

# Tkivno inženirstvo pri zdravljenju hrustančnih poškodb

Tissue engineering in the treatment of cartilage lesions

Jakob Naranđa, Matjaž Vogrin

Univerzitetni klinični center (UKC) Maribor, Oddelek za ortopedijo, Ljubljanska 5, 2000 Maribor

## Korespondenca/ Correspondence:

Jakob Naranđa  
Zagernikova ulica 9,  
2000 Maribor  
e: jaka\_naranda@yahoo.com  
t: 031/387-160

## Ključne besede:

regeneracija hrustanca in hondrogeneza, tkivno inženirstvo, celični nosilci, rastni faktorji (RF), zarodne celice, bioreaktorji

## Key words:

cartilage regeneration and chondrogenesis, tissue engineering, scaffolds (cell carriers), growth factors (GF), stem cells, bioreactors

## Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2013;  
82: 686-94

Prispelo: 18. okt. 2012,  
Sprejeto: 22. jul. 2013

## Izvleček

**Izhodišča:** Sklepni hrustanec ima zmanjšano intrinzično sposobnost celjenja, zato je zdravljenje hrustančnih poškodb še vedno velik izziv v ortopedski kirurgiji. Regenerativne oblike zdravljenja, kot je implantacija avtolognih hrustančnih celic (ACI – Autologous Chondrocyte Implantation), je obetavna možnost pri zdravljenju sklepnega hrustanca, saj omogoča obnovo hialinega hrustanca. Nasprotno pa tradicionalna tehnika zdravljenja (npr.: stimulacija kostnega mozga – mikrofrakturiranje) spodbuja nastajanje fibrinsko-hrustančnega tkiva z drugačnimi biomehanskimi značilnostmi in slabšimi kliničnimi rezultati. Tehnika ACI je doživela številne dosežke in se stalno izboljšuje. Nov koncept pri ohranjanju hrustančnega tkiva uporablja tehnologijo tkivnega inženirstva, pri katerem kombiniramo nove biomateriale kot celične nosilce, dajemo rastne faktorje, uporabljamo mezenhimske matične celice in mehansko stimulacijo. Nedavni razvoj novih generacij ACI uporablja hrustancu podobno tkivo v 3-dimenzionalni kulturi, ki je zasnovano na uporabi biorazgradljivega materiala in služi kot začasen celični nosilec za *in vitro* gojenje ter omogoča kasnejšo implantacijo na mestu hrustančne poškodbe. V klinični praksi so zelo obetavne enostopenjske metode, saj zmanjšajo stroške in obolevnost bolnikov. Moderni koncept tkivnega inženirstva omogoča tvorbo hialinega hrustanca in nudi možnost trajne ozdravitve hrustančne poškodbe.

**Zaključki:** Pregledni članek obravnava novosti pri zdravljenju sklepnega hrustanca in zajema moderne vidike tkivnega inženirstva z uporabo biomaterialov, rastnih faktorjev, mezenhimskih matičnih celic in bioreaktorjev ter predstavlja možnosti za klinično uporabo.

## Abstract

**Background:** Articular cartilage lesions with the inherent limited healing potential are difficult to treat and thus remain a challenging problem for orthopaedic surgeons. Regenerative treatment techniques, such as autologous chondrocyte implantation (ACI), are promising as a treatment option to restore hyaline-like cartilage tissue in damaged articular surfaces, as opposed to the traditional reparative procedures (e.g. bone marrow stimulation – microfracture), which promote a fibrocartilage formation with lower tissue biomechanical properties and poorer clinical results. ACI technique has undergone several advances and is constantly improving. The new concept of cartilage tissue preservation uses tissue-engineering technologies, combining new biomaterials as a scaffold, application of growth factors, use of stem cells, and mechanical stimulation. The recent development of new generations of ACI uses a cartilage-like tissue in a 3-dimensional culture system that is based on the use of biodegradable material which serves as a temporary scaffold for the *in vitro* growth and subsequent implantation into the cartilage defect. For clinical practice, single stage procedures appear attractive to reduce cost and patient morbidity. Finally, modern concept of tissue engineering facilitates hyaline-like cartilage formation and a permanent treatment of cartilage lesions.

**Conclusion:** The review focuses on innovations in the treatment of cartilage lesions and covers modern concepts of tissue engineering with the use of biomaterials, growth factors, stem cells and bioreactors, and presents options for clinical use.

