální lidské ušní chrupavky nepoužité během rinoseptoplastiky pro rekonstrukci nosního skeletu nebo fragmenty chrupavky odebrané při plastice ušních boltců. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s použitím odebrané tkáně pro výzkumné účely. Vzorky chrupavky jsme vložili do fyziologického roztoku a uchovávali v chladničce při teplotě 4°C. Časový interval mezi odběrem chrupavky a transplantací ve většině případů nepřekročil 24 hodin. Výjimkou byly dva případy, kdy byla transplantace štěpů provedena za 48 hodin po jejich odběru. Osm vzorků chrupavky bylo před transplantací uchováváno 7 – 14 dnů v živném roztoku při teplotě 37°C.

V *první části experimentu* jsme z chrupavky připravili různé typy štěpů nebo implantátů (trojrozměrné nosiče s kulturou lidských ušních chondrocytů), které byly následně transplantovány, resp. implantovány imunodeficientním myším do oblasti dorza. Za 8 až 16 týdnů po transplantaci byly štěpy nebo implantáty vyjmuty a histologicky a imunohistochemicky vyšetřeny.

V *druhé části experimentu* provedené na králících jsme různým způsobem traumatizovali ušní chrupavku u jednoho zvířete přímo v oblasti obou ušních boltců (bez transplantace), u dalších dvou králíků jsme transplantovali autologní štěpy připravené z ušní chrupavky subkutánně do oblasti dorza. Po 8 týdnech byly štěpy odstraněny a vyšetřeny.

3.2.1.1 Normální netransplantovaná lidská ušní chrupavka

Celkem jsme vyšetřili 36 vzorků nenádorové tkáně ušní chrupavky. Jednalo se o :

1. 30 vzorků *normální elastické chrupavky ušního boltce*, která byla součástí vzorků odebraných pro různé nádorové léze (nejčastěji bazaliomy), dále během plastické operace ušních boltců nebo myringoplastiky, event. při odběru štěpu z ušního boltce pro potřeby rekonstrukce nosního skeletu (19 mužů ve věku 9 – 82 let; 11 žen ve věku 6 – 73 let)
2. Vzorky 6 ušních boltců *od nedonošených a potracených plodů* v 20. – 22. týdnu těhotenství, které neměly samostatný pohřební obřad. (4 plody mužského pohlaví a 2 plody ženského pohlaví)

3.2.1.2 Patologicky změněná lidská ušní chrupavka

Vyšetřili jsme vzorky *patologicky změněné lidské ušní chrupavky* od 5 pacientů, u kterých došlo v této oblasti k traumatickému (4 případy) nebo zánětlivému (1 případ) poškození, vyžadujícímu léčebný chirurgický zákrok.

3.2.1.3 Transplantovaná ušní chrupavka

3.2.1.3.1 Vzorky autologní ušní chrupavky odebrané při revizních operacích nosu

V rámci indikovaných revizních operací nosu bylo nutné u *dvou pacientů* upravit velikost a tvar štěpu z ušní chrupavky transplantované při předchozí operaci provedené před 13 resp. 67 měsíci. Odstraněné části autotransplantátů jsme podrobili histologickému a imunohistochemickému vyšetření.

3.2.1.3.2 Lidská ušní chrupavka transplantovaná imunodeficitním myším

3.2.1.3.2.1 Příprava štěpů z lidské ušní chrupavky před transplantací myším

Celkem bylo připraveno a následně transplantováno *23 imunodeficitním myším* 32 štěpů z lidské ušní chrupavky. Vzhledem k tomu, že se jednalo o nevyužité zbytky chrupavky, nebylo možné vytvořit štěpy jednotného tvaru a velikosti. Přesto jsme se snažili dosáhnout alespoň podobných rozměrů, které se pohybovaly v rozmezí cca 3 – 5 mm x 6 – 10 mm x 2 mm. Pro potřeby studie však nebyla identická velikost štěpů rozhodující.

A) Štěpy z normální chrupavky

Z výše uvedeného počtu (32 štěpů) jsme transplantovali celkem 6 štěpů *intaktní ušní chrupavky* (Tab. 5), perichondrium bylo na obou stranách štěpu zachováno.

B) Štěpy z arteficiálně traumatizované chrupavky

Transplantovali jsme 18 štěpů z lidské ušní chrupavky (Tab. 6) upravených následujícími způsoby:

- 3 štěpy – perichondrium na jedné straně štěpu zachováno, na druhé straně odstraněno
- 3 štěpy – perichondrium na obou stranách štěpu odstraněno
- 3 štěpy – perichondrium na jedné straně štěpu ponecháno, na druhé straně odstraněno a provedeno několik incisí chrupavky vzdálených od sebe 2 – 3 mm přibližně do poloviny tloušťky chrupavky
- 3 štěpy – perichondrium odstraněno z obou stran štěpu, na jedné straně provedeno několik incisí chrupavky vzdálených od sebe 2 – 3 mm přibližně do poloviny tloušťky chrupavky
- 3 štěpy – chrupavka nařezána na několik drobných fragmentů o velikosti 2 x 2 mm
- 3 štěpy – chrupavka mírně rozdrcena v drtiči (Cottle bone crusher, 523900, Karl Storz, Německo)

C) Štěpy z chrupavky uchované v živném roztoku

Osm vzorků ušní chrupavky (Tab.7) odebrané při operaci bylo očištěno od okolních měkkých tkání. Rovněž byla částečně odstraněna perichondrální vazivová tkáň a makroskopicky i perichondrium z obou stran. Poté byla chrupavka po dobu 7 – 14 dnů kultivována v živném roztoku Nutriet mixture F12 Ham (Sigma, St. Louis, MO, USA) doplněném o 10% fetální telecí sérum, s 80 µg/ml gentamicinu ve vlhkém inkubátoru při teplotě 37°C s 5% CO₂. Po vyjmutí z media byly vzorky chrupavky promyty ve fosfátovém pufru (PBS, Sigma, St. Louis, MO, USA) a následně transplantovány imunodeficitním myším.

3.2.1.3.2.2 Příprava implantátů ze scaffoldů a tkáňové kultury lidských ušních chondrocytů

Operativně vyjmutá ušní chrupavka byla očištěna od okolních měkkých tkání včetně perichondria, rozkrájena na drobné fragmenty menší než 1 mm v průměru a enzymaticky natrávena kolagenázou II 2mg/ml (Sigma, St.Louis, MO, USA) a 0,1 mg/ml hyaluronidázou (Sigma, St..Louis, MO, USA), které byly rozpuštěny v DMEM mediu (Dulbecco´s Modified Eagle´s Minimal Essential Medium, Sigma, St.Louis, MO, USA) při teplotě 37°C po dobu 18 hodin.

Izolované buňky byly kultivovány v DMEM mediu doplněném o 10% fetální telecí sérum s 80 µg/ml gentamicinu při teplotě 37°C s 5% CO₂ po dobu 7 - 21 dní (všechny použité ingredience byly od firmy Sigma, St.Louis, MO, USA). Výměna média probíhala každý třetí den kultivace.

Scaffoldy (viz dále) ve tvaru plochých disků o průměru 6 mm a tloušťce 2 mm (Obr.VII A) byly nejprve ponořeny do fosfátového pufru (PBS, Sigma, St. Louis, MO, USA) za účelem vypuzení vzduchu z pórů, následně byly ponořeny do media použitého při kultivaci a osídleny vykultivovanými chondrocyty. Druhý den po osídlení chondrocyty byly scaffoldy opět ponořeny do PBS a po vyjmutí byly připraveny k vlastní implantaci. Zpočátku jsme ponechávali scaffoldy ponořené v kultivačním mediu 4 dny, abychom dosáhli co největšího počtu chondrocytů na nosiči. Opakovaně jsme mikroskopicky vyšetřovali jak suspenzi chondrocytů před osídlením scaffoldu i vlastní scaffoldy po 1 až 4 dnech kultivace v živném roztoku s vykultivovanými chondrocyty. Zjistili jsme, že není signifikantní rozdíl v počtu vitálních buněk po 1. a 4. dnu na scaffoldech, proto jsme dobu kultivace zkrátily na 1 den.

Bylo připraveno celkem 14 implantátů z různých druhů scaffoldů (Tab.8). Dva nosiče ze želatiny byly ve formě pěny, zbylých 12 bylo tvořeno nanovláknem z různých polymerů. Nosiče s kulturou lidských ušních chondrocytů byly implantovány 11 imunodeficitním myším.

Scaffoldy ve formě želatinové pěny:

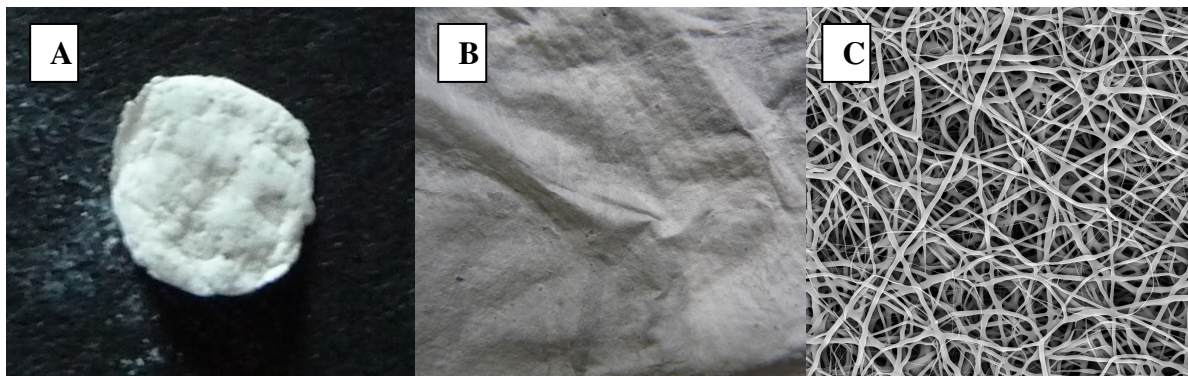
- 2 kusy z 5% želatinové pěny (Gelita Imagel BP Typ 68 917) v D H₂O

Scaffoldy z nanovláken:

- 2 kusy PCL - polycaprolakton (Obr.VII A-C) (WAKO Pure Chemical Industries, Japan), rozpuštěno a zvlákněno v roztoku chloroform/ethanol (9:1)

- 2 kusy PLGA – kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové (75/25) (Lakeshore Biomaterials™, Birmingham, Alabama, USA)
- 2 kusy PVB – polyvinylbutyrát
- 6 kusů nanovláknů PVA/Chitosan – polyvinyl alkohol (Sloviol M – NCHZ a.s., Nováky, SR)/ Chitosan (Medicol), hmotnostní poměr 89:11 (obsah chitosanu v sušině – 2,3 wt%), síťováno při 140° C 15 minut, následně zvlákněno

Všechny nosiče byly připraveny v Laboratoři tkáňového inženýrství Ústavu experimentální medicíny AV ČR v.v.i.



Obrázek VII. Scaffold z PCL (nanovláknů). A, B makroskopicky; C elektronmikroskopicky

Foto: Laskavostí Mgr. Prosecké, Laboratoř tkáňového inženýrství ÚEM AV ČR v.v.i.

3.2.1.4 Ušní chrupavka u králíků

3.2.1.4.1 Způsoby traumatizace ušní chrupavky v oblasti boltce

Chrupavka obou ušních boltců u jednoho králíka byla upravena následujícími způsoby:

- odstranění části ušní chrupavky obdélníkového tvaru o velikosti 15 x 20 mm, odstranění perichondria na jedné straně a její opětovné vložení do místa odběru
- transkartilaginózní incize chrupavky v délce 30 mm a její následná sutura
- pět inkompletních incizí přibližně do poloviny tloušťky chrupavky na jedné straně dlouhých 30 mm a vzdálených od sebe 2 mm
- rozdělení části ušní chrupavky na několik drobných fragmentů o velikosti cca 2x2 mm včetně perichondria, jejich uvolnění a ponechání v blízkosti místa odběru

3.2.1.4.2 Příprava autologních štěpů z ušní chrupavky u králíků

Z chrupavky obou ušních boltců u dvou králíků byly vytvořeny čtvercové štěpy o velikosti cca 10 x 10 mm. U každého zvířete jsme odebrali celkem čtyři štěpy (dva z pravého a dva z levého ušního boltce), dva z nich jsme zbavili z obou stran perichondria, u dalších dvou jsme perichondrium oboustranně ponechali. Bezprostředně poté následovala autotransplantace štěpů subkutánně do oblasti dorza.

3.2.2 Kloubní chrupavka

Vzorky kloubní chrupavky byly získány během chirurgických zákroků provedených na Ortopedické klinice Nemocnice Na Bulovce. Dále byly vyšetřeny tkáně odebrané v průběhu pitvy.

Kromě toho byla studována kultura chondrocytů použitá k transplantaci (ACT - autologous chondrocyte transplantation) v místě traumatických defektů distálního konce femuru dodaná italskou firmou (Hyalograft® C, FIDIA Advanced Biopolymers, Italy).

3.2.2.1 Normální a patologicky změněná kloubní chrupavka a novotvořená chrupavka po ATC

Bylo vyšetřeno celkem 68 vzorků normální i patologicky změněné kloubní chrupavky a chrupavky nově vytvořené po transplantaci chondrocytů (Tab.9).

3.2.2.1.1 Normální kloubní chrupavka

- 7 vzorků patologicky nezměněné chrupavky hlavice femuru (nekroptický materiál odebraný během pitvy pro náhlé úmrtí; 4 vzorky od mužů ve věku 23-45 let, 3 vzorky od žen ve věku 19-37 let).
- 15 vzorků patologicky nezměněné chrupavky hlavice femuru (bioptický materiál odebraný při operaci fraktury krčku femuru; 7 vzorků od mužů ve věku 57-72 let, 8 vzorků od žen ve věku 55-68 let).

3.2.2.1.2 Patologicky změněná kloubní chrupavka

- 12 vzorků chrupavky hlavice femuru při osteoartróze (bioptický materiál odebraný během náhrady kyčelního kloubu; 6 vzorků od mužů ve věku 52-67 let, 6 vzorků od žen ve věku 54-70 let).
- 7 vzorků tibiální chrupavky hemofiliků (bioptický materiál odebraný během operace kolenního kloubu u pacientů s hemofilickou artropatií; 7 mužů ve věku 23-42 let).
- 15 vzorků z oblasti posttraumatických defektů chrupavky distálního femuru (bioptický materiál odebraný během preoperativní artroskopie z oblasti reziduální chrupavky v místě traumatického defektu; 12 mužů ve věku 23-35 let, 3 ženy ve věku 21 – 34 let).

3.2.2.1.3 Novotvořená kloubní chrupavka po ATC

- 12 vzorků nově vytvořené chrupavky distálního femuru po autologní transplantaci chondrocytů. Jednalo se o bioptický materiál odebraný během kontrolní artroskopie 10 měsíců po transplantaci autologních chondrocytů vázaných na nosič italské provenience (Hyalograft® C, FIDIA Advanced Biopolymers, Italy; 12 mužů ve věku 23-35 let)

3.2.2.2 Tkáňová kultura kloubních chondrocytů

Pro potřeby srovnávací histologické a imunohistochemické studie jsme vyšetřili před transplantací i kulturu chondrocytů připravenou v Itálii s nosičem z esteru kyseliny hyaluronové (Hyalograft® C) aplikovanou pacientům z Ortopedické kliniky Nemocnice na Bulovce.

3.3 Chirurgické postupy u experimentálních zvířat

3.3.1 Chirurgické postupy při transplantaci lidské ušní chrupavky a implantaci scaffoldů s kulturami lidských ušních chondrocytů myším

Operační postup při transplantaci 32 transplantátů připravených z lidské ušní chrupavky a implantaci 14 implantátů ze scaffoldů s kulturou lidských ušních chondrocytů byl identický. K experimentům jsme použili celkem 34 samic imunodeficitních myší NOD.129S7 (B6) Rag1.

Operace probíhala v laminárním boxu s filtrovaným vzduchem v celkové anestézii za sterilních podmínek. K anestézii jsme použili intraperitonálně podanou směs Ketaminu (Narkamon 5%, Spofa, Česká republika) a Xylazinu (Xylased 2%, Bioveta, Ivanovice na Hané, Česká republika) v dávce ketaminum hydrochloridum 1,9 mg a xylazinum hydrochloridum 0,22 mg na myš 20g.. Po odstranění chlupů z dorza cca v rozsahu 2x2 cm a přípravě operačního pole jsme vedli kožní incisi ve střední čáře cca 2 cm dlouhou. Paravertebrálně jsme vytvořili buď jednu podkožní kapsu na jedné straně dorza nebo dvě kapsy na obou stranách páteře, do nichž jsme vložili jednotlivé transplantáty. Ránu jsme sešili vstřebatelným šicím materiálem Chirlac 4/0 (Chirmax s.r.o., Praha, ČR). Myši byly po operaci až do probuzení umístěny na vyhřívané podložce s teplotou 37° C.

Explantace byla provedena po 8 týdnech v případě scaffoldů a po 12 nebo 16 týdnech v případě ostatních transplantátů. Těsně před vyjmutím štěpu byli myši usmrceny cervikální dislokací.

3.3.2 Chirurgické postupy u králíků

K chirurgickým experimentům jsme použili tři samice outbredních králíků (Chinchilla Bastard, Charles River Deutschland, Germany). Operační výkony u králíků probíhaly za sterilních podmínek v celkové intravenózní anestézii podáním směsi Ketaminu (Narkamon 5%, Spofa, Česká Republika – 50mg/kg) a Xylazinu (Xylased 2%, Bioveta, Ivanovice na Hané, ČR - 5mg/kg).

Experiment se skládal ze dvou částí. První spočívala v traumatizaci ušní chrupavky různými způsoby přímo v oblasti ušního boltce (jeden králík), druhá pak v transplantaci autologních štěpů ušní chrupavky do oblasti dorza paravertebrálně (dva králíci).

V prvním případě jsme po odstranění chlupů a přípravě operačního pole vedli kožní incisi dlouhou 6 – 8 cm uprostřed ventrální strany boltce rovnoběžně s jeho dlouho

osou.. Uvolnili jsme kůži a podkoží, obnažili jsme chrupavku, kterou jsme upravili způsoby popsanými v části 3.2.1.5.1. Poté jsme ránu sešili jednotlivými stehy vstřebatelným šicím materiálem Chirlac 4/0 (Chirmax s.r.o., Praha, ČR).

V druhé části pokusu jsme identickým chirurgickým přístupem odebrali z obou ušních boltců králíků autologní chrupavčité štěpy velikosti cca 10 x 10 mm a výše popsaným způsobem upravili (viz kap. 3.2.1.5.2.) Po přípravě operačního pole a odstranění chlupů na dorzu jsme vedli paravertebrálně 4 kožní incise dlouhé cca 2 cm (dvě na každé straně). Vytvořili jsme čtyři podkožní kapsy, do každé jsme vložili po jednom autotransplantátu ušní chrupavky, celkem tedy 4 transplantáty u každého králíka..Rány jsme sešili jednotlivými stehy vstřebatelným šicím materiálem Chirlac 4/0 (Chirmax s.r.o, Praha, ČR). Všechny rány se zhojily bez komplikací.

Po dvou měsících jsme všechny tři králíky usmrtili letální dávkou Thiopentalu 1g intrakardiálně (Thiopental Valeant 1g, Valeant Czech Pharma, Praha, ČR) a odebrali jsme v prvním případě celé ušní boltce s upravenou chrupavkou, v druhém pak chrupavčité autotransplantáty z paravertebrální oblasti dorza.

3.4 Použité vyšetřovací metody

3.4.1 Histologické vyšetření

Vzorky obsahující ušní chrupavku odebranou z terapeutických důvodů při operaci pacientů nebo vyjmutou z místa transplantace, resp. implantace experimentálním zvířatům byly zpracovány způsobem obvyklým při běžném bioptickém histologickém vyšetření.

Hlavice femuru byly po fixaci v 10% formolovém roztoku nařezány na plátky šíře 3-5mm. Z periferie a centra povrchu kloubní hlavice jsme odebrali vzorky obsahující kloubní chrupavku i přilehlou kostěnou tkáň. Kromě toho byly z povrchu hlavice odebrány vzorky tvořené pouze chrupavkou. Vzorky obsahující i kostěnou tkáň byly fixovány v 10% pufovaném formolu a dekalifikovány v roztoku EDTA při 40 °C. Vzorky tvořené pouze chrupavkou byly zpracovány bez odvápnění.

Kultury chondrocytů vázané na nosiče jsme zpracovali identickým způsobem jako bioptické vzorky, tj. po zalití do parafinu.

Parafinové bloky se zalitými vzorky vyšetřovaných tkání byly krájeny na mikrotomu a po odparafinování barveny hematoxylinem-eozinem, PASem a to i po natrávení

amylázou, dále pak Safraninem O, alciánovou modří a za použití metody dle Massona doplněné o barvení na elastiku.

3.4.2 Imunohistochemická vyšetření

Imunohistochemická vyšetření byla provedena na 3-4 μm silných řezech montovaných na skla krytá poly-L-lyzinem. Použili jsme standardní avidin-biotin peroxidázovou metodu. Jako chromogen byl využit diaminobenzidin, jako enzym křenová peroxidáza.

Všechny vzorky, s výjimkou ušní chrupavky králíků, byly vyšetřeny s protilátkou proti α -SMA (monoklonální, klon 1A4, 1:100, Dako, Glostrup, Denmark) a svalově specifickému aktinu (monoklonální, klon HHF35, 1:100, Dako), což je protilátka reagující se všemi třemi izotypy α -aktinu (kosterního, srdečního a hladkého svalstva) a s γ -hladkosvalovým aktinem. V jednotlivých analyzovaných skupinách byla provedena i vyšetření s dalšími protilátkami jak je uvedeno níže.

Konkrétně se jednalo o protilátku proti desminu (1:200, Dako), h-caldesmonu (1:50, Dako), vimentinu (1:300, Bio-Genex, San Ramon, CA, USA), CD68 (klon KP1, 1:20, Dako), myogeninu (1:50, Dako), myoD1 (1:50, Dako).. Dále byly použity protilátky proti GFAP (gliální fibrilární protein, 1:200, Dako) a polyklonální protilátka proti S-100 proteinu (1:1600, Dako) a jeho různým izoformám. Protilátky proti izoformám S-100 proteinu (Neo Markers, Fremont, CA, USA) byly ředěny následujícím způsobem – S-100 A1 (1:25), S-100 A2 (1:50), S-100 A4 (1:200) a S-100 A6 (1:200). Protilátka proti S-100 P (5mg/ml) a S-100 A10 (5 mg/ml) pocházely od R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Proliferační aktivita chondrocytů chrupavky boltce byla testována za pomoci protilátky Ki67 (klon MIB 1; 1:50, Dako).

Vybrané vzorky lidské ušní a kloubní chrupavky byly vyšetřeny s protilátkou proti CD 34 (1:200, Immunotech S.A., Marseille, France).

3.4.3 RT-PCR analýza

Ve vybraných případech byla u vybraných vzorků chrupavkové tkáně použita metoda RT-PCR s použitím primerů pro všechny známé izoformy aktinu a desmin (Tab.1). Použili jsme deparafinované vzorky tvořené pouze chrupavkovou tkání. Celkem jsme touto metodou analyzovali 17 vzorků (5 z patologicky nezměněné kloubní chrupavky, 5 z elastické chrupavky ušního boltce, 5 z chrupavky s osteoartrotickými a posttraumatickými změnami, 2

vzorky s kulturou autologních chondrocytů vázaných na nosič a 2 vzorky z nově vzniklé chrupavky odebrané 10 měsíců po autologní transplantaci chondrocytů).

Izolace celkové RNA, syntéza cDNA a RT-PCR analýza byly provedeny podle standardních postupů (Tvrdík et al. 2005). Podmínky PCR byly následující: denaturace při 95°C 3 minuty, annealing při 57 °C 1 minutu a extenze při 72 °C 1 minutu. Následovalo 45 cyklů s podmínkami: denaturace při 95 °C 1 minutu, annealing při 45-57 °C 1 minutu a extenze při 72 °C 1 minutu. Celá reakce byla ukončena závěrečnou extenzí trvající 10 minut při 72 °C.

Tabulka 1. Seznam primerů použitých pro RT-PCR analýzu

Gen	Primer	Sekvence (5' - 3')	Ta (°C)	PCR produkt (bp)
α -SKA	sense	TTCCATTTTCTTCCACAGGG	53	103
α -SKA	antisense	GCTGCCATCGTAAACTGACA	53	103
α -SMA	sense	AGGTAACGAGTCAGAGCTTTGGC	53	199
α -SMA	antisense	CTCTCTGTCCACCTTCCAGCAG	53	199
α -CAA	sense	CCTTCTCTCTCCATCTACCTTCC	47	177
α -CAA	antisense	AGGTTGCAAGTCCTAGTCTGG	47	177
γ -SMA	sense	CCACCTTCCAGCAGATGTG	47	155
γ -SMA	antisense	AGGCTTGTAGGTTTTAATGTTTCA	47	155
β -actin	sense	aggccaaccgcgagaagatgacc	53	332
β -actin	antisense	gaagtccagggcgacgtagcac	53	332
γ -actin	sense	GTCTGTGGCTTGGTGAGTCT	57	166
γ -actin	antisense	GAAACTGGGTCTACGGCTT	57	166
Dezmin	sense	TCAGCTTCAGGAACAGCAGG	57	224
Dezmin	antisense	GGTGTCGGTATTCCATCATC	57	224

Ta = annealing temperature; bp = base pairs; α -SKA = alfa-skeletální aktin; α -SMA alfa-hladkosvalový aktin; α -CAA = alfa-kardiální aktin; γ -SMA = gama-hladkosvalový aktin

4 Výsledky

4.1 Ušní chrupavka u lidí a experimentálních zvířat

4.1.1 Histologické, imunohistochemické a molekulárně biologické nálezy v normální lidské ušní chrupavce

4.1.1.1 Nálezy v ušních boltcích u nedonošených potracených plodů

Vyšetření vzorků ušních boltců od 6 potracených plodů prokázalo, že ušní chrupavkový základ je tvořen nezralými mezenchymovými buňkami, které na rozdíl od elastické chrupavky dospělých neexprimují S100 protein ani α -aktin hladké svaloviny (Tab. 2). Počínající produkce elastických vláken byla prokazatelná pouze v některých oblastech ušní chrupavky v řezech barvených metodou k průkazu elastických vláken (Obr.1). Dalším rozdílem zásadního významu oproti ušní chrupavce dospělých bylo zjištění vysoké proliferací aktivity chrupavkových buněk znázorněné protilátkou proti Ki67 (Obr.2)

4.1.1.2 Nálezy v normálních ušních boltcích u dětí a dospělých

Ve všech 30 vyšetřených případech byla nalezena normální ušní chrupavka elastického typu vyskytující se v dané lokalizaci (Obr. 3-5). Komůrkové buňky byly uloženy v lakunách a obklopovala je mezibuněčná hmota bohatá na proteoglykany barvicí se v reakci k průkazu kyselých mukopolysacharidů tj. alcianovou modří (Obr.6). Jen ojediněle byly komůrkové prostory prázdné. Vedle nefibrilární komponenty mezibuněčná hmota obsahovala četná elastická vlákna, která vytvářela kolem jednotlivých chrupavkových buněk hustou síť dobře identifikovatelnou v histochemické reakci k průkazu elastiky, jako je tomu např. při použití barvení dle Massona kombinovaného s barvením na elastiku (Obr.7).

Při vyšetření ušních chrupavek odebraných z léčebných důvodů jsme učinili několik nálezů, které většinou nebyly, pokud je nám známo, dosud v písemnictví zaznamenány. Jedná se o nálezy získané při histologickém vyšetření a také při použití imunohistochemických reakcí s monoklonálními protilátkami, které popisujeme v následujícím textu.

Při analýze histologických preparátů barvených metodou k průkazu elastiky jsme zjistili, že v centrální části chrupavkové lamely ušního botce se struktura chrupavkové tkáně vyznačovala větší hustotou elastických vláken ve srovnání s jejími periferními částmi. Nález imponoval jako by ušní chrupavka byla složena ze tří různě silných vrstev lišících se hustotou elastických vláken (Obr.7-9). Hustota elastických vláken, ale také koncentrace a tvar chrupavkových buněk se měnily podle toho, zda se jednalo o zevní vrstvu v oblasti konkavity (scapha, fossa anhelicis) nebo zevní vrstvu na konvexní straně (helix, eminentia scaphae, anhelix). Zevní vrstva konkávní strany byla méně buněčná, chondrocyty měly oválný tvar a mezi nimi byla hojnější elastická vlákna, zatímco povrchová vrstva konvexní strany obsahovala větší koncentraci buněk vřetenitého a protáhlého tvaru, které byly obklopeny málo početnými elastickými vlákny (Obr 8-11).

Při imunohistochemickém vyšetření buněk normální ušní chrupavky jsme vedle positivity S- 100 proteinu (Obr. 10 a 11) v řadě chondrocytů zjistili dosud nepopsanou pozitivitu alfa aktinu hladké svaloviny, dále jen aktin (Kaňa et al..2006). Tyto aktin pozitivní chondrocyty (Obr. 12 a 13) tvořily zhruba 60% buněčné populace ušní chrupavky (Tab.2). Chondrocyty s pozitivitou aktinu převažovaly v periferních oblastech, zatímco centrální zóna obsahovala především aktin negativní chondrocyty (Obr. 12 a13). Výjimečně tyto buňky dávaly pozitivní reakci i s protilátkou proti svalově specifickému aktinu.

Tabulka 2. Výsledky analýzy exprese α -hladkosvalového aktinu v normální ušní chrupavce u dětí a dospělých a u potracených nedonošených plodů

Zdroj ušní chrupavky	Počet případů	Věk	α -SMA pozitivní chondrocyty		Exprese S-100
			Povrchová vrstva	Centrální zóna	
Potracené nedonošené plody	6	20 – 22 týdnů	-	-	-
Děti a dospělí	30	6-82 let	60%	<10%	+

Použité zkratky: + = pozitivní výsledek; - = negativní výsledek

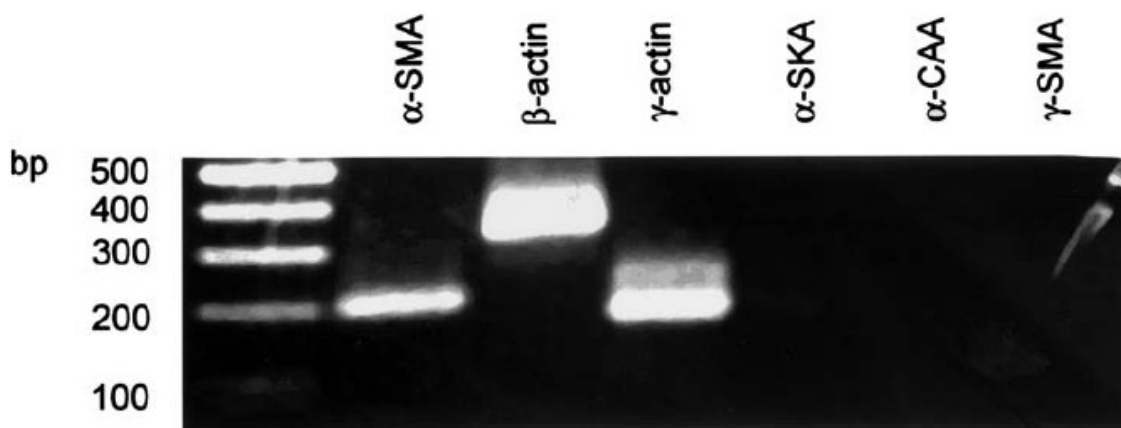
Dalším neobvyklým a dosud nepopsaným nálezem byl výskyt CD 34 pozitivních buněk v oblasti perichondria (Obr. 14). Zaznamenali jsme je pouze ve 20% vyšetřených vzorků, přičemž se jednalo o ojedinělé buňky nebo jejich skupinky, jejichž distribuce byla

zcela nepravidelná. Jejich příslušnost k chondrocytům potvrzovala pozitivní reakce s protilátkou proti S-100 proteinu.

Analýza exprese různých izoforem S-100 proteinu ukázala v některých případech pozitivitu ve všech vrstvách ušní chrupavky. Týkalo se to S-100 proteinu prokazovaného za pomoci polyklonální protilátky (Obr. 15 a 16) a jeho izoforem A1, A6, B2 a P (Obr. 17-19). Naproti tomu při použití protilátek proti izoformám S-100 proteinu A2 a A10 (Obr. 20) byly výsledky pozitivní především v chondrocytech obou periferních zón nacházejících se v blízkosti perichondria. Protilátka proti izoformě A4 S-100 proteinu dávala jen slabě pozitivní výsledky ve všech vrstvách. Výjimečně jsme zaznamenali pozitivitu některých chondrocytů v reakci s protilátkou proti GFAP. Proliferační aktivita chondrocytů stanovená za pomoci protilátky proti Ki 67 byla kompletně negativní (Obr. 21).

4.1.1.3 RT-PCR analýza

RT-PCR analýza (Obr. VIII) potvrdila přítomnost mRNA hladkosvalového alfa aktinu v aurikulárních chondrocytech ve všech 5 vyšetřených vzorcích a výsledek byl v souladu s výsledky imunohistochemického vyšetření. Přítomnost mRNA dalších tkáňově specifických izoforem aktinu (α -SKA, α -CAA a γ -SMA) nebyla zjištěna. Negativně vyzněla také vyšetření k průkazu mRNA desminu a CD 34, což bylo dáno výběrem vzorků. Přítomny byly mRNA pro beta- a gama-aktin představující běžnou nespecifickou součást buněčného cytoskeletu.



Obrázek VIII. RT-PCR analýza přítomnosti mRNA jednotlivých izoforem aktinu v ušních chondrocytech. Produkty PCR byly separovány elektroforézou na agarózovém gelu a vizualizovány pomocí ethidium bromidu. Molekulární hmotnost DNA markerů je uvedena v párech bází (bp). Produkty PCR reakce znázorněné na obrázku odpovídají očekávaným molekulárním hmotnostem. Použité zkratky: bp = base pairs; α -SKA = alfa-skeletální aktin; α -SMA = alfa-hladkosvalový aktin; α -CAA = alfa-kardiální aktin; γ -SMA = gama-hladkosvalový aktin.

4.1.2 Histopatologické nálezy v patologicky změněné lidské ušní chrupavce

4.1.2.1 Reaktivní patologické změny ušní chrupavky u lidí

V bioptickém materiálu, který jsme měli k dispozici od pacientů ošetřovaných na našem oddělení ORL VFN, bylo možno získat představu o charakteru reaktivní reakce ušní chrupavky za různých patologických stavů.

4.1.2.1.1 Agresivní polychondritida

U pacienta s agresivní polychondritidou jsme zaznamenali destrukci jedné ze zevních vrstev ušní chrupavky, která byla doslova arodována po celé délce vyšetřené vzorku z jedné třetiny až poloviny tloušťky chrupavkové vrstvy (Obr. 22). Místo defektu vyplňovala buněčná tkáň s rysy tkáně granulační, místy velmi cévnatá. Zánětlivá celulizace byla minimálně zastoupena.

Ve vlastní zachované chrupavkové tkáni přitom nebylo možno prokázat žádné regresivní změny, které by event. mohly předcházet rozvoji tohoto patologického procesu. Chondrocyty exprimovaly jak S-100 protein, tak aktin hladké svaloviny (Tab.3).

4.1.2.1.2 Posttraumatické změny

S traumatickým poškozením ušní chrupavky nejspíše mohou souviset nálezy drobných ložisek jizevnatého charakteru, které jsme občas zaznamenali při vyšetřování bioptického materiálu odebraného při operaci (3 případy). Jednalo se o mikroskopické okrsky tvořené pouze vazivovou tkání bez chondrocytů a elastických vláken, které se většinou nacházely v periferních částech ušní chrupavky. Jejich identifikace byla snadná především při vyšetření řezů barvených metodou k průkazu vaziva a elastiky dle Massona. Expres S-100 proteinu ani aktinu nebyla u vitálních chondrocytů sousedících s těmito ložisky nijak narušena (Tab.3).

Neobvyklé posttraumatické změny komplexního charakteru jsme pozorovali v ušní chrupavce odebrané pacientovi se zápasnickou minulostí (judo), u kterého byla indikována plastická úprava poškozeného boltce. V tomto případě byla rozsáhlá část ušní chrupavky nekrotická, přičemž chyběla jakákoliv zánětlivá odezva v okolní tkáni. Zároveň byly přítomny rozsáhlé i drobné vazivové jizvy (Obr. 23) podobného charakteru jak je popsáno v předchozím odstavci. V okolním vazivu se nacházely drobné fragmenty vitální chrupavky. Svědčil pro to nález chondrocytů bez známek regresivních změn. V těchto místech

měl povrch chrupavky jakoby vroubkovaný charakter v důsledku odlomení drobných fragmentů této tkáně.

Nejzajímavější nález představovaly drobné proliferáty nově vytvořené chrupavky vytvářející prominující výrůstky na povrchu ušní chrupavky. Zajímavé byly především tím, že se svojí základní strukturou odlišovaly od původní elastické chrupavky, neboť připomínaly chrupavku vazivovou (Obr. 24). Chondrocyty přitom exprimovaly S-100 protein i alfa hladkosvalový aktin (Tab.3), takže nebylo pochyb o chondrocytárním původu buněk vytvářejících tuto novou tkáň. Při podrobnějším ohledání bylo možno navíc prokázat přítomnost nečetných elastických vláken mezi těmito buňkami.

Tabulka 3. Histopatologické nálezy v patologicky změněné lidské ušní chrupavce

Pacient	Věk (roky)	Pohlaví (m/ž)	Patologické změny chrupavky	Exprese α -SMA	Exprese S-100
1	43	ž	agresivní polychondritida – resorpce chrupavky, proliferace vaziva v okolí	+	+
2	32	m	traumatické změny (zápasník judo) náhrada vazivem, proliferace nové chrupavky	+	+
3	25	m	drobná ložiska jizevnatého charakteru	+	+
4	32	m	drobná ložiska jizevnatého charakteru	+	+
5	51	ž	drobná ložiska jizevnatého charakteru	+	+

Použité zkratky: + = pozitivní výsledek; - = negativní výsledek

4.1.3 Změny v normální lidské ušní chrupavce transplantované pacientům s deformitami nosního skeletu

Měli jsme k dispozici materiál odebraný od dvou pacientů z oblasti deformity nosního skeletu po autotransplantaci ušní chrupavky. Jednalo se o přebytečnou tkáň, která byla odstraněna při revizní operaci.

V obou případech jsme ve vyšetřených vzorcích zaznamenali různě velké fragmenty transplantované ušní chrupavky, ojediněle byly zastiženy i drobné části původní chrupavky nosního skeletu. Tkáň ušní chrupavky si i po několika letech uchovala svoji

základní strukturální komponentu, to jest elastická vlákna (Obr. 25 a 26), podle nichž ji bylo možné snadno odlišit od původní nosní chrupavky hyalinního typu. Transplantovaná ušní chrupavka byla z větší části vitální, to znamená, že převažovaly buňky s barvitelnými jádry (Obr. 25-27). Vedle toho se však v transplantovaných fragmentech nacházely i prázdné lakuny bez jakýchkoliv zbytků po původních buňkách (Obr. 27). Rovněž chyběla jakákoliv buněčná reakce, avšak v okolí se nacházelo hutné vazivo. Drobné úlomky chrupavky zastižené ve vyšetřovaných vzorcích přitom byly prakticky bez zachovaných vitálních buněk (Obr. 28).

Reakce k průkazu S-100 proteinu byla ve větší části buněčné populace zřetelně pozitivní. (Obr. 29). Naproti tomu pozitivitu alfa hladkosvalového aktinu jsme zjistili jen v periferní zóně a to pouze ojediněle (Tab.4). CD 34 pozitivní buňky blízké buňkám kmenovým, jsme vůbec neprokázali.

Tabulka 4. Pacienti s vyšetřenou transplantovanou ušní chrupavkou do nosního dorza

Pacient	Věk (roky)	Pohlaví	Umístění štěpu	Doba od transplantace do odběru vzorku	Exprese α -SMA	Exprese S-100
1	37	ž	nosní dorzum	67	+	+
2	33	ž	nosní dorzum	13	+	+

Použité zkratky: + = pozitivní výsledek; - = negativní výsledek;

4.1.4 Změny v normální lidské ušní chrupavce po transplantaci myším

Ve všech případech se štěpy dobře ujaly a vhojily bez rejekční či zánětlivé reakce ze strany hostitelského zvířete. Transplantát byl obvykle obklopen tenkým vazivovým pouzdem, přičemž vazivová tkáň byla ložiskovitě ve zvýšené míře buněčná.

Základní struktura chrupavky zůstala v těchto případech zachována, včetně sítě elastických vláken a nevláknité mezibuněčné hmoty, jak jsme mohli ověřit v preparátech barvených Safraninem O a alcianovou modří. V některých vzorcích zůstalo zachováno i tzv. vrstevnaté uspořádání, jak je popsáno výše.

Nekrotické chondrocyty jsme ve vzorcích vyšetřených před transplantací zaznamenali v buněčné populaci pouze výjimečně. Po transplantaci tvořily takto změněné chondrocyty v průměru přibližně 4% buněčné populace transplantátu (Obr 30). Zánětlivou reakci v okolí nekrotických chondrocytů jsme přitom nezaznamenali. Apoptoticky změněné

chondrocyty nebyly rovněž přítomny. Nekrotické chondrocyty bylo možné spolehlivě identifikovat jako eosinofilní útvary uvnitř lakun se zachovanou základní konturou jaderných struktur avšak bez barvicí se jaderné bazofilní DNA (Obr.30).

V některých vzorcích jsme pozorovali zcela drobné vazivové jizvy, v jejichž rozsahu chyběly jak chondrocyty, tak elastická vlákna (Obr. 31). Jejich vznik v souvislosti s transplantací není vyloučen, avšak na druhé straně je nutné připustit, že tyto změny mohly být ve vzorku přítomny již před transplantací, jak jsme ojediněle zaznamenali u kontrolních případů.

Jinou změnou, která však podle našeho názoru s transplantací bezprostředně souvisí, je nález ojedinělých okrsků jakéhosi myxoidního prosáknutí chrupavkové tkáně (Obr. 32), v jejímž rozsahu sice chyběla elastická vlákna, ale chondrocyty volně ležící v řídké mezibuněčné hmotě přežívaly. Podobné změny jsme pozorovali v lidské chrupavce u pacientů s těžkým traumatickým poškozením chrupavky boltce.

Imunohistochemické vyšetření za účelem zjištění proliferační aktivity chondrocytů s protilátkou proti Ki67 vyznělo u vitálních vzorků, podobně jako před transplantací, zcela negativně.

Větší část chondrocytů exprimovala α -hladkosvalový aktin stejně jako ve vzorcích vyšetřených před transplantací (Tab.5). U části zvířat však byla exprese aktinu patrná pouze v úzké zóně chondrocytů uložených v periferních částech implantátu (Obr.33).

Expese polyklonálního S-100 proteinu (Tab.5) byla z hlediska intenzity i topografických vztahů vyjádřena identickým způsobem jako v kontrolních vzorcích (Obr. 34). O vitalitě transplantovaných vzorků svědčily i pozitivní nálezy v transplantátech vyšetřených protilátkami proti různým izoformám S-100 proteinu. Nejmarkantnější byly výsledky reakce s protilátkou proti S-100 A1, kdy reagovala pozitivně většina chondrocytů, samozřejmě bez oblastí s prázdnými lakunami. Pozitivita izoform S-100 A6, A10, AP byla rovněž zřetelná, ale vázala se na pouze na buňky obou periferních zón. Naproti tomu reakce s protilátkami proti S-100A2, A4 vyzněly prakticky kompletně negativně.

Tabulka 5. Výsledky experimentální subkutánní transplantace normální lidské ušní chrupavky

Mys č.	Pacient		Doba ponechání štěpu (týdny)	exprese α -SMA	exprese S-100	Vitalita štěpu
	Věk (roky)	Pohlaví (m/ž)				
1	36	m	12	+	+	vitální, drobné vazivové jizvy
2	24	ž	12	+	+	zcela vitální
3	27	ž	12	+	+	zcela vitální
4	41	m	16	+	+	ojedinělé nekrotické buňky
5	30	ž	16	+	+	drobné jizvy
6	45	m	16	+	+	ojedinělé nekrotické buňky

Použité zkratky: + = pozitivní výsledek; - = negativní výsledek

4.1.5 Změny transplantované ušní chrupavky upravené traumatizací

Některé vzorky ušní chrupavky použité k transplantaci byly před transplantací zbaveny z jedné (Obr. 35 a 36) nebo obou stran perichondria, což vitalitu podstatně neovlivnilo. V těsném sousedství defektu však část chondrocytů zanikla, jak pro to svědčil nálezný prázdných lakun.

Jiné byly částečně incidovány z jedné strany skalpelem (Obr. 37 - 39) částečně rozdraceny v drtiči (Cottle bone crusher) nebo byly rozděleny na drobnější fragmenty. Ani při jednom z těchto postupů jsme však nepozorovali významnou ztrátu vitality, známky zvýšené proliferace nebo vznik vazivového spojení sousedních okrajů tkáně chrupavky. U některých vzorků jsme však zaznamenali ojedinělé, nepravidelně rozmístěné, drobné ložiskové nekrózy postihující většinou jen jednotlivé chondrocyty nebo chondrocyty v povrchové vrstvě transplantátu (laminární nekróza).

Pokud se během mechanické traumatizace oddělily drobné fragmenty chrupavky, zůstaly kromě drobných okrsků nekrotických buněk z větší části vitální obklopené původní

tukově vazivovou tkání daného místa (Obr. 38 a 39). V jednom případě drcené chrupavky jsme našli dva malé oddělené fragmenty, které byly zcela nekrotické.

Do arteficiálně vytvořených trhlin rostla cévnatá vazivová tkáň charakteru granulační tkáň (Obr. 39). Převážně v blízkosti řezu jsme místy nacházeli drobné ložiskové nekrózy jednotlivých chondrocytů a prázdné lakuny bez chondrocytů.

Kromě výše uvedených nálezů jsme nezaznamenali jiné patologické změny např. ve smyslu aroze chrupavkové tkáň v souvislosti s prorůstáním cév anebo fibroblastů. Cévy rostly pouze do arteficiálně vytvořených mikroskopických štěrbin v chrupavkové tkáni (Obr. 37 – 39). Nepozorovali jsme ani žádnou makrofágickou reakci typu z cizích těles v okolí drobných fragmentů ušní chrupavky.

Ve vitálních oblastech transplantované chrupavky chondrocyty exprimovaly jak S-100, tak i α -hladkosvalový aktin (Tab.6).

