

Katarzyna DZIEDZIC¹
Mateusz ZALEWSKI²
Artur GĄDEK²
Justyna DRUKAŁA¹

Zastosowanie chondrocytów w medycynie regeneracyjnej

Chondrocytes application in regenerative medicine

¹Pracownia Inżynierii Komórkowej i Tkankowej Zakładu Biologii Komórki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii i Małopolskie Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego
Kierownik:
Dr hab. Justyna Drukała

²Oddział Kliniczny Ortopedii i Rehabilitacji, Szpital Uniwersytecki w Krakowie
Kierownik:
Dr Artur Gądek

Dodatkowe słowa kluczowe:

chondrocyty
mezenchymalne komórki macierzyste
inżynieria tkankowa
medycyna regeneracyjna

Additional key words:

chondrocytes
mesenchymal stem cells
tissue engineering
regenerative medicine

Rekonstrukcja tkanki chrzęstnej jest ważnym przedsięwzięciem inżynierii tkankowej, podejmowanym ze względu na wysoką częstotliwość uszkodzeń oraz jej bardzo ograniczone zdolności regeneracyjne. Najstarsze, najczęściej stosowane techniki to abrazja i mikrozlamania mające na celu pobudzenie regeneracji tkanki. Najnowsze metody to implantacja autologicznych chondrocytów oraz bardziej zaawansowana implantacja autologicznych chondrocytów powiązanych z macierzą. Proces izolacji i hodowli komórek chrzęstnych jest skomplikowany ze względu na zjawisko utraty fenotypu przez chondrocyty spowodowane niską aktywnością proliferacyjną i wysokim stopniem odróżnicowywania się komórek. Innym podejściem jest pozyskiwanie mezenchymalnych komórek macierzystych z różnych źródeł (m.in. ze szpiku kostnego, okostnej i błony maziowej) i ich różnicowanie w chondrocyty.

Cartilage reconstruction is a crucial issue for tissue engineering because of high damage frequency in connection with low regenerative capacity. Microfractures and shaving are the oldest and most commonly used practices. The newest techniques are: Autologous Chondrocyte Implantation, Matrix Associated Chondrocytes Implantation and their derivatives. Dedifferentiation of chondrocytes due to low proliferation rate and phenotype loss makes isolation and in vitro culture of normal human chondrocytes very complex. Therefore, obtaining mesenchymal stem cells from various sources and differentiating them into chondrocytes is another interesting approach.

Chrzęstka to rodzaj tkanki łącznej wyjątkowo narażonej na uszkodzenia mechaniczne. Składa się z komórek chrzęstnych (chondrocytów) i macierzy zewnątrzkomórkowej bogatej w proteoglikany, które warunkują jej własności mechanofizyczne [1]. Jest ona jednym z głównych celów inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej, ze względu na wysoką częstość urazów, szczególnie chrząstki stawowej, jak również chorób degeneracyjnych postępujących wraz z wiekiem (chondromalacja) bądź związanych z reakcjami autoimmunologicznymi. Bardzo ograniczona zdolność tej tkanki do regeneracji stanowi od wielu lat wyzwanie dla badaczy [2]. Długotrwała hodowla, której poddawane są komórki pobrane i wyizolowane z biopsji od pacjenta ma wpływ przede wszystkim na ich fenotyp. Chondrocyty zmieniają profil różnicowania w kierunku komórek fibroblastopodobnych lub ulegają hipertrofii [3]. Wiąże się to między innymi ze stopniowym obniżeniem syntezy składników macierzy zewnątrzkomórkowej przez komórki, które umieszczone są w nie naturalnym dla siebie otoczeniu [4]. Podawanie pacjentom komórek o niewłaściwym fenotypie powoduje złą integrację z tkanką i zwłóknienia w obrębie ubytku prowadzące do zwiększonej częstotliwości złamań i szybszego powstawania urazów [5].

nej o odmiennej organizacji budowy: szklistą, włóknistą i sprężystą, różniące się między sobą proporcją masy macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *Extracellular Matrix*) do liczby komórek, jak również ich wzajemnym rozmieszczeniem [4]. W organizmie człowieka dominującą tkanką chrzęstną jest chrząstka szklista, pokrywająca powierzchnie stawowe. Chrzęstka stawowa ma budowę warstwową, definiowaną na podstawie kształtu komórek i ich wzajemnego położenia [6]. Warstwa powierzchniowa jest bogata w komórki przypominające fibroblasty, poniżej znajduje się warstwa pośrednia z chondrocytami właściwymi, z której izoluje się komórki do hodowli, oraz najgłębsza warstwa w miejscu przechodzenia chrząstki w kość, zawierająca zwapniałe komórki chrzęstne. Główną funkcją chondrocytów jest produkcja składników ECM – białek i proteoglikanów. Skład i budowa macierzy mają istotny wpływ na właściwości tej tkanki. Wśród białek macierzy wyróżniamy kolageny, a spośród nich na szczególną uwagę zasługuje kolagen typu II, charakterystyczny dla tkanki chrzęstnej. Proteoglikany stanowią nawet 40 % jej suchej masy. Są to glikozaminoglikany (siarczan chondroityny A i C oraz siarczan keratanu) kowalencyjnie związane z rdzeniem białkowym [7]. Większość z nich ma zdolność do tworzenia kompleksów, a także do niekowalencyjnego łączenia z kwasem hialuronowym dzięki globularnej domenie

Adres do korespondencji:

Dr hab. Justyna Drukała
Pracownia Inżynierii Komórkowej i Tkankowej Zakładu Biologii Komórki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii i Małopolskie Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego
ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
Tel.: (12) 664 61 45
Fax: (12) 664 69 02
e-mail: justyna.drukała@uj.edu.pl

Charakterystyka tkanki chrzęstnej
Wyróżnia się trzy rodzaje tkanki chrzęst-

obecnej w rdzeniu białkowym. Głównym przedstawicielem proteoglikanów w chrząstce jest agrekan. Odporność chrząstki na odkształcenia mechaniczne jest uzależniona od obecności proteoglikanów posiadających usiarczanowane glikozaminoglikany, które mają zdolność do wiązania wody. Cecha ta decyduje o silnym uwodnieniu tkanki warunkując jej prawidłowe funkcjonowanie [1]. Wykorzystuje się ją również do oznaczania składników macierzy podczas barwienia błękitem alcjanu. Ze względu na gęste usiarczowanie macierzy przez kolagen i proteoglikany, chrząstka jest tkanką nieunaczynioną i nieunierwioną, co znacząco ogranicza jej zdolności regeneracyjne [8,9].