## Uvod

Poškodbe hrustančnega tkiva so najpogostejši tip poškodb v ortopedski kirurgiji. Ugotavljajo, da je pri 63 % vseh opravljenih artroskopij prisotna tudi hrustančna sprememba.<sup>1</sup> Le-ta je lahko posledica ene same poškodbe ali ponavljajočih se nepravilnih obremenitev (npr. nestabilno koleno). Zdravljenje takšnih poškodb je zahtevno, ker hrustanec nima sposobnosti samoobnove – regeneracije, tj. z istovrstnimi celicami doseči enako funkcionalnost tkiva kot pred poškodbo. Na mestu poškodbe se tvori manjvredno fibrozno tkivo, ki ima drugačne biokemijske in biomehanske lastnosti kot zdravo hrustančno tkivo. Glavni razlog za slabo celjenje je neožiljenost hrustanca, zaradi česar ne pride do značilnega oblikovanja strdka in procesa celjenja. Prav tako hondrociti v zrelem hrustančnem tkivu nimajo sposobnosti razmnoževanja in ne zmorejo izločiti takšne količine zunajceličnega matriksa oz. medceličnine (ECM), da bi lahko popolnoma zapolnili mesto okvare. Nezdravljene poškodbe hrustanca vodijo v razvoj artroze. Da bi ta proces preprečili oz. podaljšali njegov potek, so se razvile različne strategije zdravljenja, bodisi z artroskopsko ali odprto operacijsko tehniko.<sup>2</sup> Mednje spadajo: izpiranje in debridement, stimuliranje kostnega mozga (mikrofrakturiranje), osteohondralno presajanje in vsaditev avtolognih hrustančnih celic (ACI – Autologous Chondrocyte Implantation).<sup>3,4</sup>

ACI je obetavna rešitev pri zdravljenju sklepnega hrustanca, saj omogoča trajno nadomestitev poškodovanega hrustančnega tkiva z lastnim trajnim živim tkivom. Pri tem je zelo pomembno poznavanje hondrogeneze. Gre za večstopenjski proces nastajanja hrustančnega tkiva, v katerem sodelujejo številne signalne poti, ki vodijo v aktiviranje mezenhimskih in hondroprogenitornih celic, sprožijo njihovo diferenciacijo in proliferacijo in nastajanje ECM. Nove terapevtske strategije, predvsem regenerativna medicina in tkivno inženirstvo, z uporabo mezenhimske matične celice (MMC), rastnih faktorjev (RF), biomaterialov (celični nosilci) in bioreaktorjev obljublajo boljše oz. popolno obnovo poškodovanega tkiva in s tem dolgoročno funkcionalno ozdravitev.<sup>5-7</sup>

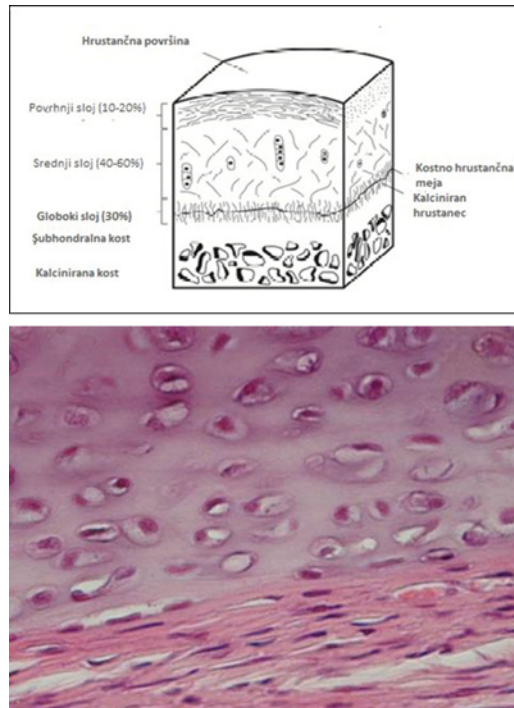
## Zgradba, značilnosti in poškodba hrustančnega tkiva

Specifična zgradba hrustančnega tkiva v sklepih zajema izjemne mehanske lastnosti in omogoča gladko drsenje sklepnih površin z minimalnim trenjem (Slika 1). Hrustanec je hiperhidrirano tkivo z 80-odstotno vsebnostjo vode, preostanek sestavljata ECM (čvrsto vezivno ogrodje medceličnine), ki je biomehanska komponenta, in hondrociti, ki so aktivna komponenta. ECM ali medceličnina sestoji iz dveh glavnih komponent: kolagena in proteoglikanov (agrekana) in je medij za prehranjevanje in medcelično komunikacijo. Pri odraslem človeku je v sklepnem hru-