Tabulka 6. Výsledky experimentální subkutánní transplantace traumatizované lidské ušní chrupavky

Myš č.	Pacient		Úprava chrupavky před transplantací	Doba ponechání štěpu (týdny)	Exprese α -SMA	Exprese S-100	Vitalita štěpu
	Věk (roky)	Pohlaví (m/ž)	štěp č. 1	štěp č. 2			
1	40	m	perichondrium odstraněno na jedné straně + paralelní incise	16	+	+	vrůstání granulační tkáně, ojedinělé nekrotické buňky
			perichondrium odstraněno na jedné straně	16	+	+	ojedinělé nekrotické buňky
2	35	m	perichondrium odstraněno na obou stranách	16	+	+	ojedinělé nekrotické buňky
			perichondrium odstraněno oboustranně + incise jednostranně	16	+	+	vrůstání granulační tkáně, ojedinělé nekrotické buňky
3	41	ž	nařezání na fragmenty 2x2 mm	12	+	+	nekróza povrchové vrstvy buněk jednoho fragmentu
			perichondrium odstraněno na obou stranách	12	+	+	zcela vitální
4	26	ž	částečně rozdrcení, perichondrium odstraněno na obou stranách	12	+	+	větší část vitální, nekróza dvou oddělených fragmentů
			perichondrium odstraněno na obou stranách	12	+	+	ojedinělé nekrotické buňky

Tabulka 6 – pokračování. Výsledky experimentální subkutánní transplantace traumatizované lidské ušní chrupavky

Myš č.	Pacient		Úprava chrupavky před transplantací	Doba ponechání štěpu (týdny)	Exprese α -SMA	Exprese S-100	Vitalita štěpu
	Věk (roky)	Pohlaví (m/ž)	štěp č. 1				
			štěp č. 2				
5	31	ž	částečné rozdrčení, perichondrium odstraněno na obou stranách	16	+	+	zcela vitální
			nařezání na fragmenty 2x2 mm	16	+	+	ojedinělé nekrotické buňky
6	33	ž	perichondrium odstraněno na jedné straně	16	+	+	laminární nekróza jedné zevní vrstvy buněk
			perichondrium odstraněno na obou stranách + incise jednostranně	16	+	+	vrůstání granulační tkáně, ojedinělé nekrotické buňky
7	31	m	perichondrium odstraněno na jedné straně	12	+	+	zcela vitální
			částečné rozdrčení, perichondrium odstraněno na obou stranách	12	+	+	ojedinělé nekrotické buňky
8	23	m	perichondrium odstraněno na jedné straně + paralelní incise	12	+	+	vrůstání granulační tkáně, ojedinělé nekrotické buňky
			perichondrium odstraněno na obou stranách + incise jednostranně	12	+	+	vrůstání granulační tkáně, ojedinělé nekrotické buňky
9	30	ž	perichondrium odstraněno na jedné straně + paralelní incise	12	+	+	vrůstání granulační tkáně, ojedinělé nekrotické buňky
			nařezání na fragmenty 2 x 2 mm	12	+	+	zcela vitální

Použité zkratky: FR = fyziologický roztok; + = pozitivní výsledek; - = negativní výsledek

4.1.6 Histopatologické nálezy v normální lidské ušní chrupavce uchovávané před transplantací v kultivačním mediu

U osmi zvířat byly transplantovány vzorky lidské ušní chrupavky, které jsme před transplantací makroskopicky zbavily perichondria a ponechali v kultivačním mediu Nutriet mixture F12 Ham (Sigma) po dobu 7 – 14 dnů při teplotě 37°C. Následně byly chrupavky transplantovány imunodeficitním myším na dobu 12 až 16 týdnů. Při mikroskopickém vyšetření jsme však zjistili, že při přípravě těchto štěpů většinou nebylo odstraněno perichondrium, ale pouze perichondrální vazivová tkáň. Tam, kde došlo současně k odstranění perichondria i periferní části chrupavky byl výsledek jiný. V těsném sousedství defektu v lakunách většinou chyběly chondrocyty a na chrupavku naléhala tkáň vazivově tuková.

Jeden štěp nebyl při pokusu o explantaci vůbec nalezen. V dalším případě jsme zaznamenali prakticky kompletní odúmrtí transplantátu, kde byly základní struktury zachovány pouze stínovitě a na první pohled bylo možné podle ztráty barvitelnosti jaderných struktur rozpoznat, že tkáň je kompletně nekrotická (Obr. 40). Ojediněle jsme zaznamenali masivní zánětlivou reakci provázenou hnisáním.

Ostatní vzorky se vhojily bez jakýchkoliv morfologicky prokazatelných změn. To znamená, že většina chondrocytů byla vitálních s dobře zachovanými cytologickými detaily, včetně dobře barvitelných jader. Ojediněle jsme našli drobné ložiskové nekrózy jednotlivých chondrocytů. V okolní tkáni jsme nezaznamenali rejekční reakci.

Imunohistochemické vyšetření opět prokázalo expresi S-100 proteinu i hladkosvalového alfa aktinu. Výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulce č.7.

Tabulka 7. Výsledky experimentální subkutánní transplantace lidské ušní chrupavky kultivované v mediu

Myš č.	Pacient		Kultivace chrupavky v mediu (dny)	Doba ponechání štěpu (týdny)	exprese α -SMA	exprese S-100	Vitalita štěpu, resorpce
	Věk (roky)	Pohlaví (m/ž)					
1	26	ž	14	16	+	+	drobné ložiskové nekrózy chondrocytů
2	33	ž	14	16	+	+	zcela vitální
3	33	m	7	16	-	-	resorpce štěpu
4	33	m	7	16	+	+	ojedinělé nekrotické buňky
5	25	m	7	12	-	-	kompletní nekróza štěpu
6	18	m	7	12	+	+	ojedinělé nekrotické buňky
7	38	m	8	12	+	+	zcela vitální
8	38	m	8	12	+	+	ojedinělé nekrotické buňky

Použité zkratky: + = pozitivní výsledek; - = negativní výsledek

4.1.7 Implantace nosičů s kulturou lidských ušních chondrocytů myším

4.1.7.1 Histologie kultury lidských chondrocytů imobilizovaných na želatinovém nosiči před implantací

Kultury chondrocytů se scaffoldem ze želatiny byly před implantací histologicky vyšetřeny. Ve všech případech jsme v prostorách mezi septy nosiče zaznamenali zcela drobné skupinky málo diferencovaných buněk oválného tvaru (Obr. 41-43), které byly pozitivní v reakci k průkazu S100 proteinu (Obr.44). Pozitivita této imunohistochemické reakce může svědčit pro jejich příbuznost s chondrocyty. Expresi α -SMA jsme nezjistili. Buněk bylo jen malé množství a vyskytovaly se pouze v drobných skupinkách bez známek produkce mezibuněčné hmoty.

4.1.7.2 Vyhodnocení implantované kultury ušních chondrocytů se želatinovým nosičem

Po 8 týdnech byl transplantát vyjmut z podkoží (Tab.8) a při histologickém vyšetření bylo zjištěno, že in vivo nedošlo k resorpci nosiče. V prostorách mezi septy z materiálu nosiče jsme zaznamenali ostrůvky chrupavkové tkáně a tkáň tukově vazivovou (Obr. 45-52). Ostrůvky chrupavky sestávaly z lakunárních chondrocytů často oddělených jemnou sítí elastických vláken, jak jsme si ověřili příslušným barvením k průkazu elastických vláken (Obr. 49 a 50). V jednom vzorku byla zastižena ojedinělé shluky nezralých buněk.

Chondrocyty vykazovaly pozitivní výsledky reakce k průkazu S-100 proteinu (Obr. 51). Pozitivní reakci jsme zaznamenali i při použití protilátek proti různým izoformám S-100 proteinu. Pro podrobnější hodnocení exprese jednotlivých izoform S-100 proteinu však nebylo množství materiálu dostatečné.

V řadě chondrocytů bylo možné prokázat α -hladkosvalový aktin (Obr.52). Na periférii těchto chrupavčitých ložisek se nacházely málo diferencované větvenité buňky rovněž pozitivní v reakci k průkazu S-100 proteinu a aktinu (Tab.8). V okolí nosiče byla patrná obrovskobuněčná reakce typu z cizích těles (Obr. 48).

4.1.7.3 Vyhodnocení implantované kultury ušních chondrocytů s různými nosiči z nanovláken

Ve skupině experimentálních zvířat, kde byly implantovány nosiče s kulturou lidských ušních chondrocytů jsme zaznamenali resorpci celého implantátu v několika případech. Jednalo se pouze o jeden typ nosiče, a sice PVA/Chitosan 89:11, kdy bylo resorbováno celkem 5 ze 6 implantátů. V posledním případě jsme sice nebyli při explantaci schopni implantát makroskopicky identifikovat, po odběru bloku tkáně z místa původní implantace však byly při mikroskopickém vyšetření nalezeny vazivově opouzdřené volné uzlíky chrupavky bez nosiče.

Výsledky u nalezených a vyšetřených implantátů byly podobné jako u předchozí skupiny. Struktury nosiče nebylo jednoduché identifikovat. Pravděpodobně jim odpovídají zbytky vláknitého bezbarvého materiálu (Obr. 55). Ve strukturách myxoidní tkáně se nacházely pruhy buněk nejasného původu, pravděpodobně fibroblastů, a kompaktní ostrůvky chrupavkové tkáně (Obr. 53-56). Nově narostlá chrupavková tkáň vytvářela ostře ohraničená uzlovitá ložiska s diskretními elastickými vlákny (Obr. 57 a 58). Buňky těchto ostrůvků exprimovaly α -hladkosvalový aktin i S-100 protein (Tab.8; Obr. 59 a 60). V okolí jednoho nosiče z PCL byla patrná obrovskobuněčná reakce typu z cizích těles (Obr. 50).

Tabulka 8. Výsledky subkutánní transplantace chondrocytů lidské ušní chrupavky na scaffoldech

Myš číslo	Pacient		Kultivace chondrocytů (dny)	Imobilizace na scaffoldu (dny)	Typ scaffoldu	Doba od transplantace do explantace (týdny)	Exprese α -SMA	Exprese S-100	Vitalita implantátu, resorpce
	Věk (roky)	Pohlaví (m/ž)	Štěp č.1						
			Štěp č.2						
1	29	ž	21	4	želatina	8	+	+	diferenciace v chrupavku málo vyznačena, obrovskobuněčná reakce
2	35	m	9	1	PVB	8	+	+	ložiska chrupavky
3	35	m	7	4	želatina	8	+	+	ložiska elastické chrupavky ve struktuře nosiče, obrovskobuněčná reakce
4	9	ž	8	4	PVA Chitosan 89:11	8	-	-	resorpce implantátu
			8	4	PVA Chitosan 89:11	8	-	-	resorpce implantátu
5	9	ž	8	4	PVA Chitosan 89:11	8	-	-	resorpce implantátu
6	9	ž	8	4	PVA Chitosan 89:11	8	-	-	resorpce implantátu

Tabulka 8. – pokračování. Výsledky subkutánní transplantace chondrocytů lidské ušní chrupavky na scaffoldech

Myš číslo	Pacient		Kultivace chondrocytů (dny)	Imobilizace na scaffoldu (dny)	Typ scaffoldu	Doba od transplantace do explantace (týdny)	Exprese α -SMA	Exprese S-100	Vitalita implantátu, resorpce
	Věk (roky)	Pohlaví (m/ž)	Štěp č.1						
			Štěp č.2						
7	30	m	9	1	PVA Chitosan 89:11	8	-	-	resorpce implantátu
8	30	m	9	1	PVA Chitosan 89:11	8	+	+	volné uzlíky elastické chrupavky vazivově opouzdřené, bez scaffoldu
9	18	m	21	1	PCL	8	+	+	ostrůvky elastické chrupavky a myxoidní hmoty s obrovskobuněčnou reakcí, vazivově opouzdřeno
			9	1	PLGA	8	+	+	dtto
10	18	m	9	1	PVB	8	+	+	dtto
11	29	m	20	1	PCL	8	+	+	ostrůvky chrupavky + elastika
			20	1	PLGA	8	+	+	ostrůvky chrupavky + elastika

Použité zkratky: α -SMA = α -hladkosvalový aktin; nanovláčna: PVA= polyvinylalkohol, PCL= polycaprolakton; PLGA= kopolymer kyseliny mléčné a glykolové; PVL= polyvinylbutyrát ; + = pozitivní výsledek; - = negativní výsledek

4.1.8 Změny ušní chrupavky u králíků po traumatizaci v oblasti boltce a po autotransplantaci ušní chrupavky do oblasti dorza

Odstraněná část ušní chrupavky zbavená perichondria z jedné strany a vložená zpět do místa odběru se vhojila aniž by vznikly nějaké regresivní změny chondrocytů (Obr. 61 – 63). Znamená to, že jsme nezaznamenali nekrotické chondrocyty ani známky resorpce chrupavkového povrchu bez perichondria.

Kompletní rozdělení ušní chrupavky transverzální incizí s následnou suturou nevedlo ke zvýšení proliferační aktivity chondrocytů. Oba konce zůstaly odděleny a spojily se pouze vazivovou tkání bez jakýkoliv známek tendence ke srůstu konců ušní chrupavky nově vytvořenou chrupavkovou tkání (Obr. 64). V oblasti některých incizí dokonce došlo k posunutí obou konců přes sebe.

Inkompletní incize chrupavky vedla ke zvýšené proliferaci chrupavkové tkáně s následným rozvojem uzlovitého ztlustění tvořeného zčásti nově vytvořenou chrupavkovou tkání (Obr. 65) v místě původního defektu.

Cíleně oddělené drobné fragmenty ušní chrupavky přežívaly ve formě malých implantátů v měkkých tkání ucha bez jakýchkoliv známek regresivních změn.

Štěpy ušní chrupavky transplantované pod kůži zad králíků se vhojily bez jakékoliv rejekční reakce a bez prokazatelných regresivních změn chondrocytů, které zůstaly vitální (Obr. 66).

Imunohistochemické vyšetření ušní chrupavky u králíků nebylo provedeno, protože cílem práce bylo ověření jejich exprese v lidské ušní chrupavce.

4.2 Lidská kloubní chrupavka

4.2.1 Základní histologické charakteristiky normální lidské kloubní chrupavky

Patologicky nezměněná kloubní chrupavka měla ve všech případech charakter chrupavky hyalinní (Obr.67) a obsahovala velké množství proteoglykanů, jak jsme si mohli ověřit v řezech barvených Safraninem O (Obr.68). Mezibuněčná hmota byla homogenní bez patrného vláknitého uspořádání, které je charakteristické pro vazivovou chrupavku.

Chondrocyty měly v povrchové vrstvě vřetenitý tvar a byly orientovány rovnoběžně s kloubním povrchem dané oblasti . V dalších vrstvách se nacházely typické komůrkové buňky většinou s jedním jádrem. Na hranici chrupavky a kosti se rozprostírala

vrstva bazofilní kalcifikované chrupavkové tkáně, naléhající na kostní plató tvořené lamelární kostí.

Analýza exprese jednotlivých izoform aktinu v patologicky nezměněné, osteoartrotické, posttraumaticky změněné a transplantované kloubní chrupavce, v kulturách chondrocytů použitých při transplantaci je uvedena níže.

Ve všech případech jsme ve větší části chondrocytů prokázali expresi S-100 proteinu a v některých chondrocytech expresi α -SMA, která byla rozsahem shodná s výsledky vyšetření s protilátkou proti svalově specifickému aktinu. Přesná lokalizace a množství buněk exprimujících α -SMA jsou uvedeny v následujícím textu a v tabulce č. 9.

Malé množství chondrocytů exprimujících α -SMA bylo nalezeno ve všech vrstvách chrupavky, jejich distribuce v hlubokých vrstvách se však v jednotlivých případech lišila. Shodným rysem ve všech případech byla exprese α -SMA přibližně ve 20% chondrocytů povrchové vrstvy chrupavky (Obr. 69 a 70). Převážná většina aktin pozitivních chondrocytů byly buňky vřetenitého tvaru. Distribuce těchto buněk přitom byla zcela nepravidelná. Znamky zonální distribuce jsme nezjistili. Expresi desminu ani CD34 jsme v žádném vzorku nenalezli.

4.2.2 Chrupavka ze spodiny kloubních defektů po traumatu

Ve všech vyšetřených vzorcích odebraných ze spodiny traumatických defektů vykazovaly zbytky chrupavkové tkáně znaky vazivové chrupavky (Obr.71). Chondrocyty exprimující α -SMA tvořily většinu buněčné populace, a to ve všech zastižených oblastech chrupavky (Obr.72). Je nutné dodat, že většinou jsme zastihli pouze spodní vrstvy zbývajícího kloubního krytu a část přilehlé subchondrální kosti. Ve všech případech jsme ve větší části chondrocytů prokázali expresi S-100 proteinu (Tab.9; Obr.73). V jednom případě byla v chondrocytech současně nalezena exprese desminu. Buňky exprimující desmin byly převážně lokalizovány v hloubi hyalinní chrupavky nad zónou kalcifikované chrupavčité tkáně. Expresi CD34 jsme v žádném vzorku neprokázali.

4.2.3 Osteoartroticky změněná kloubní chrupavka

V preparátech barvených hematoxylin-eozinem byly zřetelné degenerativní změny chrupavky s patrnou fragmentací tkáně, superficiální fibrilací a snížením výšky chrupavkové tkáně (Obr. 74), event. se známkami edématozního prosáknutí a s ojedinělými nekrotickými chondrocyty. V některých oblastech byly patrné reparativní změny s tvorbou chrupavky fibrózního typu, jinde převažovaly oblasti s tzv. klonální proliferací chondrocytů a místy byla chrupavka obvyklého vzhledu. V oblastech nahrazených fibrózní chrupavkou se v mezibuněčné hmotě nacházely nepravidelně orientované snopce kolagenního vaziva.

Buňky exprimující α -SMA se vyskytovaly hlavně v oblastech tzv. klonální proliferace (Obr.75) a v místech, kde při reparativních procesech vznikla chrupavčitá tkáň fibrózního typu (Obr.76). V místech klonální proliferace se jednalo o skupiny chondrocytů, které se v histologickém obraze nijak nelišily od ostatních chrupavkových buněk. Jejich pozitivita v reakci k průkazu aktinu byla nápadná.

V oblastech, které měly strukturu podobnou normální chrupavce, byla exprese α -SMA v nečetných chondrocytech nepravidelná ve všech zónách a počet pozitivních buněk se lišil případ od případu (Tab.9). Většina aktin pozitivních buněk současně expimovala S-100 protein. Expresi desminu ani CD34 jsme v žádném ze vzorků nenalezli.

4.2.4 Kultura chondrocytů použitá k transplantaci pro léčbu kloubních defektů

Ve vyšetřované kultuře buněk italské provenience (Hyalograft® C) převažovaly vřetenité elementy (Obr. 77) exprimující α -SMA bez současné exprese S-100 proteinu (Obr. 78). Tyto buňky nevykazovaly žádné rysy typické pro chondrocyty, spíše připomínaly fibroblasty event. myofibroblasty. Některé ležely volně, jiné byly v těsném kontaktu s vlákny kyseliny hyaluronové, která byla použita jako nosič. Vlákna nosiče se barvila hematoxylinem v modrém odstínu. Všechny buňky byly přibližně stejně vyztřálé, známky diferenciaci směrem k chondrocytům jsme nepozorovali.

4.2.5 Nově vytvořená kloubní chrupavka po transplantaci chondrocytů

Ve vzorcích odebraných z oblasti nově vytvořené chrupavky 10 měsíců po autologní transplantaci chondrocytů měla tkáň charakter hyalinní chrupavky (Obr. 79 a 80) s příměsí chrupavčité tkáně fibrózního typu. Distribuce chondrocytů v matrix byla iregulární, stejně tak sloupcovité uspořádání buněk v hluboké zóně bylo nepravidelné. Zóna kalcifikované chrupavčité tkáně byla neúplná. Tento nález svědčil pro inkompletní maturaci nově vytvořené chrupavky. Všechny buňky byly vitální. V subchondrální kostěné tkáni byly

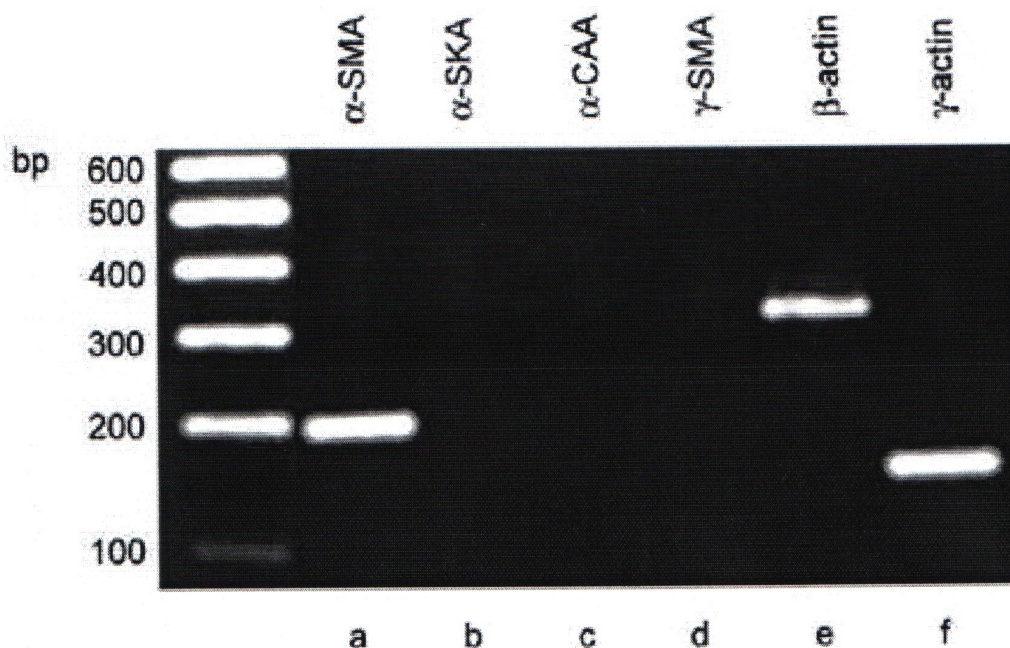
známky remodelace, o čemž svědčila přítomnost osteoklastů na povrchu kostních trámečků nebo dokonce usurujících spodní část nově vytvořené kloubní chrupavky. Ve většině chondrocytů byla nalezena exprese α -SMA (Tab.9; Obr. 81) většinou simultánně s pozitivitou S-100 proteinu (Obr. 82). Pozitivita S-100 proteinu dokládala chondrogenní diferenciaci. Průkaz desminu a CD34 vyzněl negativně. Ve dřevných prostorách subchondrální kosti jsme u dvou případů našli makrofágy obsahující ve své cytoplazmě modravý fagocytovaný materiál nejspíše odpovídající reziduím materiálu nosiče (Obr. 83).

Tabulka 9. Souhrnné výsledky analýzy exprese α -hladkosvalového aktinu v různých typech chrupavky.

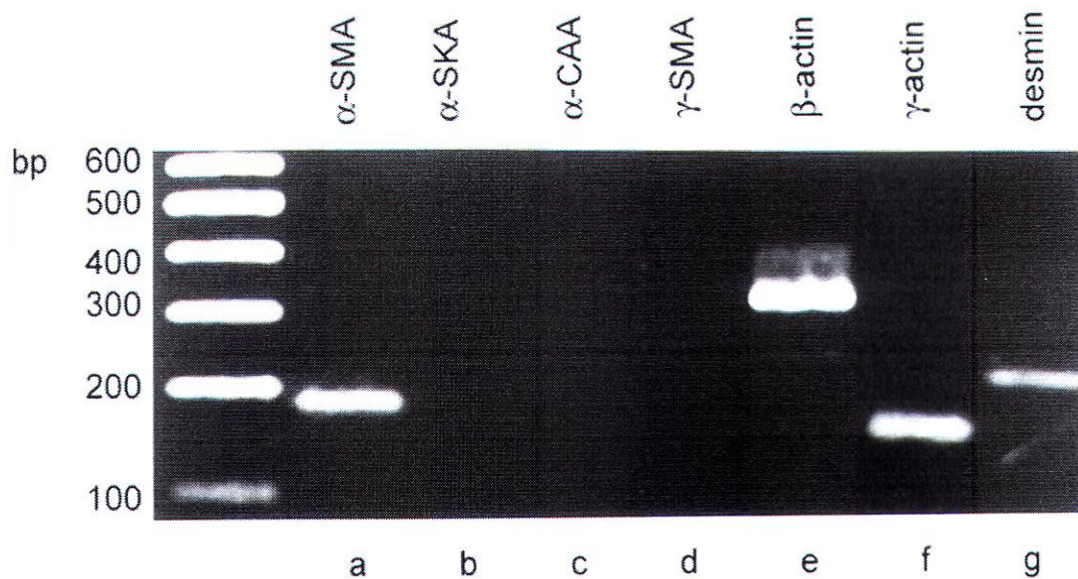
Typ chrupavkové tkáně			Počet případů	Věk (roky)	α -SMA pozitivní chondrocyty	
					superficiální vrstva	hluboké oblasti
Ušní	lidská ušní chrupavka	potracené a nedonošené plody	6	20-22 týdnů	-	-
		normální chrupavka ušního boltce	30	6- 82	60%	<10%
		traumatizovaná u lidí	5	25-51	60%	<10%
		transplantovaná u lidí	2	33 a 37	<10%	-
	lidská ušní chrupavka transplantovaná myším	intaktní	6	27-45	60%	<10%
		traumatizovaná	18	23-41	60%	<10%
		uchovávaná v médiu	6	26-38	60%	<10%
		nově narostlá na nosičích	9	9-35	60%	<10%
Kloubní	normální	normální hlavice femuru (náhlé úmrtí – nekroptický materiál)	7	19-46	18 %	10 %
		normální hlavice femuru (po fraktuře krčku)	15	55-72	22 %	15 %
	patologicky změněná	hlavice femuru při osteoartróze	12	52-70	100 % buněk v oblastech klonálního seskupení 80 % ve fibrokartilaginózní tkáni	
		tibiální chrupavka u hemofiliků	7	23-42	80 % ve fibrokartilaginózní tkáni	
		posttraumatické defekty distálního femuru	15	21-35	-	80 %
	chrupavka po autologní transplantaci chondrocytů	chrupavka distálního femuru po transplantaci chondrocytů	12	23-35	80 %	80 %
Celkem			150			

4.2.6 RT-PCR analýza

Ve všech vyšetřených vzorcích kloubní chrupavky jsme prokázali přítomnost mRNA α -SMA a β - a γ -cytoplazmatického aktinu (Obr. IX). V jednom vzorku odebraném z místa defektu kloubní chrupavky po traumatu byla prokázána přítomnost mRNA desminu (jednalo se o vzorek, ve kterém byla exprese desminu prokázána rovněž imunohistochemicky) (Obr. X).



Obr. IX RT-PCR analýza jednotlivých izoforem aktinu v kloubní chrupavce bez patologických změn. Použité zkratky: bp = base pairs; α -SKA = alfa-skeletální aktin; α -SMA = alfa-hladkosvalový aktin; α -CAA = alfa-kardiální aktin; γ -SMA = gama-hladkosvalový aktin.



Obr. X RT-PCR analýza jednotlivých izoform aktinu v kloubní chrupavce s osteoartrózou. Použité zkratky: bp = base pairs; α -SKA = alfa-skeletální aktin; α -SMA = alfa-hladkosvalový aktin; α -CAA = alfa-kardiální aktin; γ -SMA = gama-hladkosvalový aktin.

5 Diskuze

Normální netransplantovaná lidská ušní chrupavka – histologie a porovnání imunohistochemických nálezů s transplantovanou ušní a kloubní chrupavkou

Histologické a imunohistochemické vyšetření nezměněných tj. **normálních lidských ušních chrupavek** přineslo některé poznatky, které nejsou v odborné literatuře zmiňovány (Gnepp 2009, Sternberg 1997). Obě povrchové vrstvy chrupavky ušního boltce se vzájemně liší nejen hustotou elastických vláken, což bylo možné rozpoznat pouze v preparátech barvených metodami k průkazu elastiky, ale i tvarem a hustotou chondrocytů. V oblasti konvexit byla v povrchové vrstvě ušní chrupavky elastická vlákna méně četná a obklopovala pouze jednotlivé chondrocyty. Ty však byly četnější a většinou oválného tvaru. Naopak v konkávních oblastech obsahovala povrchová vrstva méně chondrocytů oválného tvaru, mezi nimiž byla hojnější vlákna elastická. Tento **fenomén vrstvení** pravděpodobně ovlivňuje nebo přímo určuje mechanické vlastnosti ušní chrupavky. Lze například uvažovat, že odlišnosti ve struktuře povrchových vrstev chrupavky ušního boltce se mohou uplatňovat při formování a udržování jeho reliéfu s četnými konvexitami a konkavitami. Je např. známo, že kovové materiály různé hustoty nebo lišící se jinými svými vlastnostmi jsou v různé míře roztažitelné při různé teplotě. Dva plátky různých kovů se za měnících se teplotních podmínek proto chovají zcela odlišně. Zůstává zatím nevysvětlené, jak se chovají dva různé biologické materiály tvořící jednu vrstvu, jako je tomu v případě vrstevnatě uspořádané ušní chrupavky. Samozřejmě, že na udržení známého reliéfu ušního boltce se nepochybně podílejí i jiné struktury jako k chrupavce fixovaná tukově vazivová tkáň a místy i svazky příčně pruhované svaloviny. Přesto nelze vyloučit, že tzv. vrstvení ušní chrupavky může hrát roli při zachování původního reliéfu především v souvislosti s některými plastickými operacemi, při kterých bude pravděpodobně třeba brát tuto skutečnost na vědomí.

Nález CD34 pozitivních buněk v oblastech blízkých perichondriu ukazuje, že některé okrsky povrchu ušní chrupavky obsahují buňky blízké mezenchymovým buňkám kmenovým, pro které je CD34 pozitivita typickým znakem. Tyto elementy by mohly představovat rezervoár buněk se schopnostmi proliferace, která se uplatňuje při regenerativních pochodech chrupavkové tkáně, které zatím nebyly blíže objasněny. Ze statické histologické studie však není možné vyvodit žádné bližší závěry o proliferačních schopnostech těchto CD 34 pozitivních buněk. Situace je o to komplikovanější, že v dospělé

ušní chrupavce jsme ani současnými moderními metodami neprokázali známky proliferační aktivity.

Togo et al. (2006) identifikovali v perichondriu boltce dospělých jedinců progenitorové buňky chrupavky, které byly úspěšně použity v experimentu pro přípravu arteficiální chrupavky metodami tkáňového inženýrství. Jejich morfologické charakteristiky ani imunofenotyp však blíže nespecifikovali. Výhodou je snadný odběr bez nutnosti odběru ušní chrupavky, nicméně podle jiných autorů jsou výsledky přípravy chrupavkové tkáně s využitím těchto buněk nekonzistentní, obtížně reprodukovatelné a navíc zřejmě hrají roli i další faktory, jako je věk nebo kultivační podmínky (Shieh et al. 2004).

Reakce k **průkazu Ki67** byla v ušních chrupavkách u dospělých kompletně negativní, na rozdíl od chrupavek boltců nedonošených plodů. Toto zjištění velmi pravděpodobně zároveň demonstruje, že s přibývajícím věkem ve fázi vyžralé elastické chrupavky se buněčný cyklus ušních chondrocytů zřejmě významnou měrou prodlužuje. V literatuře jsme nenašli žádné údaje týkající se této problematiky, a tak lze předpokládat, že problém nebyl dosud blíže studován.

V rámci imunohistochemické analýzy vzorků normální elastické ušní chrupavky jsme se poprvé pokusili blíže specifikovat **expresi jednotlivých izoform S-100 proteinu**. Polyklonální protilátka proti S-100 proteinu je, kromě melanocytárních lézí, neuroektodermových nádorů a myoepitelií, většinou využívána při identifikaci chondrocytů, ať už nenádorového nebo nádorového původu. Jak uvádí sám výrobce protilátky (DAKO), S-100 protein navíc reaguje s lipocyty, s retikulárními buňkami lymfatických uzlin a s buňkami glie. Je směsí protilátek proti třem podjednotkám S-100 proteinu bovinního mozku, a to proti proteinům S100 A1, A6 a S100 B. Specifita běžně používané protilátky proti tomuto proteinu je tedy do jisté míry omezená, s čímž je třeba počítat při interpretaci imunohistochemických nálezů, jak uvádíme v jedné z našich prací (Povýšil et al. 2008). To byl hlavní důvod, proč jsme použili protilátky i proti dalším známým podjednotkám této bílkoviny.

Dnes představuje S-100 protein skupinu 19 nízkomolekulárních proteinů vážících Ca^{2+} , které jsou exprimovány řadou různých buněčných typů, kromě jiného též chondrocyty. Podílejí se na regulaci řady intracelulárních procesů jako je fosforylace proteinů, aktivita enzymů, buněčná proliferace a diferenciace, strukturální organizace cytoskeletu a buněčných membrán či intracelulární homeostáza kalcia. Navíc některé izoformy S-100 proteinu jsou secernovány do extracelulárního prostoru a uplatňují se jako chemoatraktanty leukocytů, modulují proliferaci buněk a regulují aktivaci makrofágů. Bylo doloženo (Povýšil et al. 2008),

že některé S-100 proteiny ovlivňují progresi nádorového růstu, například prostřednictvím tumor supresorového genu. Pozitivita S-100 proteinu je tedy v mnohých případech výrazem určité buněčné aktivity, kterou nelze zatím dostatečně specifikovat.

Přesto jsme považovali za užitečné sledovat *expresi S-100 proteinu v chondrocytech ušní chrupavky za různých experimentálních podmínek ve srovnání s nálezy v chrupavce normální*. Ukázalo se, že zatímco většina chondrocytů reaguje s polyklonální protilátkou, při použití dostupných protilátek proti různým izoformám S-100 proteinu se výsledky do určité míry liší. Zdá se, že aktivita S 100 proteinu v chondrocytech je určitým, dosud blíže nejasným způsobem modifikována v závislosti na jejich uložení v jednotlivých odlišných zónách ušní chrupavky. Protilátky proti polyklonálnímu S100 proteinu a S100 A1, A6, B2 a P proteinům vykazovaly silnou pozitivitu chondrocytů ve všech vrstvách ušní chrupavky. S protilátkou proti S-100 A4 byla reakce ve všech vrstvách minimální. Protilátky proti S-100 A2 a A10 prokázaly aktivitu pouze v zevních vrstvách ušní chrupavky, zatímco v centrální části byla reakce chondrocytů negativní nebo slabá. Tyto nálezy by mohly svědčit ve prospěch předpokladu, že metabolicky neaktivnější budou pravděpodobně chondrocyty obou zevních vrstev v sousedství perichondria.

U *transplantovaných různých typů štěpů lidské ušní chrupavky* imunodeficitním myším jsme aktivitu S-100 proteinu prokazovali pouze ložiskovitě, což ukazuje na určité změny jejich metabolické a biologické aktivity. V případě kultury ušních chondrocytů na želatinovém nosiči před implantací a u nově narostlé chrupavky na různých typech nosičů po jejich implantaci myším jsme reakci k průkazu polyklonálního S-100 proteinu využili především pro potvrzení jejich chondrogenního původu. Exprese jednotlivých izoform S-100 proteinu nebyla blíže studována. Celá otázka aktivity různých izoform S-100 proteinu v chondrocytech je zatím nejasná a čeká na další objasnění (Cross et al. 2005, Donato 1999, Povýšil et al. 2008).

V naší studii zároveň poprvé informujeme o **výskytu aktin pozitivních chondrocytů**, které tvořily až 60% celkové buněčné populace a vyskytovaly se převážně v povrchových vrstvách **normální ušní chrupavky** (Kaňa et al. 2006). Aktin pozitivní buňky, které v identických vzorcích měly také příslušnou mRNA prokázanou metodou RT-PCR, měly charakter typických chondrocytů, což bylo ověřeno i pozitivitou v reakci k průkazu S-100 proteinu. Ojedinele buňky tohoto typu vykazovaly pozitivitu v reakci se svalově specifickým aktinem a s protilátkou proti CD 34. Ušní chrupavka z rovných oblastí boltce měla v obou zevních vrstvách přibližně stejně širokou vrstvu aktin pozitivních vřetenitých chrupavkových buněk. Naproti tomu v oblastech obloukovitě zahnutých se však struktura

zevních vrstev lišila. V povrchové vrstvě v oblasti konvexity ušní chrupavky převažovaly aktin pozitivní vřetenité buňky, zatímco v protilehlé povrchové vrstvě konkávní strany se nacházely buňky ovoidního tvaru rovněž vykazující pozitivitu alfa hladkosvalového aktinu. Navíc toto uspořádání korelovalo s množstvím elastických vláken, jak je popsáno v úvodu diskuze.

V naší práci jsme potvrdili přítomnost **exprese α -SMA v osteoartroticky změněné kloubní chrupavce**, která je výrazně vyjádřena hlavně v oblastech tzv. klonální proliferace a v místech, kde v rámci reparativních procesů vznikla chrupavčitá tkáň fibrózního typu (Povýšil et al. 2008). Kromě toho jsme prokázali **expresi α -SMA i v některých chondrocytech patologicky nezměněné kloubní chrupavky**, což dosud nebylo popsáno (Povýšil et al. 2008). V patologicky nezměněné kloubní chrupavce byla exprese α -SMA vyjádřena nejvýrazněji ve vřetenitých chondrocytech povrchové první zóny. Dále jsme prokázali expresi α -SMA v defektní kloubní chrupavce po traumatu, v nově vytvořené kloubní chrupavce po transplantaci. V kultuře chrupavkových buněk použité k transplantaci (Hyalograft® C) převažovaly vřetenité buňky exprimující α -SMA bez současné exprese S-100 proteinu. V jednom případě jsme ve vzorku chrupavky odebraném ze spodiny defektu po traumatu kromě α -SMA prokázali i expresi desminu (Povýšil et al. 2005).

Imunohistochemické vyšetření chrupavky ušního boltce stejně jako studium kloubní chrupavky za normálních i různých patologických okolností znovu otevřelo otázku výskytu a významu α -aktinu hladké svaloviny v chondrocytech různých chrupavkových tkání. Jednoznačně se ukázalo, že za normálních okolností aktin pozitivní chondrocyty převažují v ušní chrupavce, zatímco v chrupavce kloubní se tyto buňky za normálních okolností vyskytují pouze v povrchové vrstvě a k jejich zmnožení dochází především za různých patologických stavů včetně situace po transplantaci kultury chondrocytů. V této souvislosti stojí za to v krátkosti zrekapitulovat současné poznatky o různých typech aktinů tak, jak je tato problematika v současné době známa.

Aktiny jsou ubikvitní eukaryotické proteiny vyskytující se nejen v buňkách svalových, ale také v dalších elementech různé histogeneze. Uplatňují se v rámci různých buněčných funkcí včetně svalové kontrakce, buněčné motility, buněčného transportu, buněčné adhezivity, fagocytózy, dělení a udržování tvaru a integrity buňky (Ramaekers et Bosman 2004, Vandekerckhove et Weber 1981). V jiných než svalových buňkách se přibližně polovina cytoplazmatického aktinu vyskytuje jako aktinový monomer, což je globulární protein asociovaný s ATP (G-aktin). Elektronmikroskopickým vyšetřením lze dobře identifikovat druhou formu aktinu, která je polymerizovaná ve formě aktinových filament (F-

aktin). Aktinová filamenta jsou polarizovaná a mají plus a minus konec. Každé aktinové vlákno představuje stočený řetězec složený z globulárních molekul aktinu směřujících stejným směrem podél osy vlákna (Reisler et Egelman 2007). Stabilita i funkce aktinových filament jsou modifikovány velkým počtem aktin-vázajících proteinů. Aktinová vlákna jsou většinou nestabilní, mohou však vytvářet i stabilní struktury jako například stresová vlákna, kontraktilní prstenec během buněčného dělení, stabilní struktury v mikroklcích či kontraktilní systém ve svalech (Alberts et al. 1998).

Pomocí elektroforézy lze u obratlovců rozlišit 6 izoform aktinu, které se dělí do dvou tříd (Vandekerckhove et Weber 1981). Do první třídy se řadí cytoplazmatický β -aktin, cytoplazmatický γ -aktin a γ -hladkosvalový aktin. Druhou třídu tvoří α -kardiální aktin, α -skeletální aktin a α -hladkosvalový aktin (α -SMA). Cytoplazmatický β -aktin a γ -aktin jsou ubikvitní. Geny jednotlivých izoform jsou lokalizovány na odlišných chromozómech. Další čtyři izoformy aktinu jsou tkáňově specifické a vyskytují se ve svalstvu skeletálním (α -skeletální aktin), kardiálním (α -kardiální aktin, α -skeletální aktin) a ve svalovině cév a zažívacího traktu (α - a γ -hladkosvalový aktin).

Rozdíly mezi jednotlivými izoformami aktinu jsou minimální a většinou spadají na vrub délky polypeptidových řetězců aminokyselin, které se liší maximálně o jednu aminokyselinu (374 nebo 375 aminokyselin). Oproti tomu jsou rozdíly v sekvenci aminokyselin přece jen nápadnější. Bývají lokalizovány hlavně v oblasti N-terminálního konce, který je exponován na povrchu molekul G-aktinu i na povrchu polymerizovaných aktinových filament (F-aktinu). Nejvíce jde o 25 odlišných aminokyselin mezi cytoplazmatickým γ -aktinem a α -skeletálním aktinem. Čtyři svalové izoformy aktinu jsou si vzájemně ještě podobnější, největší rozdíl v primární struktuře těchto polypeptidů je 8 aminokyselin (Vandekerckhove et Weber 1981). Jednotlivé izoformy aktinu jsou in vivo i přes minimální strukturální rozdíly do určité míry funkčně heterogenní (Mounier et al. 1997, Khaitlina 2001). Mechanizmy této funkční heterogenity nejsou jednoznačně objasněny. Pravděpodobně se na ní podílí různé další proteiny odlišně se vázající na N-terminální konec molekuly aktinu v závislosti na primární struktuře jednotlivých izoform (Lehman et al. 2001).

Expresse jednotlivých izoform se během vývoje v některých tkáních podstatně mění, což zatím zůstává nevysvětlené. Například ve skeletálních svalech v počátku embryonálního vývoje převažuje exprese α -hladkosvalového aktinu a později převládne exprese α -kardiálního aktinu (Babai et al. 1990, Gunning et al. 1983). Alfa-skeletální aktin převládá při narození a následně pak zůstává hlavní izoformou dospělých skeletálních svalů

(Moll et al. 2006). Analogická situace je u svaloviny myokardu, kdy je exprese α -SMA během vývoje nahrazena α -skeletálním a α -kardiálním aktinem (Clement et al. 2007). Pro správný vývoj a funkci srdeční svaloviny je přechodná exprese α -SMA v časných fázích vývoje nezbytná. Vzhledem k tomu, že nejsou mechanismy tohoto působení jednoznačně objasněny, nebudeme se touto otázkou blíže zabývat.

Cytoplazmatický β - a γ -aktin jsou ubikvitní proteiny, které se vyskytují ve všech buňkách včetně svalových. Tyto proteiny se účastní buněčné motility, transportu, adhezivity, dělení a udržování tvaru i integrity buňky. Přes značnou strukturální homologii je jejich prostorová lokalizace v buňce a jejich funkce do určité míry odlišná. Zatímco je gama-cytoplazmatický aktin přednostně syntetizován a lokalizován v centrální části buňky, vyskytují se β -aktin v oblasti vedoucího okraje pohybujících se buněk (Kashina 2006).

Alfa- a γ - hladkosvalový aktin se typicky vyskytují především v buňkách hladké svaloviny, jejíž hlavní schopností je schopnost kontrakce. Alfa- hladkosvalový aktin je dominantní izoformou v hladké svalovině cév, naopak v hladké svalovině zažívacího traktu převažuje γ -hladkosvalový aktin (Vandekerckhove et Weber 1981). Alfa-hladkosvalový aktin je během embryonálního vývoje přechodně exprimován také v příčně pruhované kosterní svalovině a ve svalovině myokardu, jak již bylo zmíněno v předchozím textu (Woodcock-Mitchell et al. 1988). Alfa-hladkosvalový aktin se kromě hladké svaloviny vyskytuje také v myofibroblastech, myoepiteliích a pericytech (Chaponnier et Gabbiani 2004, DeNofrio et al. 1989, Hinz et al. 2003, Schmitt-Gräff et al. 1994, Willems et al. 1994). Na rozdíl od hladké svaloviny však ani jedna z těchto buněk neobsahuje h-caldesmon. V případě myofibroblastů je množství α -SMA rozhodujícím faktorem pro sílu kontrakce vyvinutou těmito buňkami. Ta je totiž v případě exprese α -SMA podstatně vyšší než u buněk, které tuto formu neexprimují nebo ji exprimují v menším množství. Přesný mechanismus zvyšování síly kontrakce sice není znám, pravděpodobně však souvisí s integrací α -SMA do stresových vláken (Hinz et al. 2002, Katoh et al. 1998). Exprese těžkého řetězce hladkosvalového myozinu není potřebná ke zvýšení kontraktálního potenciálu fibroblastů a myofibroblastů a α -SMA tak pravděpodobně interaguje s nesvalovými myoziny. Koncentrace těchto myozinů se však nezvyšuje a neovlivňuje kontraktální potenciál těchto buněk (Hinz et al. 2001).

V příčně pruhované a srdeční svalovině se typicky vyskytují *α -skeletální aktin a α -kardiální aktin* označované také jako sarkomerické aktiny. Postnatálně tvoří většinu sarkomerických aktinů příčně pruhované svaloviny α -skeletální aktin. Exprese α -SMA v srdeční svalovině je během embryonálního vývoje nahrazena α -skeletálním a α -kardiálním aktinem (Clement et al. 2007). Exprese α -skeletálního aktinu v srdeční svalovině se po

narození, snižuje, nicméně i u dospělých tvoří tato izoforma asi 20% sarkomerických aktinů myokardu (Vandekerckhove et al. 1986). Za určitých patologických stavů, jako je srdeční hypertrofie či některé kardiomyopatie, dochází k výraznému zvýšení exprese α -skeletálního aktinu v buňkách srdeční svaloviny, u idiopatické dilatační kardiomyopatie však zůstává nezměněna (Adachi et al. 1998, Bakerman et al. 1990, Suurmeijer et al. 2003).

Během *embryonálního vývoje* lze expresi α -kardiálního aktinu prokázat nejen ve svalovině srdeční, ale i ve fetálních (umbilikálních) cévách a ve větším množství také ve skeletální svalovině, kde je po narození nahrazena α -skeletálním aktinem. Za normálních okolností je pak α -kardiální aktin exprimován pouze v modifikovaných svalových buňkách v oblasti nervovėsvalového vřeténka a v určitém množství i v dalších buňkách skeletální svaloviny (Clement et al. 1999). Podle některých prací tvoří tato izoforma aktinu ve skeletální svalovině u dospělých jedinců méně než 5% přítomného množství sarkomerických aktinů (Ilkovski et al. 2005), podle jiných literárních pramenů je to až 10-15% (Ravenscroft et al. 2008). Výjimkou jsou okohybné svaly, kde α -kardiální aktin tvoří přibližně 65% sarkomerických aktinů. Podíl této izoformy je tak jen o něco nižší, než je obvyklé u srdeční svaloviny (Ravenscroft et al. 2008). Kromě vysokého procenta α -kardiálního aktinu, jsou v okohybných svalech exprimovány i další proteiny neobvyklé pro ostatní skeletální svalovinu, jako je například utrofin. Díky tomuto specifickému složení okohybných svalů nedochází k jejich poškození při většině různých kongenitálních myopatiích vzniklých na podkladě mutace genu ACTA1 pro α -skeletální aktin (Andrade et al. 2000, Ilkovski et al. 2005).

Za určitých *patologických stavů* dochází k výraznému zvýšení exprese α -kardiálního aktinu v *příčně pruhované kosterní svalovině*. Příkladem může být degenerativní atrofie nebo Duchennova svalová dystrofie, ke zvýšení ale také dochází například i během svalové regenerace (Moll et al. 2006). Role α -kardiálního aktinu ve vývoji a funkci srdeční svaloviny není sice jednoznačně objasněna, nicméně je známým faktem, že mutace genu pro tuto izoformu aktinu vedou ke vzniku idiopatické dilatační kardiomyopatie a familiární hypertrofické kardiomyopatie (Mogensen et al. 1999, Olson et al. 2005).

Expresi α -kardiálního aktinu byla rovněž postnatálně prokázána v buňkách hladké svaloviny cév při ateroskleróze, kde dochází k fenotypické přeměně hladkosvalových buněk s alterací cytoskeletu. V těchto buňkách se v rámci fenotypických změn snižuje exprese α -SMA a naopak se zvyšuje exprese β -cytoskeletálního aktinu a je exprimován α -kardiální aktin. Alfa-kardiální aktin je v těchto buňkách distribuován podobným způsobem jako

cytokeratin 8 a 18, což jsou intermediální filamenta typicky přítomná v dediferencovaných hladkosvalových buňkách (Bea et al. 2000).