Potencjalne źródła komórek wykorzystywanych do regeneracji chrząstki

Komórki chrzęstne wywodzą się z mezo-dermalnego listka zarodkowego. Biorąc pod uwagę dobrze poznany i scharakteryzowany szlak chondrogenyzy, najszerzej wykorzystywanymi komórkami w celu usprawnienia regeneracji tej tkanki, obok chondrocytów izolowanych z biopsji tkanki chrzęstnej pacjenta, są mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs ang. Mesenchymal Stem Cells). Można je pozyskiwać z kilku źródeł. Najczęściej stosowane są MSCs pochodzące ze szpiku kostnego [10,11]. Wykazano ich wysoki potencjał różnicowania w kierunku chondrocytów, a ze względu na łatwość izolacji są najczęściej wykorzystywane do badań nad chondrogenezą [12]. MSCs mogą być izolowane także z okostnej, ochrzęstnej oraz błony maziowej. W badaniach porównujących zdolność do odtwarzania tkanki chrzęstnej prowadzonych na MSCs różnego pochodzenia, dowiedziono najlepszych właściwości MSCs izolowanych z błony maziowej [13].

Zjawisko odróżnicowania się chondrocytów izolowanych z tkanki chrzęstnej, prowadzące do utraty ich pierwotnego fenotypu jest jednym z największych problemów związanych z namnażaniem tych komórek *in vitro*. W tkance rezydują one po kilka w jamkach zagłębionych w macierzy zewnątrzkomórkowej. Liczba komórek przypadająca na 1 cm³ chrząstki jest niewielka, zatem również wydajność izolacji jest czynnikiem limitującym zastosowanie tej techniki na szeroką skalę [14]. W optymalizacji hodowli kluczowym okazał się właściwy dobór pożywki hodowlanej i układ przestrzenny komórek w hodowli. Wykazano, że komórki z natury słabo adherentne, hodowane w układzie dwuwymiarowym na podłożu polistyrenowym tracą swój prawidłowy fenotyp [15]. Najprostszym sposobem stworzenia komórkom trójwymiarowych warunków do wzrostu było umieszczanie ich w agarozie, tworzenie kultur peletowych i tzw. „mikromas” [16]. W tym celu wysiewano komórki na bloczki agarozowe, bądź poprzez wirowanie przy prędkości 120 – 500 g tworzone pelety komórkowe, które następnie inkubowano w 37°C (5% CO₂, 95% wilgotności) przez 48 godzin, a potem umieszczano na szalkach Petriego i hodowano w odpowiedniej pożywce [17]. Te pierwotne systemy trójwymiarowe sprawdziły się w wielu laboratoriach ze względu na ich prostotę, niski koszt uzyskania (bez użycia specjalistycz-

negu sprzętu) i stosunkowo dobre odwzorowanie warunków *in vivo*. Najważniejszymi czynnikami wyróżniającymi je od zwykłych hodowli w monowarstwie jest zapewnienie warunków hipoksji komórkom znajdującym się w centrum peletu, odzwierciedlenie gradientowej dystrybucji substancji odżywczych oraz uniemożliwienie przylegania komórek do ściany naczynia [3]. Ten ostatni czynnik ma duże znaczenie dla ekspresji niektórych receptorów powierzchniowych, w tym integrzyn, związanych z jednej strony z adhezją komórek, z drugiej z transdukcją sygnału [18,19]. W konsekwencji adhezja do podłoża ma wpływ m.in. na migrację komórek i ekspresję proteaz zaangażowanych w przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej, w celu dojrzewania i utrzymania fenotypu przez chondrocyty [20]. Umożliwia to zmianę architektury, udostępnianie zmagazynowanych w ECM czynników wzrostu i różnicowania oraz odsłanianie miejsc ich wiązania na komórkach [7]. Długotrwałe siły napięcia działające na chondrocyty stymulują je do produkcji związków katabolicznych, np. cytokin prozapalnych (IL-1) lub metaloproteaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP13), co bezpośrednio przekłada się na obniżoną syntezę kolagenu typu II. Badania japońskiej grupy potwierdziły, iż silne rozciągnięcie komórki powoduje wzmożoną ekspresję integrzyn i kinaz zależnych od adhezji, jak również aktywuje mechanozależne kanały wapniowe. Oba te czynniki sprzyjają utrzymaniu fibroblastopodobnego fenotypu komórek i wpływają hamująco na proces chondrogenyzy [18]. Wykazano również, że rozplaszczona na podłożu odróżnicowane ludzkie chondrocyty cechują się około 15-krotnie wyższym poziomem fosforylacji kinaz ERK (ang. Extracellular signal-Regulated Kinase), który koreluje ze wzrostem proliferacji i ograniczeniem syntezy kolagenu typu II [21]. Badania grupy prof. Takahashi potwierdziły, iż blokowanie integrzynozależnego kontaktu między komórką a macierzą zewnątrzkomórkową znacząco wspomaga proces chondrogenyzy. Doświadczenia prowadzone na różnicowanych chondrocytach sugerują, iż podczas nadmiernego przylegania komórek do podłoża zmianie ulega profil syntetyzowanego kolagenu z typu II na charakterystyczny dla fibroblastów typ I [15].

Kolejną generacją produktów wykorzystywanych do hodowli chondrocytów w układzie trójwymiarowym są różnego rodzaju kapsuły m.in. z alginianu, kopolimeru kwasu poli L-mlekowego i glikolowego (PLGA) [22]. Duże nadzieje pokłada się w strukturach utworzonych z kapp karagenu. Ten izolowany z krasnorostów polisacharyd jest bogaty w grupy siarczanowe, co upodabnia jego strukturę do macierzy chrzęstnej, a po drugie zwiększa jego hydrofilowy charakter. Tworzy się z niego hydrożele w formie płatów lub kapsuł, w których hodowane są komórki [23]. Popa i współpracownicy badali jego oddziaływanie z chondrocytami różnego pochodzenia (linii komórkowej, z przegrody nosowej i powstałych z ASC). Testy wykazały, że związek ten ma dużą zdolność do gromadzenia wody, pozwala na zachowanie przez komórki zdolności do podziałów, produkcji składników macierzy