**Tabela 1:** Dokazani učinki različnih rastnih faktorjev na hrustančno tkivo.<sup>21</sup>

Rastni faktorji		Učinek na hrustančne celice
TGF-β	Transforming Growth Factor β	Spodbujanje sinteze ECM Zmanjšanje katabolne aktivnosti
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein - 2	Spodbujanje sinteze ECM Povečana razgradnja agrekana
BMP-7	Bone Morphogenetic Protein - 7	Spodbujanje sinteze ECM Zmanjšana razgradnja ECM
IGF-1	Insulin-like growth factors	Spodbujanje sinteze ECM Zmanjšan metabolizem ECM
FGF-2	Fibroblast Growth Factors-2	Zmanjšanje aktivnosti agrekanaze Povečana sinteza PG
FGF-18	Fibroblast Growth Factors-18	Povečana proliferacija hondrocitov Spodbujanje sinteze ECM

**Slika 1:** Shematski prikaz zgradbe hrustančnega tkiva in histološki vzorec.<sup>8,9</sup>  
\* *histološki vzorec je last avtorja.*



stancu v največji meri prisoten kolagen tipa II, v manjših količinah pa tudi kolageni tipa VI, IX, X in XI, ki se povezujejo s proteoglikani in hialuronsko kislino v makroagregate. Negativni naboj proteoglikanov povzroči vezavo vode in s tem razpenjanje kolagenske mreže, kar prispeva k izjemni prožnosti in trdnosti hrustanca.<sup>8</sup>

Hrustanec ne vsebuje krvnih žil, živcev in limfnih žlez. Prehranjevanje poteka z difuzijo oz. prenosom vode in topljencev, ki se uravnava preko obremenitvenih sil na hrustanec. Pri obremenitvi hrustanca se tekočina skupaj s hranilnimi snovmi vtisne v globlje sloje, nasprotno pa se ob razbremenitvi le-ta povrne v površinske sloje. Takšne ciklične obremenitve so ključne za stimuliranje rasti hrustanca, regeneriranje in tvorbo ECM. Metabolizem hrustanca je odvisen predvsem od anabolnih in katabolnih dejavnikov, citokinov, RF, proliferacije in fenotipskega izražanja. Pomembno vlogo imajo tudi razgradni encimi, katerih funkcija je cepitev vezi znotraj struktur ECM. Normalna obnova in remodeliranje hrustančnega tkiva je strogo nadzorovana, saj je za pravilno delovanje in ohranitev hrustančnega tkiva potrebno ravnovesje v delovanju vseh signalnih poti.<sup>9</sup>

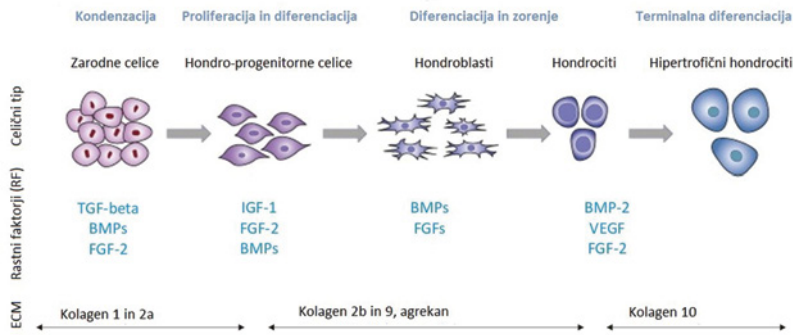
Sklepni hrustanec nima zadostne sposobnosti za lastno obnovitev lokaliziranih

okvar, ki so posledica poškodbe ali bolezni. Vzrok je neožiljenost hrustanca in s tem nezmožnost celjenja. Prav tako hondrociti v zrelem hrustančnem tkivu nimajo zadostne sposobnosti proliferacije in ne zmorejo zapolniti okvare. Odziv hrustanca na poškodbo je predvsem odvisen od globine poškodbe. V primeru hondralne poškodbe (spodaj ležeča kost je brezhibna), poškodbi sledi odziv hondrocitov iz okolice, ki sicer nekoliko proliferirajo, vendar kompletno ne zapolnijo mesta poškodbe. Začnejo prevladovati degradacijski procesi, zato se okvara sčasoma povečuje. Kadar pa okvara sega v spodaj ležečo kost (subhondralna sprememba), pride na mestu okvare do krvavitve in oblikovanja fibrinskega strdka, v katerega migrirajo MMC, ki zapolnijo okvaro z vezivno-hrustančnim tkivom. Le-to je makroskopsko podobno pravemu hialinu, vendar se od njega pomembno razlikuje v strukturalni urejenosti medceličnine, zaradi česar ima drugačne biomehanske značilnosti in sčasoma degenerira. Končni rezultat poškodbe hrustanca je nastanek artroze.<sup>10-12</sup>