Z uvedeného přehledu vyplývá, že problematika exprese různých izoform aktinů je značně komplikovaná, protože v buňkách některých tkání se vyskytují izoformy, které pro danou tkáň jsou proti očekávání málo specifické. Zmíněná skutečnost na jedné straně ukazuje, že tato problematika není dostatečně objasněna a vyžaduje další cílené studie. Na druhé straně je zřejmé, že interpretace pozitivních nálezů spojených s expresí aktinu především z hlediska diagnostických závěrů v bioptické praxi může být značně složitá.

Význam exprese α -SMA jako jedné z kontraktilních izoform aktinu v buňkách patologicky nezměněné i různým způsobem poškozené chrupavky zůstává nejasný. Jeho úloha může být v přenosu intracelulární tenze do extracelulární matrix, což může ovlivňovat kromě jiného i tkáňově specifické uspořádání této matrix (Kim et Spector 2000, Kinner et Spector 2002). V případě elastické chrupavky ušního boltce se mohou chondrocyty exprimující α -SMA podílet spolu s elastickými vlákny na neobvyklé elasticitě této chrupavky a její schopnosti měnit tvar pod vlivem mechanických podnětů bez poškození tkáně (Kaňa et al. 2006). Naše histologické nálezy tzv. vrstevnatého uspořádání některých oblastí ušní chrupavky zároveň naznačují, že aktin pozitivní chondrocyty mohou pravděpodobně podstatnou měrou přispívat spolu s rozvrstvením elastických vláken k udržení fixního reliéfu ušního boltce.

Z literatury také není jasné, jestli je exprese α -SMA v chondrocytech elastické ušní a hyalinní kloubní chrupavky přítomna trvale, či jde o výsledek patologického procesu nebo mechanické zátěže. Ukazuje se však, že **exprese α -SMA v buňkách kloubní chrupavky** i menisku může být regulována určitými růstovými faktory, jako je např. TGF- β 1, který expresi α -SMA v těchto buňkách zvyšuje, či PDGF, který expresi α -SMA naopak snižuje (Zaleskas et al. 2001). Výsledky naší studie ukázaly, že určité procento chondrocytů exprimujících α -SMA je přítomno jak v normální ušní chrupavce, tak v patologicky nezměněné chrupavce kloubní. V kloubní chrupavce se nicméně jejich množství v případě poškození v rámci osteoartrózy nebo posttraumatických změn zvyšuje

Na rozdíl od hyalinní kloubní chrupavky jsme u **transplantované ušní chrupavky** jak v experimentu u myší, tak u dvou pacientů s deformitami nosního skeletu *nárůst aktin pozitivních chondrocytů v souvislosti s poškozením nepozorovali*. V případě patologicky změněné lidské ušní chrupavky (polychondritida, posttraumatické změny) jsme nárůst aktin pozitivních chondrocytů rovněž nezaznamenali. V jednom případě u pacienta se zápasnickou minulostí, kdy traumatické změny ušní chrupavky byly výrazně vystupňovány, však byla

patrná náhrada rozsáhlejších poškozených oblastí chrupavkou vazivového typu tj. chrupavkou bez elastické komponenty a hodnocení změn v expresi alfa hladkosvalového aktinu nebylo možné.

Transplantovaná lidská ušní chrupavka u lidí a imunodeficitních myší

Výsledky našich pokusů na experimentálních myších stejně jako vyšetření transplantované autologní ušní chrupavky do nosního skeletu u lidí potvrdily, že ušní chrupavka je biologickým materiálem, který je vhodný pro transplantaci do oblastí deformit nosního skeletu různé etiologie. Nezaznamenali jsme *žádné rejekční změny v místě experimentálních transplantátů ani implantátů u myší*. Valná část buněk ušní chrupavky zůstala vitální, jak jsme si mohli ověřit při histologickém vyšetření doplněném o speciální metody vyšetření imunohistochemického, včetně vyšetření aktivity různých izoform S-100 proteinu, které dobře monitorují různé biologické funkce buněk.

Při použití transplantátů lidské ušní chrupavky uchovávaných ve fyziologickém roztoku po dobu maximálně 24 hodin jsme sice zaznamenali určitý nárůst počtu nekrotických chondrocytů, avšak v míře, která v žádném případě nenarušila funkčnost transplantované ušní chrupavky. Množství nekrotických buněk bylo větší v některých případech, kdy byly transplantáty traumatizovány nebo byly zbaveny perichondria a po dobu 7 - 14 dnů uchovávány v kultivačním mediu. Otázkou při porovnávání různých typů transplantátů se situací v normální netransplantované ušní chrupavce zůstává stanovení přesného počtu odumřelých chondrocytů. Problém je v tom, že není jasné jak hodnotit tzv. prázdné lakuny, ve kterých v příslušné rovině v době vyšetření chybí jakékoliv alespoň stínovitě zachované buněčné zbytky. Nelze totiž vyloučit, že nepřítomnost buněčných struktur ať už vitálních či odumřelých je dána pouze rovinou řezu v době vyšetření, přičemž lakuna zbytky chondrocytů obsahuje.

Podobné výsledky jsme mohli potvrdit i ve vzorcích *transplantátů* odebraných z terapeutických důvodů v oblasti nosního dorza dvou z našich *pacientů*.

Při *transplantaci štěpů z normální, netraumatizované elastické lidské ušní chrupavky imunodeficitním myším* nedošlo k narušení základní sítě elastických vláken. Je však nutno počítat s možností vzniku drobných vazivových jizev mikroskopického rozměru, jejichž přítomnost však negativně neovlivní základní vlastnosti ušní chrupavkové tkáně. Nález ojedinělých okrsků myxoidního prosáknutí chrupavkové tkáně rovněž vitalitu chrupavkové tkáně zásadním způsobem neovlivnilo.

Traumatizace ušní chrupavky před vlastním transplantačním výkonem nevedla ke zvýšení proliferační aktivity, jak jsme mohli ověřit při použití protilátky proti Ki67, pomocí níž se zcela běžně ověřuje proliferační aktivita různých tkání včetně aktivity různých nádorových procesů. Ušní chrupavka se tedy neliší od ostatních typů chrupavkové tkáně svojí extrémně nízkou proliferační aktivitou, kterou není možné za pomoci v současné době používané imunohistochemické reakce, tj. vyšetřením Ki67, běžně monitorovat. Mohli jsme si však ověřit, že v případě nedonošených plodů, které byly potraceny přibližně kolem 22. týdne těhotenství, je naopak proliferační aktivita zřetelná a týká se přibližně 20% buněk. S růstem plodu a hlavně s nástupem dospělosti se pravděpodobně proliferace výrazně omezí, což však nemůžeme v souvislosti s chyběním příslušného materiálu ověřit.

V souvislosti s traumatizací ušní chrupavky jsme nepozorovali významnou ztrátu vitality nebo známky zvýšené resorpce. Rozlomené nebo incizí narušené struktury ušní chrupavkové tkáně se znovu nespojily novotvořenou chrupavkovou tkání, jak uvádějí některé literární prameny (Bönisch et al 2007, Nolst Trenité et al. 1988), nýbrž do štěrbin vrostla cévnatá granulační tkáň, která ale viabilitu chrupavky podstatným způsobem nenarušila. Rovněž oddělení perichondria s částí povrchové vrstvy chrupavky vitalitu transplantátu zásadně neovlivnilo. Transplantát zůstal z 90% vitální, odumřely pouze chondrocyty v těsné blízkosti řezu.

Konečně rozdrcení chrupavky nevedlo (až na dvě výjimky) k zániku chondrocytů v drobných fragmentech, které přežívaly obklopené vazivovou tkání. V tomto případě důsledky traumatizace chrupavkové tkáně pravděpodobně závisí na síle mechanismu použitého při jejím drcení. V našem experimentu byla traumatizace relativně šetrná, což by vysvětlovalo přežívání buněk v drobných fragmentech.

V otázce *resorpce chrupavky* po transplantaci se názory v literatuře různí. Zatímco u transplantátů z intaktní chrupavky většina prací uvádí přes 90% životaschopných chondrocytů, u traumatizované chrupavky jsou údaje v tomto směru značně rozdílné. Yilmaz et al. (2001) uvádějí, že i značně traumatizovaná chrupavka zůstává životaschopná. K podobným závěrům dospěli i Rudderman et al. 1994, kdy se viabilita chondrocytů drcené chrupavky v experimentu u králíků pohybovala mezi 70% - 90%. Oproti tomu Bujia (1994) uvádí, že po rozdrcení chrupavky přežívá jen 10-30% chondrocytů. V závislosti na použité technice drcení chrupavky Verwoerd-Verhoef et al. (1991) prokázali v experimentu se septální chrupavkou mladých králíků jen 10% - 30% vitálních chondrocytů. Na rozdíl od pozorování jiných autorů byly nekrotické okrsky nahrazovány novotvořenou chrupavčitou tkání z přežívajících chondrocytů.

Cakmak et al. (2005) se pokusili podle síly použité k drcení lépe *kvantifikovat stupeň rozdrčení ušní chrupavky*. Viabilita chondrocytů se v experimentu u králíků pohybovala, v závislosti na stupni rozdrčení, v rozmezí 10% - 70%. Autoři současně konstatují, že lehkým nadrcením chrupavky je možné indukovat proliferaci chrupavky a metaplastickou osifikaci. Se stupněm rozdrčení chrupavky však vzrůstá i počet nekrotických chondrocytů a transformace chrupavky ve vazivovou tkáň. Výsledkem nepravidelné resorpce, ke které u drcené chrupavky častěji dochází, jsou nerovnosti na povrchu štěpu, které mohou být velmi nápadné zejména u dorzálních štěpů (Sičák 2007). Cakmak et al. 2005 ověřovali také viabilitu lidských chondrocytů v chrupavce odebrané z nosního septa, kterou opět nadrtili různou intenzitou použité síly a kultivovali v živném roztoku. V těžce traumatizované chrupavce našli po 10ti dnech kultivace jen 68% viabilních chondrocytů, zatímco v lehce drcené chrupavce to bylo až 93%. Dlouhodobě stabilních a předvídatelných výsledků augmentace pomocí štěpů z nepatrně nebo mírně drcené chrupavky (septální i ušní) dosáhli stejní autoři i v klinickém souboru 462 pacientů (Cakmak et Buyuklu 2007). Na základě výše uvedených poznatků lze konstatovat, že stupeň resorpce transplantované chrupavky závisí na rozsahu traumatizace způsobené drcením a tento fakt je třeba zohlednit při přípravě štěpu z drcené chrupavky a volbě vhodné lokality k jeho umístění. Pro doplnění je třeba uvést, že větší stupeň resorpce ve srovnání s autologní chrupavkou je zmiňován v literatuře u allogenní chrupavky nebo kosti (Doležal 1999, Huizing et de Groot 2003, Kridel et Konior 1993).

Ke korekci sedlovité deformity nosního dorza používají někteří autoři (Calvert et al. 2006, Daniel et Calvert 2004, Kelly et al. 2007) *fragmenty chrupavky* (septální, ušní nebo žeberní) o průměru 0,5 – 1 mm („*diced cartilage*“) propláchnuté antibiotickým roztokem, kterými vyplní vak z temporální fascie ve tvaru „rukávu“ umístěný na nosní dorzum. Fascie sice není bezpodmínečně nutná pro přežití chrupavky, ale pokud jsou fragmenty chrupavky použity samostatně, dochází k určité resorpci v místech, kde chybí perichondrium. Vak z fascie nahrazuje perichondrium, udržuje správný tvar a hladký povrch štěpu a zůstává dlouhodobě viabilní. Postupně dojde k vytvoření solidní masy z fragmentů chrupavky vzájemně spojených vazivem. Poprvé byl tento postup použit Peerem, který již v roce 1944 publikoval stať o použití takto upravené chrupavky pro rekonstrukci boltce při mikrocii a vyplnění depresí v oblasti kalvy. Calvert et al. 2006 zaznamenali při použití této techniky výborné výsledky, zvláště u pacientů indikovaných k revizním výkonům. V drobných fragmentech chrupavky přežívá asi 85% buněk (Bujia 1994). Kazikdas et al. (2007) publikovali experimentální studii, kde u králíků srovnávali viabilitu drcené ušní chrupavky a ušní chrupavky rozdělené na drobné fragmenty („*diced cartilage*“) transplantované buď

samostatně nebo obalené v Surgicelu nebo v HYAFFu. HYAFF je komerčně vyráběná esterifikovaná forma kyseliny hyaluronové, která se pro svůj příznivý vliv na hojení ran a antiadhezivní vlastnosti používá v pevné formě v různých chirurgických indikacích (tamponády apod.). Nejlepší výsledky stran zachování integrity štěpu, viability chondrocytů a novotvorby chrupavčité tkáně na periférii vzorků, poskytovaly štěpy jak z drcené chrupavky, tak na drobné fragmenty rozdělené („diced“) chrupavky, obojí obalené v HYAFFu.

Na *rychlost resorpce* má vliv poměr mezi povrchem a objemem štěpu, proto se tenší štěpy rychleji (Bujia 1994, Huizing et de Groot 2003, Lattyak et al. 2003). Příčinou větší resorpce chrupavky mohou být i cévy vrůstající do drobných otvorů vzniklých například po sutuře vícevrstevných („sendvičových“) štěpů nebo při fixaci štěpu ke stávajícím strukturám nosního skeletu (Huizing et de Groot 2003). Resorpce je dále ovlivněna i místem odběru. Rychleji se resorbují štěpy pocházející z jiné lokality, než je místo jejich inserce. K přežívání transplantátů přispívá i nízká metabolická a imunologická aktivita některých oblastí (nosní dorzum a špička) usnadňuje přežívání transplantátů na rozdíl od nosního septa, kde je tato aktivita větší (Huiznig et de Groot 2003). Lattyak a spol. (2003) pozorovali větší rozsah resorpce u chrupavčitých štěpů v oblasti nosního dorza ve srovnání se štěpy použitými v oblasti nosní špičky.

Görür et al. (2007) upozorňují na roli apoptózy, která je podstatně častěji detekována u posttraumaticky vzniklé deviace, než u deviace jiné etiologie nebo u nedeviované septální chrupavky. Doporučuje proto odebírat materiál z netraumatizovaných oblastí septa, protože apoptóza zvyšuje pravděpodobnost resorpce a změny tvaru štěpu. Arslan et al. (2007) se zabýval problematikou apoptózy u štěpů z tzv. „diced cartilage“ obalené v Surgicelu® (oxidovaná regenerovaná celulóza). Ve skupině pacientů, u nichž byla použita k augmentaci nosního dorza traumatizovaná chrupavka, došlo ve všech případech k částečné nebo úplné resorpci štěpu, na rozdíl od skupiny s netraumatizovanou chrupavkou, kde byl objem štěpu téměř u všech pacientů dlouhodobě stabilní. Jako jednu z příčin tohoto selhání vidí právě v apoptotických změnách, které nemusí být při odběru chrupavky patrné a mohou být potencovány další traumatizací při odběru a zpracování chrupavky. Je nutné ovšem uvést, že proces degradace Surgicelu sám o sobě zvyšuje pravděpodobnost resorpce chrupavky tím, že vyvolává reakci proti cizímu tělesu spojenou s lymfocytární infiltrací, obrovskobuněčnou reakcí a pozdní fibrózou (Calvert et al. 2006). Lidský organismus totiž nedisponuje enzymatickým vybavením potřebným pro metabolické zpracování celulózy (Ertas et al. 2000).

Resorpci většího rozsahu lze podle některých autorů zabránit ponecháním perichondria alespoň na jedné straně štěpu. Na druhou stranu lze v ojedinělých případech zaznamenat růst transplantované chrupavky, právě u chrupavčitých štěpů s ponechaným perichondriem, případně u mladších jedinců, kde není růst nosu ještě zcela ukončen (Huizing et de Groot 2003, Nolst Trenité 2005, Tardy et al. 1985).

Ve skupině štěpů z ušní chrupavky, které byly před vlastní transplantací zbaveny perichondria a poté uchovávány po určitou dobu v *kultivačním médiu*, jsme jeden štěp při pokusu o explantaci nenalezli, předpokládáme proto, že došlo k jeho resorpci. U dalšího štěpu došlo k úplné nekróze štěpu provázené místy zánětlivou reakcí provázenou hnisáním. Pravděpodobnou příčinou mohla být kontaminace během transportu a manipulaci se štěpem a následná zánětlivá reakce s nekrózou nebo nechtěná traumatizace štěpu při opakované manipulaci, nelze vyloučit ani podíl zhoršené výživy chrupavkového štěpu. V ostatních případech se kromě drobných ložiskových nekrotických jednotlivých chondrocytů vzorky vhojily bez jiných prokazatelných morfoloických změn. Na základě našich zkušeností lze konstatovat, že uchovávání štěpů z lidské ušní chrupavky po určitou dobu před vlastní transplantací v kultivačním médiu při teplotě 37°C nepřineslo pro výsledky transplantace žádné výhody, naopak mohlo zvýšit riziko kontaminace štěpu a jeho následné nekrózy a resorpce. Podle literárních údajů lze autologní chrupavku před transplantací úspěšně dlouhodobě uchovávat například ve fyziologickém roztoku s přidáním antibiotik v chladu cca při -16% - -18°C (Guyuron et al. 1994), dále v 70% isopropyl alkoholu, Merthiolátu, Cialitu apod. (Bujia et al. 1991, Clark et Cook 2002, Guyuron et Friedman 1994, McGlynn et Sharpe 1981, Pankin et Chirkova 1973, Wong et al. 2003)

Ušní chrupavka u králíků – změny po traumatizaci v oblasti ušního boltce a po autologní transplantaci

Králíci jsou vhodným zvířecím modelem pro studium histologických změn ušní chrupavky nebo chrupavky nosního septa za různých experimentálních podmínek (Ale de Souza et al. 2008, Bönisch et al. 2007, Cakmak et al. 2005, Kazikdas et al. 2007, Wiseman et al. 2000). Z tohoto důvodu jsme využili možnost zkoumat histologické změny ušní chrupavky jednak po traumatizaci v oblasti ušních boltců, jednak po transplantaci autologních štěpů subkutánně do oblasti dorza experimentálních zvířat. Cílem práce nebylo zjišťování exprese aktinu v chondrocytech jiných živočišných druhů, proto jsme imunohistochemické vyšetření zaměřené tímto směrem neprováděli.

V místech po provedené inkompletní incisi jsme zaznamenali zvýšenou proliferaci chrupavkové tkáně s následným rozvojem uzlovitého ztlustění tvořeného zčásti nově vytvořenou chrupavkou. Obdobné změny, ovšem u drcené králičí ušní chrupavky, popisují Cakmak et al. 2005. V případě chrupavky, která byla rozdělena kompletní incizí a následně sešitá došlo ke srůstu pouze vazivovou tkání. Znamky zvýšené proliferační aktivity chondrocytů a tendenci ke srůstu novotvořenou chrupavkovou tkání jsme nepozorovali.

Místy došlo k posunu okrajů chrupavky přes sebe. Posun okrajů s jejich částečným překrytím („overlap“) popisují u septální chrupavky v experimentu na králících například Bönisch et al (2007) nebo Nolst Trenité et al. (1988).

Wiseman et al. (2000) pozorovali na králičím modelu nárůst celkového objemu a plochy štěpů složených ze dvou vrstev ušní chrupavky po autotransplantaci do druhostranného boltce. Na nárůstu objemu a plochy štěpu se podílela především nově vytvořená vazivová tkán a v menší míře i novotvořená chrupavka na okrajích štěpu. Sutura štěpů neměla žádný vliv na výslednou tloušťku nebo celkový objem štěpů. U části vzorků byla pozorována fibroprodukce a chondrogenese jednak mezi vrstvami chrupavky, jednak mezi štěpem a původní chrupavkou uloženou pod ním. Rovněž byly pozorovány jen minimální změny ve smyslu osifikace, resorpce či zánětu.

V naší studii jsme u králíků změny ve smyslu resorpce transplantované ušní chrupavky, zánětlivé změny ani zvýšenou fibroprodukci v okolí štěpů po dvou měsících nezaznamenali.

Implantace nosičů s kulturou lidských ušních chondrocytů imunodeficitním myším

V části naší práce, ve které jsme testovali možnosti **kultivace ušních chondrocytů ve tkáňové kultuře** jsme potvrdili, že autologní kulturu lze vypěstovat a přenést na vhodný nosič. Při histologickém vyšetření *autologní kultury chondrocytů na želatinových nosičích* jsme ve všech případech v prostorách mezi septy nosiče zaznamenali zcela drobné skupinky málo diferencovaných buněk oválného tvaru bez známek produkce mezibuněčné hmoty, které byly pozitivní v reakci k průkazu S100 proteinu, což nejspíše svědčí pro jejich příbuznost s chondrocyty. Expresi α -SMA jsme nezjistili.

Po 8 týdnech od implantace došlo v několika případech k resorpci celého implantátu. Jednalo se však pouze o jeden typ implantátů, kdy by použit nanovláknenný nosič z PVA/Chitosanu 89:11. Resorbováno bylo celkem 5 ze 6 implantátů, přičemž v posledním případě jsme sice nebyli při explantaci schopni implantát makroskopicky identifikovat, po

odběru bloku tkáně z místa původní implantace byly při mikroskopickém vyšetření nalezeny vazivově opouzdřené volné uzlíky chrupavky bez nosiče. Pravděpodobnou příčinou resorpce nosičů výše uvedeného složení byl jednak nevhodný vzájemný poměr jednotlivých homopolymérů nosiče s vyšším hmotnostním poměrem PVA, který vedl k jeho rychlému rozpadu. PVA se využívá především jako nosič nejrůznějších léčiv, kde je jeho relativně rychlý rozklad ve vodných roztocích výhodný, nicméně vhodnou chemickou modifikací by jistě bylo možné změnit vlastnosti tohoto polymeru tak, aby se doba jeho degradace prodloužila až na několik týdnů (Dailey et al. 2005, Chung et Park 2007).

V ostatních případech, kdy byl implantát nalezen a následně vyšetřen, jsme jak u scaffoldů ze želatiny, tak z nanovláken z různých materiálů, ve většině případů zaznamenali vznik ložisek chrupavkové tkáně se všemi charakteristikami elastické chrupavky, která se v základních rysech nelišila histologickou strukturou ani imunofenotypem od normální ušní chrupavky. Buňky byly pozitivní v reakci k průkazu S-100 proteinu a některé byly i α -SMA pozitivní. Navíc mezibuněčná hmota obsahovala prokazatelná nečetná elastická vlákna. Po osmi týdnech od implantace nebyl materiál nosičů ze želatiny ve větší míře rezorbován. U nanovláken nebylo možno resorpci blíže posoudit pro jejich obtížnou identifikovatelnost. V okolí nosičů ze želatiny, ale i tří nosičů z nanovláken z různých polymerů (PCL, PVB i PLGA) byla v okolí patrná obrovskobuněčná reakce typu z cizích těles. U části vzorků jsme zaznamenali, podobně jako jiní autoři (Christophel et al. 2006, Haisch et al. 2002, Rotter et al. 1999, Shieh et al. 2004) i vznik vazivového pouzdra kolem implantátu.

V některých prostorách mezi strukturami nosiče však vyrostla i tkáň tukově vazivová nebo málo diferencovaná tkáň mezenchymová. Tento fenomén je možno vysvětlit v souladu se současnými představami o kmenových buňkách (Alison et al. 2009) dvojitým způsobem. Buď byly při přípravě tkáňové kultury získány kmenové mezenchymové buňky schopné diferenciaci do několika buněčných typů, nebo se nově vzniklá tkáň vyvinula ze dvou či tří typů unipotentních kmenových buněk s omezenou jednosměrnou potencií diferenciaci, pocházejících z buněk, které osídlily implantát společně s ušními chondrocyty nebo mohly migrovat do implantátu z okolní pojivé tkáně příjemce (Christophel et al. 2006).

Tuto otázku nelze spolehlivě rozhodnout bez dalších náročných a finančně nákladných pokusů, které by mohly být předmětem našeho zájmu až v pozdějším období. Z našich nálezů také vyplývá, že vypěstování čisté kultury buněk elastické chrupavky nemusí být jednoduché, neboť chrupavková tkáň ušního boltce těsně souvisí s různými komponentami mezenchymových tkání těsně na ni naléhajícími a jejich oddělení může být při preparaci z pochopitelných důvodů obtížné.

Problematice tkáňového inženýrství zabývající se přípravou různých typů tkání včetně chrupavkové je věnována velká pozornost a tomu odpovídá i velké množství publikovaných studií. Výzkumné týmy se soustřeďují na několik základních oblastí. Jedná se především o nalezení co nejvhodnějšího zdroje buněk pro vytvoření arteficiální chrupavky. Dále se vyvíjí značné úsilí k nalezení ideálního nosiče těchto buněk z biokompatibilního a biodegradovatelného materiálu a vhodného strukturálního uspořádání, který umožní rovnoměrnou distribuci buněk ve scaffoldu, jejich adhezi, růst, proliferaci a rovnoměrné ukládání mezibuněčné hmoty. Scaffold by se měl odbourávat postupně a jeho degradační produkty by neměly být toxické a neměly by jakýmkoliv způsobem bránit růstu a maturaci chrupavkové tkáně. Důležité jsou rovněž otázky týkající se dlouhodobého zachování mechanické stability a udržení vhodného tvaru a velikosti novotvořené tkáně, což má velký význam právě v oblasti hlavy a krku. V posledních letech se dostávají do popředí i otázky imunologické týkající se tolerance arteficiálně vytvořené autologní tkáně. S tím souvisí i pokusy o vytvoření nových tkání pomocí nových kultivačních technik, kdy je nová tkáň připravena bez použití nosiče.

Pro řešení výše uvedených otázek se využívají nejrůznější postupy jak *in vitro*, tak *in vivo*. Značná část studií probíhá *in vitro*, kdy se hledají optimální zdroje buněk pro kultivaci. Preferovaným zdrojem buněk pro tkáňové inženýrství chrupavky byly po dlouhou dobu kloubní chondrocyty. Souviselo to i s rychle se rozvíjejícím klinickým využitím autologních transplantací chondrocytů (ACT) v ortopedii při léčbě velkých posttraumatických defektů kloubních (především kolenních) chrupavek. Ukazuje se však, že kloubní chrupavka nemusí být ideálním zdrojem buněk, jednak díky nutnosti další traumatizace kloubu při jejich odběru, jednak také proto, že chondrocyty nemají ideální růstové a proliferační charakteristiky ve srovnání s jinými zdroji chondrocytů. Proto se pozornost v poslední době obrací i k jiným zdrojům, tzn. chondrocytům z ušního boltce, chrupavky nosního septa nebo žeberní chrupavky (Christophel et al. 2006, Farhadi et al. 2006, Fujihara et al. 2010, Haisch et al. 2002, Isogai et al. 2006, Jeon et al. 2007, Kafienah et al. 2002, Nabzdyk et al. 2009, Rotter et al. 1999, Tanaka et al. 2010, Tay et al. 2004, Watson et al. 2010).

Někteří autoři předpokládají určitou plasticitu chondrocytů pocházejících z různých zdrojů, tzn. že by mohlo dojít působením místních faktorů ke změně fenotypu těchto buněk, například při využití ušních chondrocytů pro chrupavkové náhrady v oblasti kloubů, směrem k hyalinnímu typu chrupavkové tkáně (van Osch et al. 2004). Min et al. (1996) pozoroval u transplantované lidské ušní chrupavky do defektů nosního septa po 4 týdnech novotvorbu tkáně podobné hyalinní chrupavce. V této studii se však nejednalo o

chrupavku arteficiálně připravenou metodami tkáňového inženýrství. Isogai et al. (2006) porovnávali chondrocyty bovinního původu odebrané z kloubů, nosního septa, boltce a žebra. Zjistili, že proliferaci chondrocytů a produkci mezibuněčné hmoty sice určují i lokální faktory prostředí, v němž se nacházejí, ale na druhou stranu se různé typy chondrocytů na tyto lokální faktory adaptují odlišným způsobem a pro svůj optimální růst potřebují specifické podmínky (např. kloubní chondrocyty synoviální tekutinu a mechanickou zátěž, ušní chondrocyty subkutánní pozici apod.). Autoři předpokládají, že si chondrocyty zachovávají svoje vývojové charakteristiky i po vyjmutí z jejich přirozeného prostředí, pravděpodobně díky odlišnému genetickému naprogramování, které do značné míry určuje jejich fenotypové znaky. K obdobným závěrům na podobně uspořádaném modelu dospěli i Kusuhara et al. (2009).

Přidáním růstových faktorů do kultivačního média nebo inkorporací do struktury scaffoldu lze chování a vlastnosti buněk sice ovlivnit, ale zatím nejsou známy všechny jejich biologické funkce včetně jejich lokálních, ale i celkových nežádoucích účinků (Stoop 2008). To platí i v případě kultivace mezenchymových kmenových buněk kostní dřeně (Chen et al. 2005, Han et al. 2008, Lee et al. 2004, Liu et al. 2008, Park et al. 2009, Zhang et al. 2009), z tukové tkáně (Huang et al. 2004, Lee et al. 2004). apod.. Tyto kmenové buňky jsou, díky své vyšší schopnosti proliferace ve srovnání s diferencovanými buněčnými typy a možnosti diferenciaci na různé buněčné typy pojivové tkáně, pro tkáňové inženýrství chrupavky velmi perspektivní (Goessler et al. 2007, Johnstone et al. 1998, Peltari et al. 2008, Pittenger et al. 1999, Reyes et al. 2001).. Byla také připravena chrupavková tkáň z chondroprogenitorových buněk perichondria (Togo et al. 2006), ale výsledky některých studií nebyly přesvědčivé stran struktury a vlastností takto vytvořené tkáně (Shieh et al. 2004).

Pro provádění studií *in vivo* existují v podstatě dva základní zvířecí modely. První využívá imunodeficitní zvířata, nejčastěji atymické holé myši, kde jako zdroj buněk slouží nejčastěji chondrocyty xenogenního původu (bovinní, králičí, krysí, ovčí, prasečí, lidské apod.) (Cao et al. 1997, Baek et al. 2002, Fujihara et al. 2010, Haisch et al. 2005, Isogai et al. 2006, Jeong et al. 2010, Kamil et al. 2004, Kusuhara et al. 2009, Rotter et al. 2005, Shieh et al. 2004, Tanaka et al. 2010) nebo mezenchymové kmenové buňky (Caplan 2007, Lee et al. 2004, Peltari et al. 2008, Zhang et al. 2009). Myši fungují jako optimální „bioreaktor“, který je velmi vhodný pro hodnocení arteficiálně vytvořené tkáně. Hlavní nevýhodou imunodeficitních myší je nedostatečně buněčná složka imunitní reakce zprostředkovaná T-lymfocyty částečný defekt ve vývoji B lymfocytů, což neumožňuje spolehlivě hodnotit buněčnou odpověď hostitele. Zvířata jsou rovněž příliš malá pro použití implantátů v reálné

velikosti (např. ušní boltec), aby byla imitace reálných podmínek dostatečná. Omezená délka života holých myší také nedovoluje dlouhodobé sledování (Shieh et al. 2004).

Druhý model slouží pro testování implantátů s kulturami autologních, případně allogenních chondrocytů u imunokompetentních zvířat, většinou králíků (Christophel et al. 2006, Filová et al. 2008, Shieh et al. 2004) nebo prasat (resp. miniprasat) (Filová et al. 2007, Kamil et al. 2004, Rotter et al. 2005), což je dalším zásadním a logickým krokem směrem ke klinické aplikaci arteficiálně připravené tkáně. Všechny dosud používané zvířecí modely mají své výhody a nevýhody, ale i specifické indikace. Při výběru vhodného zvířecího modelu je nutné především zohlednit požadavky vyplývající z konkrétních cílů dané studie, ale také to, aby zkoumané jevy byly z patogenetického hlediska co nejvíce analogické situaci v lidském organismu.

Pro potřeby naší práce byl vhodný první model s využitím imunodeficitních myší kmene NOD.129S7 (B6) Rag1null, které nemají funkční jak T, tak B lymfocyty a navíc mají defekt i přirozené imunity. Hlavním předmětem naší práce bylo provedení histologického a imunohistochemického vyšetření novotvořené chrupavky se zaměřením na analýzu exprese α -SMA a S-100 proteinu po jejich transplantaci na různých typech nosičů. Nezaznamenali jsme žádné podstatné rozdíly mezi jednotlivými typy nosičů z hlediska vlivu na novotvorbu chrupavkové tkáně.

Povzbudivé výsledky implantace u imunodeficitních zvířat jsou bohužel velmi často provázeny selháním těchto postupů u imunokompetentních jedinců (Shieh et al. 2004). Přesto, že u imunodeficitních zvířat není vyvinuta T-lymfocyty zprostředkovaná buněčná imunita, dochází i u těchto jedinců v souvislosti s implantací arteficiálně připravené tkáně k zánětlivým projevům (Haisch et al. 2005), i když jsou většinou podstatně méně vyjádřeny, než u imunokompetentních zvířat (Christophel et al. 2006, Kamil et al. 2004, Rotter et al. 2005). Tato reakce vedoucí v konečném důsledku až k destrukci a resorpci implantátu, probíhá nejčastěji ve formě zánětu v místě implantace (Haisch et al. 2005, Kabelka et al. 2005) na němž se podílejí především makrofágy a autoprotilátky proti různým typům kolagenu (Bujia et al. 1994, Fujihara et al. 2009, Naumann et al. 1994). Příčinou vzniku zánětlivé reakce bývá především přítomnost cizorodého materiálu nosiče a jeho degradačních produktů, případně zbytků kultivačního média (Fujihara et al. 2010, Haisch et al. 2002, Haisch et al. 2005, Rotter et al. 2005). V rámci reakce proti cizímu tělesu je stimulována migrace buněk imunitního systému do scaffoldu a sekrece katabolických faktorů, čímž dochází k narušení procesu regenerace tkáně a následnému vrůstání cév a vaziva do implantátu, kalcifikacím, případně i osifikaci chrupavkové tkáně (Christophel et al. 2006,

Haisch et al. 2005, Kamil et al. 2004, Kusuhara et al. 2009, Rotter et al. 1999, Zhang et al. 2009).

Je známo, že některé polymery (např. alginát, PGA/PLLA), které mohou aktivovat makrofágy a monocyty v rámci reakce na cizí tělesa a indukovat syntézu interleukinu -1 (IL-1) a tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α) a prostaglandinu E2 (PGE 2) (Au et al. 2007, Rotter et al. 2005, van Schilfgaarde et de Vos 1998, Villinger 1998, Weber et al. 1994). Tyto cytokiny jsou známé schopností potlačovat syntézu proteoglykanů (TNF- α) a produkci kolagenu II a aggrecanu (IL-1).

Reakce na cizí tělesa je charakterizována třemi fázemi: začátkem, progresí a rezolucí (Luttikhuisen et al. 2006). Fujihara et al. (2010) poukazují na skutečnost, že vliv makrofágů může být u implantátů tvořených nosičem a autologními chondrocyty ve fázi progresu v určitých ohledech komplikovaný. Jednak některé cytokiny a růstové faktory, jako jsou IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- α , TGF- β a další, mohou negativně ovlivnit viabilitu chondrocytů v implantátu. Při regeneraci chrupavky může katabolický cytokin IL-1 β stimulovat chondrocyty k sekreci aggrecanázy a metaloproteináz matrix (MMPs), které mohou rozkládat proteoglykany v novotvořené chrupavce (Goldring 2000, Jeong et al. 2010, Loeser 2006, Peltari et al. 2008). Dále makrofágy ovlivňují také aktivitu a proliferaci T lymfocytů, které mohou také zesilovat intenzitu tkáňové reakce, jejímž výsledkem je poškození regenerované tkáně. Zatímco ve fázi progresu hrají makrofágy hlavní roli v udržování zánětlivých procesů, ve fázi rezoluce mohou stimulovat fibroprodukcí díky sekreci TGF- β . V této fázi, která nastává přibližně 2-3 týdny po transplantaci, mohou reziduální makrofágy naopak podporovat zrání arteficiální chrupavky sekrecí TGF- β , který účinně podporuje tvorbu ECM a diferenciaci chondrocytů (Moulharat et al. 2004). Proto je důležité pro úspěšnou regeneraci chrupavky udržet viabilitu transplantovaných buněk během fáze progresu, tzn. po dobu několika týdnů po transplantaci. Intenzita imunitní reakce na nosiče osídlené chondrocyty ve srovnání s reakcí na implantaci samostatných nosičů se může lišit. Při implantaci nosičů osídlených lidskými ušními chondrocyty atymickým myším zaznamenali Fujihara et al. (2009) nižší počet makrofágů a krevních cév infiltrujících implantát a nižší hladinu interleukinu-1 β (IL-1 β). Chrupavka je považována za jednu z tzv. imunoprivilegovaných tkání, jejíž antigeny normálně nevyvolávají imunitní reakci (Bolano et al. 1991). Některé faktory, jako je například faktor inhibující migraci makrofágů (MIF), Fas ligand (FasL) nebo TGF- β vytvářené v transplantovaných chondrocytech, mohou být během vyžívání arteficiální chrupavkové tkáně zodpovědné za toto imunitní privilegium. Výsledky výše uvedených studií ukazují, že se cytokiny nebo humorální faktory secernované makrofágy

během reakce proti cizímu tělesu, v tomto případě implantátu, mohou podílet na imunoprivilegovaném postavení chrupavky, na němž se aktivně podílejí chondrocyty, které regulují migraci a aktivitu makrofágů.

Hromadění kyselých degradačních produktů scaffoldů z PLA nebo PGA může vést k poklesu pH, které negativně ovlivňuje adhezi a růst chondrocytů (Athanasίου et al.1995, Rotter et al. 1999, Stoop 2008). Podobně, jako např. Haisch et al. (2005) jsme v naší práci opakovaně zaznamenali reakci na cizí těleso v podobě přítomnosti obrovských mnohojaderných buněk z cizích těles. Je však nutné konstatovat, že přesný mechanismus zánětlivé reakce na implantované nosiče osídlených kultivovanými chondrocyty není dosud plně objasněn.

Jedinou klinickou aplikací, kdy se již řadu let rutinně využívají zkušenosti dosažené ve tkáňovém inženýrství, jsou transplantace, resp. implantace autologních kultur kloubních chondrocytů vázaných na nosiče z kyseliny hyaluronové (Grigolo et al. 2002, Pavesio et al. 2003, Podškubka et al.2006) nebo jako suspenze buněk ve fibrinovém lepidle (Handl et al.2006, Visna et al. 2004) do oblasti velkých posttraumatických defektů kloubních (zejména kolenních) chrupavek.

Oproti tomu je klinická aplikace arteficiálně připravené chrupavkové tkáně v oblasti hlavy a krku zatím zcela výjimečná (Yanaga et al. 2004, Yanaga et al. 2006, Yanaga et al. 2009) a díky řadě dosud nevyřešených otázek tak zůstává stále předmětem experimentálních studií. Na rozdíl od ortopedických indikací, kdy je nosič osídlený chondrocyty umístěn do tzv. imunoprivilegované oblasti kloubu (Brittberg et al. 1994), vede subkutánní pozice implantátu v oblasti hlavy a krku u imunokompetentních jedinců k zánětlivé reakci a jeho následné resorpci (Bücheler et Haisch 2003, Peiseler 2001, Rotter et al. 2005).

Hledají se způsoby, jak ochránit implantovanou tkáň před destrukcí způsobenou výše uvedenými faktory. Kromě hledání nových materiálů, které nebudou interferovat s regeneračním procesem chrupavkové tkáně se testují postupy, jak eliminovat nežádoucí zánětlivou reakci. Jednou z možností, jak ochránit implantát, je jeho enkapsulace v biokompatibilní membráně působící jako imunologická bariéra (Haisch et al. 2005, Taguchi et al. 2005). Nicméně nejsou vyřešeny problémy s biokompatibilitou a stabilitou pouzdra, protože použitý materiál může rovněž vyvolávat imunitní odpověď.

Rychlost degradace a uvolňování degradačních produktů se liší jednak v závislosti na struktuře, složení a fyzikálních a chemických vlastnostech daného nosiče, ale i na vlastnostech prostředí (pH, teplota, přítomnost různých enzymů in vivo apod.), ve kterém je

uložen (Zeng et al. 2004). Gong et al. (2007) zjistili, že doba degradace scaffoldů z PLLA [poly (L- lactid)] osídlených aurikulárními chondrocyty novozélandských králíků a implantovaných atymickým myším byla výrazně kratší, než při kultivaci in vitro, což vedlo ke zhoršení mechanických vlastností implantátu. Proto autoři považují za ideální z hlediska mechanické stability novotvořenou chrupavkovou tkáň, aby byla struktura nosiče zůstala zachována pokud možno během celého regeneračního procesu.

Na druhou stranu, jak již bylo uvedeno, může materiál nosiče vyvolávat chronické zánětlivé změny vedoucí v konečném důsledku k rozpadu a resorpci celého implantátu, jednak mohou degradační produkty uvolňované při jeho rozkladu nosičů bránit vzniku plnohodnotné tkáně (Stoop 2008, Weidenbecher et al. 2007). Z tohoto důvodu je některými autory doporučováno dokončit proces regenerace chrupavky in vitro, dokud nedojde k úplné degradaci materiálu nosiče a náhradě materiálu nosiče novotvořenou tkání a teprve poté provést implantaci (Kamil et al. 2003).

V posledních letech se sice rozvíjejí i metody přípravy tkání bez použití scaffoldů, které dávají zejména při rekonstrukcích laryngotracheálních defektů u zvířat slibné výsledky. Tyto postupy jsou však zatím podstatně méně rozšířeny ve srovnání s metodami využívajícími nosiče buněk (Furukawa et al. 2008, Gilpin et al. 2010, Naumann et al. 2004, Tani et al. 2010, Yanaga et al. 2006). Jejich výhodou je, že odpadají rizika spojená s implantací cizorodého materiálu nosiče, ale chrupavková tkáň připravená těmito metodami zatím nesplňuje především požadavky na mechanickou stabilitu.

V oblasti hlavy a krku popsali Yanaga et al. (2004, 2006 a 2009) opakovaně autologní transplantaci suspenze kultivovaných lidských ušních chondrocytů bez nosiče, které při kultivaci v médiu s autologním sérem a FGF (v druhém souboru bez FGF) secernovaly hojné množství ECM gelovité konzistence, která byla u menších defektů v lokální, u větších pak v celkové anestezii injikována do předem připravené podkožní kapsy v oblasti defektu.. K zevní fixaci použili pouze náplastovou fixaci a na nosním dorzu ještě zevní dlahu. Injikovaná hmota ztvrdla v místě defektu během 7-10 dnů. MRI i kontrolní biopsie po několika měsících prokázala novotvořenou chrupavku s normálně diferencovanými chondrocyty obklopenou jemným vazivovým pouzdrém podobným perichondriu, které obsahovalo krevní cévy. Klinické výsledky po 3-34 měsících sledování byly velmi dobré, u žádného pacienta nedošlo k resorpci injikovaného materiálu nebo k jeho úniku do okolních tkání. Touto metodou však není možné připravit předem vhodný tvar, který je závislý na velikosti podkožní kapsy a těsnosti zevní fixace, tkáň lze použít pouze pro vyplnění defektů nikoliv do míst, kde má plnit funkci mechanické opory okolních měkkých tkání.. Otázkou

zůstávají také biologické a biofyzikální vlastnosti takto vytvořené tkáně v dlouhodobém horizontu.

Obdobný způsob kultivace použili Yanaga et al. (2009) spolu s dvoufázovou implantační technikou k vytvoření náhrady ušního boltce u 4 pacientů. Kultivované ušní chondrocyty s gelovitou ECM ale nejdříve injikovali subkutánně do oblasti hypogastria na 6 měsíců. Po explantaci upravili novotvořenou chrupavkovou tkáň do tvaru ušního boltce a transplantovali do místa chybějícího ušního boltce. Během 2-5 letitého sledování nedošlo k resorpci tkáně, estetické výsledky popisují autoři jako dobré.

Z výše uvedených skutečností vyplývá, že problematika tkáňového inženýrství je značně složitá a ke klinickému využití arteficiálně připravené chrupavkové tkáně, která by byla srovnatelná s normální chrupavkou zbývá ještě relativně dlouhá cesta.

Hlavním předmětem této části naší práce bylo studium buněčných změn kultur lidských ušních chondrocytů, ke kterým dochází po implantaci s různými typy nosičů. Nezabývali jsme se proto blíže dalšími aspekty tkáňového inženýrství, například podrobnějším zkoumáním vlivu složení, struktury a vlastností jednotlivých scaffoldů na novotvorbu chrupavkové tkáně, mechanickými vlastnostmi novotvořené chrupavkové tkáně nebo sledováním změn tvaru implantátů apod.

Na základě studia dostupné literatury k této problematice však můžeme konstatovat, že histologické popisy chrupavkové tkáně vytvořené metodami tkáňového inženýrství jsou často poměrně povrchní. Většinou jsou zaměřeny na průkaz obsahu proteoglykanů, kolagenu typu I a II, výjimečně i elastiky (Haisch et al. 2002, Shieh et al. 2004, van Osch et al. 2004). Charakter chondrocytů včetně průkazu S-100 proteinu nebo α -SMA není, na rozdíl od naší práce, blíže sledován.

Tkáňová kultura lidských kloubních chondrocytů před a po autologní transplantaci

Význam prekurzorových buněk chondrogenní řady exprimujících α -SMA (viz úvodní část diskuze) by mohly dokumentovat i nálezy ve **tkáňových kulturách**, které byly použity k **transplantaci chondrocytů při léčbě posttraumatických defektů kloubní chrupavky**. Ve tkáňové kultuře kloubních chondrocytů dominovaly vřetenité buňky zřetelně exprimující α -SMA. Tyto buňky daly vzniknout nové kloubní chrupavce, která po 10 měsících od transplantace obsahovala velké množství chondrocytů exprimujících α -SMA a S-100 protein. Lze tedy předpokládat, že buňky exprimující α -SMA na jedné straně představují mladší elementy blízké buňkám prekurzorovým a snad i elementům vazivové chrupavky. Pro

tuto domněnku by svědčily i nálezy nádorových chrupavkových buněk exprimujících α -SMA blízkých chondroblastům v kostních nádorech charakteru benigního chondroblastomu a chondromyxoidního fibromu (Povýšil et al. 1997). Na druhé straně se jedná o buňky, které budou mít pravděpodobně schopnost značné proliferace, samozřejmě též pod vlivem účinku místních faktorů.

Vyšetření novotvořené kloubní chrupavky po transplantaci autologní kultury kloubních chondrocytů na **nosiči z esteru kyseliny hyaluronové** (Hyalograft® C) bylo pro nás velmi důležité, protože se jednalo o klinickou aplikaci tohoto postupu u lidí. Při vyšetření kontrolních vzorků odebraných po 10 měsících z nově narostlé kloubní chrupavky jsme zjistili, že se vytvořila nová kloubní chrupavka sestávající u části pacientů převážně z chrupavky hyalinní nebo tvořená směsí chrupavky hyalinního a fibrózního typu (Povýšil et al. 2008). S postupem „dozrávání“ nově narostlé kloubní chrupavky by však velmi pravděpodobně došlo k její přestavbě v chrupavku čistě hyalinního typu. To jsme však u našich pacientů neměli možnost ověřit, neboť odběr dalších vzorků v pozdějším období po operaci nebyl možný z etických důvodů.

Materiál nosiče byl v podstatě dobře rezorbovatelný, i když jsme zaznamenali jeho zbytky ve formě hematoxylinem se barvícího materiálu v cytoplazmě makrofágů kostní dřevě a ojediněle též v nečetných chondrocytech nově vytvořené kloubní chrupavky. Na základě vyšetření omezeného počtu pacientů lze konstatovat, že použitá autologní kultura kloubních chondrocytů na nosiči z esteru kyseliny hyaluronové (Hyalograft® C) dává z morfologického hlediska a s ohledem na klinické nálezy velice dobré výsledky (Podškubka et al. 2006, Povýšil et al. 2008).