zewnątrzkomórkowej oraz ekspresji markerów chondrocytarnych (kolagenu II, czynnika transkrypcyjnego SOX9 i agrekanu). Cechy te utrzymują się jednak do 14 dni w hodowli *in vitro*. Rozwiązanie to ma duży potencjał aplikacyjny, gdyż nałożenie płatka bądź kapsuły z komórkami ułatwia ich adhezję do miejsca ubytku [23]. W badaniach przeprowadzonych przez Caron i współpracowników porównano hodowlę dwuwymiarową na podłożu polistyrenowym z najprostszymi układami trójwymiarowymi, kulturą peletową i hodowlą w kulkach alginianowych [3]. Analiza tempa wzrostu, zdolności syntezy składników macierzy (kolagen II, GAG) oraz ekspresji markerów chondrocytów prawidłowych (m.in. SOX9) i hipertroficznym (COL10A1 i RUNX2) wykazała, że układ 3D ogranicza tempo proliferacji komórek i hipertrofię przy równoczesnym zachowaniu ich prawidłowego fenotypu. Rozwiązania dotyczące hodowli 3D opierają się m.in. na technologii tzw. „cell-sheet”, która polega na nieenzymatycznym odrywaniu arkuszy komórek (dzięki zastosowaniu układu nieadherentnych naczyń i płyt stopniowo obniżających temperaturę) i ich późniejszym składaniu w 3 – 5 warstwowe konstrukty 3D wszczepiane w miejsce ubytku. Ta technologia, testowana na modelach mysim i psim, powiązana ze stymulacją komórek związkiem TD-198946, który jest induktorem tworzenia chrzęstnej macierzy zewnątrzkomórkowej, okazała się skuteczna i bardzo obiecująca [24].

Ze względu na wysokie koszty procedur z wykorzystaniem komórek i nośników, długi czas potrzebny do wyhodowania odpowiedniej liczby komórek oraz komplikacje związane z pobraniem materiału do hodowli, proponuje się także inne podejście, w którym nie wykorzystuje się komórek, a jedynie żelowe arkusze kolagenu I [20]. Metoda ta zakłada zdolność migracyjną komórek chrzęstnych i kompatybilność żeli kolagenowych z ECM chrząstki. Próba kliniczna z wykorzystaniem tej procedury, przeprowadzona na 15 pacjentach wykazała całkowitą integrację wprowadzonego nośnika z otaczającą tkanką oraz zasiedlenie go przez chondrocyty, co monitorowano nieinwazyjnym obrazowaniem metodą rezonansu magnetycznego (MRI, ang. Magnetic Resonance Imaging) [25]. Brakuje jednak długotrwałego monitorowania stanu pacjenta w celu wykrycia ewentualnego wytworzenia przez implant chrząstki włóknistej, a co za tym idzie wzrostu ryzyka dalszych urazów mechanicznych, jednak sam kierunek wydaje się być interesujący.

Badacze sięgali po różne tkanki, m.in. tkankę kostną próbując wykorzystać ją jako stymulator chondrogenyzy, jednak efekt był niezadowolający [26]. Badania przeprowadzone w 2002 r. wykazały wysoką zdolność chondrocytów izolowanych z przegrody nosowej do produkcji składników ECM [9]. Obecnie uważa się jednak, że wykorzystywanie komórek wywodzących się z chrząstki sprężystej na powierzchniach stawowych jest niebezpieczne ze względu na możliwość przywrócenia ich pierwotnego fenotypu. Przeprowadzono również szereg badań z wykorzystaniem multipotencjalnych komórek macierzystych wyizolowanych z

tkanki tłuszczowej. Mogą one różnicować się w komórki prekursorowe wspólne dla osteocytów i chondrocytów, które pod wpływem SOX9 dają początek chondrocytom, a pod wpływem m.in. RUNX2 osteocytom [27]. Komórki uzyskiwane z tkanki tłuszczowej mają kilka podstawowych zalet, są łatwo dostępne w dużej liczbie, ich pozyskiwanie nie stwarza dodatkowego ryzyka (nie narusza się uszkodzonej już tkanki), a ich właściwości nie odbiegają od MSCs pozyskiwanych ze szpiku kostnego [28]. Stwierdzono, że kokultura komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej (ASC, ang. *Adipose derived Stem Cells*,) z chondrocytami powoduje przyspieszenie tempa proliferacji komórek chrzęstnych oraz stymuluje formowanie ECM. Ponadto dowiedziano, że ASC izolowane z podrzępkowego fałdu tłuszczowego mają zdolność do dłuższego utrzymywania fenotypu w hodowli *in vitro* niż chondrocyty [29].

Udział czynników wzrostu w proliferacji chondrocytów i utrzymaniu ich fenotypu

Głównymi czynnikami wzrostu wykorzystywanymi w hodowli chondrocytów są te cząstki sygnałowe, które uczestniczą w procesie chondrogenезы, między innymi TGF- β 1, TGF- β 3, BMP 2, BMP 4, BMP 7, IGF oraz bFGF [30,31]. Stosuje się je nie tylko w celu indukcji różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych w kierunku chondrocytów, ale również w celu utrzymania fenotypu komórek [14]. Zarówno TGF- β 1 jak i BMP-2 indukują produkcję kolagenu II *in vitro*. Ponadto BMP-2 wykazuje zdolność do wspomagania procesu różnicowania komórek chrzęstnych odróżnionych w trakcie hodowli *in vitro* [30].

Ubytki chrząstki i sposoby ich leczenia

Badania epidemiologiczne wskazują, że uszkodzenia tkanki chrzęstnej stanowią bardzo poważny problem i jedną z najczęściej występujących dolegliwości związanych z układem narządu ruchu. Zgodnie z danymi opublikowanymi w 2011 r. przez Główny Urząd Statystyczny na zapalenie kości i stawów cierpi 11% badanych, z kolei na reumatoidalne zapalenie stawów ponad 8%.

Wyróżnia się trzy stopnie urazów chrząstki stawowej:

- uszkodzenie powierzchni stawowej niewpływające na mechanikę stawu,
- mechaniczne uszkodzenie ograniczające się do części chrzęstnej,
- mechaniczne uszkodzenie obejmujące zarówno część chrzęstną jak i kostną stawu.

Urazy chrząstki następują w wyniku kontuzji, a następnie odłamania fragmentu chrząstki lub na skutek stanu patologicznego (chondromalacja lub reumatoidalne zapalenie stawów, zespół przedwczesnego zużywania się chrząstki stawowej), nasilają się z wiekiem, w związku ze wzmożoną aktywnością procesów degeneracyjnych prowadzących do mikrozłamań [32]. Wszystkie wymienione jednostki chorobowe wywołują znaczne pogorszenie jakości życia pacjenta, a głównym ich objawem klinicznym są dolegliwości bólowe i ograniczenie zakresu ruchów w dotkniętym chorobą stawie.