Sodobni koncept zdravljenja hrustančnih poškodb temelji na razumevanju hondrogeneze in preučevanju dejavnikov, ki vplivajo na njen potek. V procesu hondrogeneze sodelujejo številne signalne poti in RF, izražajo se različni sklopi transkripcijskih dejavnikov, celične adhezijske molekule in komponente ECM (Slika 2). Upoštevanje in posnemanje procesa nastajanja hrustančnega tkiva omogoča nadzorovano izgradnjo novega hialinega hrustanca, ki ima enake funkcionalne in strukturne lastnosti kot nativni hrustanec. Tako je možno poškodovano hrustančno tkivo uspešno nadomestiti z novim in doseči dolgoročno funkcionalno ozdravitev. Nove terapevtske možnosti pri gojenju sklepnega hrustanca vključujejo uporabo bioloških pristopov, kot so: RF, MMC in druge celice, celični nosilci in bioreaktorji vse zato, da bi dosegli ugodno okolje za rast hrustančnega tkiva.<sup>13</sup>

## Zdravljenje hrustančnega tkiva

Glavni cilj zdravljenja hrustančnih poškodb je zmanjšati simptome pri bolniku, obnoviti hrustančno kongruenco, prepre-



**Slika 2:** Shematski prikaz različnih faz hondrogeneze (prikazani so ključni rastni faktorji in spremembe v ECM).<sup>13</sup>  
\* Razlaga kratic rastnih faktorjev (RF) je v Tabeli 1.

čiti nadaljnje poškodbe in ohraniti delovne sklepa brez vstavitve umetnih vsadkov. Kirurške tehnike pri zdravljenju hrustančne poškodbe lahko delimo na paliativne, popravilne (reparativne) in obnovitvene (restorativne). Večina tehnik vodi v nastanek fibrinsko-hrustančnega tkiva, ki ima značilno slabše biomehanske in biokemične značilnosti v primerjavi z nativnim hialinim hrustancem. Kirurško tehniko izberemo glede na zahtevo bolnika; pri manj zahtevnih bolnikih z zmerno simptomatiko se lahko odločimo za paliativne tehnike, kot sta izpiranje in debridement. Reparativne tehnike, kot so mikrofrakturiranje in abrazijska, uporabimo pri bolnikih, ki imajo bolj izražene simptome in so tudi bolj aktivni. S temi tehnikami spodbujamo nastajanje fibrinsko-hrustančnega tkiva. Glavna težava takšnega zdravljenja je omejena dolgoročna zmožnost fibrinsko-hrustančnega tkiva na prenos obremenitve in strižne sile v sklepu. Hkrati pa na novo oblikovano brazgotinsko tkivo ne prepreči napredovanja degenerativne hrustančne spremembe. Nasprotno pa se pri večjih okvarah in zelo zahtevnih bolnikih (atleti oz. športniki z veliko stopnjo aktivnosti) poslužujemo reparativnih tehnik, kot sta ACI in avtologna hondralna transplantacija (AHT), s katerimi želimo doseči dolgoročno funkcionalno ozdravitev.<sup>14,15</sup>

### Implantacija avtolognih hrustančnih celic

Implantacija avtolognih hrustančnih celic (Autologous Chondrocyte Implantation – ACI) je obetavna rešitev pri zdravljenju sklepnega hrustanca, saj omogoča trajno nadomestitev poškodovanega hrustančne-