Roberts et al. (2009) hodnotili biopsie z novotvořené chrupavky včetně subchondrální kosti kolenních kloubů odebraných během kontrolní artroskopie provedené průměrně po 12 měsících po ACI u 58 pacientů. 65% vzorků bylo tvořeno převážně vazivovou chrupavkou, 15% hyalinní chrupavkou, 17% smíšenou hyalinní a vazivovou chrupavkou a 3% pouze vazivovou tkání. Autoři při imunohistochemickém vyšetření stanovovali přítomnost kolagenu typu I a II a prokolagenu IIA, který je syntetizován prekurzorovými buňkami chondrogenní řady (tzn. chondrogenní mezenchymové buňky a buňky perichondria) a je důležitý při vývoji chrupavky, zejména v časných stádiích. V této studii byla přítomnost prokolagenu IIA prokázána u 96% vzorků jak hyalinní, tak smíšené hyalinní a vazivové chrupavky, přičemž poměr kolagenu II a prokolagenu IIA se zvyšoval s časovým odstupem od operace. Podle autorů je tak přítomnost prokolagenu IIA znakem aktivních reparativních procesů v novotvořené chrupavce s vysokým stupněm buněčné

aktivity. Toto zjištění koresponduje se závěry jiných studií, které popisují aktivní remodelační procesy probíhající v novotvořené chrupavce, kdy s rostoucím časovým odstupem od ACI dochází k vyvrávání této tkáně (Brun et al. 2008, Marcacci et al. 2005, Roberts et al. 2001).

Je třeba ale vzít v úvahu, že interpretace histologických nálezů v publikovaných pracích není zcela jednotná. Hodnocení novotvořené tkáně se mohou lišit z několika důvodů. Způsob odběru vzorku může být v jednotlivých studiích odlišný, odebírání se pouze malý vzorek tkáně z jednoho místa a nejsou stanovena jednotná kritéria pro hodnocení histologických nálezů (Podškubka et al. 2006).

Předpokládá se, že na regenerační proces kloubní chrupavky má pozitivní vliv i přiměřené zatěžování kloubů (Filová et al. 2007), a z těchto důvodů je mechanická zátěž a chemické složení okolního prostředí velmi důležité pro chondrogenézu in vivo (Bueno et al. 2009, Mouw et al. 2005).

Přes intenzivně probíhající výzkum a dosažený pokrok ve tkáňovém inženýrství zůstává vytvoření chrupavkové tkáně, která by byla svojí strukturou a vlastnostmi srovnatelná s nativní chrupavkou a rutinně využitelná v rekonstrukční chirurgii v oblasti hlavy a krku, ještě relativně vzdáleným cílem (Stoop 2008). Velká část studií je totiž stále prováděna buď in vitro nebo in vivo na imunodeficitních zvířecích modelech. Ke zhodnocení přínosu arteficiálně připravených tkání je nutné provést prospektivní, randomizované a kontrolované studie na imunokompetentních zvířecích modelech založené na dlouhodobém sledování a kontrole kvality implantovaných tkání.

Je pravděpodobné, že v budoucnu budou v tkáňovém inženýrství využívány především lidské adultní nebo embryonální kmenové buňky. Nicméně klinické využití výsledků vědeckého pokroku v této oblasti zůstává spojeno také s vyřešením některých dosud nezodpovězených etických otázek.

Přípravu chrupavkových tkání pomocí metod tkáňového inženýrství je ovšem nutné chápat také jako velmi efektivní prostředek pro modelaci biologických a molekulárních procesů, které probíhají během vývoje chrupavky. Takto získané poznatky pak bude možné, podle některých autorů (Pelttari et al. 2009), využít pro indukci regeneračních procesů, které by mohly v budoucnu, v rámci tzv. moderní regenerativní medicíny nahradit tradiční implantaci arteficiálně vytvořených tkání.

6 Závěry

1. Histologické vyšetření normální lidské ušní chrupavky přineslo některá nová zjištění, která dosud nebyla v odborné literatuře zaznamenána.

Jedná se o tkáň s *minimální proliferací aktivitou*, jak jsme si mohli ověřit s protilátkou proti Ki67. S tím kontrastovala *vysoká proliferací aktivita v ušní chrupavce u nedonošených plodů*. Proces vyžívání této tkáně je tedy spojen s výrazným úbytkem její proliferací aktivity.

Poprvé jsme podrobně popsali *vrstevnaté uspořádání chrupavky ušního boltce* v histologickém obraze. Centrální a obě povrchové vrstvy chrupavky se liší množstvím elastických vláken, počtem, tvarem a uspořádáním chondrocytů, v místě záhybů vykazují obě zevní vrstvy odlišné uspořádání

2. Poprvé jsme prokázali *přítomnost α -aktinu hladké svaloviny (α -SMA) v chondrocytech ušní chrupavky*, především v obou periferních vrstvách uložených v blízkosti perichondria. Tento nový imunohistochemický nález byl ověřen i metodou RT-PCR, která zároveň vyloučila přítomnost dalších izoform aktinu s výjimkou beta a gama izoformy, které však jsou ubikvitní. Pozitivní exprese některých izoform S-100 proteinu (A1, A6, B2 a P) jsme našli ve všech vrstvách ušní chrupavky, zatímco pozitivita izoform A2 a A10 byla zaznamenána v chondrocytech obou periferních zón.

Poprvé jsme také prokázali, že u části vyšetřených vzorků se v blízkosti perichondria vyskytují drobné skupiny *CD 34 pozitivních chondrocytů* blízkých mezenchymovým kmenovým buňkám, které současně exprimují *S-100 protein*.

3. Patologické změny lidské ušní chrupavky zánětlivého (agresivní polychondritida) nebo traumatického původu vedly v závislosti na rozsahu poškození ke vzniku ložisek jizevnatého charakteru, případně až k nekróze a destrukci menších či větších oblastí chrupavky. Exprese jak S-100 proteinu, tak α -SMA ve vitálních chondrocytech zachované chrupavky nebyla nijak narušena.

Na rozdíl od kloubní chrupavky jsme u patologicky změněné lidské ušní chrupavky nezaznamenali nárůst aktin pozitivních chondrocytů v souvislosti s poškozením.

4. Histologickým vyšetřením vzorků **ušní chrupavky transplantované lidem do oblasti nosního skeletu** (2 pozorování) jsme ověřili, že tkáň zůstává z valné většiny vitální. Reakce k průkazu *S-100 proteinu* byla většinou zřetelně *pozitivní*, oproti tomu byla *pozitivita alfa hladkosvalového aktinu* zjištěna jen *ojediněle* v periferní zóně chrupavky.

5. U štěpů z lidské ušní chrupavky transplantovaných imunodeficitním myším kmene NOD.129S7 (B6) Rag1null jsme zjistili pouze určité změny, a to i za pomoci imunohistochemického vyšetření různých *izoforem S-100 proteinu*, které transplantaci mohou provázet, ale nenarušují zásadním způsobem funkci a strukturu transplantátů.

Transplantace štěpů z **normální, netraumatizované ušní chrupavky** nenarušila základní síť elastických vláken, je však nutno počítat s možností vzniku drobných mikroskopických jizev. Vitalita transplantované chrupavky byla přitom natolik zachována, že *chondrocyty exprimovaly prakticky všechny izoformy S-100 proteinu i α -SMA*.

Traumatizace ušní chrupavky nevedla k významné ztrátě vitality nebo zvýšené resorpci. Do štěrbin rozlomené nebo incizí narušené struktury ušní chrupavkové tkáně vrostla cévnatá granulační tkáň. Rozdrcení chrupavky nevedlo (až na dvě výjimky) k zániku chondrocytů v drobných fragmentech, které přežívaly obklopené vazivovou tkání. Ve vitálních oblastech transplantované chrupavky *chondrocyty exprimovaly jak S-100, tak i α -SMA*.

Uchování ušní chrupavky v kultivačním médiu po určitou dobu před vlastní transplantací nepřineslo pro výsledek transplantace žádné podstatné výhody. U většiny štěpů jsme sice nezaznamenali zhoršení vitality chrupavkového štěpu po transplantaci ve srovnání s normální chrupavkou, na druhou stranu je nutné počítat se zvýšeným rizikem nekrózy a resorpce štěpu, jak jsme mohli pozorovat u dvou případů. Chondrocyty vitálních vzorků exprimovaly jak *S-100* protein, tak *α -SMA*

6. Histologické a imunohistochemické vyšetření kultury lidských ušních chondrocytů na nosičích ze želatiny před implantací prokázalo přítomnost drobných skupinek málo diferencovaných oválných buněk mezi septy nosiče, které byly *pozitivní v reakci k průkazu S-100 proteinu*, což nejspíše svědčí pro jejich příbuznost s chondrocyty. Expresi *α -SMA* jsme nezaznamenali.

Implantace trojrozměrných nosičů s kulturou lidských ušních chondrocytů ze želatiny nebo z nanovláken z různých polymerních materiálů vedlo ve většině případů ke vzniku uzlovitých ložisek chrupavky elastického typu v potřebné lokalizaci. Chondrocyty vykazovaly *pozitivní* výsledky reakce k průkazu *S-100 proteinu i α -SMA*.

7. Histologické změny traumatizované ušní chrupavky u králíků byly obdobné jako u traumatizované lidské ušní chrupavky transplantované imunodeficitním myším. Jediným rozdílem byla zvýšená proliferace a novotvorba chrupavkové tkáně v místech po inkompletních incizích. Po **autologní transplantaci ušní chrupavky** subkutánně do dorza

jsme nezaznamenali změny ve smyslu resorpce, rejekce, zánětlivé reakce ani zvýšené fibroprodukce v okolí štěpů.

8. Značný teoretický význam by mohly mít nálezy chondrocytů exprimujících α -SMA v kloubní chrupavce. Prokázali jsme, že u patologicky nezměněné kloubní chrupavky lze tyto buňky identifikovat převážně jen v povrchové vrstvě, která nejspíše hraje roli v procesu regenerace i reparace, a vřetenité chondrocyty pravděpodobně představují jakousi záložní jednotku. Jejich růstová potence však zatím nebyla spolehlivě ověřena.

Zjistili jsme, že množství buněk exprimujících α -SMA často narůstá v kloubních chrupavkách s artrotickými změnami, pravděpodobně v souvislosti s náhradou kloubních defektů tkání s charakteristikami chrupavky vazivové. V místech fibrilace povrchu kloubní chrupavky s tzv. klonálními změnami se však obvykle nacházejí lakunární buňky s identickým fenotypem a tak lze předpokládat, že vysvětlení může být komplikovanější. Význam této transformace není blíže objasněn, jsou však prokázány určité změny genotypu chondrocytů artrotické chrupavky, které by mohly být příčinou změny jejich imunofenotypu.

9. Vyšetření kultury lidských kloubních chondrocytů na nosiči z kyseliny hyaluronové (Hyalograft®C) prokázalo přítomnost nezralých vřetenitých buněk, které neměly žádné histologické ani imunohistochemické znaky chondrocytů. Jednalo se o vřetenité buňky se zřetelnou pozitivitou aktinu hladké svaloviny, takže je nebylo možno odlišit od myofibroblastů. Reakce k průkazu *S-100 proteinu*, jako relativně specifického markeru chondrocytů, byla *negativní*.

Výsledky **autologní transplantace chondrocytů (ATC)** do defektů kloubní chrupavky s využitím výše uvedené kultury ověřené na 10 pacientech přitom byly po 10 měsících výborné. Nově vytvořená kloubní chrupavka v místě defektů měla všechny znaky chrupavky hyalinní avšak ložiskovitě promíchané s okrsky vazivové chrupavky. Většina chondrocytů byla α -SMA i S-100 pozitivní. Lze přitom předpokládat, že po delší době by došlo k postupné přestavbě v chrupavku hyalinní.

7 Využití ušní chrupavky v nosní chirurgii na ORL oddělení

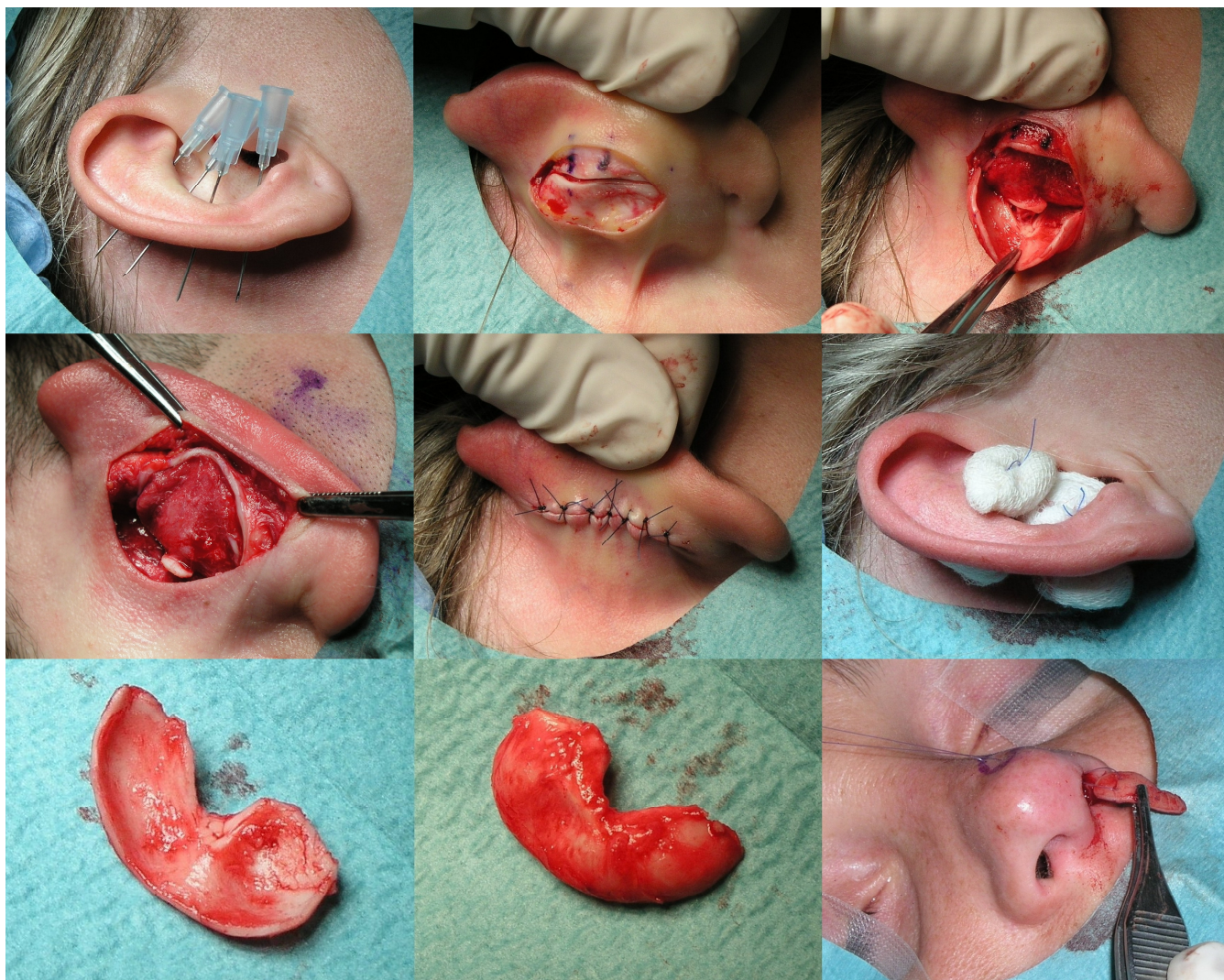
VFN v Praze

Funkční a estetickou rinoseptoplastiku provádíme na ORL oddělení VFN v Praze oddělení již po dobu několika let. Od ledna 2003 do září 2009 bylo provedeno celkem 334 operací zevního nosu a nosního septa (rinoseptoplastik) u 170 mužů a 164 žen. U všech pacientů se jednalo o funkčně-estetickou operaci, kde hlavním cílem bylo obnovení normální respirační funkce nosu se současnou korekcí deformity skeletu zevního nosu.

K rekonstrukci nosního skeletu byla chrupavka ušního botce úspěšně použita u 48 pacientů, z toho v 11 případech jsme odebrali ušní chrupavku z obou ušních boltců (Obr.XI). Odběr byl proveden vždy z řezu na zadní ploše boltce (posteriorní přístup). Po operaci byli pacienti sledováni průměrně 31 měsíců (rozmezí 3 – 78 měsíců).

Výsledky hodnocení našeho souboru, které nejsou součástí disertační práce, potvrdily, že ušní chrupavka je pro rekonstrukci deformovaných nebo chybějících anatomických struktur zevního nosu i nosního septa velmi vhodným materiálem, což potvrzují i nálezy z histologického vyšetření štěpů odebraných při revizních operacích, stejně jako naše experimentální studie. Ušní boltce se po odběru chrupavky zhojily bez jakýchkoli závažnějších časných či pozdních komplikací. K rejekci štěpu z ušní chrupavky ani jiné závažnější časné nebo pozdní komplikaci v místě inserce v oblasti nosního skeletu nedošlo. Jak funkční, tak estetické výsledky operací byly ve většině případů velmi dobré a srovnatelné s výsledky zahraničních studií.

V současné době připravujeme pokračování naší pilotní experimentální studie s využitím scaffoldů osídlených kultivovanými autologními ušními chondrocyty. V první fázi je naším cílem úspěšná aplikace novotvořené chrupavky do oblasti nosního skeletu (primárně do oblasti nosního septa) na imunokompetentním zvířecím modelu. Pokud budou výsledky této studie příznivé, budeme v druhé fázi usilovat ve spolupráci s dalšími pracovišti (AV ČR) o aplikaci arteficiálně připravené chrupavky do nosního skeletu u lidí.



Obr.XI Odběr ušní chrupavky s příkladem inserce štěpu

8 Literatura

- Adachi, S., Ito, H., Tamamori, M., Tanaka, M., Marumo, F., Hiroe, M.: Skeletal and smooth muscle alpha-actin mRNA in endomyocardial biopsy samples of dilated cardiomyopathy patients. *Life Sci.* 1998; 63: 1779-1791.
- Aigner, J., Tegeler, J., Hutzler, P., Campoccia, D., Pavesio, A., Hammer, C., Kastenbauer, E., Naumann, A: Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 42:172–181.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: *Essential Cell Biology*. New York, Garland Publishing. 1998.
- Ale de Souza, M.M., Gregorio, L.C., Sesso, R., Ale Souza, S., Settanni, F.: Study of rabbit septal cartilage grafts placed on the nasal dorsum. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2008; 10: 250-254.
- Alison, M., R., Islam, S.: Attributes of adult stem cells . *J. Pathol.* 2009; 217: 144-160.
- Allcroft, R.A., Friedman, C.D., Quatela, V.C.: Cartilage grafts for head and neck augmentation and reconstruction: Autografts and homografts. *Otolaryngol Clin. Nort Am.* 1994; 27: 69-80.
- Andrade, F.H., Porter, J.D., Kaminski, H.J.: Eye muscle sparing by the muscular dystrophies: lessons to be learned? *Microsc. Res. Tech.* 2000; 48: 192 – 203.
- Ansari, K., Asaria, J., Hilger, P., Adamson, P.A.: Grafts and implants in rhinoplasty – Techniques and long-term results. *Operative Techniques in Otolaryngology.* 2008;19: 42 – 58.
- Araco, A., Gravante, G., Araco, F., Castri, F., Delogu, D., Filingeri, V., Casciani, C.U., Cervelli, V.: Autologous cartilage graft rhinoplasties. *Aesth. Plast. Surg.* 2006; 30: 169-174.
- Arslan, E., Majka C., Polat, A.: The fate of diced cartilage grafts of traumatized versus nontraumatized origin. *Aesth. Plast. Surg.* 2007; 31:365-371.
- Athanasίου, K.A., Niederauer, G.G., Agrawal, C.M., Landsman, A.S: Applications of biodegradable lactides and glycolides in pediatry. *Clin. Pediatr. Med. Surg.* 1995; 12: 475-495,
- Au, R.Y., Al-Talib, T.K., Au, A.Y., Phan, P.V., Frondoza, C.G.: Avocado soybean unsaponifiables (ASU) suppress TNF-alpha, IL-1beta, Cox-2, iNOS gene

- expression, and prostaglandin E (2) and nitric oxide production in articular chondrocytes and monocyte/macrophages. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007; 15: 1249-1255.
- Aulthouse, A.L., Beck, M., Griffey, Sanford, J., Arden, K., Machado, M.A., Horton, W.A.: Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 1989;25:659–668.
- Babai, F., Musevi-Aghdam, J., Schürch, W., Royal, A., Gabbiani, G.: Coexpression of alpha-sarcomeric actin, alpha-smooth muscle actin and desmin during myogenesis in rat and mouse embryos. I. Skeletal muscle. *Differentiation* 1990; 44: 132-142.
- Badrul, A. H., Aminuddin, B. S., Sharaf, I., Samsudin, O. C., Munirah, S., Ruszymah, B. H.: The effects of autologous human serum on the growth of tissue engineered human articular cartilage, *Med. J. Malaysia*, 2004; 59, Suppl B: 11-12.
- Baek, C.H., Lee, J.C., Jung, Y.G., Ko, Y.J, Yoon, J.J., Park, T.G.: Tissue-engineered cartilage on biodegradable macroporous scaffolds: cell shape and phenotypic expression. *Laryngoscope*. 2002; 112: 1050-1055.
- Baek, C.H., Ko, Y.J.: Characteristics of tissue-engineered cartilage on macroporous biodegradable scaffold. *Laryngoscope*. 2006; 116: 1829-1834.
- Ballert, J.A., Park, S.S.: Functional consideration in revision rhinoplasty. *Facial Plast. Surg.* 2008; 24: 348-357.
- Bakerman, P.R., Stenmark, K.R., Fisher, J.H.: Alpha-skeletal actin messenger RNA increases in acute right ventricular hypertrophy. *Am. J. Physiol.* 1990; 258: L173-8.
- Baran, C.N., Tiftikcioglu, Y.O., Baran, N.K.: The use of alloplastic materials in secondary rhinoplasties: 32 years of clinical experience. *Plast. Reconstr. Surg.* 2005;116: 1502-1516.
- Bateman, N., Jones, N.S.: Retrospective review of augmentation rhinoplasties using autologous cartilage grafts. *J. Laryngol. Otol.* 2000; 114: 514-518.
- Bea, F., Bär, H., Watson, L., Blessing, E., Kübler, W., Kreuzer, J., Janh., L.: Cardiac alpha-actin in smooth muscle cells: detection in umbilical cord vessels and in atherosclerotic lesions. *Basic Res. Cardiol.* 2000; 95: 106-113.
- Becker, D.G., Becker, S.S.: Treatment of nasal obstruction from nasal valve collapse with alar batten grafts. *J. Long. Term. Eff. Med. Implants.* 2003; 13: 259-269.
- Becker, D.G., Becker, S.S.: Auricular cartilage in revision rhinoplasty. *Facial Plast. Surg.* 2003; 19: 41-51.

- Becker, D.G., Bloom, J.: Five techniques that I cannot live without in revision rhinoplasty. *Facial Plast. Surg.* 2008; 24: 358-364.
- Beeson, W.H.: The nasal septum. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 1987; 20: 743-769.
- Betka, J., Černý, E.: *Atlas chirurgie hlavy a krku*. První vydání, Praha, Triton. 251 s.
- Bhattarai, N., Edmondson, D., Veseih, O., Matsen, F. A., Zhang, M.: Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials.* 2005; 26: 6176-6184.
- Bhati, R.S., Mukherjee, D.P., McCarthy, K.J., Rogers, S.H., Smith, D.F., Shalaby, S.W.: The growth of chondrocytes into a fibronectin-coated biodegradable scaffold. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001; 56, 74-82.
- Boccieri, A.: Subtotal reconstruction of the nasal septum using a conchal reshaped graft. *Ann. Plast. Surg.* 2004; 53: 118-125.
- Boccieri, A., Macro, C.: Septal considerations in revision rhinoplasty. *Facial Plast. Surg. Clin. N. Am.* 2006; 14: 357-371.
- Boccieri, A., Marano, A.: The conchal cartilage graft in nasal reconstruction. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 2007; 60: 188-194.
- Boccieri, A., Marianetti, T.: Perichondrium graft: harvesting and indications in nasal surgery. *J. Craniofac. Surg.* 2010; 21: 41-44.
- Bolano, L. Kopta, J.A.. The immunology of bone and cartilage transplantation. *Orthopedics.* 1991; 14: 987-996.
- Bos, P. K., DeGroot, J., Budde, M., Verhaar, J. A., van Osch, G. J.: Specific enzymatic treatment of bovine and human articular cartilage: implications for integrative cartilage repair. *Arthritis Rheum.* 2002; 46, 976-985.
- Bönisch, M., Mink, A.: Clinical and histological results of septoplasty with a resorbable implant. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2000; 126: 1373-1377.
- Bönisch, M., Nolst Trenité, G.J.: Reconstructive septal surgery. *Facial Plast. Surg.* 2006; 22: 251-256.
- Bönisch, M., Hajas, T., Nolst Trenité, G.J.: Morphological and histological findings after typical surgical manipulations on growing septal cartilage in rabbits. *Facial Plast. Surg.* 2007; 23:231-238.
- Bracaglia, R., Fortunato, R., Gentileschi, S.: Secondary rhinoplasty. *Aesthetic Plast. Surg.* 2005, 29: 230-239.
- Britt, J.C., Park, S.S.: Autogenous tissue-engineered cartilage: evaluation as an implant material.. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1998; 124: 671-677.

- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilson, A., Ohlsson, C., Isakson, O., Peterson, L.: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 1994; 331: 889-895.
- Brun, P., Dickinson, S.C., van B.Cortivo, R., Hollander, A.P., Abatangelo, G.: Characteristics of repair tissue in second-look and third-look biopsies from patients treated with engineered cartilage: relationship to symptomatology and time after transplantation. *Arthritis Res. Ther.* 2008; R132: 1-8.
- Bueno, E.M., Bilgen, B., Barabino, G.A.: Hydrodynamic parameters modulate biochemical, histological, and mechanical properties of engineered cartilage. *Tissue Eng. Part A.* 2009; 15: 773-785.
- Bujia, J., Wilmes, E., Hammer, C, Kastenbauer, E.: Class II antigenicity of human cartilage: relevance to the use of homologous cartilage graft for reconstructive surgery. *Ann. Plast. Surg.* 1991, 26: 541-543.
- Bujia, J.: Determination of the viability of crushed cartilage grafts: clinical implications for wound healing in nasal surgery. *Ann. Plast. Surg.* 1994, 32: 261-265.
- Bujia, J. Alsalameh, A., Sittinger, M., Hammer, C., Wilmes, E., Burmester, G.: Humoral immune response against minor collagens type IX and XI in patients with artilage graft resorption after reconstructive surgery. *Ann. Rheum. Dis.* 1994; 53: 229-234.
- Bulinski, J.C.: Actin discrimination. *Science* 2006, 313: 180-181.
- Buma, P., Ramrattan, N.N., van Tienen, T.G., Veth, R.P.H.: Tissue engineering of the meniscus. *Biomaterials.* 2004; 25: 1523-1532.
- Bücheler, M., Haisch, A.: Tissue engineering in otorhinolaryngology. *DNA Cell Biol.* 2003; 22: 549-564.
- Cakmak, O., Ergin, T.: The versatile autogenous costal cartilage graft in septorhinoplasty. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2002; 4: 172-176.
- Cakmak, O., Bircan, S., Buyuklu, F., Tuncer, I., Dal, T., Ozluoglu, L.N.: Viability of crushed and diced cartilage grafts: A study in rabbits. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2005; 7: 21-26.
- Cakmak, O., Buyuklu, F., Yilmaz, Z., Sahin, F.I., Tarhan, E., Ozluoglu, L.N.: Viability of cultured human nasal septum chondrocytes after crushing.. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2005; 7: 406-409.
- Cakmak, O., Buyuklu, F.: Crushed cartilage grafts concealing irregularities in rhinoplasty. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2007; 9: 352-357.

- Calvert, J.W., Brenner, K., DaCosta-Iyer, M., Daniel, R.K.: Histological analysis of human diced cartilage. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006; 118: 230-236.
- Cao, Y, Vacanti, J.P., Paige, K.T., Upton, J., Vacanti, C.A.: Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast.Reconstr.Surg.* 1997; 100:297-302.
- Caplan, A.I.: Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J. Cell. Physiol.* 2007;213: 341-347.
- Castagnola, P., Dozin, B., Moro, G., Cancedda, R.: Changes in the expression of collagen genes show two stages in chondrocyte differentiation in vitro. *J. Cell Biol.* 1988; 106:461–467.
- Cárdenas-Camarena, L., Guerrero, M.T.: Use of cartilaginous autografts in nasal surgery: 8 years of experience. *Plast. Reconstr. Surg.* 1999; 103: 1003-1014.
- Caterson, E.J., Nesti, L.J., Li, W.J., Danielson, K.G., Albert, T.J., Vaccaro, A.R., Tuan, R.S.: Three-dimensional cartilage formation by bone marrow-derived cells seeded in polylactide/alginate amalgam. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001; 57:394–403.
- Chang, C.H., Liu, H.C., Lin, C.C., Chou, C.H., Lin, F.H.: Gelatin–chondroitin–hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 2003;24:4853–4858.
- Chaponnier, C., Gabbiani, G.: Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *J. Pathol.* 2004, 204: 386-395.
- Chen, R.R., Mooney, D.J.: Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering. *Pharm.Res.* 2003; 20: 1103-1112.
- Chen, G., Sato, T., Ushida, T., Hirochika, R., Tateishi, T.: Redifferentiation of dedifferentiated bovine chondrocytes when cultured in vitro in a PLGA-collagen hybrid mesh. *FEBS Letters.* 2003; 542:95-99.
- Chen, J., Wang, C., Lu, S., Wu, J., Guo, X., Duan, C., Dong, L., Song, Y., Zhang, J., Jing, D. et al.: In vivo chondrogenesis of adult bone-marrow-derived autologous mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* 2005; 319: 429–438.
- Christophel, J.J., Chang, J.S., Park, S.S.: Transplanted tissue-engineered cartilage. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2006; 8: 117-122.
- Chun, K.W., Yoo, H.S., Yoon, J.J., Park, T.G.: Biodegradable PLGA microcarriers for injectable delivery of chondrocytes: effect of surface modification on cell attachment and function. *Biotechnol. Prog.* 2004, 20:1797-1801.

- Chung, H.J., Park, T.G.: Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. 2007; 59:249-262.
- Bujia, J., Wilmes, E., Hammer, C, Kastenbauer, E.: Class II antigenicity of human cartilage: relevance to the use of homologous cartilage graft for reconstructive surgery. *Ann. Plast. Surg.* 1991, 26: 541-543.
- Clément, S., Chaponnier, C., Gabbiani, G.: A subpopulation of cardiomyocytes expressing alpha-skeletal actin is identified by a specific polyclonal antibody. *Circ. Res.* 1999; 85: e51-8.
- Clement, S., Stouffs, M., Bettiol, E., Kampf, S., Krause, K.H., Chaponnier, C., Jaconi, M.: Expression and function of α -smooth muscle actin during embryonic-stem-cell-derived cardiomyocyte differentiation. *J. Cell Science.* 2007; 120: 229-238.
- Conrad, K., Gillman, G.: A 6-year experience with the use of expanded polytetrafluoroethylene in rhinoplasty. *Plast. Reconstr. Surg.* 1998; 101: 1675-1683.
- Constatian, M.B.: Indications and use of composite grafts in 100 consecutive secondary and tertiary rhinoplasty patients: introduction of the axial orientation. *Plast. Reconstr. Surg.* 2002, 110: 1116-1133.
- Coskun, B.U., Seven, H., Yigit, O., Alkan, S., Savk, H., Basak, T., Dadas, B.: Comparison of diced cartilage graft wrapped in surgicell and diced cartilage graft wrapped in fascia: an experimental study. *Laryngoscope.* 2005; 115: 668-671.
- Cross, S.S., Hamdy, F.C., Deloulme, J.C. , Rechman, I.: Expression of S-100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are overexpressed in common cancers. *Histopathology.* 2005; 46: 256-269.
- Dai, W., Kawazoe, N., Lin, X., Dong, J., Chen, G.: The influence of structural design of PLGA/collagen hybrid scaffolds in cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 2010; 31: 2141-2152.
- Dailey, L.A., Wittmar, M., Kissel, T.: The role of branched polyesters and their modifications in the development of modern drug delivery vehicles. *J. Control. Release.* 2005; 101: 137-149.
- Daniel, R.K., Calvert, J.W.: Diced cartilage grafts in rhinoplasty surgery. *Plast. Reconstr. Surg.* 2004; 113: 2156-2171.
- DeFatta, R.J., Williams III, E.F.: The decision process in choosing costal cartilage for use in revision rhinoplasty. *Facial Plast. Surg.* 2008; 24: 365-371.

- DeNofrio, D., Hoock, T.C., Herman, I.M.: Functional sorting of actin isoforms in microvascular pericytes. *J. Cell Biol.* 1989; 109: 191-202.
- Demirkan, F., Arsian, E., Unal, S., Aksoy, A.: Irradiated homologous costal cartilage: versatile grafting material for rhinoplasty. *Aesthetic Plast. Surg.* 2003; 27: 213-220.
- Doležal, P.: Možnosti korekcie sedlovitej deformácie nosa. *Choroby hlavy a krku.* 1997; 6: 9-13.
- Doležal, P.: Korektívna septorinplastika. 1. vydanie, Banská Bystrica, Advert, 1999; 145 s. ISBN 80-968297-O-X.
- Doležal, P.: Chirurgia kostnochrupkovej klenby nosa. *Otolaryngol. Chir. hlavy krku.* 2007; 1: 146 – 153.
- Donato, R.: Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999; 1450:191-231.
- Dresner, H.S., Hilger, P.A.: An overview of nasal dorsal augmentation. *Semin. Plast. Surg.* 2008; 22: 65-73.
- Drury, J.L., Mooney, D.J.: Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. *Biomaterials.* 2003;24:4337–4351.
- Duda, G.N., Haisch, A., Endres, M., Gebert, C., Schröder, D., Hoffmann, J.E., Sittinger, M.: Mechanical quality of tissue engineered cartilage: Results after 6 and 12 weeks in vivo. *J Biomed Mater Res.* 2000 ;53:673–677.
- Ertas, N.M., Hucumenoglu, S., Besalti, O., Ozak, A., Celebioglu, S.: The effect of oxidized, regenerated cellulose on diced cartilage xenografts: an experimental study. *Ann. Plast. Surg.* 2000; 45: 224–225.
- Fan, H, Hu, Y., Qin, L., Li, X., Wu, H., Lv, R.: Porous gelatin-chondroitin-hyaluronate tri-copolymer scaffold containing microspheres loaded with TGF- β 1 induces differentiation of mesenchymal stem cells in vivo for enhancing cartilage repair. *J. Biomed., Mater. Res.* 2006; 77A: 785-794.
- Faris, C., Koury, E., Kathari, P., Frosh, A.: Functional rhinoplasty with batten and spreader grafts for correction of internal nasal valve incompetence. *Rhinology.* 2006; 44: 114-117.
- Favaretto, A. L., Lins, C. E., Felipe, M. S., Da Cruz, W. B.: Characterization of a chondrocyte primary culture from rib cartilage of the rat. *Rev. Bras. Biol.* 1989; 49:731-736.

- Fedok, F.G.: Revision rhinoplasty using the endonasal approach. *Facial Plast. Surg.* 2008; 24: 293-309.
- Filová, E., Rampichová, M., Handl, M., Lytvynets, A., Halouzka, R., Usvald, D., Hlučilová, J., Procházka, R., Dezortová, M., Rolencová, E., Košťáková, E., Trč, T., Šťastný, E., Koláčná, L., Hájek, M., Motlík, J., Amler, E.: Composite hyaluronate-type I collagen-fibrin scaffold in the therapy of oteochonndral defects in miniature pigs. *Physiol. Res.* 2007; 56 (Suppl 1): S5-S16.
- Filová, E., Jelínek, F., Handl, M., Lytvynets, A., Rampichová, M., Varga, F., Čináti, J., Soukup, T., Trč, T., Amler, E.: Novel Composite Hyaluronan/Type I Collagen/Fibrin Scaffold Enhances Repair of Osteochondral Defect in Rabbit Knee. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 2008; 87B: 415–424.
- Fischer, H., Gubisch, W.: Nasal valves-importance and surgical procedures. *Facial Plast. Surg.* 2006; 22: 266-280.
- Foda, M.T.: The caudal septal replacement graft. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2008; 10: 152-157.
- Freyria, A. M., Ronziere, M. C., Roche, S., Rousseau, C. F., Herbage, D.: Regulation of growth, protein synthesis, and maturation of fetal bovine epiphyseal chondrocytes grown in high-density culture in the presence of ascorbic acid, retinoic acid, and dihydrocytochalasin B, *J Cell Biochem.* 1999; 76: 84-98.
- Fujihara, Y., Takato, T., Hoshi, K.: Immunological response to tissue-engineered cartilage derived from auricular chondrocytes and a PLLA scaffold in transgenic mice. *Biomaterials.* 2010; 31: 1227-1234.
- Fujihara, Y., Asawa, Y., Takato, T., Hoshi, K.: Tissue reactions to engineered cartilage based on poly-L-lactic acid scaffolds. *Tissue Eng. Part A.* 2009; 15: 1565-1577.
- Furukawa, K.S., Imura, K., Tateishi, T., Ushida, T.: Scaffold free cartilage by rotational culture for tissue engineering. *J. Biotechnol.* 2008; 133: 134-145.
- Fujisawa, T., Hattori, T., Ono, M., Uehara, J., Kubota, S., Kuboki, T., Takigawa, M.: CCN family 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) stimulates proliferation and differentiation of auricular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008; 16: 787-795.
- Gaissmaier, C., Fritz, J., Krackhardt, T., Flesch, I., Aicher, W.K., Ashammakhi, N.: Effect of human platelet supernatant on proliferation and matrix synthesis of human articular chondrocytes in monolayer and three-dimensional alginate cultures. *Biomaterials.* 2005; 26:1953–60.

- Gassmaier, C., Koh, J.L., Weise, K.: Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair. *Injury*. 2008; 39 Suppl 1: S88-S96.
- Gentile, P., Cervelli, V.: Nasal dorsum reconstruction with 11th rib cartilage and auricular cartilage grafts. *Ann. Plast. Surg.* 2009; 62: 63-66.
- Gibson, T., Davis, B. and Curran, R.C.: The long-term survival of cartilage homografts in man. *Br.J. Plast. Surg.* 1959; 11: 177 – 187.
- Gilpin, D.A., Weidenbecher, M.S., Dennis, J.E.: Scaffold-free tissue engineered cartilage implants for laryngotracheal reconstruction. *Laryngoscope*. 2010; 120: 612-617.
- Gnepp, D.R.: Diagnostic surgical pathology of the head and neck. 2nd ed. Saunders Elsevier; 2009.
- Goessler, U.R., Straeter, J.S., Riedel, K., Bran, G.M., Hörmann, K., Riedel, F.: Tissue engineering in head and neck reconstructive surgery: what type of tissue do we need? *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 2007; 264: 1343-1356.
- Goldring, M.B.: The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43:1916-1926.
- Gong, Y., Zhou, Q., Gao, C., Shen, J.: In vitro and in vivo degradability and cytocompatibility of poly(L-lactic acid) scaffold fabricated by a gelatin particle leaching method. *Acta Biomater.* 2007; 3: 531-540.
- Görür, K. Polat, G., Ozcan, C., Arslan, E., Vayisoğlu, Y., Oztürk, O.G., Bağdatoğlu, O.: The role of apoptosis in traumatic versus nontraumatic nasal septal cartilage. *Plast. Reconstr. Surg.* 2007; 199: 1773-1776.
- Greiner, A., Wendorff J.H.: Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2007;46(30):5670-703.
- Grigolo, B., Lisignolia, G., Piacentinia, A., Fiorinia, M., Gobbib, P., Mazzottib, G., Ducac, M., Pavesioc, A., Facchini, A.: Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAFFs11): molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials.* 2002; 23:1187–1195
- Grimaud, E., Heymann, D., Redini, F.: Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002; 13: 241-257.
- Gruber, R.P., Pardun, J., Wall, S.: Grafting the nasal dorsum with tandem ear cartilage. *Plast. Reconstr. Surg.* 2003; 112: 1110-1122.

- Gubisch, W.: Twenty-five years experience with extracorporeal septoplasty. *Facial Plast. Surg.* 2006; 22: 230-239.
- Gunatillake, P.A., Adhikari, R.: Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur. Cells Mater.* 2003; 5, 1-16.
- Gunning, P., Ponte, P., Blau, H., Kedes, L.: α -skeletal and α -cardiac actin genes are coexpressed in adult human skeletal muscle and heart. *Moll. Cell Biol.* 1983; 3: 1985-1995.
- Guo, T., Zhao, J., Chang, J., Ding, Z., Hong, H., Chena, J., Zhang, J.: Porous chitosan-gelatin scaffold containing plasmid DNA encoding transforming growth factor-b1 for chondrocytes proliferation. *Biomaterials.* 2006; 27: 1095-1103.
- Gunter, J.P.: Management of the deviated nose. The importance of septal reconstruction. *Clin. Plast Surg.* 1988; 15: 43 – 55.
- Guyuron, B., Friedman, A.: The role of preserved autogenous cartilage graft in septorhinoplasty. *Ann. Plast. Surg.* 1994; 32: 255-260.
- Haisch, A., Kläring, S., Gröger, A., Gebert, C., Sittinger, M.: A tissue-engineering model for the manufacture of auricular-shaped cartilage implants. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 2002; 259:316–321
- Haisch, A., Gröger, A., Gebert, C., Leder, K., Ebmeyer, J., Sudhoff, H., Jovanovic, S., Sedlmaier, B., Sittinger, M.: Creating artificial perichondrium by polymer complex membrane macroencapsulation: immune protection and stabilization of subcutaneously transplanted tissue-engineered cartilage. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 2005; 262: 338-344.
- Han, K., Kim, J., Son, D., Park, B.: How to harvest the maximal amount of conchal cartilage. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 2008; 61: 1465-1471.
- Han, S.H., Kim, Y.H., Park, M.S., Kim, I.A., Shin, J.W., Yang, W.I., Jee, K.S., Park, K.D., Ryu, G.H., Lee, J.W.: Histological and biomechanical properties of regenerated articular cartilage using chondrogenic bone marrow stromal cells with a PLGA scaffold in vivo. *J. Biomed. Mater. Res.* 2008; 87A: 850-861.
- Handl, M., Trč, T., Hanus, M., Šťastný, E., Fricová-Poulová, M., Neuwirth, J., Adler, J., Havránová, D., Varga, F.: Léčba hlubokých chondrálních defektů pately transplantací kultivovaných autologních chondrocytů. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.* 2006;73: 373-379.
- Harris, L.D., Kim, B., Mooney, D.J.: Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 42: 396-402.

- He, L., Liu, B., Xipeng, G., Xie, G., Liao, S., Quan, D., Cai, D., Lu, J., Ramakrishna, S.: Microstructure and properties of nano-fibrous PCL-b-PLLA scaffolds for cartilage tissue engineering. *Eur. Cell Mater.* 2009; 18: 63-74.
- Hersel, U., Dahmen, C., Kessler, H.: RDG modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials.* 2003; 24: 4385-4415.
- Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Chaponnier, C.: α -smooth actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol. Biol. Cell.* 2001; 12: 2730-2741.
- Hinz, B., Gabbiani, G., Chaponnier, C.: The NH₂-terminal peptide of alpha-smooth muscle actin inhibits force generation by the myofibroblast in vitro and in vivo. *J. Cell Biol.* 2002; 157:657-663.
- Hinz, B., Dugina, V., Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B., Chaponnier, C.: Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol. Biol. Cell* 2003; 14: 2508-2519.
- Holmes, T.C.: Novel peptide-based biomaterial scaffolds for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2002; 20: 16-21.
- Homicz, M.R., Chia, S.H., Schumacher, B.L., Masuda, K., Thonar, E.J., Sah, R.L., Watson, D.: Human septal chondrocyte redifferentiation in alginate, polyglycolic acid scaffold, and monolayer culture. *Laryngoscope.* 2003; 113: 25-32.
- Horton, W., Hassel, J.R.: Independence of cell shape and loss of cartilage matrix production during retinoic acid treatment of cultured chondrocytes. *Dev. Biol.* 1986;115:392–397.
- Huang, Z.M., Zhang, Y.Z., Kotaki, M., Ramakrishna, S.: A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* 2003; 63:2223-2253.
- Huang, J.I., Zuk, P.A., Jones, N.F., Lorenz, H.P., Hedrick, M.H., Benhaim, P.: Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plast. Reconstr. Surg.* 2004; 113: 585-594.
- Huizing, E.H., de Groot, J.A.M.: *Functional Reconstructive Nasal Surgery.* Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2003, 386. ISBN 3-13-129411-6 (GTV)
- Hung, S.C., Kuo, P.Y., Chang, C.F., Chen, T.H., Ho, L.L.T.: Alpha-smooth actin expression and structure integrity in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* 2006;324: 457-466.
- Hybášek, I.: *Ušní, nosní a krční lékařství.* První vydání, Praha, Galén. 1999, 220s.

- Ilkovski, B., Clement, S., Sewry, C., North, K.N., Cooper, S.T.: Defining alpha-skeletal and alpha-cardiac actin expression in human heart and skeletal muscle explains the absence of cardiac involvement in ACTA1 nemaline myopathy. *Neuromuscular Disord.* 2005; 15: 829-835.
- Isogai, N., Morotomi, T., Haykawa, S., Munakata, H., Tabata, Y., Ikada, Y., Kamiishi, H.: Combined chondrocyte-copolymer implantation with slow release of basic fibroblast growth factor for tissue engineering an auricular cartilage construct. *J. Biomed. Mater. Res.* 2005; 74A: 408-418.
- Isogai, N., Kusuhara, H., Ikada, Y., Ohtani, H., Jackquet, T., Hillyer, J., Owder, E., Landis, W.J.: Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures. *Tissue Eng.* 2006; 12: 691-703.
- Jackson, M.R.: Fibrin sealants in surgical practice: An overview. *Am. J. Surg.* 2001;182:1S–7S.
- Jakob, M., Demartean, O., Schafer, D., Stumm, M., Heberer, M., Martin, I.: Enzymatic digestion of adult human articular cartilage yields a small fraction of the total available cells, *Connect Tissue Res*, 2003; 44: 173-180.
- Jang, J., Bengali, Z., Houchin, T.L., Shea, L.D.: Surface adsorption of DNA to tissue engineering scaffolds for efficient gene delivery. *J. Biomed. Mater. Res.* 2006; 77A: 50-58
- Jeschke, B., Meyer, J., Jonczyk, A., Kessler, H., Adamietz, P., Meenen, N.M., Kantlehner, M., Goepfert, C., Nies, B.: RGD-peptides for tissue engineering of articular cartilage. *Biomaterials*, 2002; 23: 3455-3463
- Jeon, Y.H., Choi, J.H., Sung, J.K., Kim, T.K., Cho, B.C., Chung, H.Y.: Different effects of PLGA and Chitosan scaffolds on human cartilage tissue engineering. *J. Craniofac. Surg.* 2007; 18: 1249-1258.
- Jeong, C.G., Hollister, S.J.: A comparison of the influence of material on in vitro cartilage tissue engineering with PCL, PGS, and POC 3D scaffold architecture seeded with chondrocytes. *Biomaterials*. 2010; 31: 4304-4312.
- Johnstone, B., Hering, T.M., Caplan, A.I., Goldberg, V. M., Yoo, J.U.: In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp. Cell. Res.* 1998, 238: 265-272.
- Kabelka, Z., Rypáček, F., Lesný, P.: Náhrada defektů v ORL oblasti in vitro připravenými implantáty z autologní chrupavky. *Choroby hlavy a krku (Head and Neck Diseases)*. 2005, 2, 34–39.