Ubytki chrząstki próbowano leczyć na wiele sposobów. Jedną z pierwszych metod było opracowane w 1941 roku przez Magnussona usunięcie elementów drażniących (ang. *debridement*), bardziej w celu zahamowania rozwoju choroby niż jej wyleczenia [2]. Krótką charakterystykę najważniejszych metod zebrano w Tab. I.

W ciągu ostatnich dwudziestu lat istotnie poszerzył się zakres możliwości odbudowywania chrząstki. Zaawansowane metody inżynierii tkankowej cechuje jednak różna skuteczność, a wciąż najpowszechniej stosowaną metodą pozostaje mikrozlamanie lub nawiercanie warstwy podchrzęstnej w miejscu ubytku. Jest to zabieg jednoetapowy i może być wykonany podczas artroskopii po usunięciu zbędnych fragmentów tkanki chrzęstnej. W wytworzonej łozie wykonuje się otwory penetrujące tkankę podchrzęstną za pomocą sztydła artroskopowego (ang. *chondro-peak*). Należy zwrócić uwagę, aby otwory oddalone były od siebie o kilka milimetrów i miały odpowiednią głębokość (sygnalizowane jest to przez wypływ kropli tłuszczowych z wytworzonych kanalików). Pozwala to na dostęp nieodróżnionych komórek macierzystych szpiku, które migru-

ją do miejsca uszkodzenia i uczestniczą w regeneracji ubytku przez odtworzenie niepełnowartościowej chrząstki włóknistej lub szklistopodobnej. Wstępne wyniki leczenia są zwykle dobre, natomiast długoterminowe są niezadowolające [33].

Metodą nowej generacji, rozwiniętą w obszarze inżynierii tkankowej, jest implantacja autologicznych chondrocytów (ang. *ACI, Autologous Chondrocyte Implantation*, Tabela I). Podczas pierwszego zabiegu pobierana jest chrząstka z obszaru niedotkniętego chorobą, z której następnie izoluje się komórki i namnaża w warunkach *in vitro*. Po upływie ok. 3 tygodni komórki implantuje się w miejscu urazu i pokrywa płatkami okostnej, który najczęściej pochodzi z kości piszczelowej. Wyniki badań klinicznych są obiecujące, jednak ingerencja w kość piszczelową, jak i późniejsze wszycie okostnej w zdrową chrząstkę powodują, że z klinicznego punktu widzenia metoda ta wydaje się zbyt inwazyjna. Zadowolająca ocena kliniczna pacjentów dotycząca odczuwania dolegliwości bólowych i powiększenia zakresu ruchów przemawia jednak za jej zastosowaniem. Z meta-analizy przeprowadzonej na Uniwersytecie Wiedeńskim wynika, że biorąc pod uwagę pięcioletni okres badań ACI jest procedurą znacznie skuteczniejszą od mikrozłamań. Autorzy jednakże zwracają uwagę na fakt, że różnica ta zaciera się wraz z upływem czasu [34]. W literaturze spotkać można opisy badań długoterminowych, gdzie po upływie dziesięciu lat 75% pacjentów poddanych testom zgłosiło znaczącą poprawę i zniesienie objawów klinicznych uszkodzenia chrząstki. Wyniki podobnych badań zostały zaprezentowane m.in. w Miami podczas 8 Światowego Kongresu ICRS w 2009r [35]. Metoda ACI została zastosowana w grupie dwustu dwudziestu czterech pacjentów. Ocena przeprowadzona na podstawie skali Lysholma, Tegner'a-Wallgreen'a i Brittberg'a-Petersona (Tab. II). Pierwsza kontrola po 3 latach wykazała znaczną poprawę u badanych w odniesieniu do wszystkich trzech skali, wskazując poprawę funkcji kolana co przekłada się na możliwość zwiększenia aktywności fizycznej. Analiza wyników powtórnej kontroli

Tabela I

Trzy generacje leczenia ubytków tkanki chrzęstnej.

Three generations of cartilage lesions treatment.

Rodzaj metody	Nazwa metody	Opis
tradycyjna	debridement, abrazje, mikrozlamania	Techniki chirurgiczne opierające się na usunięciu zbędnych i podrażniających fragmentów tkanki (<i>debridement</i>) bądź mające na celu pobudzenie regeneracji poprzez wypływ szpiku kostnego do miejsca urazu. W 80% przypadków w grupie 59 pacjentów zaobserwowano w ciągu 7-17 lat dobre i satysfakcjonujące wyniki [46].
I generacji	ACI (ang. <i>Autologous Chondrocytes Implantation</i>) ACI-C, CACI (ang. <i>Autologous Chondrocytes Implantation with Collagen</i>)	Metoda zaproponowana w 1994 przez Brittberg'a polegała na pobraniu materiału z miejsc nieobciążonych, wyizolowania i rozhodowania a następnie aplikacji autologicznych chondrocytów w miejscu urazu z użyciem płatka okostnej [47],[48]. W technikach ACI-C i CACI zamiast płatka okostnej stosuje się dwuwarstwową błonę kolagenową [49]. Stanowi ona nie tylko podporę mechaniczną dla przeszczepu ale również aktywne rusztowanie stymulujące do wytwarzania składników ECM. Ocena kliniczna 24 miesiące po zabiegu była w 74% przypadków co najmniej dobra, jednak w niektórych po pewnym czasie doszło do przerostu [50].
II generacji	AMIC (ang. <i>Autologous Matrix Induced Chondrogenesis</i>)	Połączenie tradycyjnej techniki mikrozłamań z biomateriałami, m.in. podwójną błoną kolagenową Chondro-Guide®. Stwarza dla komórek macierzystych szpiku środowisko sprzyjające chondrogenезы [51].
III generacji	MACI (ang. <i>Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation</i>) MACT (ang. <i>Matrix Assisted Chondrocyte Transplantation</i>)	Metoda polega na implantacji autologicznych chondrocytów hodowanych <i>in vitro</i> w biomateriałowej macierzy. Mogą być one zbudowane np. z kwasu hialuronowego bądź jego pochodnych usieciowanych w struktury trójwymiarowe (HYALOGRAFT®) [52].

Tabela II

Skale oceny skuteczności leczenia ubytków tkanki chrzęstnej.