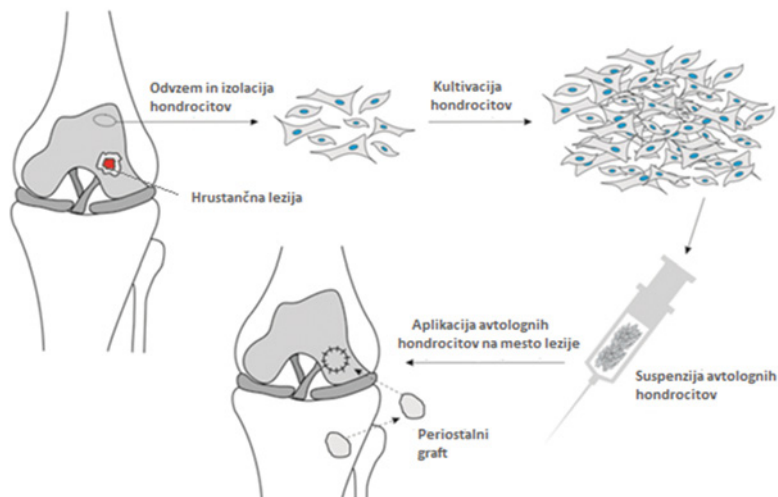
ga tkiva z lastnim živim tkivom (Slika 3). Metoda temelji na obnovi poškodovanega hrustančnega tkiva z bolnikovimi lastnimi celicami, ki jih prej odvzamemo iz neobremenilne površine poškodovanega sklepa, nato hondrocite izoliramo, jih v obliki enoslojne kulture namnožimo do ustreznega števila in jih naneseemo na poškodovani predel, nanos pa učvrstimo z biološkim fibrinskim lepilom in periostom.<sup>5,6</sup> Slabosti te metode so predvsem: od starosti odvisna rast hrustančnega tkiva, problem zadostnega števila celic, izoliranih iz majhne količine odvzetega tkiva, in prisotnost hitre dediferenciacije hondrocitov med gojenjem v enoslojni kulturi (izguba fenotipskih lastnosti, celice postanejo podobne fibroblastom in ne tvorijo značilnega hrustančnega ECM). Dodatni problem je tehnična izvedba, uspešna vsaditev gojenih hondrocitov in preprečevanje njihovega razlitja iz mesta poškodbe.<sup>7</sup> Dolgoročno se v 10–25 % na mestu vsaditve pojavlja hipertrofija perisota, kar je največkrat vzrok za ponovno operacijo.<sup>16</sup>

Izboljšanje metode ACI temelji predvsem na razumevanju hondrogeneze in preučevanju dejavnikov, ki vplivajo na njen potek. Pri tem igrajo pomembno vlogo MMC, ki proliferirajo in se diferencirajo v zrele hondrocite in tvorijo ECM. Slika 4 prikazuje nove terapevtske možnosti in biološki pristop pri gojenju sklepnega hrustanca, ki vključuje uporabo RF, MMC, celičnih nosilcev in bioreaktorjev.<sup>17</sup> Novejše študije raziskujejo aditivni in sinergistični učinek kombinacije različnih materialov, MMC, RF in bioreaktorjev za zagotovitev ugodnega okolja za rast hrustančnega tkiva, ki bo strukturno najbolj ustrezal odraslemu hialinemu hrustancu in ne bo vseboval manjvrednega brazgotinskega tkiva.<sup>18</sup>

### Tkivno inženirstvo hrustančnega tkiva

Namen tkivnega inženirstva je obnovitev tkiva z uporabo celic, ki jim z izbiro ustreznih nosilcev in drugih biomaterialov ustvarimo ugodne pogoje za njihovo rast, razmnoževanje in izražanje ustreznih genov za njihovo diferenciacijo v tkivno specifično obliko.<sup>17</sup> Pri tkivnem inženirstvu





**Slika 3:** Shematski prikaz različnih stopenj v procesu avtologne presaditve hrustanca.<sup>5,6</sup>

hrustanca je to velik izziv zaradi specifičnih lastnosti hrustančnega tkiva, počasne rasti, značilne strukturne urejenosti ECM, izrednih mehanskih lastnosti in velike stopnje dediferenciacije v celičnih kulturah. Dobro poznavanje strukture hrustančnega tkiva, metabolizma in procesa hondrogeneze omogoča *in vitro* gojenje hrustančnega tkiva v sklopu tkivnega inženirstva. Takšen pristop tkivnega inženirstva vključuje uporabo že omenjenih bioloških pristopov (Slika 4). Pri tem so izredno pomembni celični nosilci, saj omogočajo gojenje v tridimenzionalno strukturah in spodbujajo nastanek hialinega hrustanca. Dodatno z nanosom različnih RF, ki endogeno uravnavajo hondrogenezo, usmerimo tkivno kulturo v fenotipsko značilno hrustančno strukturo.<sup>13</sup> Številne študije so ugotovljale sinergistični učinek nanosa različnih RF, uporabo celičnih nosilcev in mehanske stimulacije.<sup>19,20</sup>