- Kafienah, W., Jakob, M., Demarteau, O., Frazer, A., Barker, M.D., Martin, I., Hallander, A.P.: Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes. *Tissue eng.* 2002; 8: 817-826.
- Kamil, S.H., Kojima, K., Vacanti, M.P., Bonassar, L.J., Vacanti, C.A., Eavey, R.D.: In Vitro Tissue Engineering to Generate a Human-Sized Auricle and Nasal Tip. *Laryngoscope.* 2003;113: 90-94
- Kamil S.H., Vacanti, M.P., Aminuddin, B.S., Jackson, M.J., Vacanti, C.A., Eavey, R.D.: Tissue engineering of a human sized and shaped auricle using a mold. *Laryngoscope.* 2004; 114: 867-870.
- Kaňa, R., Dundr, P., Tvrđík, D., Nečas, E., Povýšil, C.: Expression of actin isoforms in human auricular cartilage. *Folia Biol.(Praha).* 2006; 52: 167-172.
- Kang, S.E., Jeon, O, Kim, B.S.: Poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres as an injectable scaffold for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng.* 2005; 11, 438-447.
- Kashina, A.S.: Differential arginylation of actin isoforms: the mystery of the actin N-terminus. *Trends Cell. Biol.* 2006; 16: 610-615.
- Kato Y, Hiraki Y, Inoue H, Kinoshita M, Yutani Y, Suzuki F.: Differential and synergistic actions of somatomedin-like growth factors, fibroblast growth factor and epidermal growth factor in rabbit costal chondrocytes. *Eur. J. Biochem.* 1983;129:685–690.
- Kato, K., Kano, Y., Masuda, M., Onishi, H., Fujiwara, K.: Isolation and contraction of stress fibers. *Mol. Biol. Cell.* 1998; 9: 1919-1938.
- Kazikdas, K.C., Ergur, B.E., Tugyan, K, Guneli, E., Kaya, D., Sahan, M.: Viability of crushed and diced cartilage grafts wrapped in oxidized regenerated cellulose and esterified hyaluronic acid: an experimental study. *Laryngoscope,* 2007; 117: 1728-1734.
- Kelly, M.H., Bulstrode, N.W., Waterhouse, N.: Versatility of diced cartilage-fascia grafts in dorsal nasal augmentation. *Plast. Reconstr. Surg.* 2007, 120: 1654-1659.
- Khaitlina, S.Y.: Functional specificity of actin isoforms. *Int. Rev. Cytol.* 2001; 202: 35-98.
- Killian, G.: Die submuköse Fensterresektion de Nasencheidewand. *Arch.Laryngol. Rhinol. Otol.* 1904, 16: 362.
- Killian, G.: The submucous window resection of the nasal septum. *Ann.Otol. Rhinol. Laryngol.* 1904, 14: 363.
- Kim, A.C., Spector, M.: Distribution of chondrocytes containing alpha-smooth muscle actin in human articular cartilage. *J. Orthop. Res.* 2000; 18: 749-755.

- Kim, T.G., Yoon, J.J., Lee, D.S., Park, T.G.: Gas foamed open porous biodegradable polymeric microspheres. *Biomaterials*. 2006; 27: 152-159.
- Kim, D.W., Gurney, T.: Management of naso-septal L-strut deformities. *Facial Plast. Surg.* 2006; 22: 9-27.
- Kim, M.S., Ahn, H.H., Shin, Y.N., Cho, M.H, Khang, G., Lee, H.B.: An in vivo study of the host tissue response to subcutaneous implantation of PLGA and/or porcine small intestinal submucose-based scaffolds. *Biomaterials*. 2007; 28: 345137-43.
- Kim, D.Y., Pyun, J.H., Choi, J.W., Kim, J.H., Lee, J.S., Shin, H.A., Kim, H.J., Lee, H.N., Min, B.H., Cha, H.E., Kim, C.H.: Tissue-engineered allograft tracheal cartilage using fibrin/hyaluronan composite gel and its in vivo implantation. *Laryngoscope*. 2010; 120: 30-38.
- Kinner, B., Spector, M.: Expression of smooth muscle actin in osteoblast in human bone. *J. Orthop. Res.* 2002; 20: 622-632.
- Kisiday, J., Jin, M., Kurz, B., Hung, H., Semino, C., Zhang, A., Grodzinsky, A.J.: Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002; 99: 9996-10001.
- Koduri, S., Goldberg, R.P., Kwon, C., Dobrez, D.G., Sand, P.K.: Factors influencing the long-term success of periurethral collagen therapy in the office. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2006;17:346–351
- Komura, M., Komura, H., Kanamori, Y., Tanaka, Y., Suzuki, K., Sugiyama, M., Nakahara, S., Kawashima, H., Hatanaka, A., Hoshi, K., Ikada, Y., Tabata, Y., Iwanaka, T.: An animal model study for tissue-engineered trachea fabricated from a biodegradable scaffold using chondrocytes to augment repair of tracheal stenosis *J. Pediatr. Surg.* 2008; 43: 2141–2146.
- Konrádová, V., Uhlík, J., Vajner, L.: *Funkční histologie*. 2.vydání, Jinočany, Nakladatelství H&H Vyšehradská s.r.o., 2000: 58-61.
- Kováč, M.: Septoplastika a rinoplastika. In: Sičák a kol. *Rinológia-choroby nosa a prinosových dutín*. Prvé vydanie. Martin, Kozák –Press, 2006: 186 – 230.
- Kováč, M.: Otvorená a zatvorená septorinoplastika. *Otorinolaryngol. Chir. hlavy krku*. 2007; 1: 136 – 145.
- Klein, A.M., Graham, V.L., Gulleth, Y., Lafreniere, D.: Polyglycolic acid/poly-L-lactic acid copolymer use in laryngotracheal reconstruction: a rabbit model. *Laryngoscope*. 2005;115: 583-587.

- Krause, C.J.: Augmentation rhinoplasty. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 1975; 8: 743-752.
- Kreklau, B., Sittinger, M., Mensing, M. B., Voigt, C., Berger, G., Burmester, G. R., Rahmanzadeh, R., Gross, U.: Technical note: Tissue engineering of biphasic joint cartilage transplant. *Biomaterials.* 1999; 20:1743-1749.
- Kridel, R.W., Konior, R.J.: Irradiated cartilage grafts in the nose. A preliminary report. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1993; 119: 24-30.
- Kubies, D., Rypáček, F., Kovářová, J., Lednický, F.: Microdomain structure in polylactide-block-poly(ethylene oxide) copolymer films. *Biomaterials.* 2000; 21: 529-536.
- Kusuhara, H., Isogai, N., Enjo, M., Otani, H., Ikada, Y., Jacquet, R., Lowder, E., Landis, W.J.: Tissue engineering a model for the human ear: assesment o size, shape, morphology, and gene expression following seeding of different chondrocytes. *Wound Rep. Reg.* 2009; 17:136-146.
- Lattyak, B.V., Maas, C.S., Sykes, J.M.: Dorsal onlay cartilage autografts. Comparing resorption in a rabbit model. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2003; 5: 240-243.
- Leach, J.B., Bivens, K.A., Patrick, C.W., Schmidt, C.E.: Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. *Biotechnol. Bioeng.* 2003; 82, 578-589
- Lee, J.E., Kim, S.E., Kwon, I.C., Ahn, H.J., Cho, H., Lee, S., Kim, H.J., Seong, S.C., Lee, M.C.: Effects of chitosan scaffold containing TGF- β 1 encapsulated chitosan microspheres on vitro chondrocyte culture. *Artif. Organs.* 2004; 28: 829-839.
- Lee, J.W., Kim, Y.H., Kim, S.H., Han, S.H., Hahn, S.B.: Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. *Yonsei Med. J.* 2004; 45, Suppl.: 41-47.
- Lee, R.H., Kim, B., Choi, I., Kim, H., Choi, H.S., Suh, K., Bae, Y.C., Jung, J.S.: Charakterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tussue. *Cell Physiol. Biochem.* 2004; 14: 311-324.
- Lefebvre, V., Peeters-Joris, C., Vaes, G.: Production od collagens, collagenase and collagense inhibitor durin the dediferentiation of articular chondrocytes by seriál subcultures. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990; 1051, 266-275.
- Lehman, W., Rosol, M., Tobacman, L.S., Craig, R.: Troponin organization on relaxed and activated thin filaments revealed by electron microscopy and three dimensional reconstruction. *J. Mol. Biol.* 2001; 307: 739-744.

- Lesný, P., Přádný, M., Michálek, J., Janoušek, P., Kabelka, Z.: Vliv povrchového náboje polymerních hydrogelů na růst chondrocytů in-vitro. *Choroby hlavy a krku -Head and Neck Diseases*. 2005; 2, 6–10.
- Li, W., Laurencin, C.T., Caterson, E.J., Tuan, R.S., Ko, F.K.: Electrospun nanofibrous structure a novel scaffold for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 60: 613-621.
- Li, W.J., Jiang, Y.J., Tuan, R.S.: Chondrocyte phenotype in engineered fibrous matrix is regulated by fibre size. *Tissue Eng.* 2006; 12: 1775-1785.
- Li, L.Y., Huang, J.Z., Du, J.: Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocytes induced by transforming growth factor beta 1. *Journal of Clinical Rehabilitation Tissue Engineering Research*. 2010; 14: 38-41.
- Liao, E., Yaszemski, M., Krebsach, P., Hollister, S.: Tissue-engineered cartilage constructs using composite hyaluronic acid/collagen I hydrogels and designed poly(propylene fumarate) scaffolds. *Tissue eng.* 2007; 13: 537-550.
- Liu, K., Zhou, G., D., Liu, W., Zhang, W. J., Cui, L., Liu, X., Liu, T. Y., Cao, Y.: The dependence of in vivo stable ectopic chondrogenesis by human mesenchymal stem cells on chondrogenic differentiation in vitro. *Biomaterial*. 2008; 29: 2183 – 2192.
- Loeser, R.F., Pacione, C.A., Chubinskaya, S.: The combination of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 promotes increased survival of and matrix synthesis by normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2003; 48:2188–2196.
- Loeser, R.F.: Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:1357-1360.
- Lohuis, P.J., Watts, S.J., Vuyk, H.D.: Augmentation of the nasal dorsum using Gore-Tex: Intermediate results of a retrospective analysis of experience in 66 patients. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 2001; 26: 214-217.
- Lovice, D.B., Mingrone, M.D., Toriumi, D.M.: Rhinoplasty and septoplasty. Grafts and implants in rhinoplasty and nasal reconstruction. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 1999; 32: 113-141.
- Lu, L., Garcia, C.A., Mikos, A.G.: In vitro degradation of thin poly(DL-lactic-co-glycolic acid) films. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999; 46:236–244.
- Lutolf, M.P., Hubbell, J.A.: Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* 2005; 23: 47-55.

- Luttikhuisen, D.T., Harmsen, M.C., Van Luyn, M.J.: Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction. *Tissue Eng.* 2006; 12: 1955-1970.
- Ma, Z., Kotaki, M., Inai, R., Ramakrishna, S.: Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. *Tissue Eng.* 2005; 11:101-109.
- Ma, Z., Gao, C., Gong, Y., Shen, J.: Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growth factor. *Biomaterials.* 2005; 26: 1253-1259.
- Mackay, I.S. Augmentation rhinoplasty. In: Nolst Trenité, G.J.: *Rhinoplasty. A practical guide to functional and aesthetic surgery of the nose.* 3rd ed.. The Hague, Kugler Publications. 2005: 171 - 179.
- Mackay, I.S.: Bull, T.R.: The fate of Silastic in the management of saddle deformity of the nose. *J. Laryngol. Otol.* 1983; 97: 43 – 47.
- Maher, S.A. , Mauck, R.L., Rackwitz, L., Tuan, R.S.: A nanofibrous cell-seeded hydrogel promotes integration in a cartilage gap model. *J. Tissue. Eng. Regen. Med.* 2010; 4: 25–29.
- Malleim-Gerin, F., Ruggiero, F., Garrone, R.: Proteoglycan core protein and type II collagen gene expression are not correlated with cell shape changes during low density chondrocyte cultures. *Differentiation.* 1990; 43:204–211.
- Marcacci, M., Berruto, M., Brochetta, D., Delcogliano, A., Ghinelli, D., Gobbi, A., Kon, E., Pederzini, L., Rosa, D., Sacchetti, G. L., Stefani, G., Zanasi, S.: Articular Cartilage Engineering with Hyalograft C. 3-Year Clinical Results. *Clin. Orthop.* 2005; 435: 96–105.
- Marin, V.P., Landecker, A., Gunter, J.P.: Harvesting rib cartilage grafts for secondary rhinoplasty. *Plast. Reconstr. Surg.* 2008, 121: 1442-1448.
- Markalous, B., Charvát, F., Nejedlý, J., Zýková, E.: *Rinosinusitidy, sinusitidy a nosní polypy.* První vydání, Praha/Kroměříž, Triton, 2009, 405s.
- Martin, I., Vunjak-Novakovic, G., Yang, J., Langer, R., Freed, L. E.: Mammalian chondrocytes expanded in the presence of fibroblast growth factor 2 maintain the ability to differentiate and regenerate three-dimensional cartilaginous tissue. *Exp. Cell. Res.* 1999; 253: 681-688.
- Mass, C.S., Monhian, N., Shah, S.B.: Implants in rhinoplasty. *Facial Plast. Surg.* 1998, 13: 279 – 290.
- Matthews, J. A., Wnek, G. E., Simpson, D. G., Bowlin, G. L.: Electrospinning of Collagen Nanofibers. *Biomacromolecules.* 2002; 3:232-238.

- McGlynn, M.J., Sharpe, D.T.: Cialit preserved homograft cartilage in nasal augmentation: a long-term review. *Br. J. Plast. Surg.* 1981; 34: 53-57.
- Megerian, C. A., Weitzner, B. D., Dore, B., Bonassar, L. J.: Minimally invasive technique of auricular cartilage harvest for tissue engineering. *Tissue Eng.* 2000; 6: 69-74.
- Melrose, J., Chuang, C., Whitelock, J.: Tissue engineering of cartilage using biomatrices. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2008; 83: 444-463.
- Menick, F.J.: Anatomic reconstruction of the nasal rip cartilages in secondary and reconstructive rhinoplasty. *Plast. Reconstr. Surg.* 1999; 104: 2187-2198.
- Mercier, N.T., Constantino, H.R., Tracy, M.A., Bonassar, L.J.: A novel injectable approach for cartilage formation in vivo using PLG microspheres. 2004; 32: 418-429.
- Mikos, A.G., Temenoff, J.S.: Formation of highly biodegradable scaffolds for tissue engineering, *Electronic Journal of Biotechnology.* 2000; 3:114-119.
- Milella, E., Brescia, E., Massaro, C., Ramires, P., A., Miglietta, M., R., Fiori, V., Aversa, P.: Physico-chemical properties and degradability of non-woven hyaluronan benzylic esters as tissue engineering scaffolds. *Biomaterials.* 2002;23: 1053-1063.
- Min, Y.G., Kim, Y.K., Kim, H.S.: The histology of autologous auricular cartilage implanted into the nasal septum. *Clin. Otolaryngol.* 1996; 21: 339-342.
- Mogensen, J., Klausen, I.C., Pedersen, A.K., Egeblad, H., Bross, P., Kruse, T.A., Gregersen, N., Hansen, P.S., Baandrup, U., Borglum, A.D.: α -Cardiac actin is a novel disease gene in familiar hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 1999; 103: R39-R43.
- Moll, R., Holzhausen, H.J., Mennel, H.D., Kuhn, C., Baumann, R., Teage, C., Franke, W.F.: The cardiac isoform of α -actin in regenerating and atrophic skeletal muscle, myopathies and rhabdomyomatous tumors: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies. *Virchows Arch.* 2006; 449: 175-191.
- Moroni, L., de Wijn, J.R., van Blitterswijk, C.A.: Integrating novel technologies to fabricate smart scaffolds. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 2008; 19: 543-572.
- Mounier, N., Perriard, J.C., Gabbiani, G., Chaponnier, C.: Transfected muscle and non-muscle actins are differentially sorted by cultured smooth muscle and non-muscle cells. *J. Cell Sci.* 1997; 110: 839-846.
- Mueller, S., Schneider, T.O., Shortkroff, S., Breinan, H.A., Spector, M.: α -smooth actin contractile behaviour in bovine meniscus cell in type I and type II collagen-GAG matrices. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999, 45: 157-166.

- Moulharat, N., Lesur, C., Thomas, M., Rolland-Valognes, G., Pastoureau, P., Antract, P. et al.: Effects of transforming growth factor-beta on aggrecanase production and proteoglycan degradation by human chondrocytes in vitro. *Osteoarthr. Cartil.* 2004; 12: 296-305.
- Mouw, J.K., Case, N.D., Guldborg, R.E., Plaas, A.H., Levenston, M.E.: Variations in matrix composition and GAG fine structure among scaffolds for cartilage tissue engineering. *Osteoarth. Cartil.* 2005; 13: 828-836.
- Murrell, G.L.: Auricular cartilage graft and nasal surgery. *Laryngoscope.* 2004;114: 2092 – 2102.
- Murrell, G.L.: Dorsal augmentation with septal cartilage. *Sem. Plast. Surg.* 2008; 22: 124-135.
- Müller, F. A., Müller, L., Hofmann, I., Greil, P., Wenzel, M., M., Staudenmaier, R.: Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 2006; 27: 3955-3963.
- Nabzdyk, C., Prathan, L., Molina J., Perin, E., Paniagua, D., Rosenstrauch D.: Auricular chondrocytes – from benchwork to clinical applications. *In Vivo.* 2009; 23:369-380.
- Nair, L.S., Cato, L.T.: Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci.* 2007; 32: 762-798.
- Nam, Y.S., Yoon, J.J., Park, T.G.: A novel fabrication method for macroporous scaffolds using gas foaming sal as porogen additive. *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.).* 2000; 53:1-7.
- Narins, R.S., Brandt, F., Leyden, J., Lorenc, Z.P., Rubin, M., Smith, S.: A randomized, double-blind, multicenter comparison of the efficacy and tolerability of Restylane versus Zyplast for the correction of nasolabial folds. *Dermatol. Surg.* 2003; 29:588–595.
- Nassif, P.S.: Male revision rhinoplasty: pearls and surgical techniques. *Facial Plast. Surg.* 2005; 21: 250-270.
- Naumann, A., Bujia, J., Hammer, C., Wilmes, E.: Autoantibodies against cartilage components: Clinical relevance for head and neck surgery. *Laryngo. Rhino. Otol.* 1994; 73: 253-257
- Naumann, A., Dennis, J.E., Aigner, J., Coticchia, J., Arnold, J., Berghaus, A., Kastenbauer, E.R., Caplan, A.I.: Tissue engineering of autologous cartilage grafts in three-

- dimensional in vitro macroaggregate culture system. *Tissue Eng.* 2004; 10: 1695-1706.
- Nguyen, K. T., West, J. L.: Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials.* 2002; 23:4307-4314.
- Nuttelman, C.R., Mortise, D.J., Henry, S.M., Anseth, K.S.: Attachment of fibronectin to poly(vinyl alcohol) hydrogels promotes NIH3T3 cell adhesion, proliferation, and migration. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001; 57: 217-223.
- Nielsen, G.P., Keel, S.B., Dickersin, G.R., Selig, M.K., Bhan, A.K., Rosenberg, A.E.: Chondromyxoid fibroma: A tumor showing myofibroblastic, myochondroblastic, and chondrocytic differentiation. *Mod. Pathol.* 1999; 12: 514-517.
- Nof., M., Shea, L.D.: Drug-releasing scaffolds fabricated from drug-loaded microspheres. *J. Biomed., Mater. Res.* 2002; 59: 349-356.
- Nolst Trenité, G.J., Vervoerd, C.D.A., Verwoerd-Verhoef, H.L.: Reimplantation of autologous septal cartilage in the growing nasal septum. II. *Rhinology.* 1988; 26: 25-32.
- Nolst Trenité, G.J. *Rhinoplasty. A practical guide to functional and aesthetic surgery of the nose.* 3rd ed.. The Hague, Kugler Publications, 2005, 414. ISBN 90 6299 206 4
- Nolst Trenité, G.J.: Grafts in nasal surgery. In: Nolst Trenité, G.J.: *Rhinoplasty. A practical guide to functional and aesthetic surgery of the nose.* 3rd ed.. The Hague, Kugler Publications, 2005: 49 – 66.
- Nolst Trenité, G.J.: Basic approaches and techniques in nasal tip surgery. In: Nolst Trenité, G.J.: *Rhinoplasty. A practical guide to functional and aesthetic surgery of the nose.* 3rd ed.. The Hague, Kugler Publications, 2005: 87 - 96.
- Nolst Trenité, G.J.: Secondary surgery of the cleft-lip nose. In: Nolst Trenité, G.J.: *Rhinoplasty. A practical guide to functional and aesthetic surgery of the nose.* 3rd ed.. The Hague, Kugler Publications, 2005: 149 - 165.
- Nolst Trenité, G.J.: Nasal vestibular stenosis. In: Nolst Trenité, G.J.: *Rhinoplasty. A practical guide to functional and aesthetic surgery of the nose.* 3rd ed.. The Hague, Kugler Publications, 2005: 223 - 234.
- Oakes, B.W.: Orthopaedic tissue engineering: from laboratory to the clinic. *Med. J. Aust.* 2004; 180: S35-S38.
- Obtulovič, M., Sičák, M.: Naše skúsenosti so septorinoplastikami. *Choroby hlavy a krku-Head and Neck Diseases.* 200, 9: 26 – 29.

- Olson, T.M., Michels, V.V., Thibodeau, S.N., Tai, Y-S., Keating, M.T.: Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science* 1998; 280: 750-752.
- Park, T.G., Jeong, J.H., Kim, S.W.: Current status of polymeric gene delivery systems. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2006; 58, 467-486.
- Park, K., Cho, K.J., Kim, J.J., Kim, I.H., Han, D.K.: Functional PLGA scaffolds for chondrogenesis of bone-marrow derived mesenchymal stem cells. *Macromol. Biosci.* 2009; 9: 221-229.
- Pavesio, A., Abatangelo, G., Borrione, A., Brocchetta, D., Hollander, A. P., Kon, E., Torasso, F., Zanasi, S., Marcacci, M.: Hyaluronan-based scaffolds (Hyalograft C) in the treatment of knee cartilage defects: preliminary clinical findings. *Novartis Found Symp.* 2003; 249: 203-217; discussion 229-233, 234-208, 239-241.
- Peiseler, B.: Ohrmuscheln und Gelenke aus Zellkultur. 2001. *Baseler Zeitung*; 16: 55-57.
- Peltari, K., Steck, E., Richer, W.: The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. *Injury.* 2008; 39 Suppl 1: S58-S65.
- Peltari, K., Wixmerten, A., Martin, I.: Do we really need cartilage tissue engineering? *Swiss med. wkly.* 2009; 139: 602-609.
- Perets, A., Baruch, F., Weisbuch, F., Shoshany, G., Neufeld, G., Cohen, S.: Enhancing the vascularisation of three-dimensionall porous alginate scaffods by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J. Biomed. Mater. Res.* 2003; 65A:489-497.
- Perkins, S.W.: The evolution of the combined use of endonasal and external columellar approaches to rhinoplasty. *Facial Plast. Surg. Clin. N. Am.* 2004; 12: 35 – 50.
- Peter, S.J., Miller, M.J., Yasko, A.W., Yaszemski, M.J., Mikos, A.G.: Polymer concepts in tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.).* 1998; 43: 422-427.
- Pieper, J.S., Hafmans, P.B., van Wachem, P.B., van Luyn, M.J.A., Brouwer, L.A., Veerkamp, J.H., van Kuppevelt, T.H.: Loading of collagen-heparan sulfate matrices with bFGF promotes angiogenesis ad tissue generation in rats. *J.Biomed.Mater.Res.* 2002; 62:185-194.
- Pirsig, W., Kern, E.B., Verse, T.: Reconstruction af anterior nasal septum: back-to-back autogenous ear cartilage graft. *Laryngoscope.* 2004; 114: 627-638.
- Piskin, E.: Bioegradable polymeric matrices for bioartificial implants. *Int.J.Artif.Organs,* 2002; 25: 434 – 440. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A, Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R.:

- Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284:143-147.
- Podškubka, A., Povýšil, C., Kubeš, R., Šprindrich, J., Sedláček, R.: Ošetření hlubokých defektů chrupavky kolena transplantací autologních chondrocytů fixovaných na nosiči z esteru kyseliny hyaluronové (Hyalograft C). *Acta Chir. orthop. Traum. čech*. 2006;73: 251-263.
- Posever J, Phillips FM, Pottenger LA. (1995). Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta 1, insulin like growth factor-1, and insulin on human osteoarthritic articular cartilage explants. *J. Orthop. Res*. 1995, 13:832–837.
- Povýšil, C., Tomanová, R., Matějovský, Z.: Muscle-specific actin expression in chondroblastoma. *Hum. Pathol*. 1997; 28: 316-320.
- Povýšil, C., Dundr, P., Tvrdlík, D., Podškubka, A., Kaňa, T., Horák, M.: Desmin-positive and alpha-smooth muscle actin positive chondrocytes in human defective articular cartilage - preliminary report. *Čes.-slov. Patol.*: 2005; 4: 133 – 136.
- Povýšil, C., Kaňa, R., Horák, M.: Expres S-100 proteinu v osteogenních nádorech a tumoriformních osteoplastických lézích. *Čes.-slov. Patol*. 2008; 44: 59-61.
- Povýšil, C., Kaňa, R., Dundr, P., Tvrdlík, D., Horák, M., Vaculík, J., Podškubka, A., Kubeš, R.: Distribution of chondrocytes containing alpha-smooth muscle actin in human normal, osteoarthrotic and transplanted articular cartilage. *Pathol. Res. Pract*. 2008; 204: 883-890.
- Puelacher, W.C., Mooney, D., Langer, R., Upton, J., Vacanti, J.P., Vacanti, C.A.: Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers and chondrocytes. *Biomaterials*. 1994; 15:774–778.
- Quatela, V.C., Jacono, A.A.: Structural grafting in rhinoplasty. *Facial Plast. Surg*. 2002; 18: 223-232.
- Qiu, Q., Sayer, M., Kawaja, M., Shen, X., Davies, J.E.: Attachment, morphology, and protein expression of rat marrow stromal cells cultured on charged substrate surfaces. *J. Biomed. Mater. Res*. 1998; 42: 117-127.
- Ramaekers, F.C.S., Bosman, F.T. The cytoskeleton and disease. *J. Pathol*. 2004; 204: 351-354.
- Ravenscroft, G., Colley, S.M.J., Walker, K.R., Clement, S., Bringans, S., Lipscombe, R., Fabian, V., Laing, N.G., Nowak, K.J.: Expression of cardiac α -actin spares extraocular muscles in skeletal muscle α -actin diseases – quantification of striated α -actins by MRM-mass spectrometry. *Neuromuscular Disord*. 2008; 18: 953-958.

- Reisler, E., Egelman, E.H.: Actin structure and function: what we still do not understand. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 36133-36137.
- Roberts, S., Hollander, A.P., Caterson, B., Menage, Richardson, J.B.: Matrix turnover in human cartilage repair tissue in autologous chondrocyte implantation. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 2586-2598.
- Roberts, S., Menage, J., Sandell, L.J., Evans, E.H., Richardson, J.B.: Immunohistochemical study of collagen types I and II and procollagen IIA in human cartilage repair tissue following autologous chondrocyte implantation. *Knee.* 2009; 16: 398-404
- Rotter, N., Aigner, J., Naumann, A., Planck, H., Hammer, C., Burmester, G., Sittinger, M.: Cartilage reconstruction in head and neck surgery: Comparison of resorbable polymer scaffolds for tissue engineering for human septal cartilage. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 42: 347-356.
- Rotter, N., Aigner, J., Naumann A., Hammer, C., Sittinger, M.: Behavior of tissue-engineered human cartilage after transplantation into nude mice. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1999; 10: 689-693.
- Rotter, N., Haisch, B., Bücheler, M.: Cartilage and bone tissue engineering for reconstructive head and neck surgery. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 2005; 262: 539-546.
- Rotter, N., Ung, F., Rox, A.K., Vacanti, M., Eavey, R.D., Vacanti, C.A., Bonassar, L.J.: Role for interleukin 1alpha in the inhibition of chondrogenesis in autologous implants using polyglycolic acid-poly(lactic acid) scaffolds. *Tissue Eng.* 2005; 11: 192-200.
- Rowley, J.A., Madlamayan, G., Mooney, D.J.: Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials.* 1999; 20: 45-53.
- Sajjadian, A., Rubinstein, R., Naghshineh, N.: Current status of grafts and implants in rhinoplasty: Part I. Autologous grafts. *Plast. Reconstr. Surg.* 2010; 125: 40e-49e.
- Salvaya, D.M., Shea, L.D.: Inductive tissue engineering with protein and DNA-releasing scaffolds. *Mol. BioSyst.* 2006; 2, 36-48.
- Schagemann, J.C., Chung, H.W., Mrosek, E.H., Stone, J.J., Fitzsimmons, J.S., O'Driscoll, S.W., Reinholz, G.G.: Poly- ϵ -caprolactone/gel hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 2010; 93A: 454-463
- Sherris, D.A., Kern, E.B.: The versatile autogenous rib graft in septorhinoplasty. *Am. J. Rhinol.* 1998; 12: 221-227.
- Shi, G., Cai, Q., Wang, C., Lu, N., Wang, S., Bei, J.: Fabrication and biocompatibility of cell scaffolds of poly(L-lactic acid) and poly(L-lactic-co-glycolic acid). *Polym. Adv. Technol.* 2002, 13: 227-232.

- Shieh, S.J., Terada, S., Vacanti, J.P.: Tissue engineering auricular reconstruction: in vitro and in vivo studies. *Biomaterials*. 2004; 1545-1557.
- Shubailat, G.F.: Cantilever rib grafting in salvage rhinoplasty. *Aesth. Plast. Surg.* 2003, 27:281 – 285.
- Schmedlen, R.H., Masters, K.S., West, J.L.: Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering. *Biomaterials*. 2002;23:4325–4332.
- Schmitt-Gräff, A., Desmoulière, A., Gabbiani G.: Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch.* 1994; 425:3-24.
- Schnabel, M., Marlovits, S., Eckhoff, G., Fichtel, I., Gotzen, L., Vecsei, V., Schlegel, J.: Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002; 10: 62-70.
- Schneider, T.O., Mueller, S.M., Shortkroff, S.: Expression of alpha-smooth muscle actin in canine intervertebral disc in situ and in collagen-glycosaminoglycan matrices in vitro. *J. Orthop. Res.* 1999; 17: 192-199.
- Sičák, M.: Komplikácie septorinoplastiky. *Otorinolaryngol. chir. hlavy krku*. 2007; 1: 154 – 160.
- Silver, F. H., Glasgold, A. I.: Cartilage wound healing. An overview, *Otolaryngol.Clin. North. Am.* 1995; 28: 847-864.
- Singh, D.J., Bartlett, S.P.: Aesthetic management of the ear as a donor site. *Plast. Reconstr. Surg.* 2007; 120:899-908.
- Sittinger, M., Bräunling, J., Kastenbauer, E., Hammer, C., Burmester, G., Bujía, J.: Untersuchungen zum Vermehrungspotential von Nasenseptum-Chondrozyten für die in vitro-Züchtung von Knorpeltransplantaten. 1997; *Laryngo. Rhino. Otol.* 76: 96–100.
- Sohier, J., Moroni, L., van Blitterswijk, C., de Groot, K., Bezemer, J.M.: Critical factors in the design of growth factor releasing scaffolds for cartilage tissue engineering. *Expert. Opin. Drug. Deliv.* 2008; 5: 543-566.
- Spector, M.: Musculoskeletal connective tissue cells with muscle: Expression of muscle actin in and contraction of fibroblasts, chondrocytes, and osteoblasts. *Wound Repair Regen.* 2001; 9: 11-18.

- Stelter, K., Strieth, S., Berghaus, A.: Porous polyethylene implants in revision rhinoplasty: chances and risks. *Rhinology*. 2007, 45: 325-331.
- Sternberg, S.S.: *Histology for pathologists*. 2nd ed. Lippincott Williams and Wilkins; 1997.
- Sterodimas, A., de Faria, J., Correa, W.E., Pitanguy, I.: Tissue engineering and auricular reconstruction: a review. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 2009; 62: 447-452.
- Stile, R.A., Burghardt, W.R., Healy, K.E.: Synthesis and characterization of injectable poly(N-isopropylacrylamide)-based hydrogels that support tissue formation in vitro. *Macromolecules*. 1999; 32: 7370 – 7379.
- Stoop, R.: Smart biomaterials for tissue engineering of cartilage. *Injury, Int. J. Care Injured*. 2008; 39S1: S77-S87.
- Stucker, F.J.: Technical aspects of facial contouring using polyamid mesh. *Otolaryngol. Clin. N. Am.* 1982; 15: 123 – 131
- Subramanian, A., Vu, D., Larsen, G. F., Lin, H.Y.: Preparation and evaluation the electrospun chitosan/PEO fibers for potential application in cartilage tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2005; 16: 861-873.
- Suurmeijer, A.J., Clément, S., Francesconi, A., Bocchi, L., Angelini, A., Van Veldhuisen, D.J., Spagnoli, L.G., Gabbiani, G., Orlandi, A.: Alpha-actin isoform distribution in normal and failing human heart: a morphological, morphometric, and biochemical study. *J. Pathol.* 2003, 199: 387-397.
- Sykes, J.M.: Management of the middle nasal third in revision rhinoplasty. *Facial Plast. Surg.* 2008; 24: 339-347.
- Taguchi, T., Xu, L., Kobayashi, H., Taniguchi, A., Kataoka, K., Tanaka, J.: Encapsulation of chondrocytes in injectable alkali-treated collagen gels prepared using poly(ethylene glycol)-based 4-armed star polymer. *Biomaterials*. 2005; 26: 1247-1252.
- Tanaka, Y., Yamaoka, H., Nishizawa, S., Nagata, S., Ogasawara, T., Asawa, Y., Fujihara, Y., Takato, T., Hoshi, K.: The optimization of porous polymeric scaffolds for chondrocyte/atelocollagen based tissue-engineered cartilage. *Biomaterials*. 2010;31: 4506-4516.
- Tani, G., Usui, N., Kamiyama, M., Oue, T., Kuzuzawa, M.: In vitro construction of scaffold-free cylindrical cartilage using cell sheet-based tissue engineering. *Pediatr. Surg. Int.* 2010; 26: 179-185.
- Tardy, M.E. Jr., Denny, J. III., Fritsch, M.H.: The versatile cartilage autograft in reconstruction of the nose and face. *Laryngoscope*. 1985; 95: 523-533.

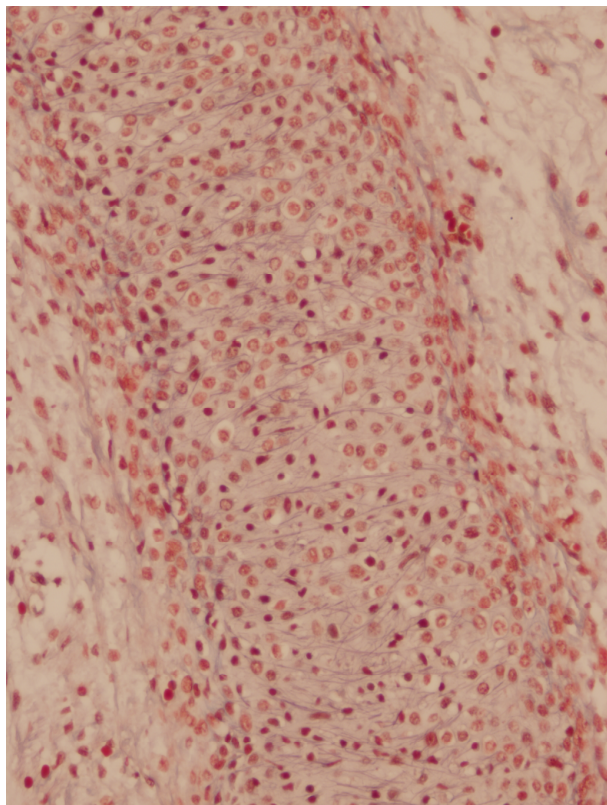
- Tardy, M.E.: Cartilage graft reconstruction of the nose. In: Tardy, M.E. (ed): *Rhinoplasty: The Art and the Science*. Vol. 2, 1st ed. IWB Saunders, Philadelphia. 1997: 648 – 723.
- Tay, A.G., Farhadi, J., Suetterlin, R. et al.: Cell yield, proliferation, and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes. *Tissue Eng.* 2004; 10: 762-770.
- Thissen, H., Chang, K.Y., Tebb, T.A., Tsai, W.B., Glattauer, V., Ramshaw, J.A.M., Werkmeister, J.A.: Synthetic biodegradable microparticles for articular cartilage tissue engineering. *J.Biomed.Mater.Res.* 2006; 77A, 590-598.
- Togo, T., Utani, A., Naitoh, M., Ohta, M., Tsuji, Y., Morikawa, N., Nakamura, M., Suzuki, S.: Identification of cartilage progenitor cells in the adult ear perichondrium: utilization for cartilage reconstruction. *Lab. Invest.* 2006; 86: 445-457.
- Toriumi, D.M., Ries, W.R.: Innovative surgical management of the crooked nose. *Facial Plast. Surg. Clin. N. Am.* 1993; 1: 63-78.
- Toriumi, D.M.: Autogenous grafts are worth the extra time. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2000; 126: 562-564.
- Trippel, S.B.: Growth factor actions on articular cartilage. *J. Rheumatol. Suppl.* 1995; 43:129–132.
- Tuli, R., Li, W.J., Tuan, R.S.: Current state of cartilage tissue engineering, *Arthritis Res. Ther.* 2003; 5, 235 – 238.
- Tvrđík, D., Svatošová, J., Dundr, P., Povýšil, C.: Molecular diagnosis of synovial sarcoma: detection of SYT-SSX1/2 fusion transcripts by RT-PCR in paraffin-embedded tissue. *Med. Sci. Monit.* 2005; 11: MT1-7.
- Vacanti, C. A., Langer, R., Schloo, B., Vacanti, J. P.: Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast. Reconstr. Surg.* 1991; 88:753-759.
- Vacanti, C. A., Paige, K., Kim, W., Sakata, J., Upton, J., Vacanti, J. P.: Experimental Tracheal Replacement Using Tissue-Engineered Cartilage. *Journal of Pediatric Surgery.* 1994; 29: 201-205.
- Válka, J. a kol.: *Korektivní operace nosu*. Vydání první, Praha, Grada Publishing a.s., 2003: 154 s. ISBN 80-247-0458-7.
- Valvoda, M., Vacková, I.: Zevní přístup při rinoplastice. *Čs. Otorinolaryng. Foniatr.* 1993; 42: 151-154.

- Vandekerckhove, J., Bugaisky, G., Buckingham, M.: Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. A quantitative determination of the two actin isoforms. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 1838-1843.
- Vandekerckhove, J., Weber, K.: Actin typing on total cellular extracts. *Eur. J. Biochem.* 1981; 113: 595-603.
- Van Osch, G.J., Mandl, E.W., Jahr, H., Koevoet, W., Nolst-Trenité, G., Verhaar, J.A.: Considerations on the use of ear chondrocytes as donor chondrocytes for cartilage tissue engineering. *Biorheology*; 41: 411-421
- van Schilfgaarde, R., de Vos, P.: Factors in succes and failure of microencapsulated pancreatic islets. *Transpl Proc.* 1998; 30: 501-502
- Verwoerd-Verhoef, H.L., Meeuwis, C.S., van der Heul, R.O., Verwoerd, C.D.: Histologic evaluation of crushed cartilage grafts in the growing nasal septum of young rabbits. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 1991; 53: 305-309.
- Visna, P., Pasa, L., Cizmar, I., Hart, R., Hoch, J.: Treatment of deep cartilage defects of the knee using autologous chondrograft transplantation and by abrasive techniques--a randomized controlled study, *Acta Chir. Belg.* 2004; 104:709-714.
- Von der Mark, K., Gauss, B., von der Mark, H., Müller, P. :Relationship between shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature.* 1977; 267:531-532.
- Vuyk, H.D., Zijlker, T.D.: Open-tip rhinoplasty. In: Nolst Trenité, G.J. *Rhinoplasty. A practical guide to functional and aesthetic surgery of the nose.* 3rd ed. The Hague, Kugler Publications, 2005: 115 - 123.
- Walter, C.: In: Nolst Trenité, G.J.: *Rhinoplasty. A practical guide to functional and aesthetic surgery of the nose.* 3rd ed.. The Hague, Kugler Publications. 2005: 209 – 221.
- Wang, Q.I., Breinan, H.A., Hsu, H., Spector, M.: Healing of defects in canine articular cartilage: distribution of nonvascular alpha-smooth muscle actin containing cells. *Wound Rep.Reg.* 2000; 8: 145-158.
- Wang, J., Elewaut, D., Hoffman, I., Veys, E. M., Verbruggen, G.: Physiological levels of hydrocortisone maintain an optimal chondrocyte extracellular matrix metabolism, *Ann. Rheum. Dis.*, 2004; 63: 61-66.
- Watson, D., Sage, A., Chang, A.A., Schumacher, B.L., Sah, R.L: Growth of human septal chondrocytes in fibrin scaffolds. *Am. J. Rhinol. Allergy.* 2010; 24: e19-e22.