The scales of cartilage lesions treatment efficacy.

Nazwa skali	Zakres punktacji	Interpretacja	Uwagi
Lysholm	0-100	0-bardzo źle 100-bez dolegliwości	Kwestionariusz Ocena ruchomości Czy pacjent utyka? Czy musi chodzić o kulach? Czy kolano blokuje się podczas zgięcia/wyprostu? Czy pacjent ma uczucie uciekania kolana? (ang. „giving way”) Czy występują problemy z chodzeniem po schodach, robieniem przysiadów? Ocena bólu Czy występuje obrzęk?
Brittberg-Peterson	0-130	0-bardzo źle 130- bez dolegliwości	<u>Kwestionariusz</u> 13 pytań dotyczących poruszania się i bólu z tym związanego, ocenianych na podstawie wzrokowej skali analogicznej przez pacjenta, każde od 0-10 pkt.
Wallgren-Tegner	0-10	0-bardzo źle, pacjent nie może wykonywać pracy względu na dolegliwości 10-bardzo dobrze, pacjent uprawia sport zawodowo	<u>Kwestionariusz</u> Aktywność fizyczna pacjenta. 6-10 może osiągnąć tylko pacjent, który uprawia sport amatorsko bądź zawodowo
AOFAS (ang. American Orthopaedic Foot and Ankle Society)	0-100	0-bardzo źle 100-bez dolegliwości	<u>Kwestionariusz</u> Pod uwagę brana jest ocena bólu (0-40pkt.), funkcji stawu (0-50pkt.) i ustawienia stopy (0-10)
Cincinnati	0-100	0-bardzo źle 100-bez dolegliwości	<u>Kwestionariusz</u> 11-komponentów, w tym: ocena możliwości wykonywania czynności życia codziennego, uczestniczenia w sportach Badanie kliniczne chorego kolana Badanie rentgenowskie w celu oceny zmian zwyrodnieniowych
ICRS (ang. International Cartilage Repair Society)	0-100	0-bardzo źle 100- bardzo dobrze	<u>Kwestionariusz</u> Ocena aktywności fizycznej pacjenta <u>Badanie kliniczne</u> Badanie rentgenowskie i artroskopia w celu oceny zmian zwyrodnieniowych

po upływie około 13 lat od czasu zabiegu wykazała, iż stan ten utrzymał się bądź poprawił u 73% pacjentów w porównaniu do kontroli przeprowadzonej po upływie 3 lat. Świadczy to o wysokiej trwałości implantu i skuteczności zastosowanej metody. Ponadto 92% badanych deklaroowało chęć ponownego poddania się tej procedurze ze względu na znaczną poprawę stanu zdrowia [36]. Obiecujące wyniki leczenia opisywane są nie tylko dla tkanki chrzęstnej stawu kolanowego, ale także np. w uszkodzeniach powierzchni stawowej kości skokowej. Baums i współpracownicy opisali badanie, w którym dwunastu pacjentów z miejscowym głębokim ubytkiem chrząstki kości skokowej zostało poddanych procedurze ACI. Jako kryterium oceny leczenia przyjęto skalę AOFAS (Tab. II) i obrazowanie MRI. Po upływie 63 miesięcy średni wynik w skali AOFAS wyniósł 88,4 pkt w porównaniu do 43,5 pkt przed operacją. Pacjenci poddani procedurze zgłaszali zniesienie dolegliwości bólowych, a także zdecydowaną poprawę w funkcjonowaniu i ustawieniu stawu [37]. W analizie z użyciem MRI tylko w jednym przypadku stwierdzono brak regeneracji chrząstki. Na podstawie powyższych wyników badań można stwierdzić, iż metoda ta jest efektywna w leczeniu ubytków tkanki chrzęstnej. O jej skuteczności najlepiej świadczy fakt, iż sportowcy znajdujący się w grupie badanej, powrócili do czynnego uprawiania sportu. ACI zastosowano również w leczeniu pourazowego uszkodzenia powierzchni stawowej stawu łódzkiego-

to-promieniowego. Pomimo uszkodzenia penetrującego przez całą grubość chrząstki metoda okazała się skuteczna. Uzyskano pełny zakres ruchów, które nie powodowały bólu u pacjenta. Dodatkowo badanie rezonansem magnetycznym wykazało całkowitą integrację implantu z miejscem uszkodzenia [38].

Istotną modyfikacją metody ACI, eliminującą konieczność pobierania płytki okostnej z kości piszczelowej jest implantacja autologicznych chondrocytów z membraną kolagenową (ACI-C, ang. Autologous Chondrocyte Implantation – Collagen, Tabela I). Podobnie jak w pierwotnej technice (ACI) podczas pierwszego zabiegu pobierana jest zdrowa chrząstka stawowa, z której w warunkach laboratoryjnych namnażane są chondrocyty. Podczas drugiej operacji wyhodowane komórki wstrzykiwane są pod płatek, który zamiast z okostnej wykonany jest z dwuwarstwowej macierzy zbudowanej z kolagenu wieprzowego typu I/III. Gooding i współpracownicy porównali wyniki leczenia trzydziestu trzech pacjentów poddanych procedurze ACI z 35 pacjentami, u których wykonano ACI-C. Średnia wielkość powierzchni ubytku wynosiła 4,54cm². Jako kryterium oceny przyjęto wynik badania artroskopowego po upływie jednego roku oraz badanie kliniczne po dwóch latach od zabiegu. Podczas kontrolnej artroskopii, aż 36% pacjentów po ACI wymagało wygładzenia chrząstki (ang. *shaving*) ze względu na hipertrofię implantu, podczas gdy u pacjentów po ACI-C nie odnotowano takich zmian.

Po 24 miesiącach wynik badania klinicznego 74% pacjentów poddanych ACI-C określono jako bardzo dobry bądź dobry (znaczną poprawę ruchomości w dotkniętym chorobą stawie, brak ograniczenia przez ból). Rezultat leczenia pacjentów poddanych procedurze ACI po 2 latach obserwacji był podobny co wskazuje na zbliżoną skuteczność obu metod. Postuluje się jednak, aby zamiast okostnej używać błony kolagenowej do przykrywania ubytków [39].