### Lokalno dajanje rastnih faktorjev (RF)

Rastni faktorji (RF) (*angl.* Growth factors – GF) so proteini, ki ob vezavi na celične receptorje preko več signalnih poti vplivajo na različne faze celične rasti: stimulirajo celjenje, mobilizirajo fibroblaste, delujejo kemotaktično, spodbujajo celično podvajanje, kopičijo zunajcelično tkivo, sodelujejo v procesu angiogeneze itd. Glavna funkcija RF je nadzorovanje in uravnavanje bioloških procesov, ki poteka v zelo kompleksnem sistemu, navadno preko več različnih in prepletajočih se signalnih poti. Prav zato

je njihova uporaba v tkivnem inženirstvu hrustančnega tkiva velikega pomena, saj vpliva na potek hondrogeneze in spodbujajo anabolne celične poti ter regeneriranje tkiva. Poznamo naslednje RF: trombocitni (PDGF), transformirajoči (TGF), vaskularni endotelni (VEGF), epidermalni (EGF), fibroblastni (PGF) idr. Prisotni so v trombocitih, ki sodelujejo v procesu celjenja in igrajo pomembno vlogo pri strjevanju krvi, zato se za klinične namene uporablja tudi s trombociti obogatena plazma (*angl.* PRP – Platelet Rich Plasma).<sup>21</sup> V Tabeli 1 so prikazane glavne skupine RF in njihov učinek na hrustančno tkivo. Številne študije so pokazale, da ima kombinacija različnih RF sinergistični učinek.<sup>22-24</sup> Prav tako je pomembna tudi koncentracija RF in časovno zaporedje pri dajanju. Dodatno je hondrogeneza odvisna tudi še od drugih dejavnikov okolja, kot so uporaba različnih biomaterialov, ki omogočajo celično rast – celični nosilci (*angl.* scaffold), uporaba mehanične sile (bioreaktorji), idr.<sup>21,24,25</sup>

### Celični nosilci (scaffolds)

Poznamo različne metode gojenja hondrocitov, v katero spadajo enoslojne kulture, tridimenzionalni sistemi, kulture organov in modeli za presaditev. Namen uporabe nosilcev je ustvariti ugodne pogoje za izboljšano rast tkiva. Enoslojna kultura je nespecifična metoda za gojenje hondrocitov, saj se pojavi hitra dediferenciacija celic in zato izguba fenotipa (Slika 5). Celice se preobrazijo v fibroblastom podobne, izgubijo sposobnost tvorjenja proteoglikanov in prav tako ne sintetizirajo kolagena tipa II (hrustančno specifični kolagen). Nasprotno pa z uporabo tridimenzionalnih kultur uspešno nadzorujemo rast hrustančnega tkiva in vzdržujemo izražanje hrustančnega fenotipa. Nosilce v grobem delimo na sintetične in naravne. Sintetični materiali, kot so polimeri hidroksilne kisline (polilaktid, poliglikolide, itd.), imajo slabost, da sprožijo neželeni vnetni odziv. Naravni polimeri, kot sta kolagen in alginat, se hitro razgradijo in imajo slabo mehansko čvrstost. Nasprotno je agarozna slabo biorazgradljiva. Novejši biomateriali, kot so »protein silk« in celuloza so trenutno



**Slika 4:** Novosti pri tkivnem inženirstvu hrustančnega tkiva.<sup>13</sup>

zelo učinkoviti za gojenje tridimenzionalnih celičnih kultur, saj so mehansko čvrsti, omogočajo dolgotrajno gojenje in so biokompatibilni.<sup>26</sup>

Idealni nosilec za pripravo tkivnih struktur iz hondrocitov naj bi imel naslednje lastnosti: standardizirano sestavo in postopek priprave, združljivost s tkivom, v katerega se nanaša (biokompatibilnost), biorazgradljivost s kontrolirano hitrostjo (ustreza nastanku novega tkiva) in biomehanske lastnosti, podobne hrustančnemu tkivu (zgradba iz materialov, ki omogočajo celično pritrdjevanje, njihovo premikanje in delitev, diferenciacijo in ustrezno poroznost in prepustnost za difuzijo hranil in odpadnih snovi). Hkrati mora nosilec celicam nuditi mehansko oporo in omogočati prenos mehničnega signala do celic, kar je eden bistvenih pogojev za kultiviranje celic pod obremenitvijo oz. s pomočjo bioreaktorja.<sup>27,28</sup>