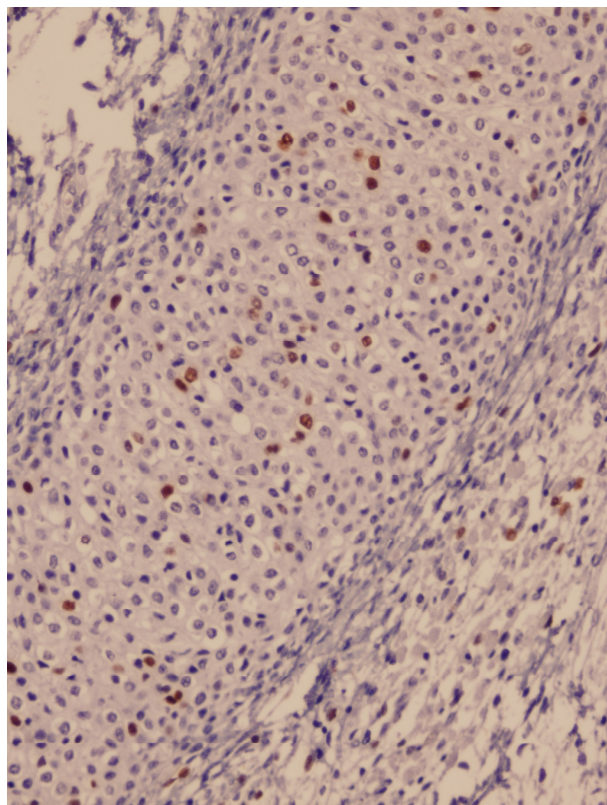
- Weber, C., Tanna, A., Costanzo, M., Ayres-Price, J., Peterson, L., Wicker, L.: Effect of host genetic background and microencapsulation on survival of Rat-to-mouse islet xenografts. *Transp. Proc.* 1994; 26: 1186-1189.
- Weidenbecher, M., Henderson, J.H., Tucker, H.M., Baskin J.Z., Awadallah, A., Dennis, J.E.: Hyaluronan-based scaffolds to tissue-engineer cartilage implants for laryngotracheal reconstruction. *Laryngoscope.* 2007; 117: 1745-1749.
- Willems, I.E., Havenith, M.G., De Mey, J.G., Daemen, M.J.: The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *Am. J. Pathol.* 1994; 145:868-875.
- Williams, C.G., Kim, T.K., Taboas, A, Malik, A., Manson, P., Eisseff, J.: In vitro chondrogenesis of bone marrow derived mesenchymal stem cells in a photopolymerizing hydrogel. *Tissue eng.* 2003; 9: 679-688.
- Wise, J.K., Yarin, A.L., Megaridis, C.M., Cho, M.: Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on oriented nanofibrous scaffolds: engineering the superficial zone of articular cartilage. *Tissue Eng: Part A.* 2009; 15: 913-921.
- Wiseman, J.B., Holt, G.R., Keefe, M.A., Holck, D.E., Canaan, R.L., Clark, W.D.: The fate of fresh, layered, non-sutured and sutured, autogenous cartilage in the rabbit model. *Arch. Plast. Surg.* 2000; 2: 256-259.
- Wnek, G., E., Bowlin, G., L.: *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering, Volume 2*, Marcel Dekker, ISBN 0-8247-5556-1, 2004
- Wong, B.J.F., Giammanco, P.F.: The use of preserved autogenous septal cartilage in „touch-up“ rhinoplasty. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2003, 5: 349 – 353.
- Woodcock-Mitchell, J., Mitchell, J.J., Low, R.B., Kieny, M., Sengel, P., Rubbia, L., Skalli, O., Jackson, B., Gabbiani, G.: α -Smooth muscle actin is transiently expressed in embryonic rat cardiac and skeletal muscles. *Differentiation* 1988, 39: 161-166.
- Wright, S.T., Calhoun, K.H., Decherd, M., Quin, F.B.: Conchal cartilage harvest: donor site morbidities, patient satisfaction, and cosmetic outcomes. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2007; 9: 298-299.
- Yanaga, H., Koga, M., Imai, K., Yanaga, K.: Clinical application of biotechnically cultured autologous chondrocytes as novel graft material for nasal augmentation. *Aesth. Plast. Surg.* 2004; 28: 212-221.
- Yanaga, H., Yanaga, K., Imai, K., Koga, M., Soejima, C., Ohmori, K.: Clinical application of cultured autologous human auricular chondrocytes with autologous serum for

- craniofacial or nasal augmentation and repair. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006;117: 2019-2030.
- Yanaga, H., Imai, K., Fujimoto, T., Yanaga, K.: Generating ears from cultured autologous auricular chondrocytes by using two-stage implantation in treatment of midrotioa. *Plast. Reconstr. Surg.* 2009; 124: 817-825.
- Yen, H.J., Hsu, S.H., Tseng, C.S., Huang, J.P., Tsai, C.L.: Fabrication of precision scaffolds using liquid-frozen deposition manufacturing for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng: Part A*; 15: 965-975.
- Yoon, J.J., Park, T.G.: Degradation behaviors of biodegradable macroporous scaffolds prepared by gas foaming of effervescent salts. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001, 55: 401-408.
- Zaleskas, J.M., Kinner, B., Freyman, T.M., Yannas, I.V., Gibson, L.J., Spector, M.: Growth factor regulation of smooth muscle actin expression and contraction of human articular chondrocytes and meniscal cells in a collagen-GAG matrix. *Exp. Cell Res.* 2001; 270: 21-31.
- Zeng, J., Chen, X.S., Liang Q.Z., Xu, X.L., Jing, X.B.: Enzymatic degradation of poly (L-lactide) and poly (epsilon-caprolactone) electrospan fibres. *Macromol. Biosci.* 2004; 4:1118-1125.
- Zhang, J., Liu, L., Gao, Z., Liwen, L., Feng, X., Wu, W., Ma, Q., Cheng, X., Chen, F.: Novel approach to engineer nasal alar cartilage employing marrow precursor cell sheet and biodegradable scaffold. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2009; 67: 257-264.
- Zou, L., Zou, X., Li, H., Mygind, T., Zeng, Y., Lü, N., Bünger, C.: Molecular mechanism of osteochondroprogenitor fate determination during bone formation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2006; 585:431-441

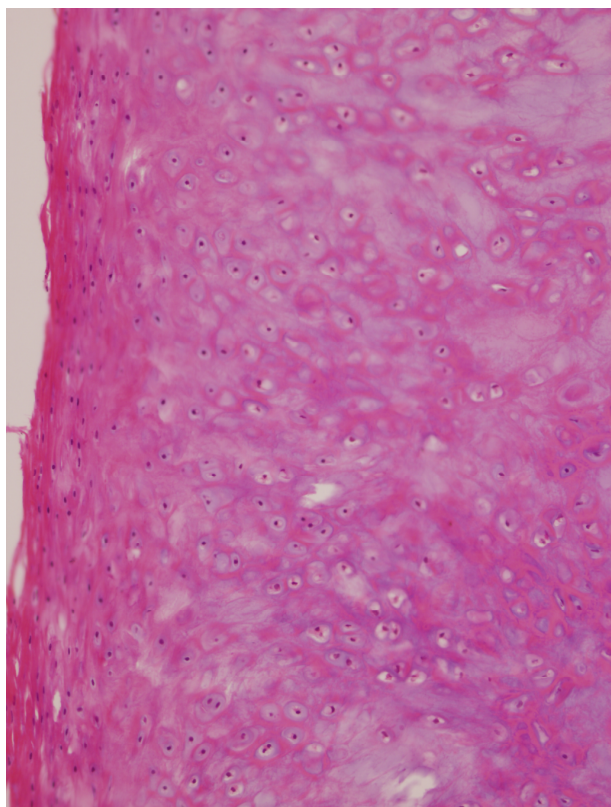
9 Obrazová příloha



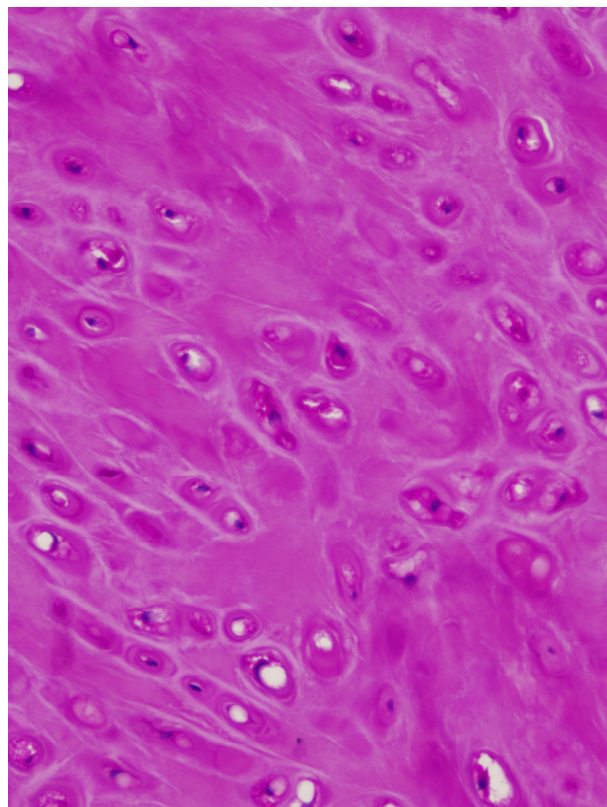
Obr. 1- Ušní chrupavka plodu potraceného ve 22. týdnu těhotenství. Chrupavková tkáň je ve srovnání s chrupavkou dospělých nápadně buněčná a obsahuje jen ojedinělá elastická vlákna. Masson el., x50



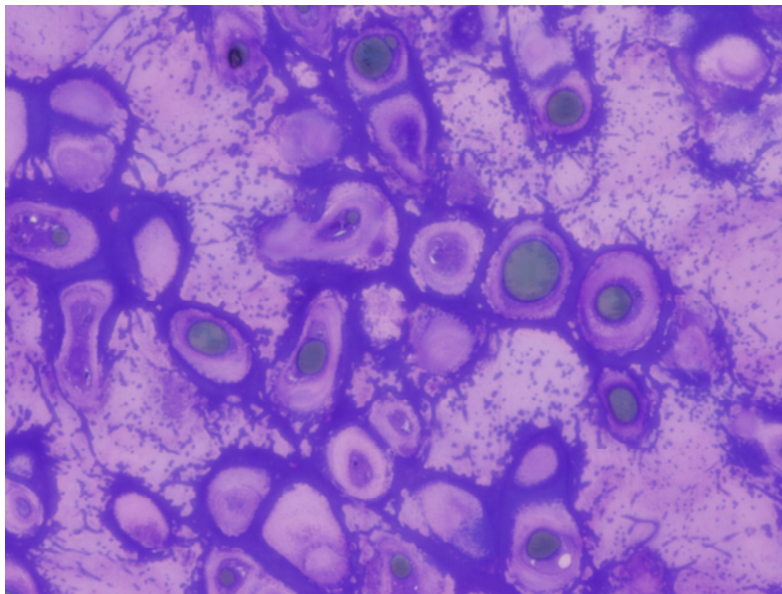
Obr. 2- Ušní chrupavka potraceného plodu ve 22. týdnu těhotenství v reakci k průkazu proliferací aktivity s protilátkou proti Ki67. Přibližně 5% chondrocytů se nachází v proliferací fázi. Jádra proliferujících buněk se barví hnědě. x50



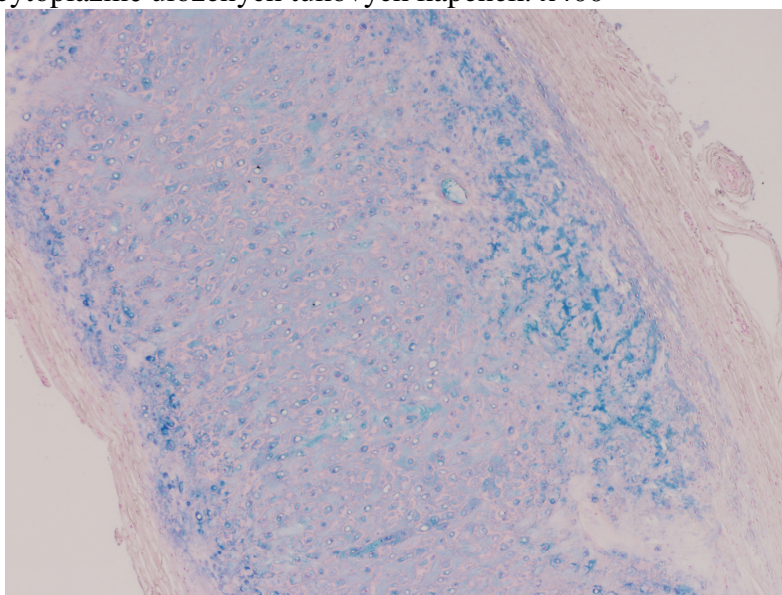
Obr. 3- Normální ušní chrupavka dospělého jedince při barvení hematoxylinem a eozinem. HEx100



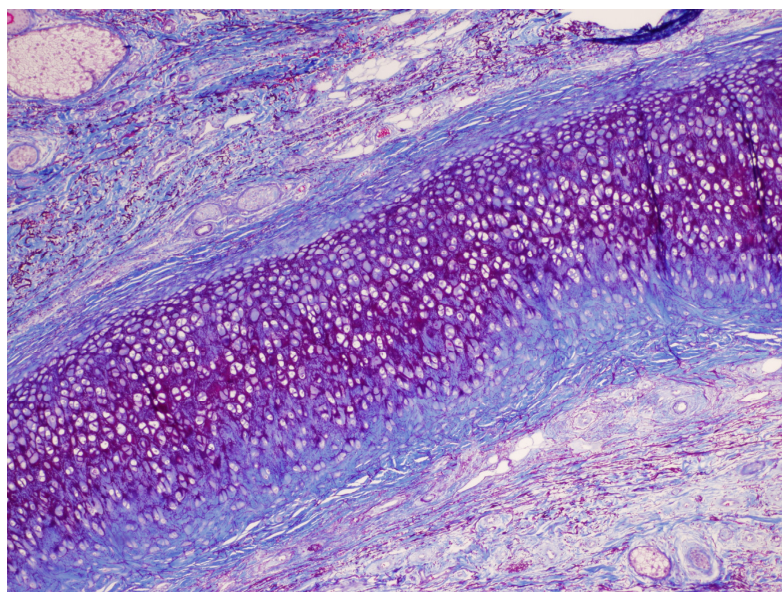
Obr. 4- Detail normální ušní chrupavky barvené metodou PAS. Chondrocyty obsahují ve své cytoplazmě červená depozita glykogenu. x200



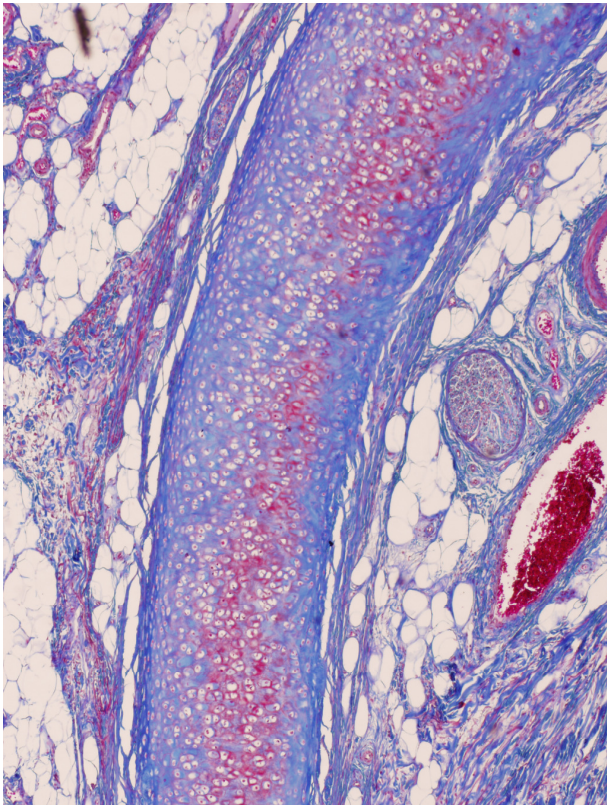
Obr. 5- Detail komůrkových chrupavkových buněk v poloténkém řezu demonstrující přítomnost poměrně četných v cytoplasmě uložených tukových kapének. x400



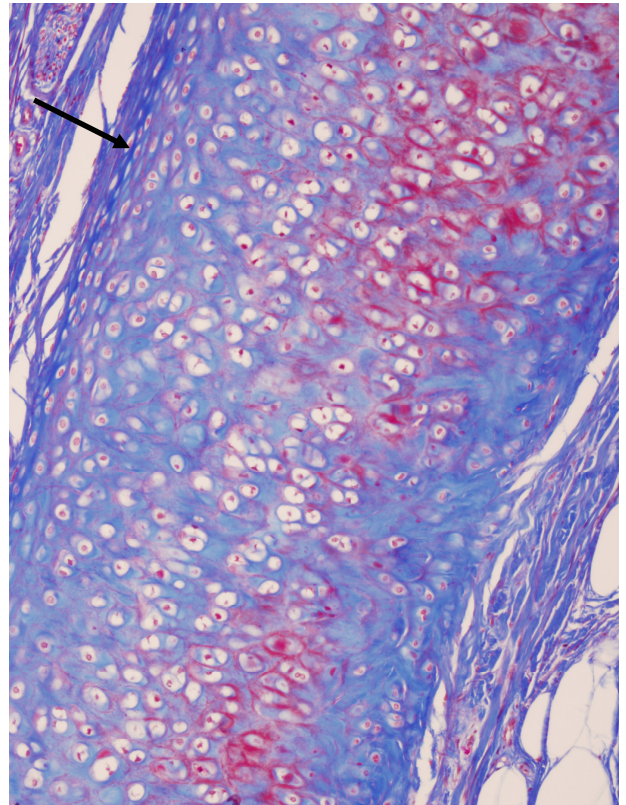
Obr. 6 – Ušní chrupavka v barvení k průkazu kyselých mukopolysacharidů v mezibuněčné hmotě. Alciánová. modř., x50



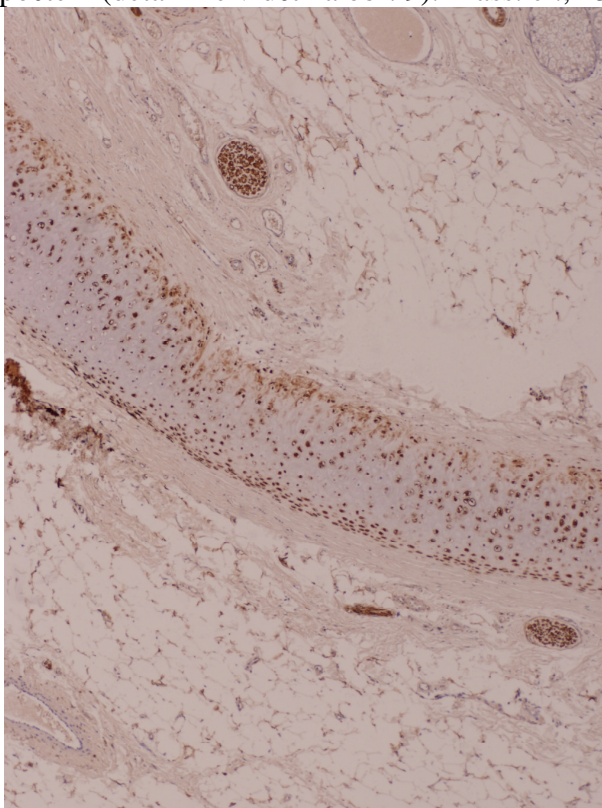
Obr. 7 – Ušní chrupavka v metodě k průkazu elastiky a vaziva. Fialová elastická vlákna tvoří velkou část mezibuněčné hmoty v centrálních přibližně 2/4 šířky ušní chrupavky. Barvení dle Massona se současným průkazem elastiky. x50



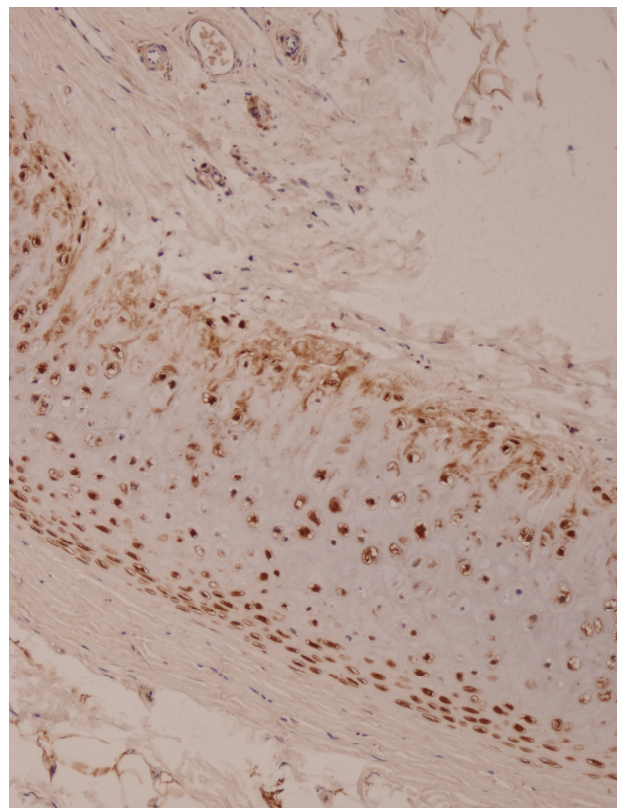
Obr. 8 – Ušní chrupavka z oblasti zakřivení boltce v metodě k průkazu elastiky a vaziva. Zřetelně lze vidět rozdílné uspořádání obou zevních vrstev, které prakticky postrádají elastická vlákna a liší se tvarem buněk a jejich počtem (detail lze vidět na obr. 9). Mass. el., x50



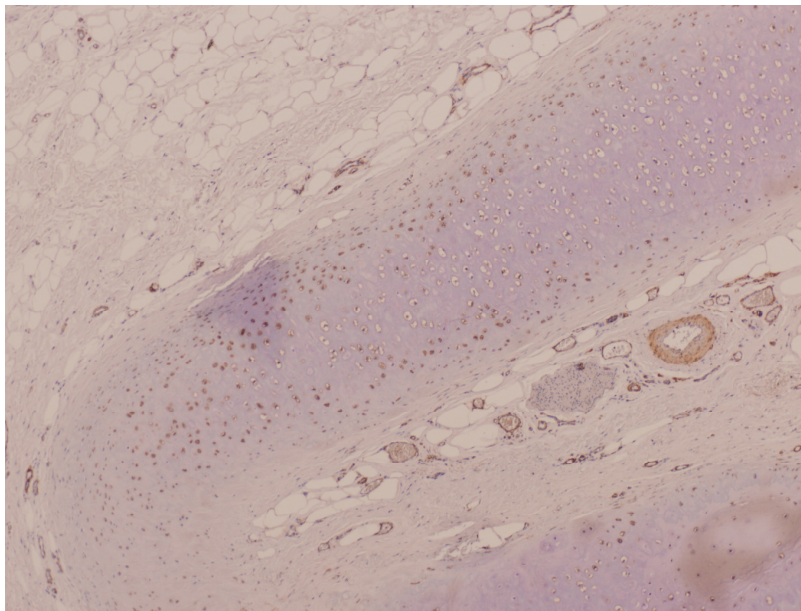
Obr. 9 – Detail ušní chrupavky z oblasti zakřivení boltce. Na konvexní straně zevní vrstva sestává z větvenitých buněk (šipka), zatímco v konkavitě jsou nečetné oválné buňky. Mass. el., x100



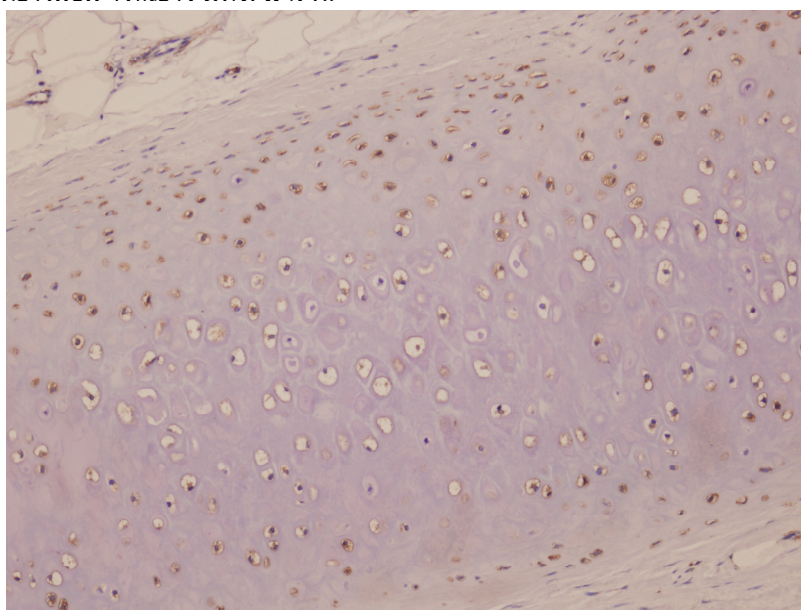
Obr. 10 – Uspořádání chondrocytů zevních vrstev ušní chrupavky v oblasti zakřivení boltce v metodě k průkazu S-100 proteinu. Zevní vrstva na konvexní straně je buněčnější a chondrocyty mají větvenitý tvar, zatímco na konkávní straně je buněk méně a mají oválný tvar. S-100 protein, x50



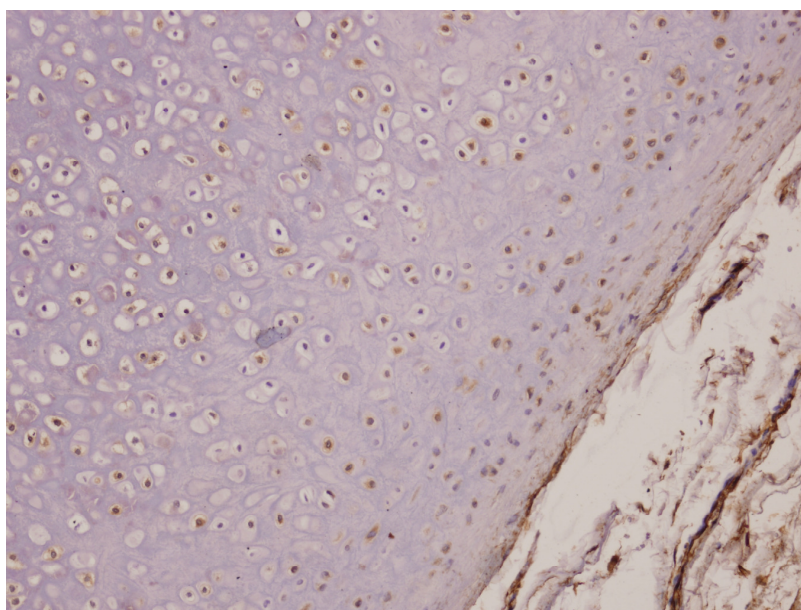
Obr. 11 – Detail předchozího záběru. x100



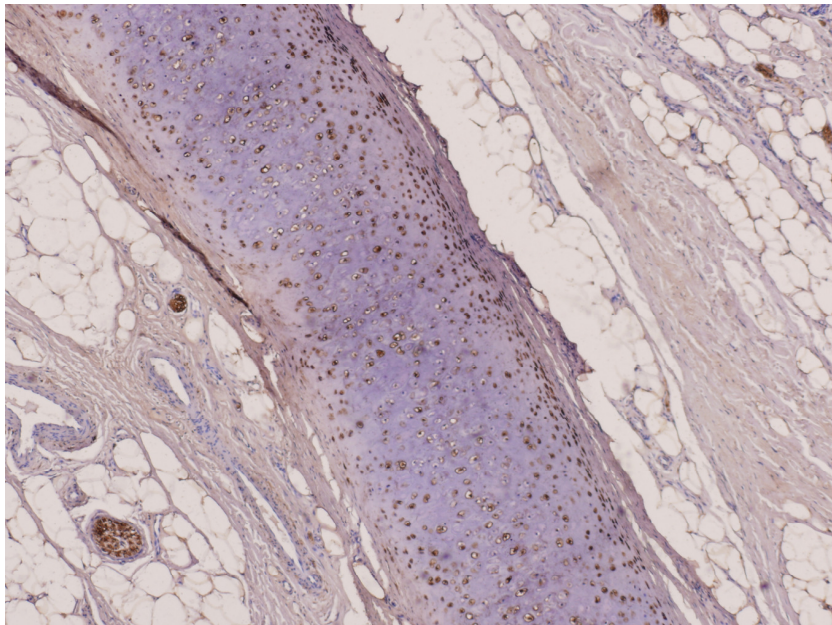
Obr. 12 – Imunohistochemický průkaz alfa aktinu hladké svaloviny v chondrocytech ušní chrupavky. Expres aktinu je zřetelně vyjádřena v buňkách zevních vrstev. SMA. x40



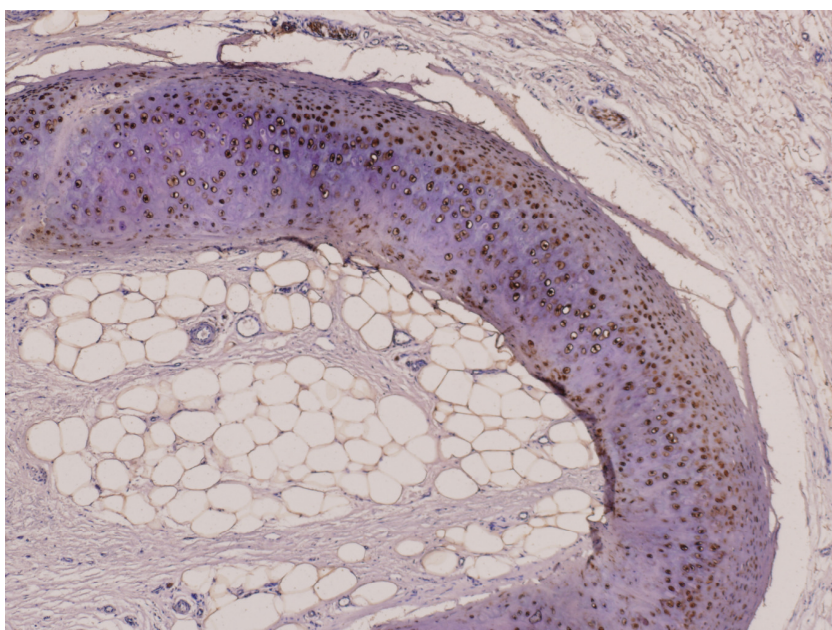
Obr. 13 – Detail z předchozího obrázku. x100



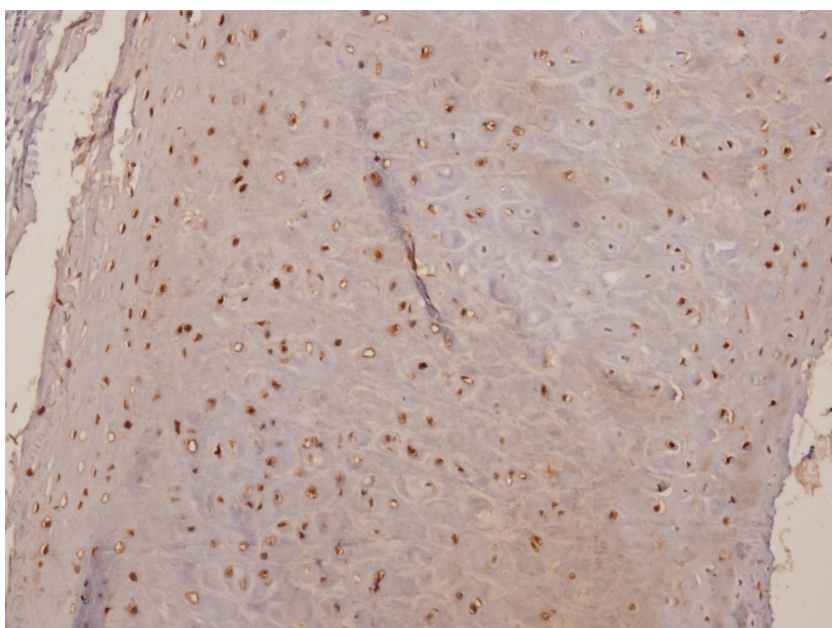
Obr.14 – Ložisková exprese CD 34 v buňkách zevní vrstvy ušní chrupavky. CD 34, x100



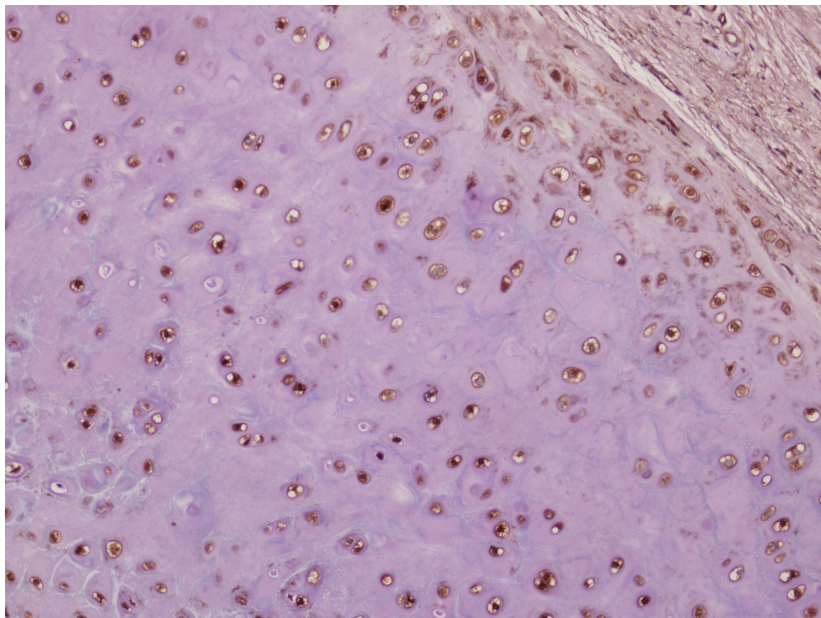
Obr. 15 – Expresse S-100 v oblasti mírného zakřivení, x40



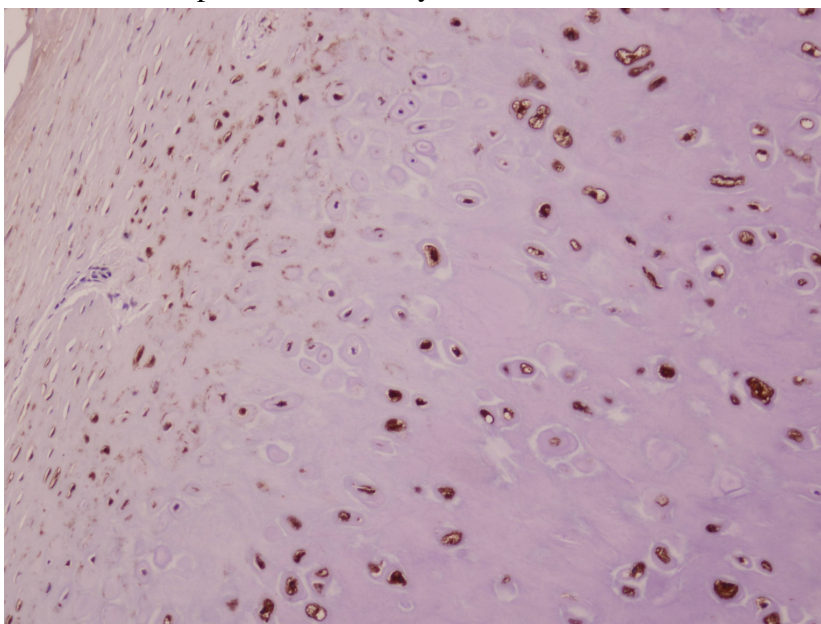
Obr. 16 - Expresse S-100 v oblasti výrazného zakřivení, x25



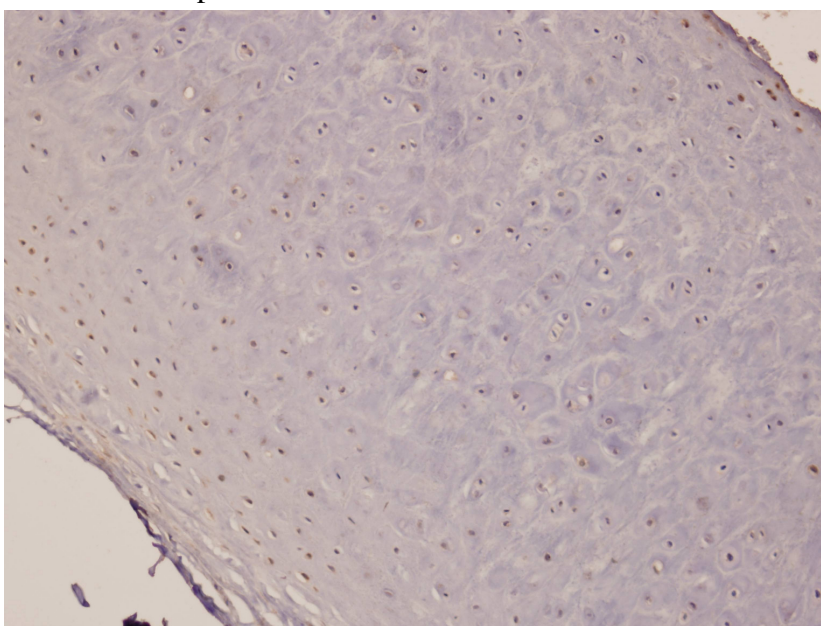
Obr. 17 - Expresse S-100A1 byla patrná ve většině ušních chondrocytů.x100



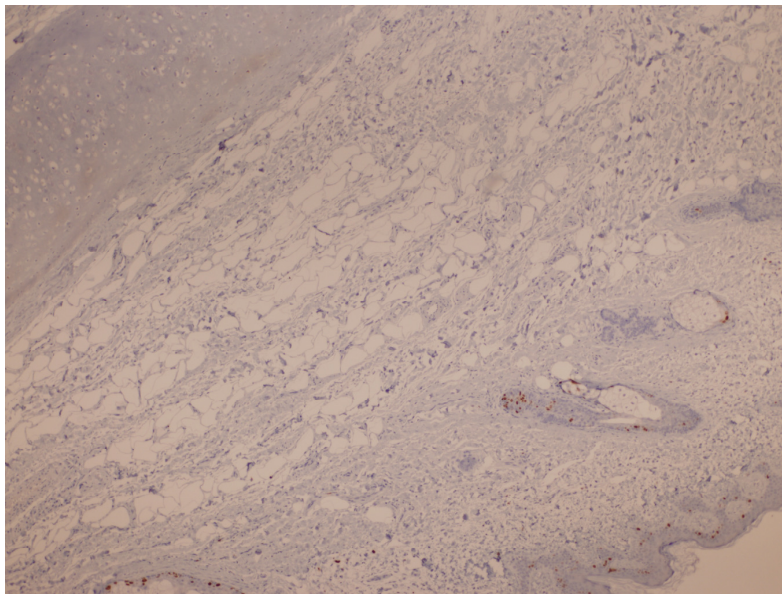
Obr. 18 – Expres S 100 A6 byla rovněž zřetelná. x200



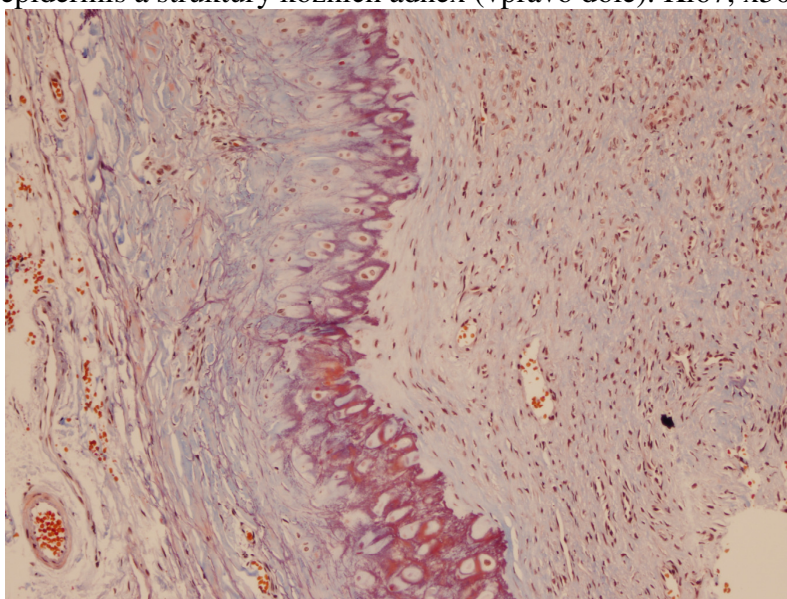
Obr. 19 – Expres S-100 B2 v detailu. x200



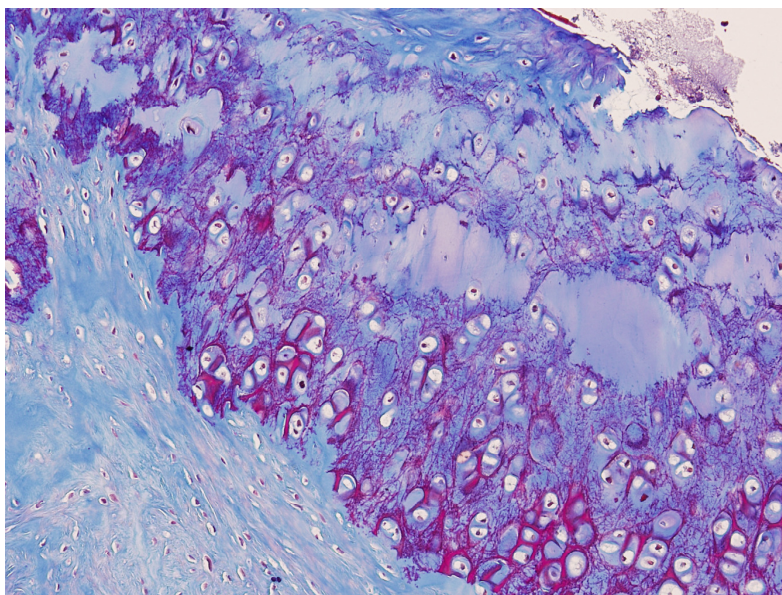
Obr. 20 – Expresi S 100A2 bylo možno pozorovat především v periferních oblastech ušní chrupavky. x100



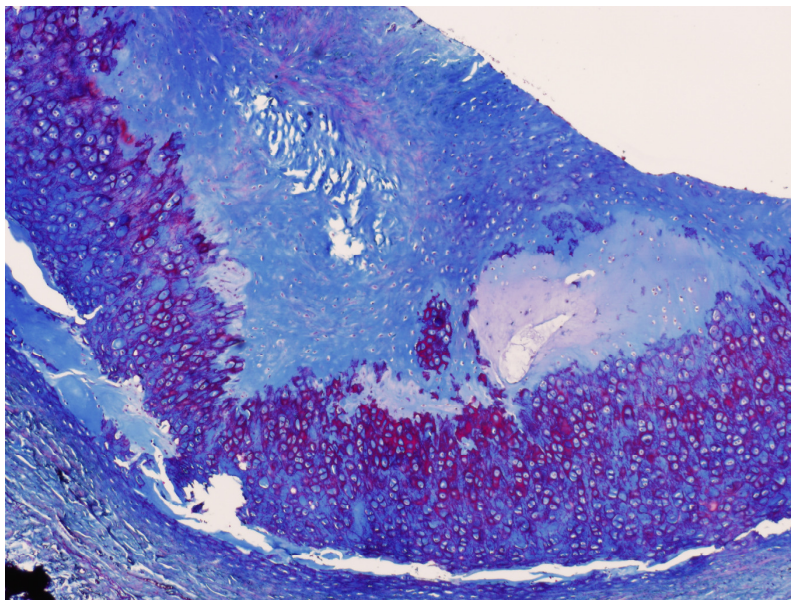
Obr. 21 – Proliferační aktivita chondrocytů ušní chrupavky prokázaná za pomoci protilátky proti Ki67 byla kompletně nulová. Jako pozitivní kontrola sloužila epidermis a struktury kožních adnex (vpravo dole). Ki67, x50



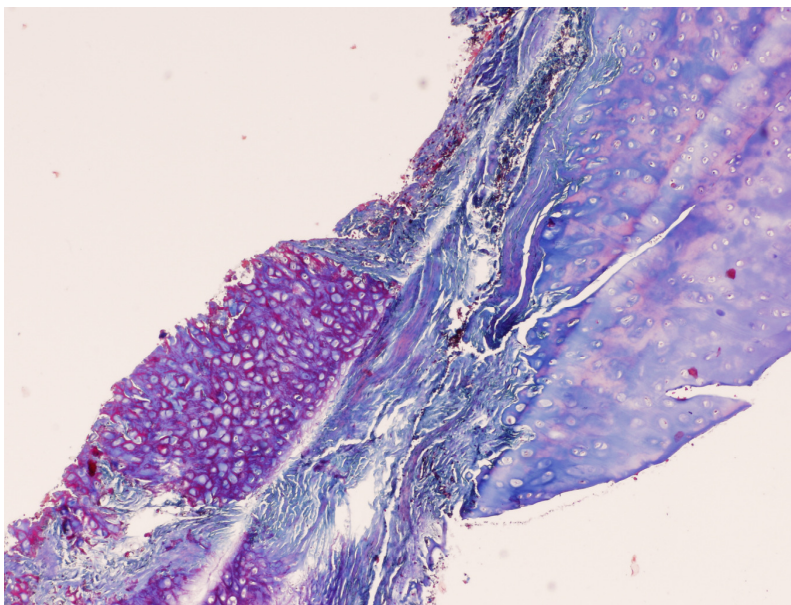
Obr. 22 – Histologický nálezn na ušním boltci u pacienta s agresivní polychondritidou v místě hluboké aroze ušní chrupavky. Defekt je vyplněn buněčnou vazivovou tkání. Mass. el. x50



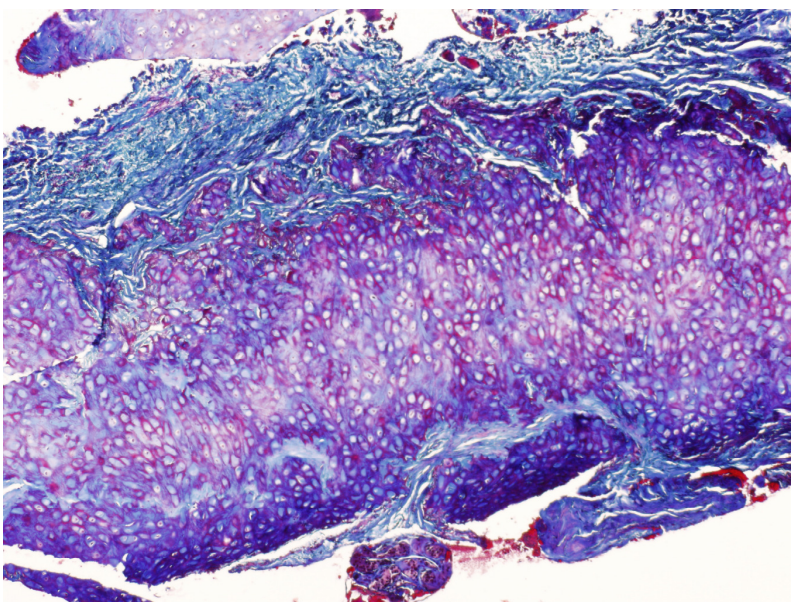
Obr. 23 – Ušní chrupavka judisty se změnami po opakované traumatizaci. V chrupavce jsou drobné vazivové jizvy (modře), ve kterých chybí chondrocyty i elastická vlákna. Mass.el. x100



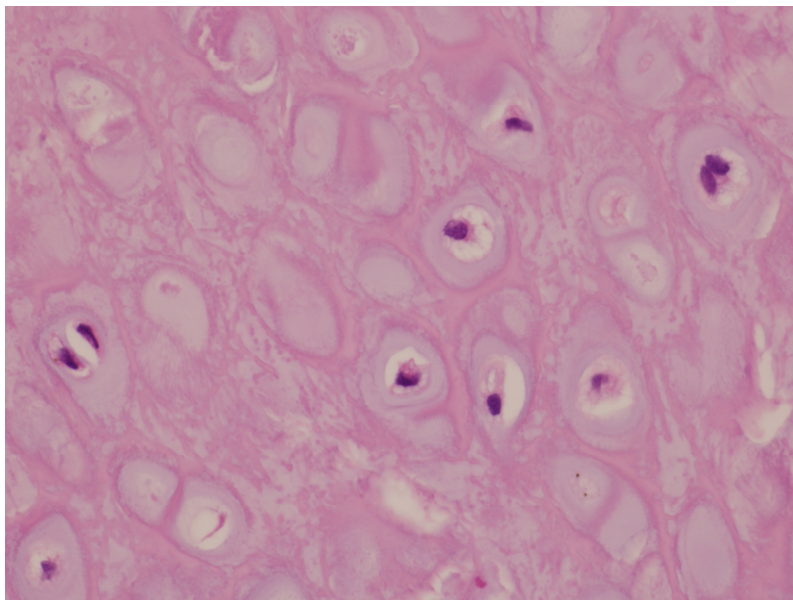
Obr. 24 – Posttraumatické změny chrupavky ušního boltce u pacienta provozujícího judo. Hluboký defekt je vyplněn hutným kolagenním vazivem. Mass.el, x50



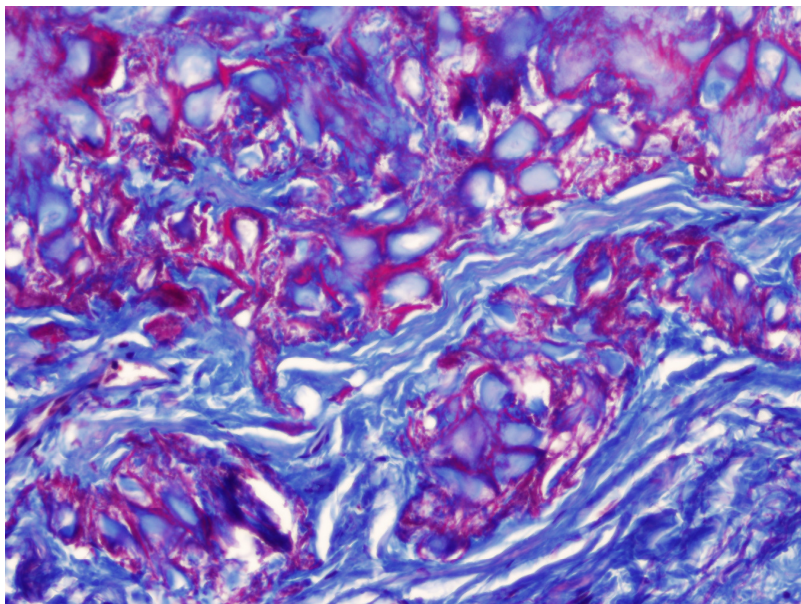
Obr. 25 – Vyjmutá část nadbytečného transplantátu vitální ušní chrupavky z oblasti nosu. Hlavní část transplantátu je kompaktní se zachovanými chondrocyty i původní mezibuněčnou hmotou včetně elastiky. V sousedství jsou drobné fragmenty chrupavky stejného typu bez známek jakékoliv rejekční reakce. Mass.el, x50



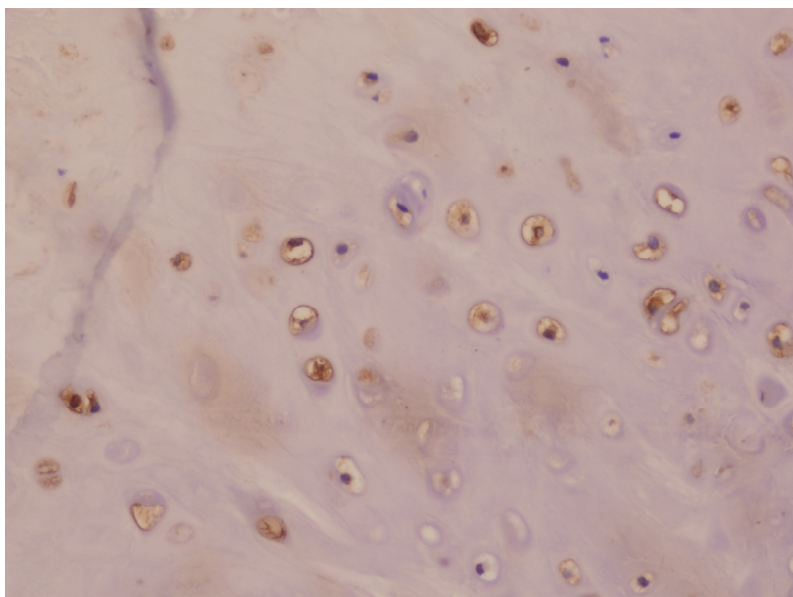
Obr. 26 – Detail vyjmuté části transplantátu ušní chrupavky v sousedství s původní nosní chrupavkou hyalinního typu. Mass.el, x50



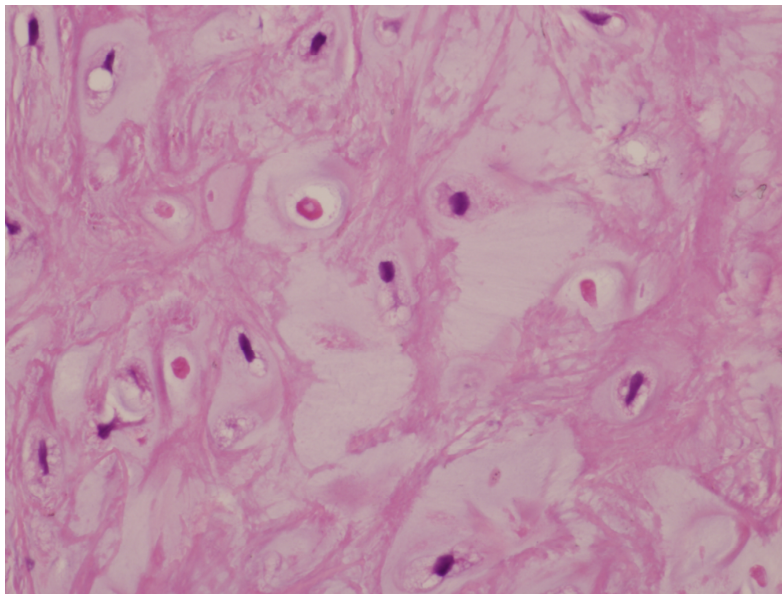
Obr. 27 – Detail vitálních chondrocytů transplantované ušní chrupavky v oblasti nosu. V jejich sousedství se nacházejí prázdné komůrky po odumřelých chondrocytech někdy se stínovitými zbytky buněčných těl. HE. x400