Bardziej złożoną i również skuteczną, jednoetapową metodą leczenia ubytków tkanki chrzęstnej jest zastosowanie trójwymiarowej membrany kolagenowej (AMIC, ang. Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis), którą wkleja się nad ubytkiem po uprzednim wykonaniu mikroślazania (Tab. I). W tej metodzie unika się dodatkowego zabiegu, jakim jest pobranie zdrowej chrząstki do hodowli chondrocytów. Jako wieczko dla skrzepu wytwarzającego się po wykonaniu otworów używana jest dwuwarstwowa macierz zbudowana z kolagenu wieprzowego typu I/III. Wpływa to nie tylko na ograniczenie kosztów, ze względu na krótszy i jednorazowy pobyt w szpitalu, ale również zmniejsza ingerencję chirurgiczną w zdrową tkankę. Gille i współpracownicy przeprowadzili badanie, podczas którego zastosowano AMIC u dwudziestu siedmiu pacjentów. Średni okres od zabiegu do ponownej ewaluacji stanu pacjenta wyniósł 37 miesięcy. W ocenie skuteczności leczenia posłużono się pięcioma różnymi skalami (Meyera, Tegnera, Lysholma, Cincinnati i ICRS, Tabela

II). Średnia powierzchnia ubytku chrząstki wynosiła 4,2 cm² (1,3-8,8 cm²). Biorąc pod uwagę wyniki (87% bardzo zadowolonych pacjentów) i obrazy uzyskane za pomocą MRI wykazujące pełne wypełnienie ubytku w większości przypadków, dołączając brak zanotowanych skutków ubocznych, można stwierdzić, iż procedura AMIC jest efektywna i bezpieczna dla pacjenta. Próba przeprowadzona we Freiburgu przez Steinwachsa i Kreuza dotyczyła 63 chorych z pełnym ubytkiem chrząstki stawowej, u których zastosowano AMIC. Pacjenci zostali podzieleni na 3 grupy w zależności od lokalizacji uszkodzenia (kłykieć, bloczek, wewnętrzna powierzchnia rzepki). Do oceny posłużyły skale ICRS i Cincinnati, a także badanie rezonansem magnetycznym. Miejsce wytworzenia mikroślamań zostało pokryte macierzą kolagenową. Stan zdrowia pacjentów oceniany był trzykrotnie po zabiegu po upływie 6, 18 i 36 miesięcy. U znacznej większości, niezależnie od miejsca uszkodzenia, zaobserwowano poprawę jakości życia i zniesienie dolegliwości bólowych, a badanie kliniczne korelowało z poprawną odbudową tkanki uwidocznionej podczas badania MRI. U żadnego z pacjentów nie zaobserwowano przerostu chrząstki w miejscu wykonywania zabiegu.

Innym zaawansowanym produktem inżynierii tkanki chrzęstnej jest implantacja hodowanych *in vitro*, autologicznych chondrocytów na trójwymiarowej matrycy, którą stanowi np. kwas hialuronowy (Hyalograft) (MACI, ang. Matrix-induced Autologous Chondrocyte Implantation, Tab. I). W badaniu przeprowadzonym na uniwersytecie Zehjiang w Chinach zastosowano metodę MACI u siedmiu dorosłych pacjentów z miejscowymi ubytkami chrząstki w stawie kolanowym. Efekty oceniono po upływie roku na podstawie wywiadu klinicznego i MRI. U sześciu z siedmiu pacjentów w badaniu rezonansowym zaobserwowano praktycznie całkowite odtworzenie chrząstki w miejscu ubytku natomiast u wszystkich poprawę kliniczną. Zadowolające wyniki uzyskano zwłaszcza u tych pacjentów, u których ubytek wynosił powyżej 2 cm² [40]. W kolejnym badaniu przeprowadzonym na uniwersytecie w Wiedniu oceniono stan dwudziestu jeden pacjentów poddanych MACI. Wyniki były bardzo zadowolające, ponieważ u wszystkich badanych zaobserwowano znaczną poprawę zarówno w badaniu klinicznym jak i dobre wyniki odbudowy chrząstki bez skutków ubocznych [41].

Zastosowanie chondrocytów aplikowanych w macierz hialuronowej lub kolagenowej, bądź kapsuł z biomateriałów zawierających chondrocyty to z pewnością jedno z ciekawszych i bardzo obiecujących kierunków badań.

Innym, również bardzo interesującym podejściem do regeneracji tkanki chrzęstnej jest stosowanie osocza bogatopłytkowego, PRP (ang. Plasma Rich Platelets). Ze względu na niski koszt i łatwy sposób uzyskiwania osocza (po pobraniu krwi pełnej od pacjenta i dodaniu aktywatora próbka poddawana jest odwirowaniu, po którym otrzymujemy frakcję bogatopłytkową) metoda znajduje coraz szersze zastosowanie. Nadzieje związane są z faktem, iż tak przygotowany preparat

zawiera specyficzne czynniki wzrostu (np. TGFβ1, IGF-1) niezbędne do procesów regeneracyjnych chrząstki. Obecnie PRP używane jest jako augmentacja istniejących już metod typu mikroślamań czy MACI. Jednakże ze względu na relatywnie krótki czas od wynalezienia tej metody w literaturze światowej nie pojawiły się jeszcze przekonujące badania, które potwierdzałyby skuteczność PRP.

Zastosowanie mezenchymalnych komórek macierzystych w inżynierii tkanki chrzęstnej

W 2007 roku Kuroda i współautorzy opisali przypadek 31-letniego zawodnika judo, u którego zdiagnozowano ubytek wielkości 20 x 30 mm penetrujący przez całą grubość chrząstki w obszarze kłykcia udowego przyśrodkowego (IV stopień według skali ICRS). Zastosowano przeszczep autologicznych mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych ze szpiku kostnego i namnożonych *in vitro*. Komórki podano do ubytku zawieszone w żelu kolagenowym pokrywając je okostną. Po siedmiu miesiącach, podczas kontrolnej artroskopii zaobserwowano całkowitą odnowę chrząstki, jednak w badaniu histopatologicznym stwierdzono tkankę chrzęstną szklistopodobną, charakteryzującą się m.in. heterogenną macierzą wzbogaconą o włókna elastyczne [42]. Mezenchymalne komórki macierzyste już po dwóch tygodniach syntezują substancję międzykomórkową zawierającą kolagen typu II i proteoglikany. Po 6-8 tygodniach ubytek jest zapewniany komórkami podobnymi do chondrocytów i substancją międzykomórkową zawierającą kolageny typu I, II, proteoglikany i białka niekolagenowe. Mimo zbliżonej do pierwotnej chrząstki szklistej budowy histologicznej, tkanka chrzęstna szklistopodobna ma gorsze właściwości biomechaniczne, co w efekcie może powodować jej szybszą degradację i czyni ją niepełnowartościową [41, 34]. Po upływie roku objawy kliniczne uległy poprawie w stopniu pozwalającym pacjentowi powrócić do czynnego uprawiania sportu [42]. W tym samym czasie komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego przeszczepiono u trzech pacjentów w dziewięciu miejscach ubytku przechodzącego przez całą grubość tkanki chrzęstnej w stawie rzepkowo-udowym. Po upływie sześciu miesięcy od zabiegu transplantacji komórek macierzystych poprawę kliniczną zaobserwowano u wszystkich trzech. Stan ten utrzymał się podczas następnej kontroli, która przeprowadzona była po 17-27 miesiącach [43]. Nejadnik i współpracownicy podjęli się próby porównania efektywności przeszczepu macierzystych komórek mezenchymalnych z ACI. Badaniem objęto siedemdziesiąt dwie osoby (podzielono na 2 grupy). U wszystkich pacjentów w obrębie obu grup zaobserwowano poprawę stanu klinicznego, a wyniki uzyskane w obu grupach były podobne. Za zastosowaniem MSCs przemawia jednak fakt, że metoda ta wymaga tylko jednej operacji wykonywanej na obciążonym stawie w przeciwieństwie do ACI [44].