### Uporaba matičnih celic

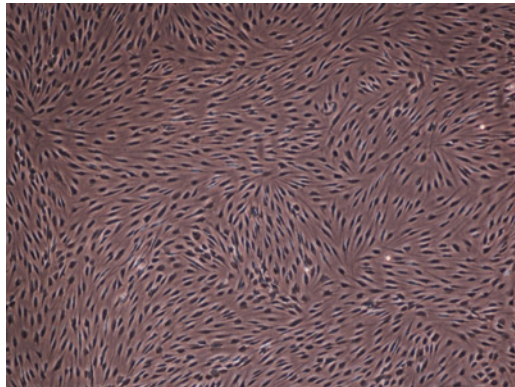
Celice za pridobivanje hrustančnega tkiva lahko pridobimo iz dveh glavnih virov: embrionalnih matičnih celic (EMC) iz notranjega sloja blastociste embrija in mezenhimskih matičnih celic (MMC), ki imajo potencial, da se diferencirajo v različna tkiva, kot so osteoblasti, hondrociti, lipoblasti

in fibroblasti.<sup>29,30</sup> Pridobivamo jih lahko iz kostnega mozga, maščob ali mišic in jih gojimo v kulturi celic, kjer s posebnimi postopki dosežemo njihovo diferenciacijo. V kulturi hondrocitov so pokazali možnosti za hondrogenozo iz MMC kostnega mozga, sinovijske tekočine, adipoznega tkiva in periosta.<sup>30</sup> Glavna prednost uporabe EMC je njihova nesmrtnost v primerjavi z MMC. Zato omogočajo neomejeno obnovitev, medtem ko je proliferacijska zmogljivost MMC omejena in se s starostjo zmanjšuje. Čeprav je MMC mnogo lažje usmeriti v hondrocitno celično linijo v primerjavi z EMC, poročajo tudi o uspešni diferenciaciji EMC v hondrocitno celično linijo.<sup>31</sup> Še vedno ostaja vprašanje, ali so MMC sposobne generirati stabilno hialino hrustančno tkivo, ki ga sicer v procesu hondrogenoze kasneje zamenja kostno tkivo. Prav tako je pri uporabi MMC problem biološka variabilnost in nestandardizirane metode priprave, odvzema in gojenja MMC za dosledno in kakovostno kontrolo biološke učinkovitosti, kar omejuje uporabo MMC v klinični praksi. Kljub temu pa je uporaba MMC postala izredno privlačna, saj so MMC lahko dostopne, enostavne za izolacijo, in imajo v primerjavi s hondrociti boljše proliferacijske in diferenciacijske sposobnosti.<sup>32</sup>

### Bioreaktorji

Kljub številnim objavam o vplivu mehanske stimulacije na hrustančno tkivo je dejanski mehanizem delovanja na celični ravni slabo poznan.<sup>18</sup> Predlaganih je bilo več mehanizmov, ki opisujejo prenos mehanskega dražljaja v biokemični signal. Ugotavljajo, da pri fizikalnem dražljaju prihaja do sprememb v mikro okolju v bližini hrustančnih celic, kot so: razlike osmotskega tlaka, pretok medcelične, spremembe v pH, idr., kar se nadalje izraža v celičnem metabolizmu. Pomembno vlogo igrajo tudi ionski in drugi celični kanalčki, integrini, ki so eni ključnih elementov v interakciji med celicami (cito-skletet aktin) in ECM, in neposreden vpliv mehanske sile na spremembe v jedru, kar naj bi vplivalo na povečano ekspresijo nekaterih ključnih molekul v procesu hondrogenoze.<sup>33</sup>