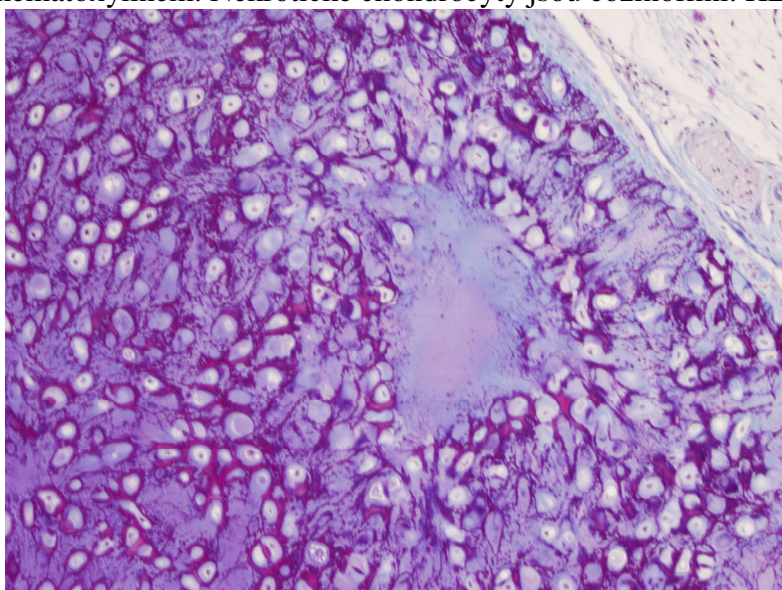
Obr. 28 – Drobné oddělené fragmenty elastické chrupavky v sousedství hlavní části transplantátu ušní chrupavky v nose jsou rovněž částečně vitální. Mass.el, x400



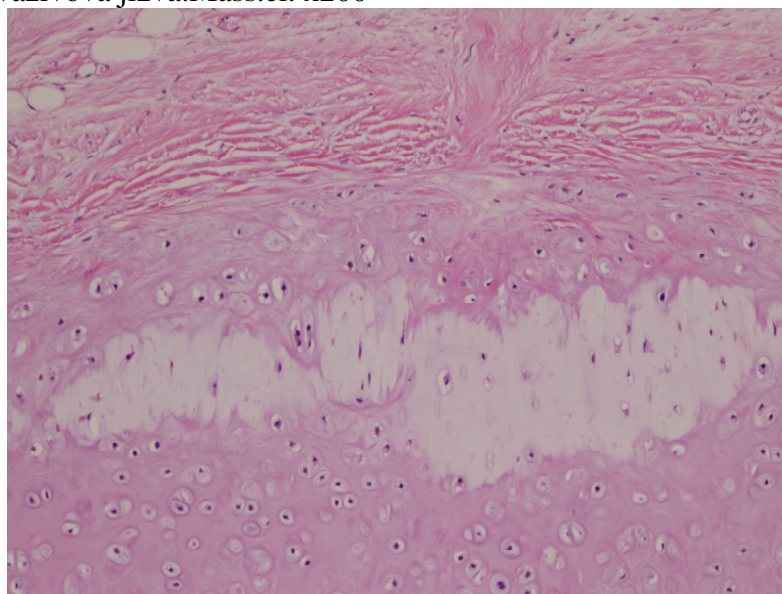
Obr. 29 – Chondrocyty transplantátu ušní chrupavky v nose exprimují S-100 protein, což je dokladem jejich vitality. S-100 protein, x200



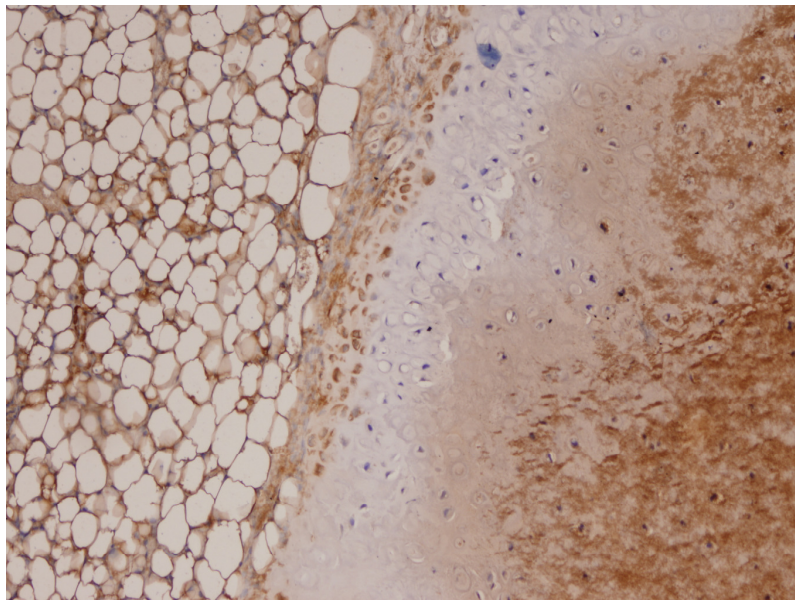
Obr. 30 - Transplantát intaktní lidské ušní chrupavky explantovaný z myši po 12 týdnech. Přežívající chondrocyty s dobře zachovanými jádry, která se barví bazofilně hematoxylinem. Nekrotické chondrocyty jsou eozinofilní. HE, x400



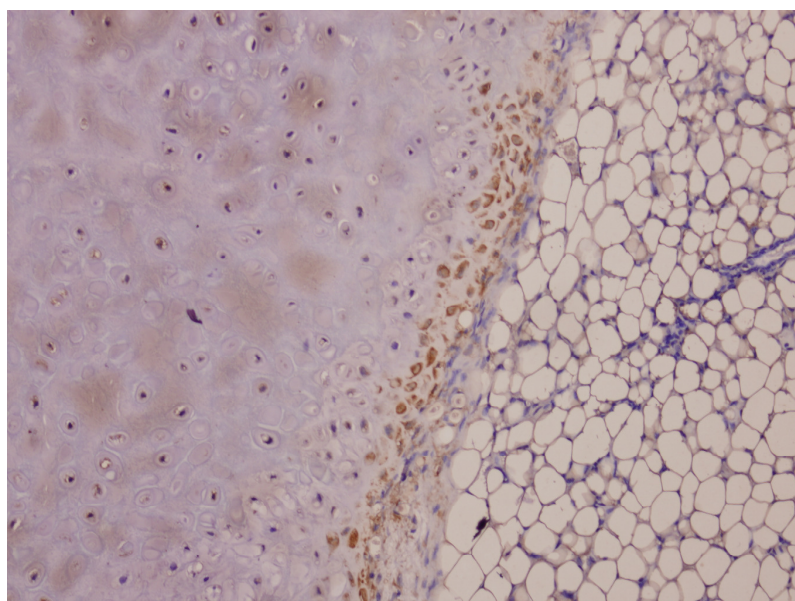
Obr. 31 – Transplantát intaktní lidské ušní chrupavky vyjmutý z myši po 12 týdnech. Jedinou změnou, která vznikla v souvislosti s regresivními změnami jen drobná vazivová jizva. Mass.el. x200



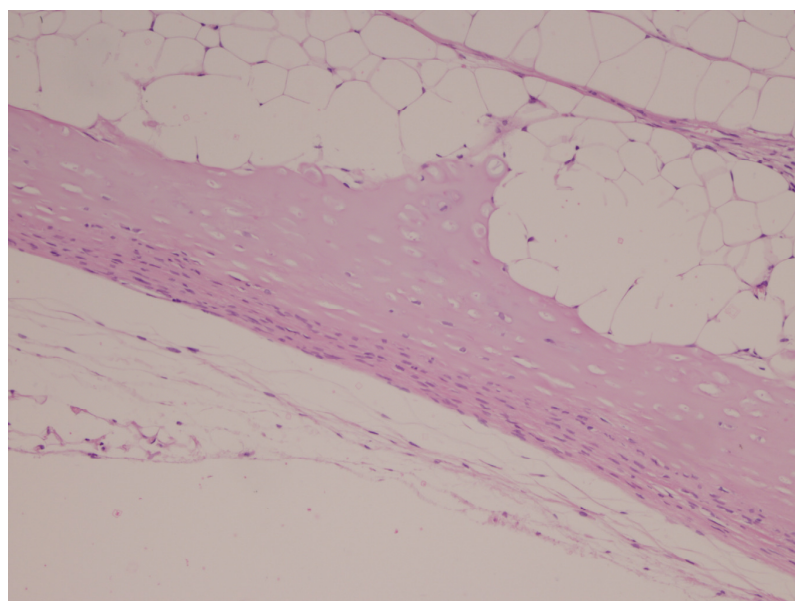
Obr. 32 – Transplantát intaktní lidské ušní chrupavky vyjmutý po 12 týdnech z myši s ložiskem myxoidního prosáknutí, v jehož rozsahu je patrný úbytek chondrocytů a mezibuněčná hmota neobsahuje vláknitou komponentu. HE. x200



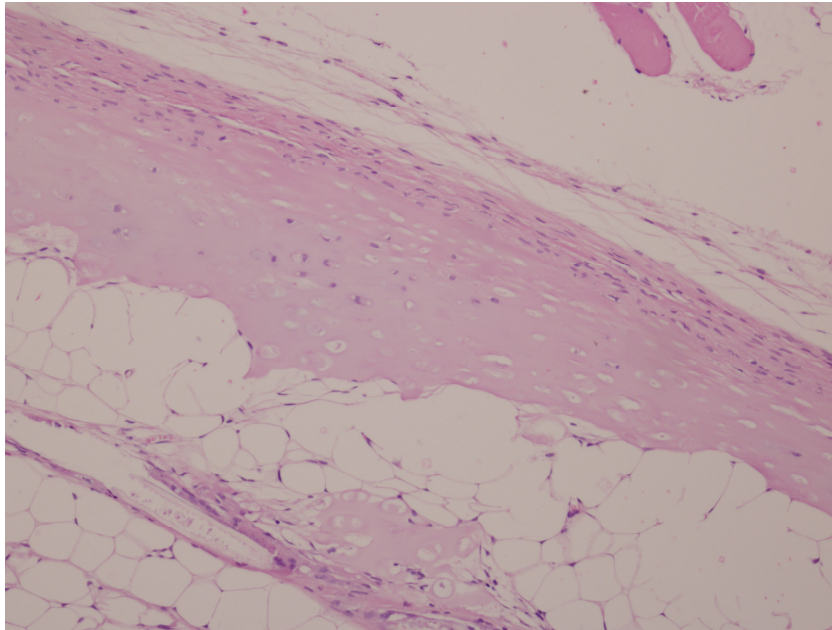
Obr. 33 - Chondrocyty transplantátu intaktní lidské ušní chrupavky exprimovaly α -SMA ve stejném rozsahu jako před transplantací. SMA, x200



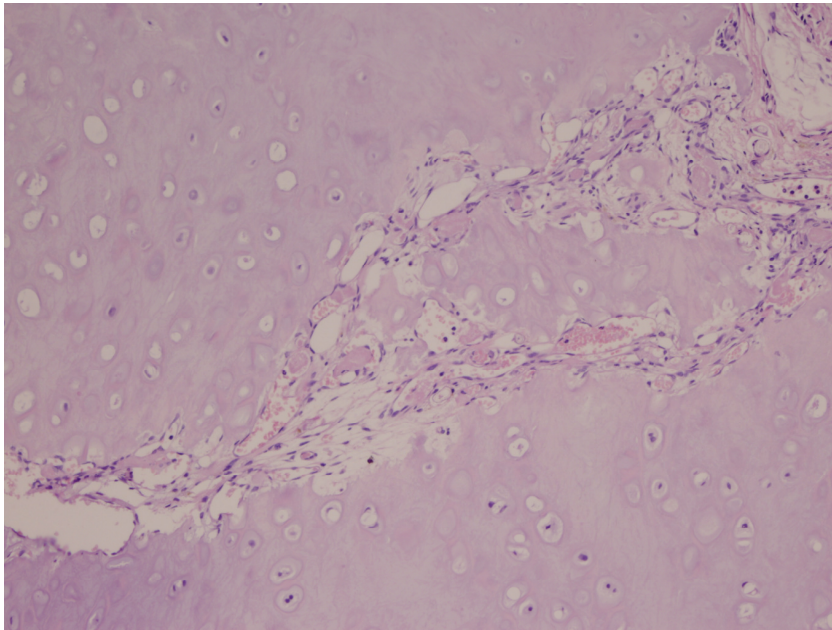
Obr. 34 - Chondrocyty transplantátu intaktní lidské ušní chrupavky exprimovaly S-100 protein jako výraz zachované vitality. S-100 protein.x200



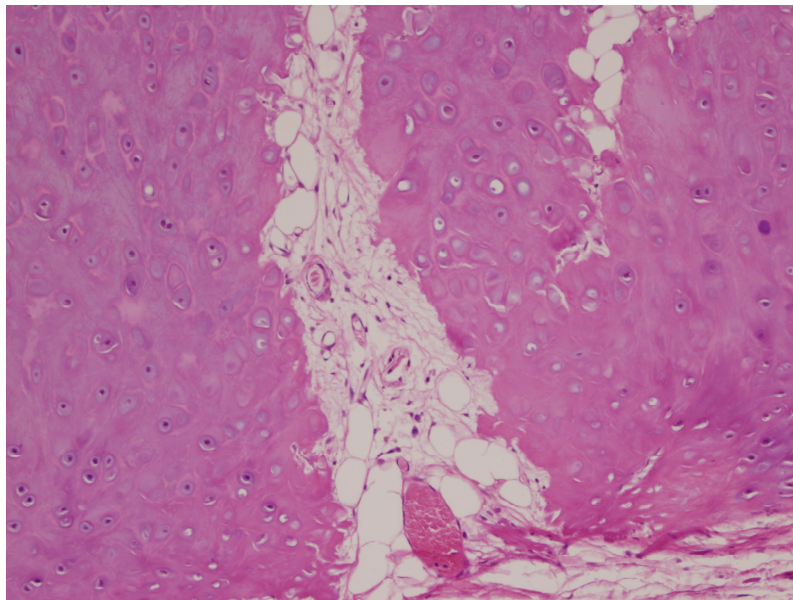
Obr. 35 - Transplantát ušní chrupavky zbavený před transplantací z jedné strany perichondria zůstal částečně vitální. Chondrocyty v místě defektu odumřely. HE,x 40.



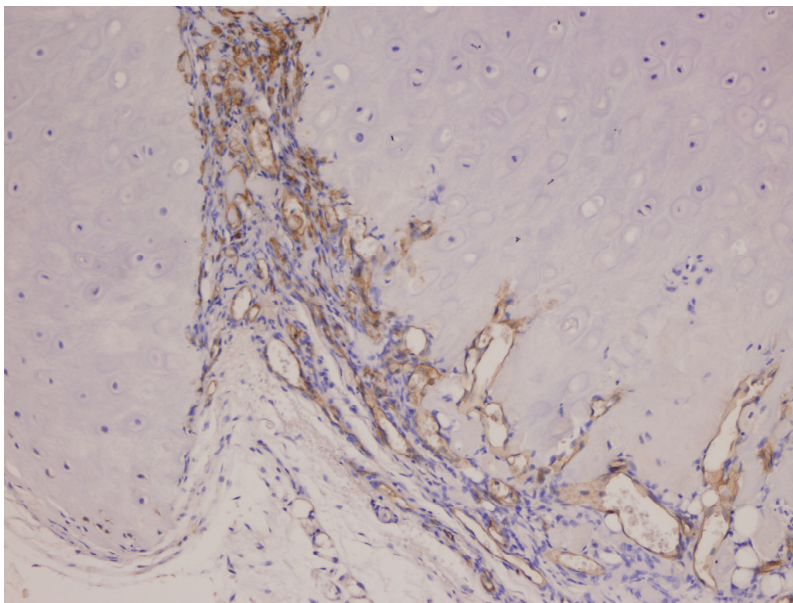
Obr. 36 – Transplantát ušní chrupavky zbavený před transplantací myši perichondria z jedné strany zůstal i po 16 týdnech částečně vitální. Chondrocyty v sousedství defektu odumřely . HE, x40



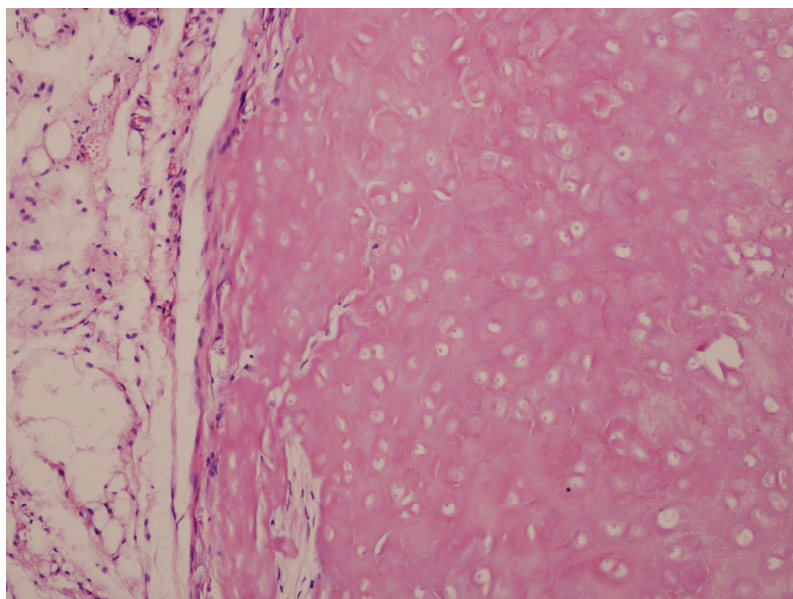
Obr. 37 – Transplantát lidské ušní chrupavky narušený před transplantací incizí zůstal i po 16 týdnech vitální. Do incize vrostla cévnatá vazivová tkáň charakteru tkáně granulační. HE, x100



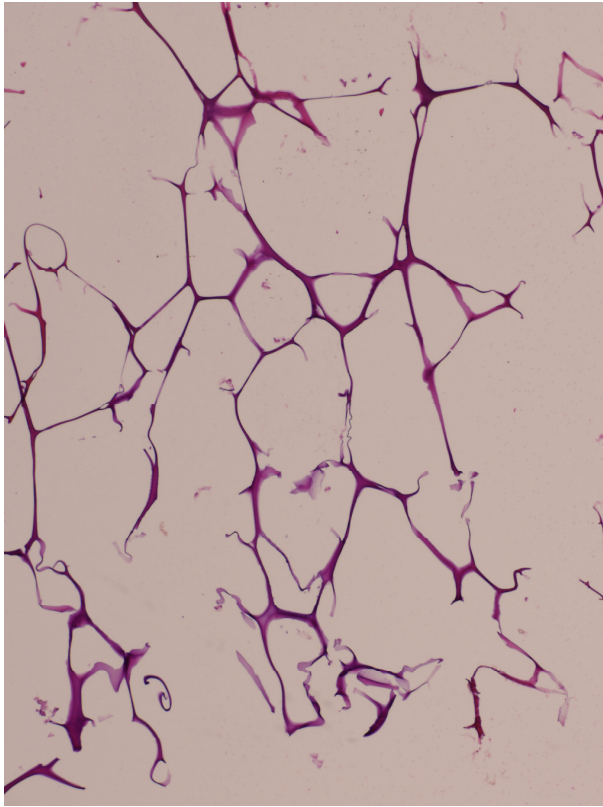
Obr. 38 – Transplantované fragmenty lidské ušní chrupavky myším se zachovanými vitálními chondrocyty. HE, x100



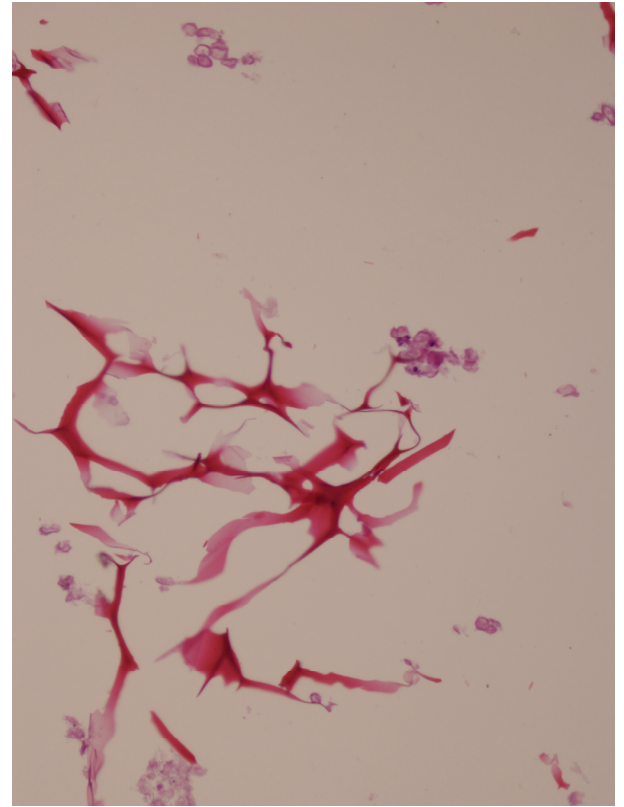
Obr. 39 – Transplantát z předchozího obrázku se zvýrazněnými strukturami cév v reakci s protilátkou proti CD 34, která je exprimována endoteliemi. CD 34, x100



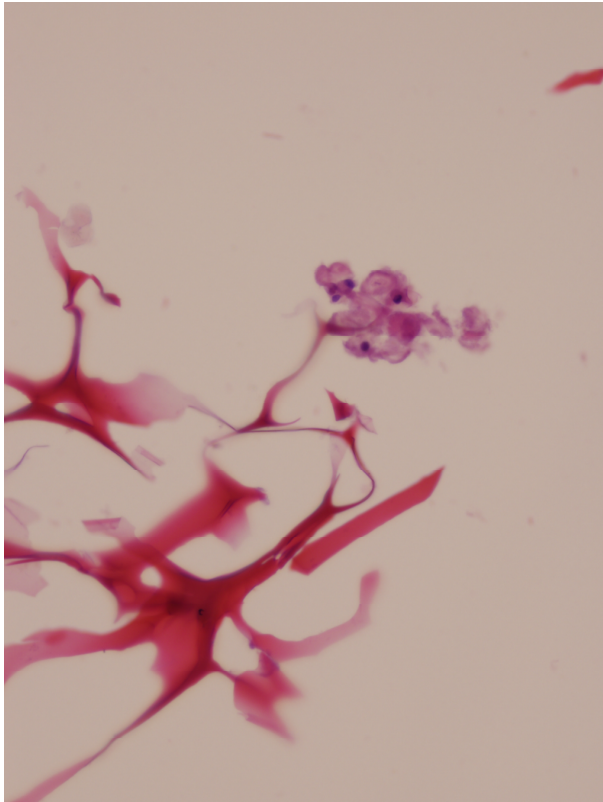
Obr. 40 – Kompletní nekrózu transplantátu ušní chrupavky uchovávané 7 dnů před transplantací v kulturačním médiu a následně transplantované myši jsme zaznamenali zcela výjimečně. V daném případě byl vzorek vyšetřen po 12 týdnech. HE, x100



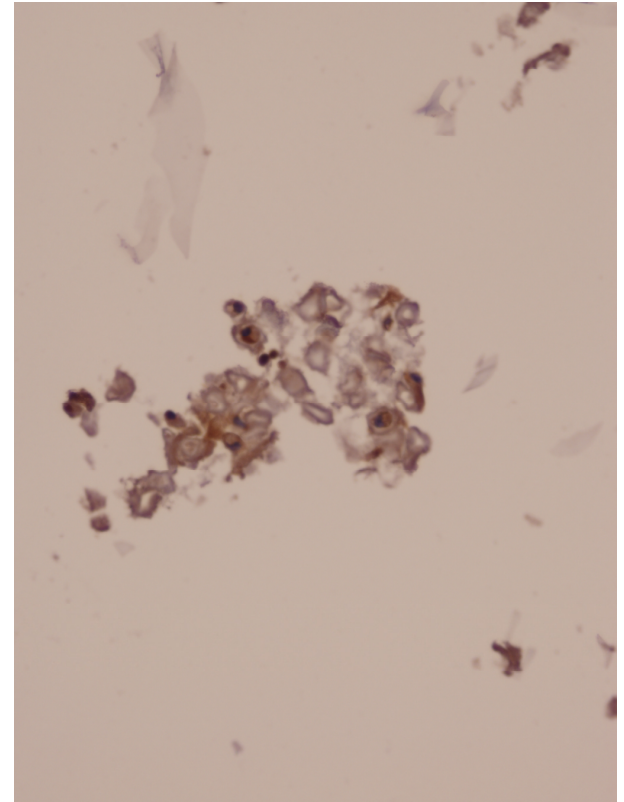
Obr. 41 – Želatinový nosič po 7 dnech kultivace lidských chondrocytů, které při tomto malém zvětšení je obtížné identifikovat. HE, x50



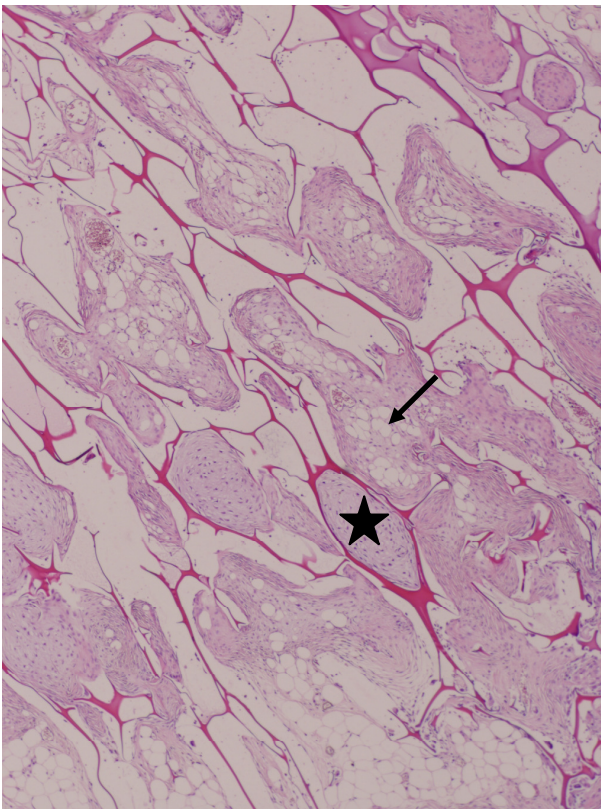
Obr. 42 – Skupinky nezralých prekurzorů chondrocytů, které narostly na želatinovém nosiči po 21 dnech kultivace. HE, x100



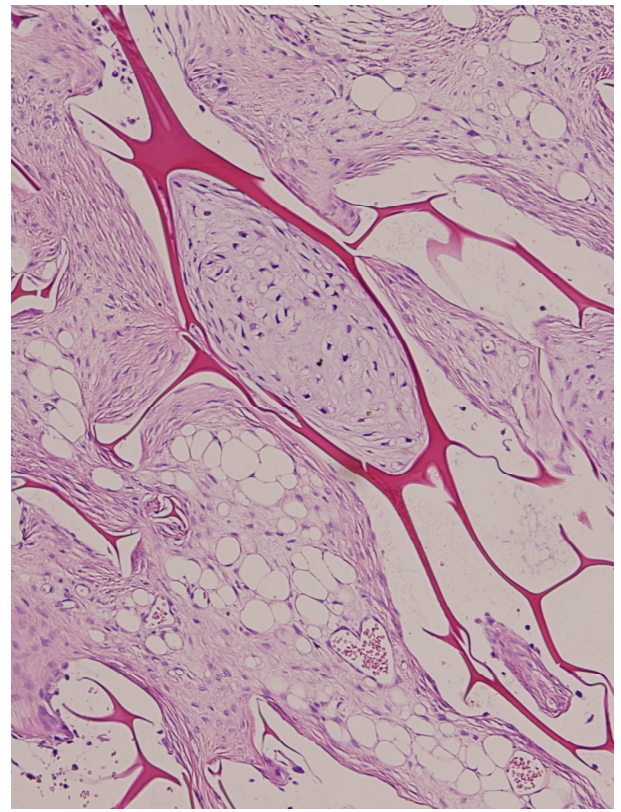
Obr. 43 – Detail skupinky nezralých prekurzorů chondrocytů, které narostly na želatinovém nosiči po 21 dnech kultivace, x200



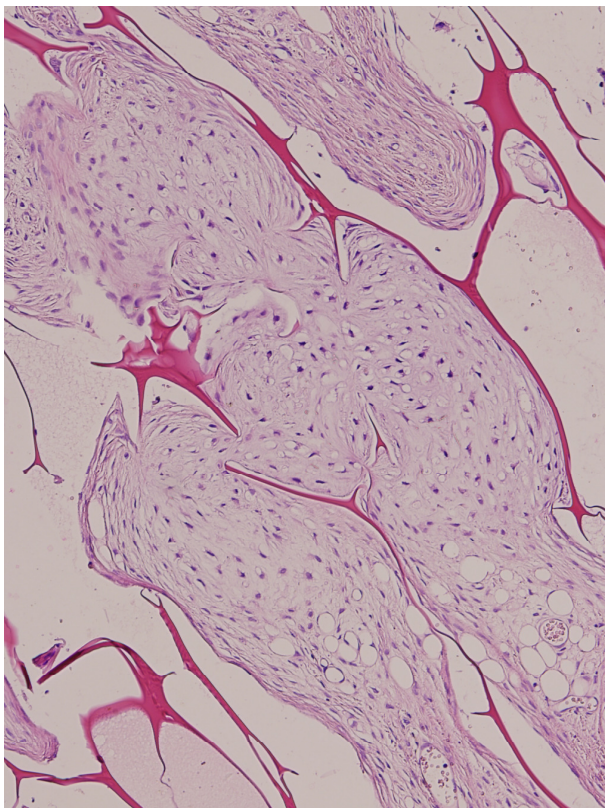
Obr. 44 - Skupinky chondrocytů z předchozího vzorku narostlé na parafinovém nosiči exprimovaly S-100 protein, jehož pozitivita ukazuje možný chondrocytární charakter zachycených buněk před transplantací. x200



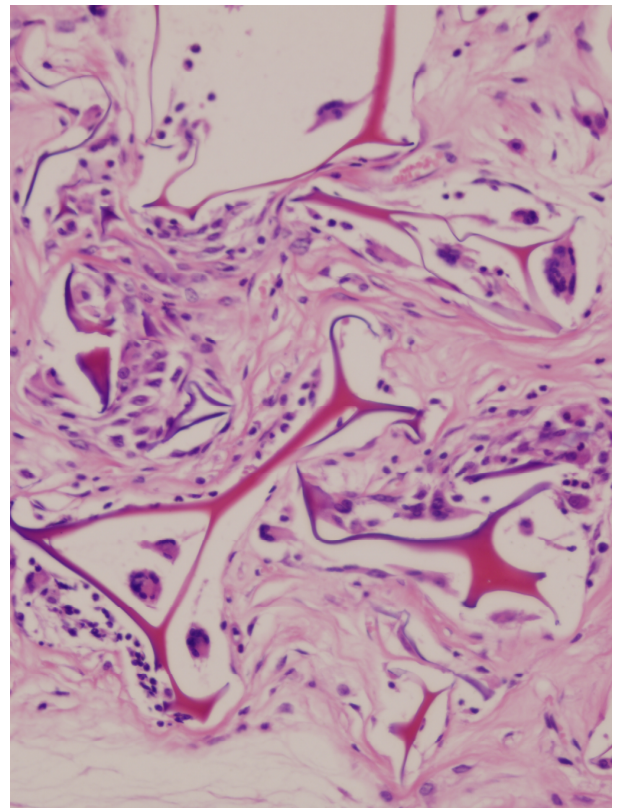
Obr. 45 – Želatinový nosič s kulturou chondrocytů 8 týdnů po transplantaci myším. V prostorách mezi septy nosiče narostla málo diferencovaná chrupavková tkáň (hvězdička) i tukově vazivová tkáň (šipka). HE, x40



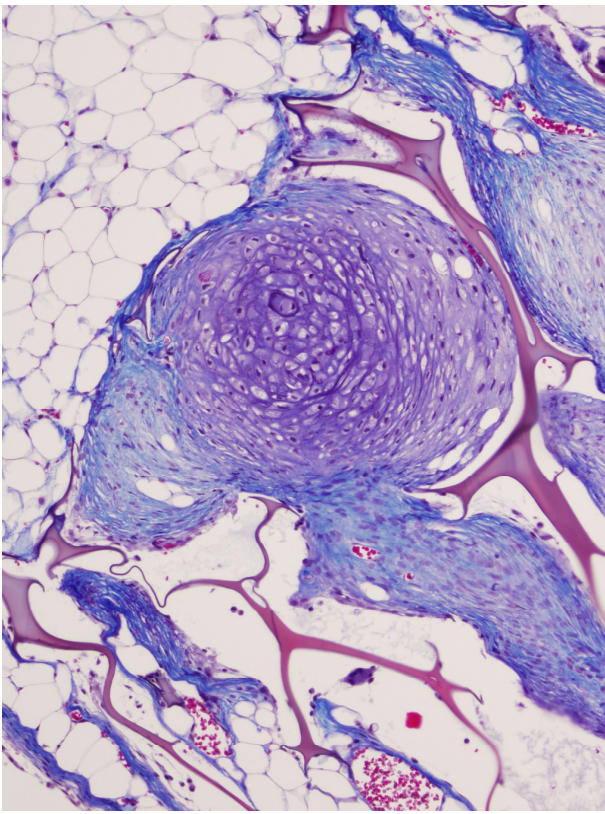
Obr. 46 - Detail nově narostlé málo diferencované chrupavkové i tukově vazivové tkáně. HE, x100



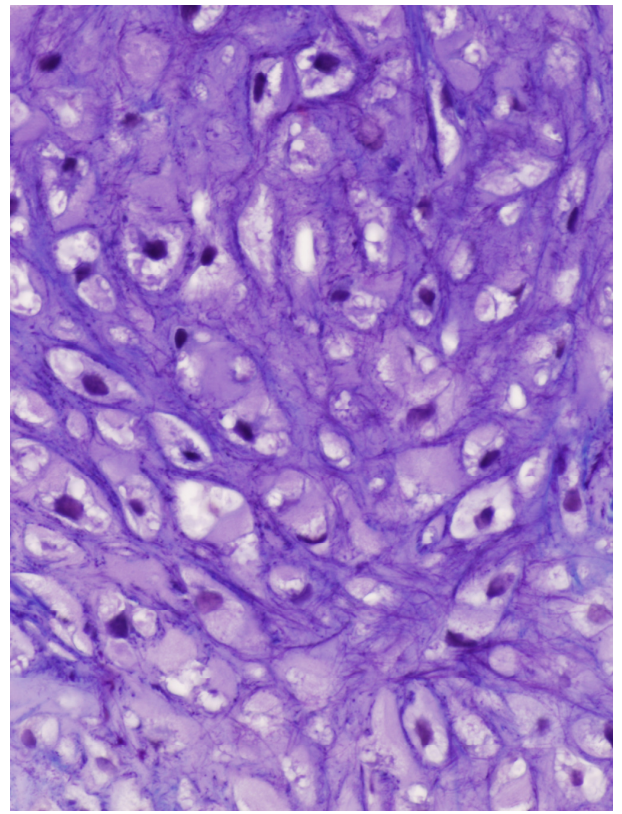
Obr. 47 - Detail nově narostlé málo diferencované chrupavkové tkáně. HE, x200



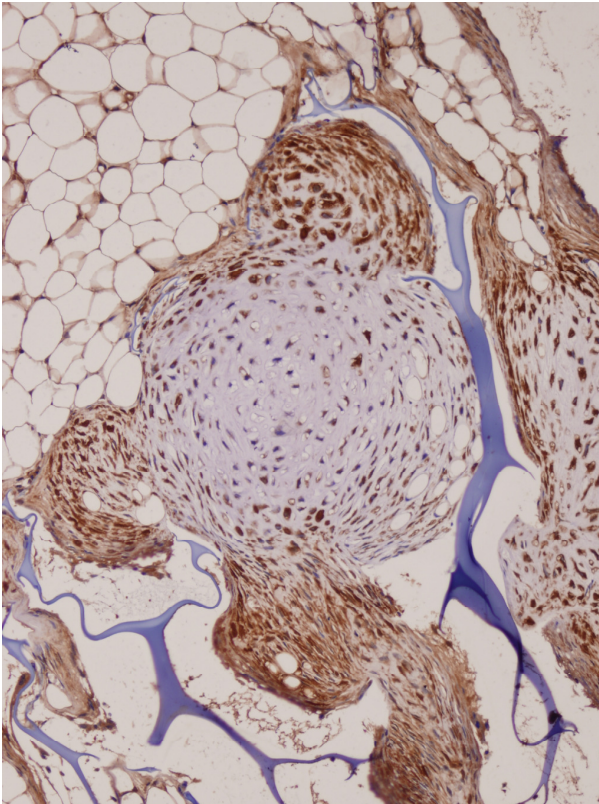
Obr. 48 – Želatinový nosič s kulturou chondrocytů 8 týdnů po transplantaci myši. Přítomnost obrovských vícejaderných buněk je výrazem reakce na přítomnost cizorodého materiálu, který je součástí nosiče. HE, x400



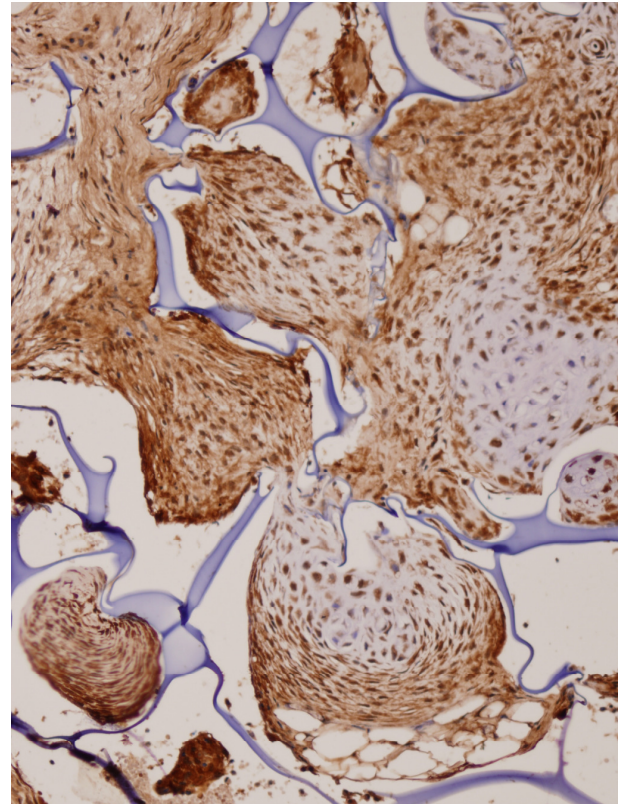
Obr. 49 – Ložisko nově narostlé chrupavkové tkáně po transplantaci kultury lidských chondrocytů s želatinovým nosičem v histochemické metodě k průkazu elastiky. Mass.el, x200



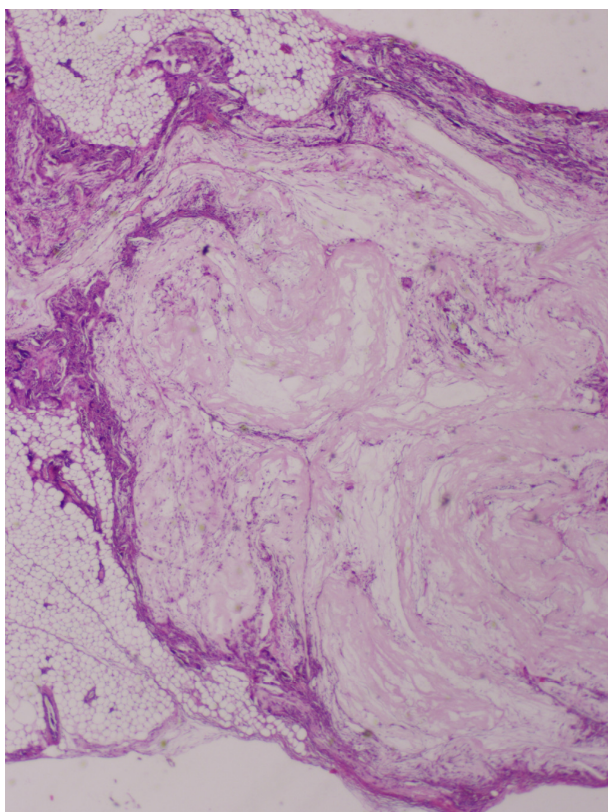
Obr. 50 – Detail ložiska nově narostlé chrupavkové tkáně po transplantaci kultury lidských aurikulárních chondrocytů s želatinovým nosičem. V mezibuněčné hmotě bylo možno prokázat přítomnost elastických vláken. Mass.el, x400



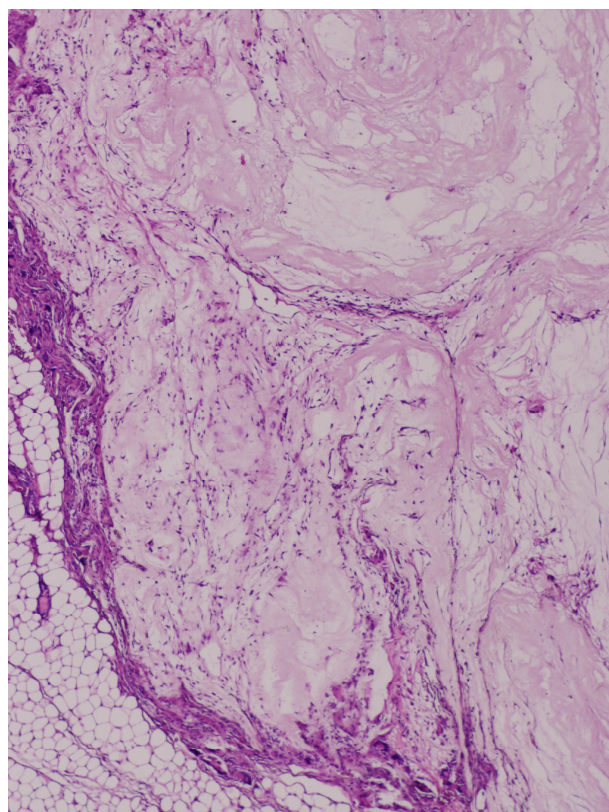
Obr. 51 – Buňky nově narostlé chrupavkové tkáně po transplantaci kultury lidských aurikulárních chondrocytů s želatinovým nosičem zřetelně exprimovaly S-100 protein. S-100 protein, x200



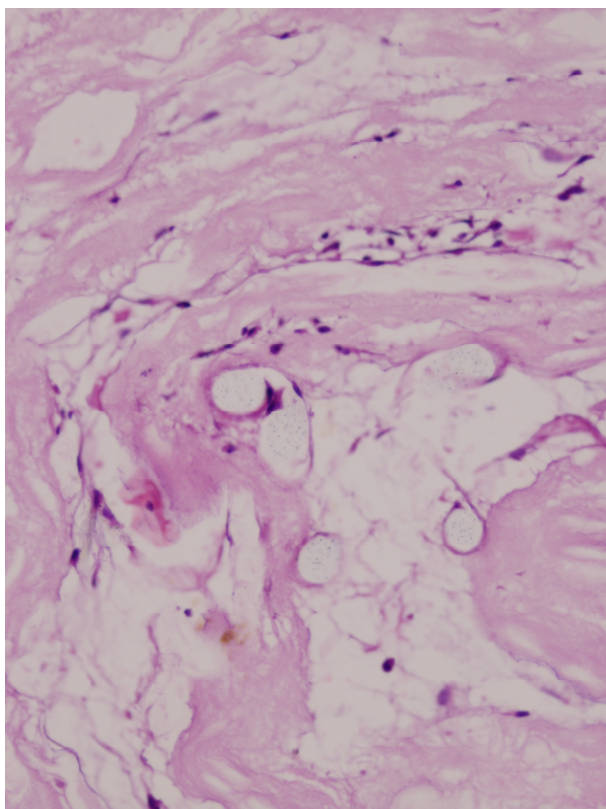
Obr. 52 – Buňky nově narostlé chrupavkové tkáně ze vzorku z předchozího obrázku exprimovaly také alfa aktin hladké svaloviny. SMA, x200



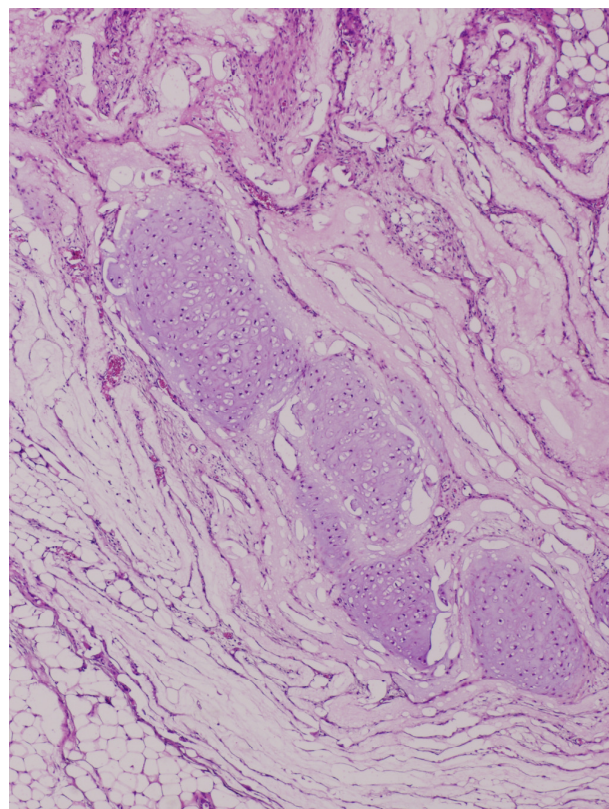
Obr. 53 – Transplantát kultury aurikulárních chondrocytů kultivovaných na nosiči z nanovláken (PGLA). Transplantát sestával z málo buněčného materiálu myxoidního charakteru s okrsky buněk nejistého původu vytvářejících pruhovité formace. HE, x100



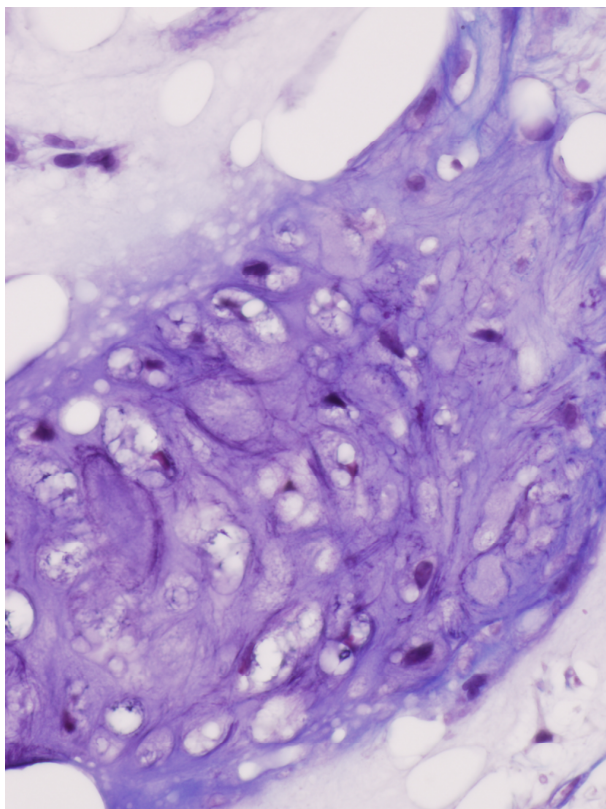
Obr. 54 – Jiná oblast transplantátu z předchozího vzorku. HE, x100