Również grupa prof. Giannini podjęła próbę leczenia zmian w chrząstce kości

skokowej z wykorzystaniem przeszczepu MSCs pochodzących ze szpiku kostnego. Zakwalifikowanych zostało 48 pacjentów w wieku 15 do 50 lat z ubytkiem o powierzchni powyżej 1,5 cm², penetrującym na głębokość większą niż 5 mm. Zagęszczenie pobranych komórek macierzystych w warunkach sali operacyjnej uzyskano za pomocą urządzenia Smart PReP. Tak przygotowany materiał był wszczepiany w miejscową zmianę w stawie skokowym z wykorzystaniem wcześniej przygotowanego rusztowania z kolagenu lub kwasu hialuronowego (w procesie estyfikacji kwasu hialuronowego powstaje podłoże dla mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego, które jednocześnie pobudza je do chondrogenyzy). Do oceny posłużyła skala AOFAS, badanie histologiczne i MRI. Kontrola wykonana po średnim okresie 24 miesięcy wykazała istotną poprawę z 64,4 do 91,4 w skali AOFAS (po upływie średnio 11 miesięcy 94% pacjentów powróciło do uprawiania sportu), histologicznie żadna nowopowstała chrząstka nie była w całości chrząstką szklistą, natomiast w badaniu MRI po 24 miesiącach zaobserwowano pełne wypełnienie ubytku u większości pacjentów [45].

Nowoczesne techniki zabiegów ortopedycznych połączone z osiągnięciami inżynierii tkankowej, wyznaczają nowe trendy w leczeniu i regeneracji uszkodzeń tkanki chrzęstnej. Mimo, iż w niektórych przypadkach brakuje długoterminowych wyników leczenia, to dotychczasowe osiągnięcia pozwalają twierdzić, iż metody te są coraz bardziej skuteczne. Znaczna poprawa komfortu życia, ustąpienie dolegliwości, poprawa zakresu ruchów to czynniki przemawiające za stosowaniem dostępnych technik regeneracji chrząstki stawowej.

Podsumowanie

Mimo dynamicznego rozwoju inżynierii tkankowej i skutecznego jej zastosowania w medycynie regeneracyjnej, leczenie ubytków chrząstki stawowej nadal pozostaje problematyczne. Optymalizacja rekonstrukcji tej tkanki z pełną kontrolą fenotypu komórek jest konieczna do uzyskania właściwych efektów leczenia. Również badania nad molekularnymi mechanizmami warunkującymi homeostazę tkanki chrzęstnej mogą dostarczyć ważnych wskazówek do skutecznego pobudzenia jej regeneracji i optymalnej rekonstrukcji *in vitro*.

Piśmiennictwo

1. Meyer U, Wiesmann HP: Bone and cartilage engineering. Springer - Verlag Merlin, Heisenberg; 2006; 2: 25-35.
2. Hunziker EB: Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. Osteoarthritis Cartilage. 2002; 10: 432-463.
3. Caron MMJ, Emans PJ, Coolen MME, Voss L, Surtel DAM. et al: Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. Osteoarthritis Cartilage. 2012; 20: 1170-1178.
4. Kuettner KE, Pauli BU, Gall G, Memoli V, Schenk RK: Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes *in vitro*. Isolation, culture characteristics, and morphology. J Cell Biol. 1982; 93: 743-750.
5. Temenoff JS, Mikos G: Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. Biomaterials 2000; 21: 431-440.

6. Karsenty G, Wagner EF: Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell*. 2002; 2: 389–406.
7. Behonick DJ, Werb Z: A bit of give and take: the relationship between the extracellular matrix and the developing chondrocyte. *Mech Dev*. 2003; 120: 1327–1336.
8. Ortega N, Behonick DJ, Werb Z: Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol*. 2004; 14: 86–93.
9. Kafienah W, Jakob M, Démarteau O, Frazer A, Barker MD, et al: Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes. *Tissue Eng*. 2002; 8: 817–826.
10. Mackay M, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, et al: Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng*. 1998; 4: 415–428.
11. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AL, et al: The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*. 1998; 80: 1745–1757.
12. Pountos I, Corscadden D, Emery P, Giannoudis PV: Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury* 2007; 38: 323–333.
13. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T: Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*. 2005; 52: 2521–2529.
14. Barbero A, Martin I: Human articular chondrocytes culture. *Methods Mol Med*. 2007; 140: 237–247.
15. Takahashi I, Onodera K, Sasano Y, Mizoguchi I, Bae JW, et al: Effect of stretching on gene expression of beta1 integrin and focal adhesion kinase and on chondrogenesis through cell-extracellular matrix interactions. *Eur J Cell Biol*. 2003; 82: 182–192.
16. Babur BK, Ghanavi P, Levett P, Lott WB, Klein T, et al: The interplay between chondrocyte redifferentiation pellet size and oxygen concentration. *PLoS One* 2013; 8: e58865.
17. Chen FH, Rausche KT, Tuan RS: Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006; 2: 373–382.
18. DeLise M, Fischer L, Tuan RS: Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage*. 2000; 8: 309–334.
19. Millward-Sadler SJ, Salter DM: Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction. *Ann Biomed Eng*. 2004; 32: 435–446.
20. Terrace C, Surgery D, Terrace C: Cell adhesion and proteoglycans. *J Cell Sci*. 1979; 88: 77–88.
21. Kim YH, Lee JW: Targeting of focal adhesion kinase by small interfering RNAs reduces chondrocyte redifferentiation capacity in alginate beads culture with type II collagen. *J Cell Physiol*. 2009; 218: 623–630.
22. Hwang NS, Varghese S, Elisseeff J: Derivation of chondrogenically-committed cells from human embryonic cells for cartilage tissue regeneration. *PLoS One* 2008; 3: 2498–2510.
23. Popa E, Reis R, Gomes M: Chondrogenic phenotype of different cells encapsulated in κ -carrageenan hydrogels for cartilage regeneration strategies. *Bio-technol Appl Biochem*. 2012; 59: 132–141.
24. Yano F, Hojo H, Ohba S, Saito T, Honnami M, et al: Cell-sheet technology combined with a thienoin-dazole derivative small compound TD-198946 for cartilage regeneration. *Biomaterials* 2013; 34: 5581–5587.
25. Efe T, Theisen C, Fuchs-Winkelmann S, Stein C, Getgood A, et al: Cell-free collagen type I matrix for repair of cartilage defects-clinical and magnetic resonance imaging results. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012; 20: 1915–1922.
26. Dai J, Wang J, Lu J, Zou D, Sun H, et al: The effect of co-culturing costal chondrocytes and dental pulp stem cells combined with exogenous FGF9 protein on chondrogenesis and ossification in engineered cartilage. *Biomaterials* 2012; 33: 7699–7711.
27. Lin Y, Luo E, Chen X, Liu L, Qiao J, et al: Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *JCMM*. 2005; 9: 929–939.
28. Wu L, Cai X, Zhang S, Karperien M, Lin Y: Regeneration of articular cartilage by adipose tissue derived mesenchymal stem cells: Perspectives from stem cell biology and molecular medicine. *J Cell Physiol*. 2013; 228: 938–944.
29. English A, Jones E, Corscadden D, Henshaw K, Chapman T, et al: A comparative assessment of cartilage and joint fat pad as a potential source of cells for autologous therapy development in knee osteoarthritis. *Rheumatology* 2007; 46: 1676–1683.
30. Freyria AM, Mallein-Gerin F: Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors. *Injury* 2012; 43: 259–265.
31. Miljkovic ND, Cooper GM, Marra KG: Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008; 16: 1121–1130.
32. Aigner T, Söder S, Gebhard PM, McAlinden A, Haag J: Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis—structure, chaos and senescence. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007; 3: 391–399.
33. Marciniak W, Szulc A: Wiktor Degi Ortopedia i Rehabilitacja. PZWL. Warszawa 2008; 2: 294–299.
34. Negrin LL, Vécsei V: Do meta-analyses reveal time-dependent differences between the clinical outcomes achieved by microfracture and autologous chondrocyte implantation in the treatment of cartilage defects of the knee? *J Orthop Sci*. 2013; 18: 940–948.
35. Steinwachs M, Kreuz PC: Autologous chondrocyte implantation: 10–20 years follow-up. *Arthroscopy* 2007; 23: 381–387.
36. Minas T, Von Keudell A, Bryant T, Gomoll AH: The John Insall Award: A minimum 10-year outcome study of autologous chondrocyte implantation. *Clin Orthop Relat Res*. 2013; 472: 41–51.
37. Baums MH, Heidrich G, Schultz W, Steckel H, Kahl E, et al: Autologous chondrocyte transplantation for treating cartilage defects of the talus. *J Bone Joint Surg Am*. 2006; 88: 303–308.
38. Medved F, Gonser P, Lotter O, Albrecht D, Amr A, et al: Severe posttraumatic radiocarpal cartilage damage: first report of autologous chondrocyte implantation. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2013; 133: 1469–1475.
39. Gooding CR, Bartlett W, Bentley G, Skinner J, Carrington R, et al: A prospective, randomised study comparing two techniques of autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects in the knee: Periosteum covered versus type I/III collagen covered. *Knee* 2006; 13: 203–210.
40. Dai X, Cai Y: Matrix-induced autologous chondrocyte implantation addressing focal chondral defect in adolescent knee. *Chin Med J (Engl)*. 2012; 125: 4130–4133.
41. Marlovits S, Aldrian S, Wondrasch B, Zak L, Albrecht C, et al: Clinical and radiological outcomes 5 years after matrix-induced autologous chondrocyte implantation in patients with symptomatic, traumatic chondral defects. *Am J Sports Med*. 2012; 40: 2273–2280.
42. Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, et al: Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007; 15: 226–231.
43. Wakitani S, Nawata M, Tensho K, Okabe T, Machida H, Ohgushi H: Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007; 1: 74–79.
44. Nejadnik H, Hui JH, Feng Choong EP, Tai BC, Lee EH: Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am J Sports Med*. 2010; 38: 1110–1116.
45. Giannini S, Buda R, Vannini F, Cavallo M, Grigolo B: One-step bone marrow-derived cell transplantation in talar osteochondral lesions. *Clin Orthop Relat Res*. 2009; 467: 3307–3320.
46. Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, et al: Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy* 2003; 19: 477–484.
47. Brittberg M: Autologous chondrocyte transplantation. *Clin Orthop Relat Res*. 1999; 26: 123–129.
48. Rodríguez-Merchán E: The treatment of cartilage defects in the knee joint: microfracture, mosaicplasty, and autologous chondrocyte implantation. *Am J Orthop*. 2012; 41: 236–239.
49. Filardo G, Kon E, Di Martino A, Patella S, Altadonna G, et al: Second-generation arthroscopic autologous chondrocyte implantation for the treatment of degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sport Traumatol Arthrosc*. 2011; 20: 1704–1713.
50. Filardo G, Kon E, Berruto M, Di Martino A, Patella S, et al: Arthroscopic second generation autologous chondrocytes implantation associated with bone grafting for the treatment of knee osteochondritis dissecans: Results at 6years. *Knee* 2011; 19: 658–663.
51. Zhou G, Liu W, Cui L, Wang X, Liu T, Cao Y: Repair of porcine articular osteochondral defects in non-weightbearing areas with autologous bone marrow stromal cells. *Tissue Eng*. 2006; 12: 3209–3221.
52. Marcacci M, Berruto M, Brocchetta D, Delcogliano A, Ghinelli D, et al: Articular Cartilage Engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results. *Clin Orthop Relat Res*. 2005; 435: 96–105.