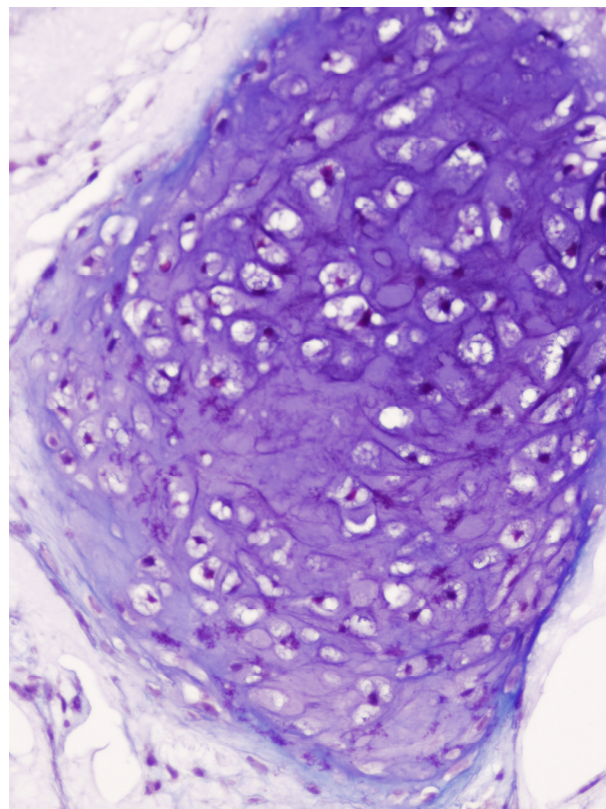
Obr. 55 – Zbytky vláknitého materiálu nosiče z nanovláken ve vzorku z předchozích obrázků. HE, x400



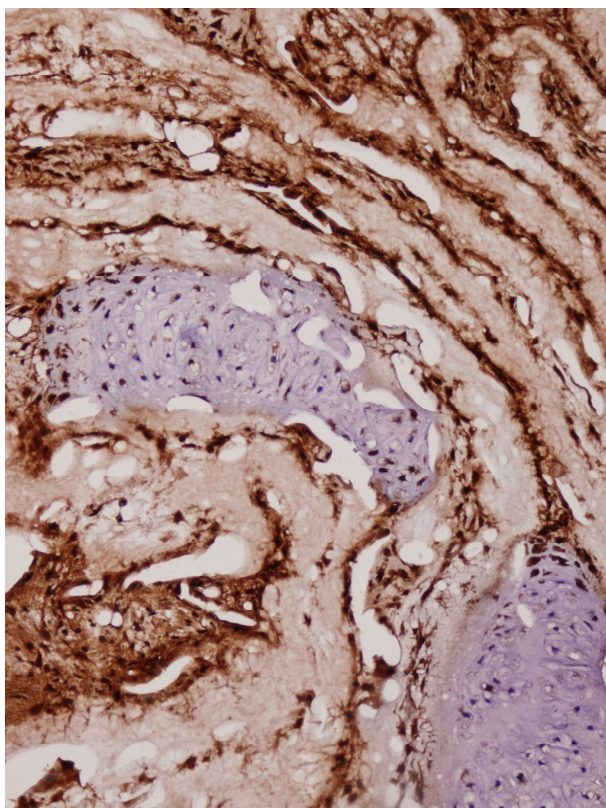
Obr. 56 – Ložiska nově narostlé chrupavkové tkáně v transplantátu kultury aurikulárních chondrocytů kultivovaných na nosiči z nanovláken. HE, x100



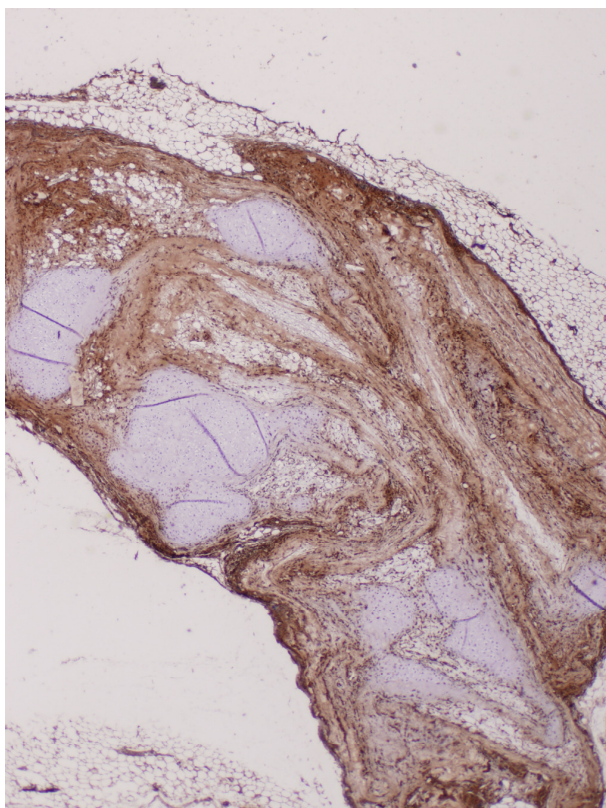
Obr. 57 – Ložiska nově narostlé chrupavkové tkáně po transplantaci kultury lidských aurikulárních chondrocytů obsahovala i jemná elastická vlákna v mezibuněčné hmotě. Mass.el., x400



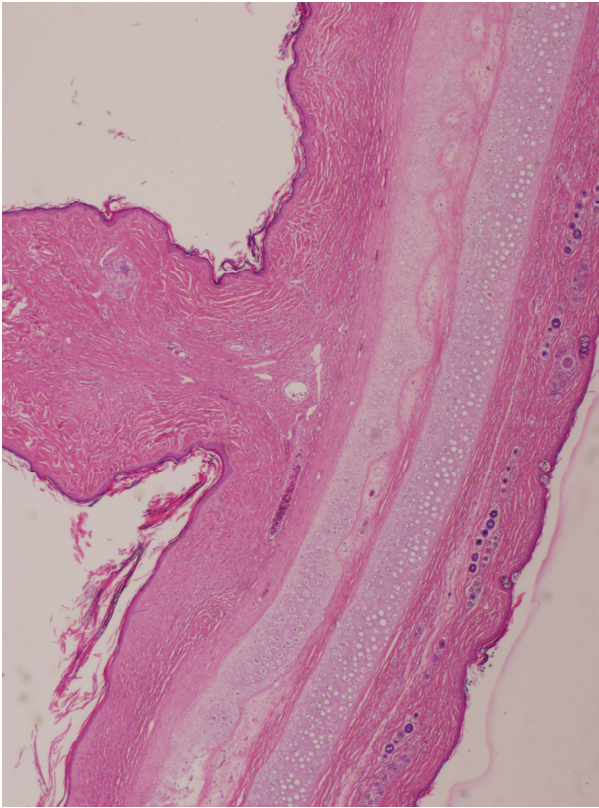
Obr. 58 – Ložisko nově narostlé chrupavkové tkáně po transplantaci kultury lidských aurikulárních chondrocytů obsahovalo i jemná elastická vlákna v mezibuněčné hmotě. Mass.el., x400



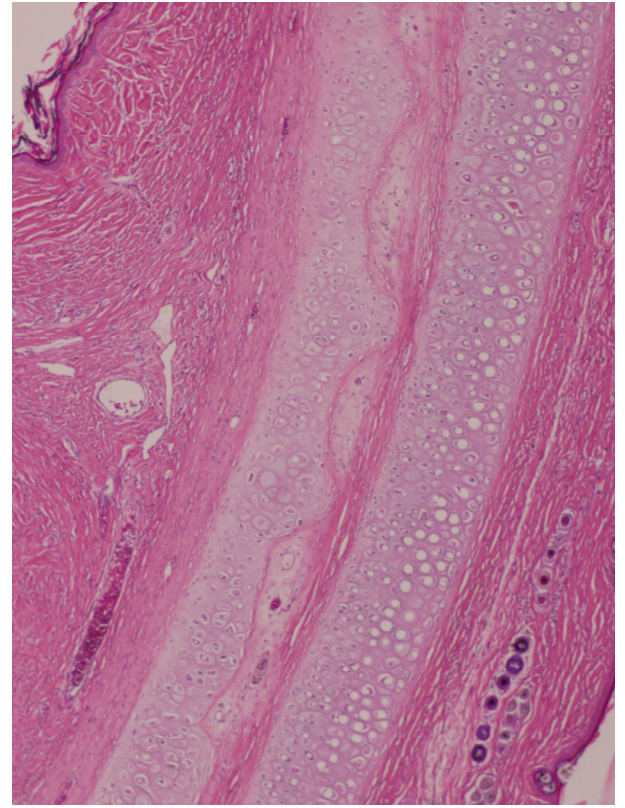
Obr. 59 - Ložiska nově narostlé chrupavkové tkáně ve vzorku z předchozích obrázků v reakci k průkazu alfa aktinu hladké svaloviny. Expres aktinu je pouze slabá. SMA, x200



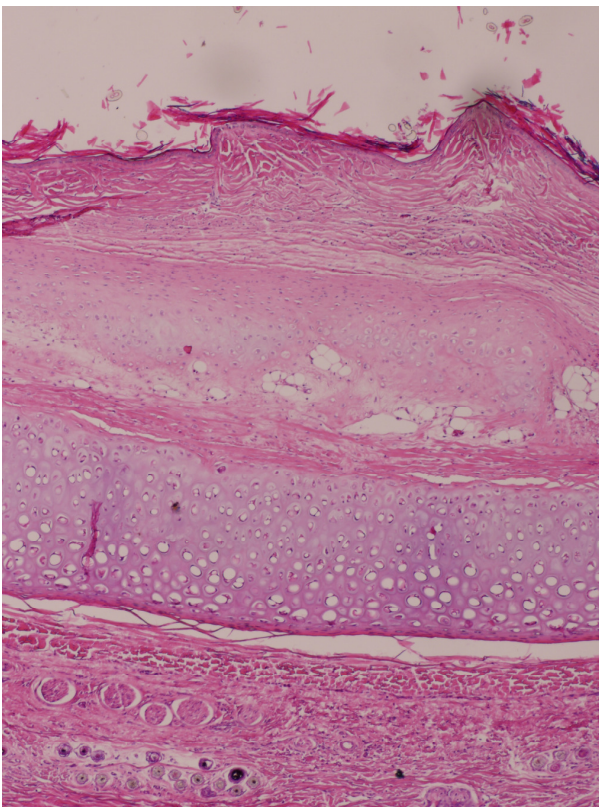
Obr. 60 – Ložiska nově narostlé chrupavkové tkáně ve vzorku z předchozích obrázků v reakci k průkazu S-100 proteinu, x100



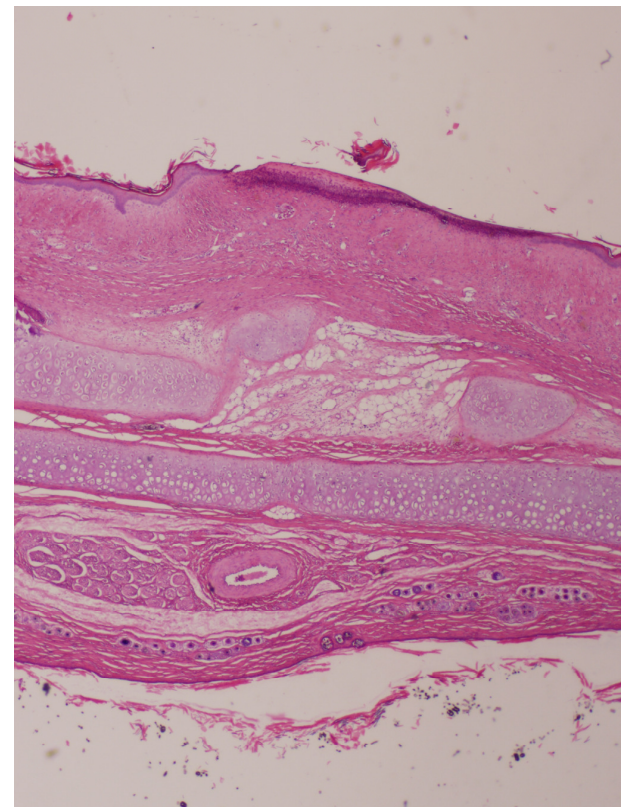
Obr. 61 Autologní transplantát ušní chrupavky *králíka* zbavený z jedné strany perichondria zůstal i za této situace vitální. V těsném sousedství se nachází původní lamela ušní chrupavky. HE, x40



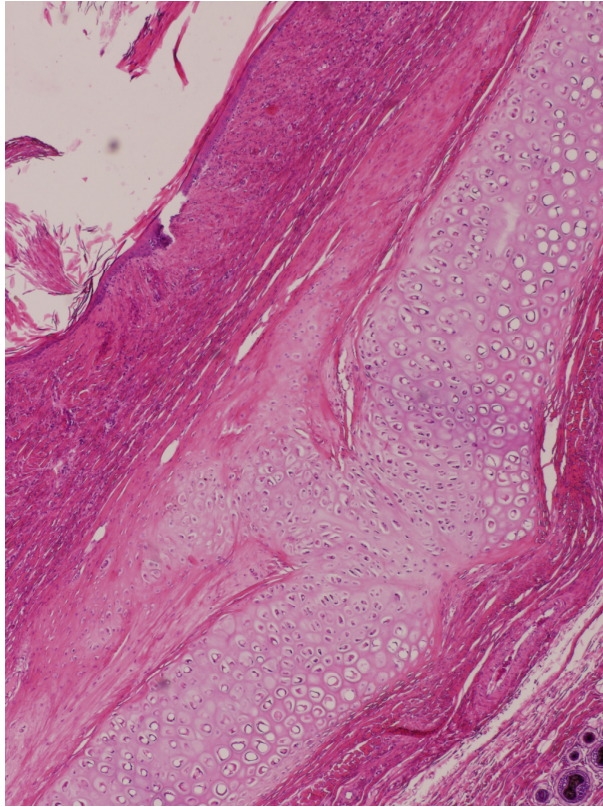
Obr. 62 – Detail z předchozího snímku. Transplantovaná chrupavka zůstala vitální i po odstranění perichondria. HE, x100



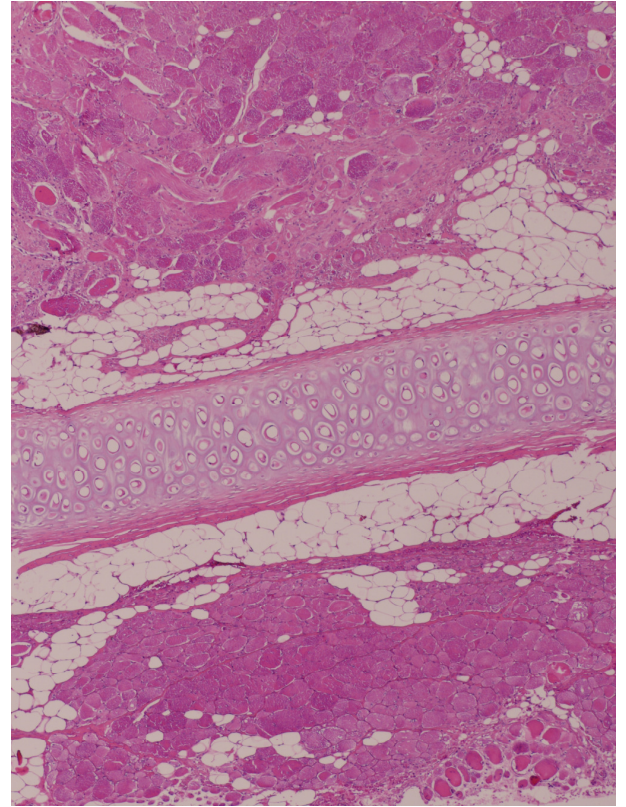
Obr. 63 – Detail jako na předchozím snímku. HE, x100



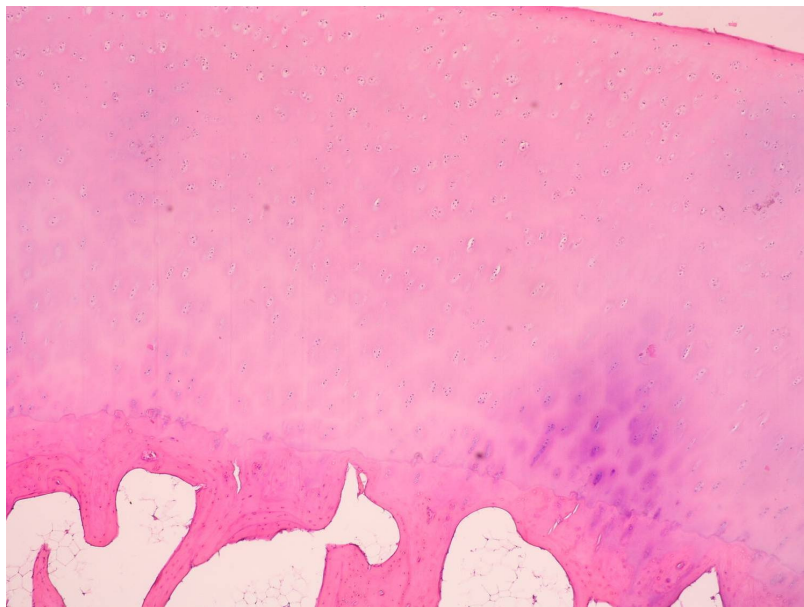
Obr. 64 - Kompletně přerušný transplantát chrupavky. Okraje obou částí se spojily pouze vazivem bez známek novotvorby chrupavkové tkáně. HE, x40



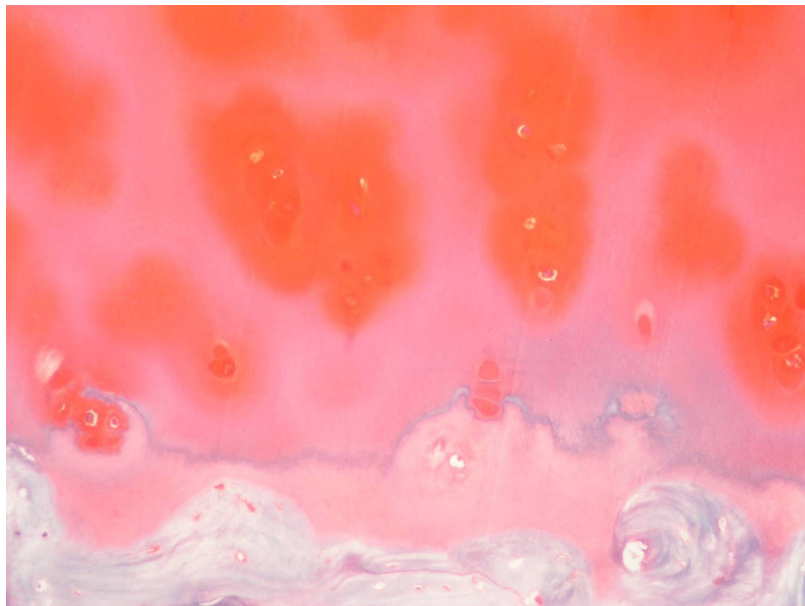
Obr. 65 – Hojení incize ušní chrupavky bylo spojeno s proliferací chrupavkové tkáně, která v nadměrné míře vyplnila arteficiálně vytvořený defekt. HE, x100



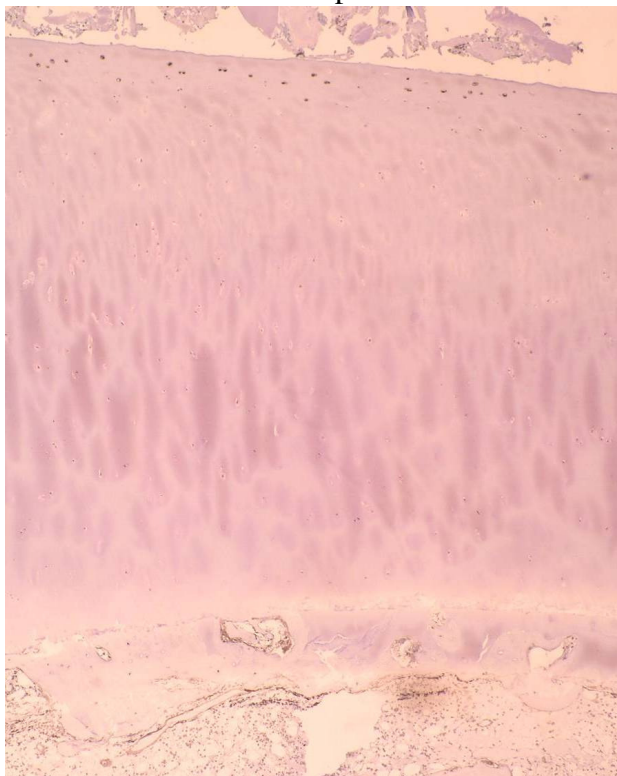
Obr. 66 – Ušní chrupavka transplantovaná subkutánně do paravertebrální oblasti dorza se dobře vhojila a zůstala vitální. HE, x40



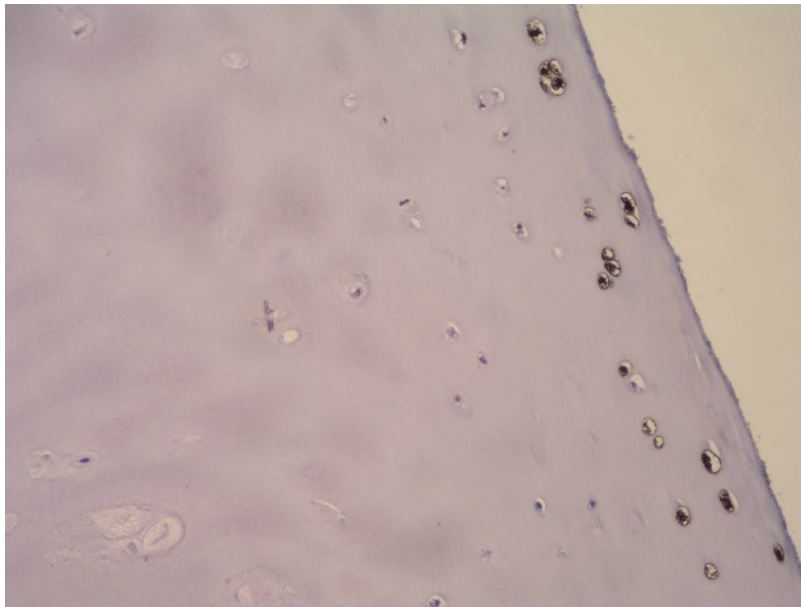
Obr. 67 – Normální hyalinní chrupavka z oblasti kloubní hlavičky femuru. HE, x30



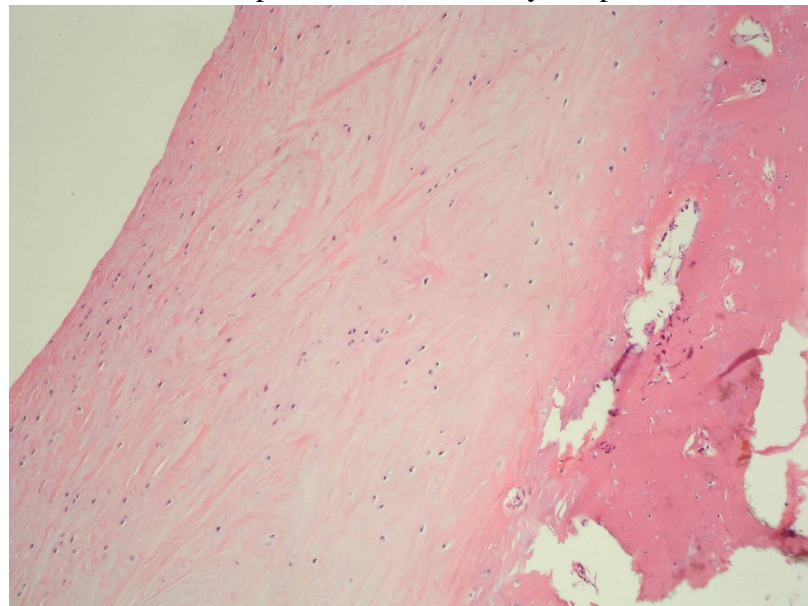
Obr. 68 – Normální kloubní chrupavka v barvení Safraninem O. x100



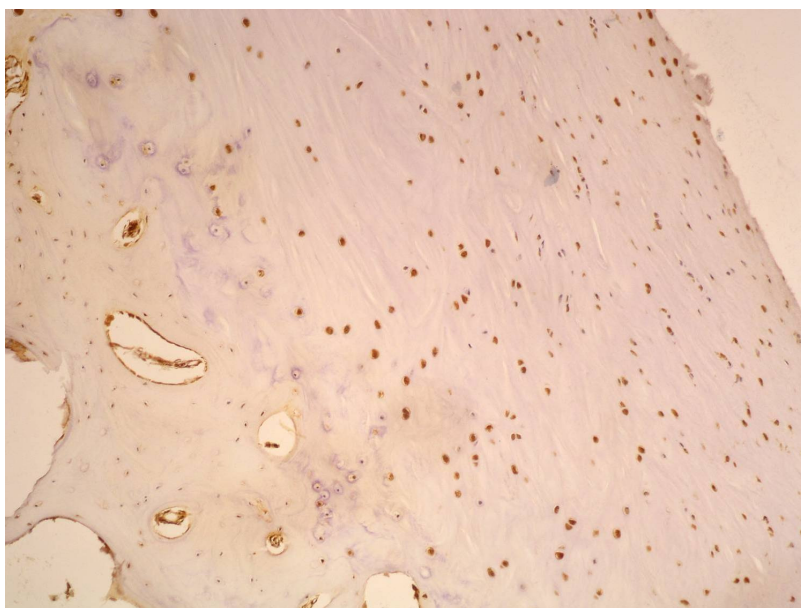
Obr. 69 – Přehledný snímek kloubní hlavičky s aktin pozitivními chondrocyty v povrchové vrstvě. X50



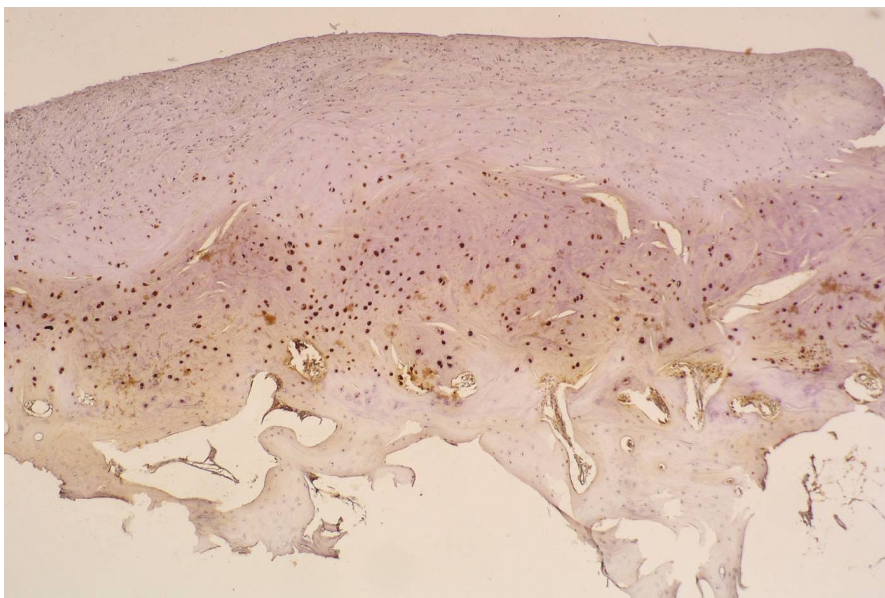
Obr.70 Detail aktin pozitivních chondrocytů v povrchové vrstvě kloubní chrupavky.x200



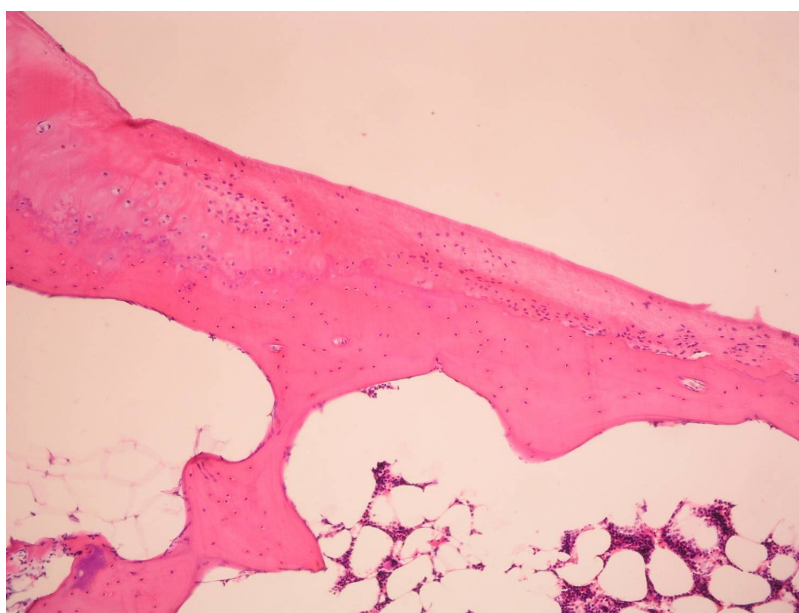
Obr. 71 – Vzorek kloubní chrupavky z posttraumatického defektu distální části femuru . Chrupavková tkáň má převážně charakter chrupavky vazivové. HE, x100



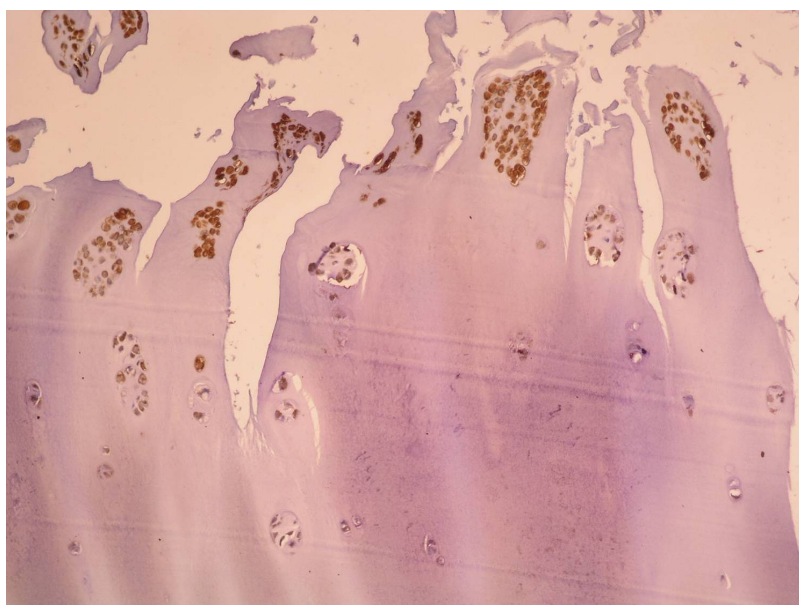
Obr. 72 – Chrupavková tkáň ze spodiny posttraumatického defektu obsahovala převážně aktin pozitivní chondrocyty. HE, x200



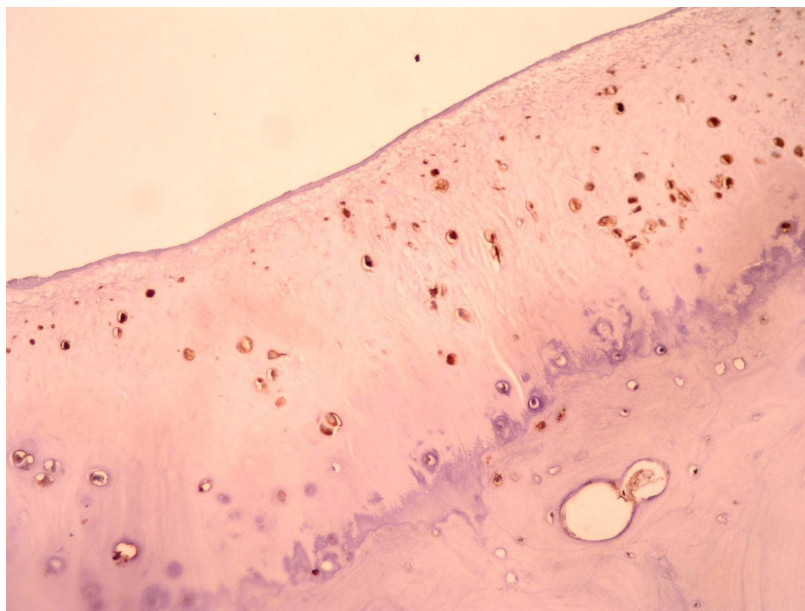
Obr. 73 – Chondrocyty z oblasti defektu současně vykazovaly pozitivitu S-100 proteinu. x100



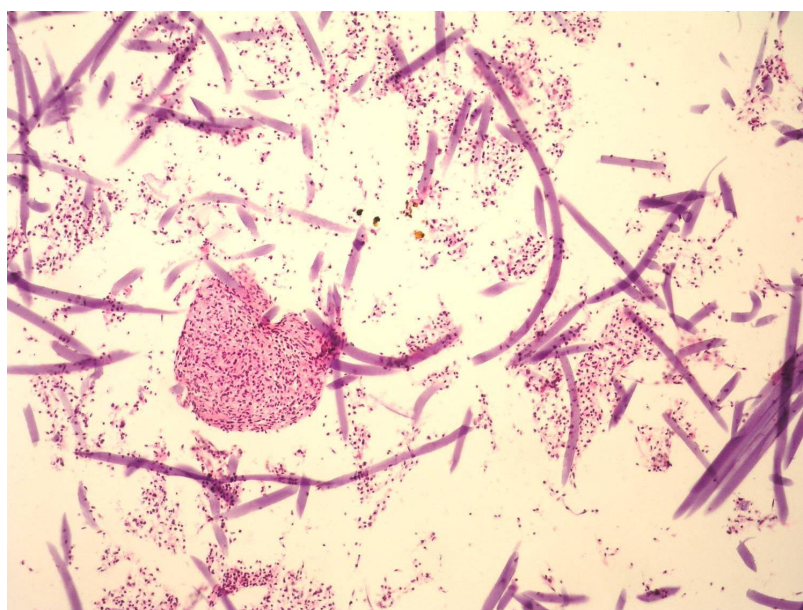
Obr. 74 – Výrazně zúžená vrstva kloubní chrupavky z artrotické hlavice femuru. HE, x100



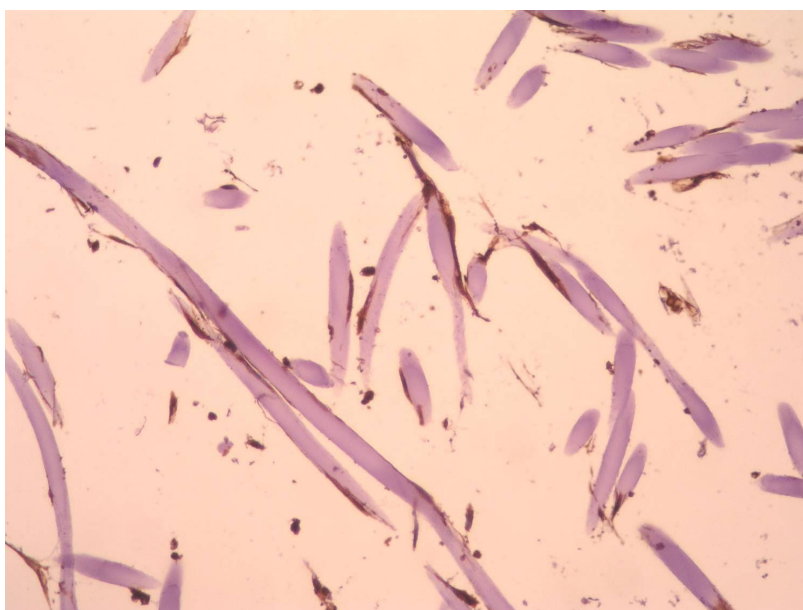
Obr. 75 – Aktin pozitivní chondrocyty z oblasti s tzv. klonální proliferací artrotické hlavice femuru. x200



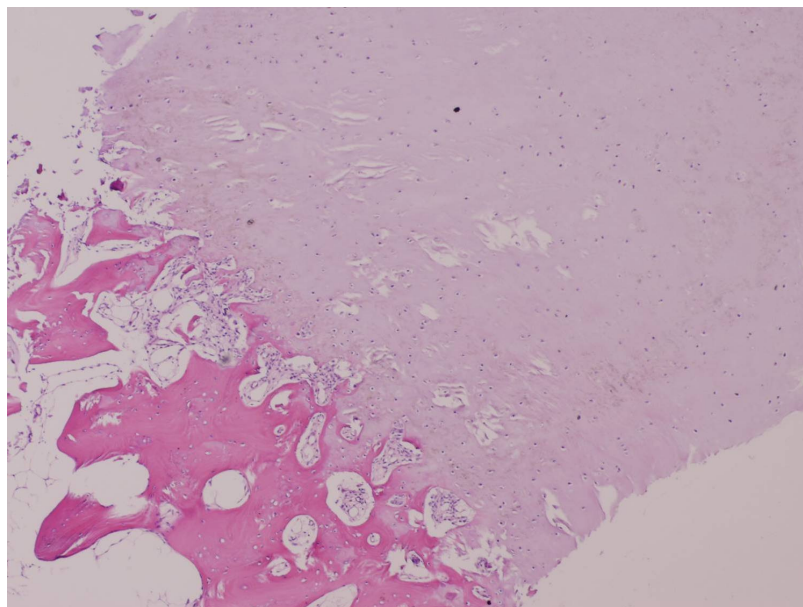
Obr. 76 – Chondrocyty z oblasti artroticky změněné hlavičky femuru vykazovaly z větší části pozitivitu α -SMA. x200



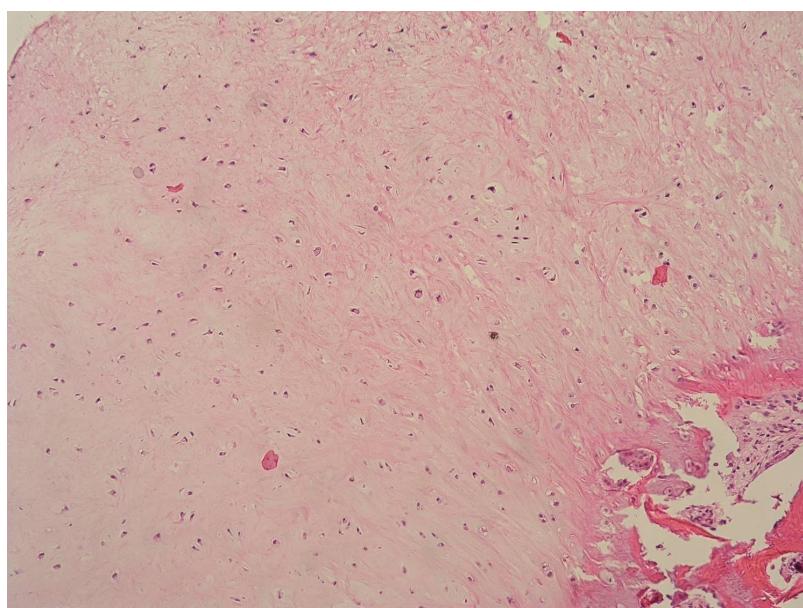
Obr. 77 – Tkáňová kultura italského původu v histologickém obraze. Mezi vlákny kyseliny hyaluronové jsou vretenité prekurzorové buňky. HE, x200



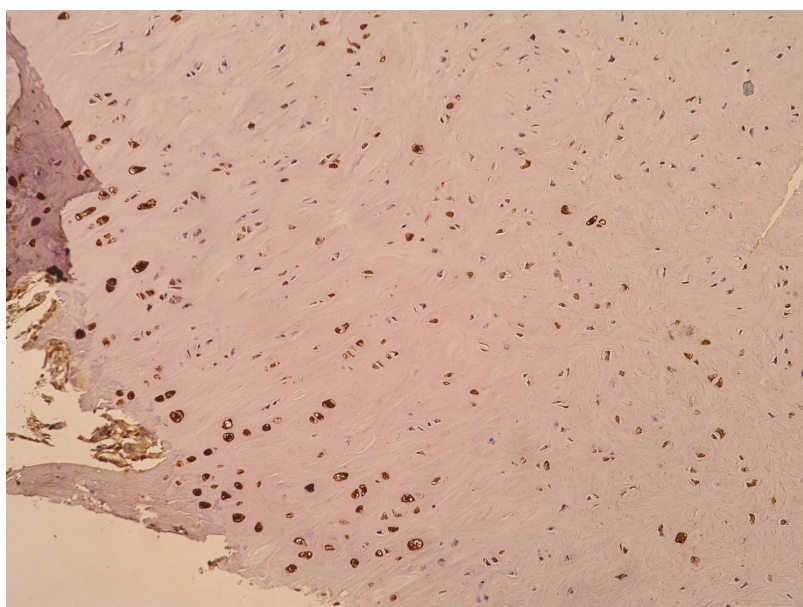
Obr. 78 – Buňky tkáňové kultury vykazovaly zřetelnou pozitivitu α -SMA. X400



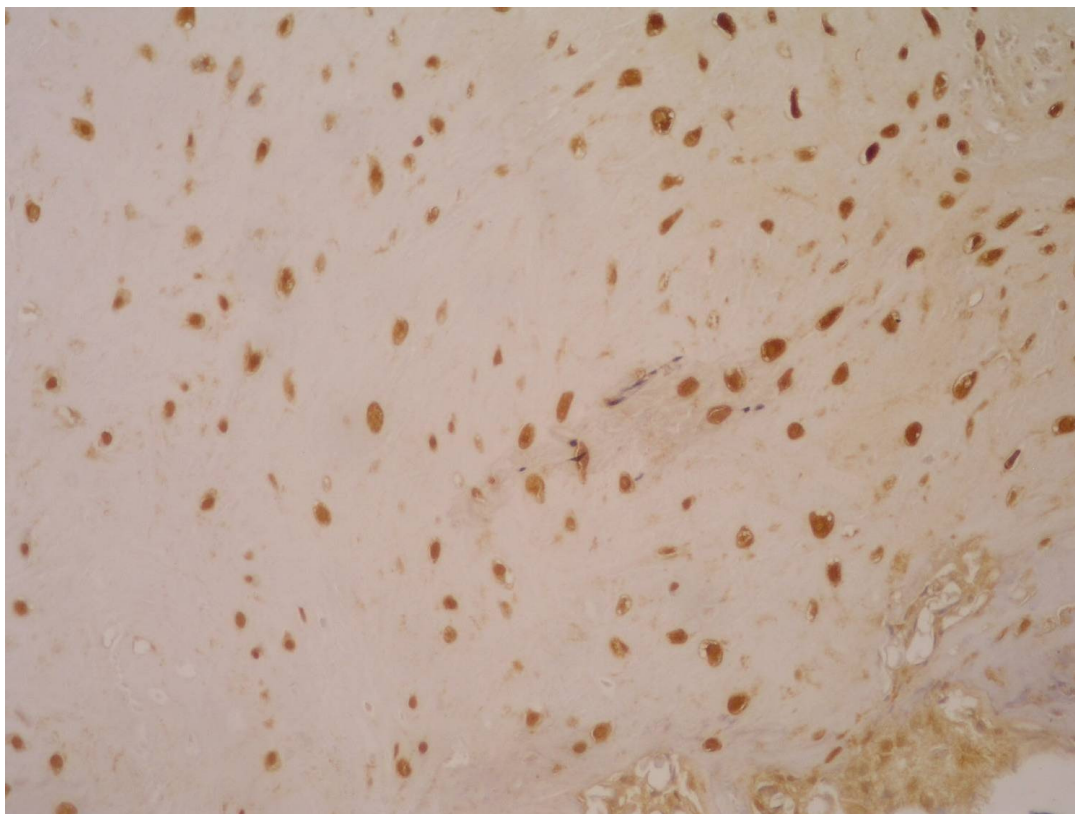
Obr. 79 – Bioptický vzorek nově narostlé kloubní chrupavky v místě transplantace autologní kultury chondrocytů. Kloubní chrupavka má převážně hyalinní charakter. x40



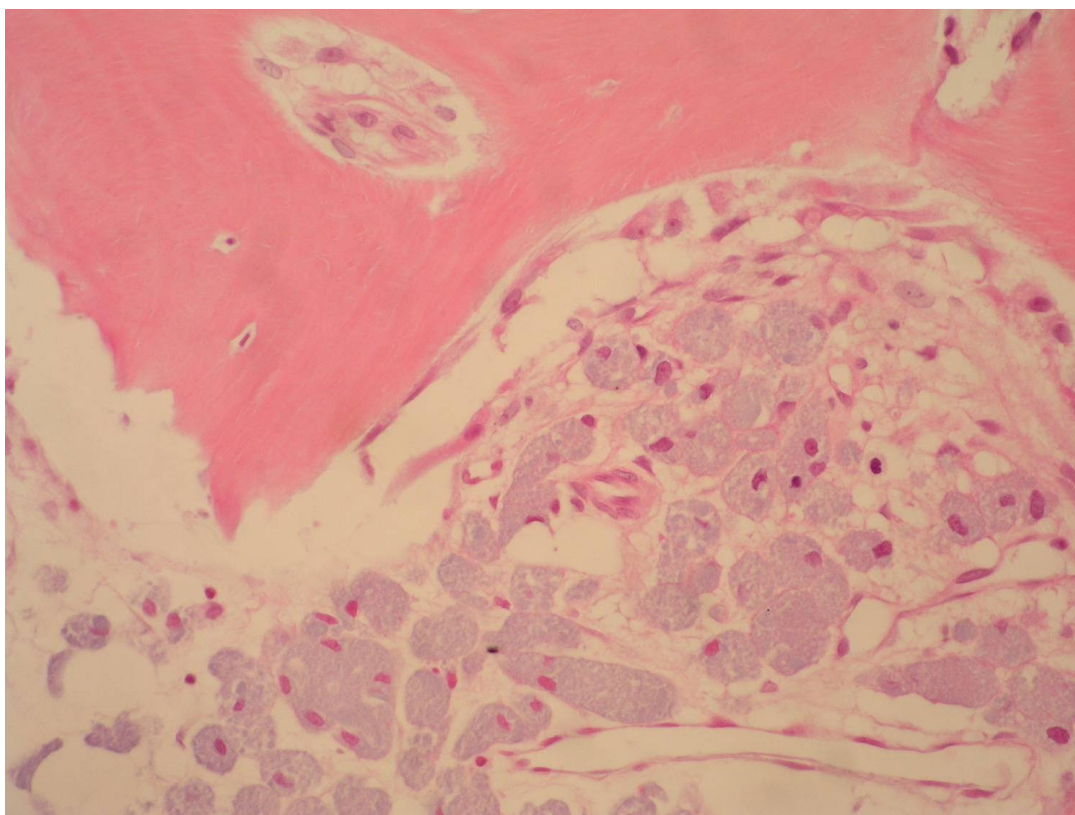
Obr. 80 – Bioptický vzorek nově narostlé kloubní chrupavky v místě defektu po transplantaci v detailu. HE, x100



Obr. 81 – Chondrocyty nově narostlé kloubní chrupavky po transplantaci vykazovaly zřetelnou pozitivitu α -SMA. x100



Obr. 82 – Chondrocyty nově narostlé kloubní chrupavky po transplantaci vykazovaly zřetelnou pozitivitu S-100 proteinu, x200



Obr. 83 – Skupina makrofágů v intertrabekulárních prostorech subchondrální kosti v místě transplantace. V jejich cytoplasmě je namodralý materiál pravděpodobně představující rezidua kyseliny hyaluronové pocházející z nosiče. HE, x400