**Slika 5:** Proliferacija hondrocitov v monoslojni celični kulturi.\*  
\* Delo avtorja.



Bioreaktor razumemo kot napravo, ki omogoča transport hranljivih snovi in izločanje odpadnih snovi ter uporabo različnih dražljajev, ki spodbujajo rast celic oz. tkiva (RF, mehanska obremenitev, vpliv magnetnega polja, svetloba, centrifugalne sile idr.). Bioreaktorji za gojenje hrustančnih kultur v ožjem pomenju napravo, ki skuša posnemati mehanične obremenitve, ki nastanejo med naravnim gibanjem med sklepnimi površinami. Izkazalo se je, da lahko regeneriranje hrustanca značilno izboljšamo s pomočjo mehanske stimulacije. Raziskave potrjujejo izboljšano sintezo hrustančnega ECM in izražanje hrustančnega fenotipa *in vitro* pri uporabi mehanske obremenitve.<sup>33,34</sup> Natančno preučevanje biomehanskih obremenitev med gibanjem v sklepu je vodilo do razvoja novejših bioreaktorjev, ki z uporabo multiaksialnih obremenitev bolje simulirajo naravno okolje. Novi bioreaktorji naj bi tako omogočali uporabo več mehanskih dražljajev hkrati, ki jih lahko kombiniramo na različne načine.<sup>35</sup> Poročajo tudi o sinergističnem učinku sočasne uporabe RF in bioreaktorjev.<sup>18</sup>

## Prihodnost zdravljenja hrustančnih poškodb

S pomočjo tkivnega inženirstva hrustančnega tkiva so se pojavile nove možnosti pri zdravljenju hrustančnih poškodb. Prvi generaciji ACI (klasična ACI), ki temelji na pridobivanju hrustanca *in vitro*, gojenju v enoslojni kulturi in pokrivanjem okvare s periostnim pokrovom, so sledile naslednje generacije, kjer uporabljajo celične nosilce, MMC in gensko zdravljenje. Znani postopki so npr. MACI (matrix/membrane autologo-

us chondrocyte implantation) in CACI (collagen-covered autologous chondrocyte implantation), v katerih se namesto periostnega pokritja uporablja membrana kolagena tipa I/III.<sup>36,37</sup> Tako se izognemo slabosti klasične ACI, kot je periostna hipertrofija, ki je največkrat vzrok za ponovno operacijo. V tretji generaciji se uporabljajo hondroinduktivni oz. hondrokonduktivni matriks in alogene celice, ki omogoča aplikacijo mehanskih obremenitev, izboljšajo njegovo čvrstost in spodbuja zorenje konstrukta.<sup>38</sup> V četrti generaciji se uporablja gensko zdravljenje, ko s spodbujanjem izražanja specifičnih genov izzovemo transkripcijo hrustančno specifičnih RF in ohranjamo fenotipske značilnosti tkiva.

Z novimi metodami želimo razviti enostopenjski proces, ki ne vključuje gojenja hrustančnih celic v laboratoriju, temveč kot izvor celic uporablja mezenhimske celice kostnega mozga (mikrofrakturiranje), ki jih na mestu okvare učvrstimo s posebnim biomaterialom (acelularni kolagenski matriks I/III in fibrinsko lepilo). Celoten postopek s kratico imenujemo AMIC (*angl.* autologous matrix induced chondrogenesis) (36). Poročajo o primerljivi uspešnosti metode klasične ACI in AMIC. Prednost je predvsem v enostopenjski metodi in nižjih stroških.<sup>39</sup> Podobna metoda uporablja zmleto hrustančno tkivo (minced articular cartilage), ki ga odvezamo z neobremenilnega dela sklepa in ga nanese na celični nosilec.<sup>40</sup> Z enostopenjsko tehniko se izognemo glavni slabosti ACI, tj. potrebi po dveh operacijah zaradi odvzema celic za gojenje v laboratoriju in s tem povezanimi visokimi stroški (stroški celične kulture in ponovne operacije), dosežemo hialinu podobno hrustančno tkivo in zmanjšamo potrebo po ponovni operaciji.

## Zaključek

V zadnjih letih se je razvilo mnogo metod za zdravljenje hrustančnih poškodb. S tkivnim inženirstvom so se razvile nove generacije ACI, v katerih se uporabljajo celični nosilci, RF, gensko zdravljenje, mehanska stimulacija idr. Mnogo raziskav preučuje prednosti in slabosti novih metod, njihov

dolgoročni učinek in uspešnost ter možnosti za nadaljnjo modifikacijo in izboljšave. Nove metode omogočajo atroskopsko operacijo, kar zmanjša možnost zapletov in skrajša čas operacije, uporaba tridimenzionalnih celičnih nosilcev ne zahteva periostnega pokrova in s tem ne prihaja do hipertrofije in potrebe po ponovni operaciji, atraktivne so metode enostopenske tehnike, saj zmanjšujejo stroške in obolevnost. Zaradi hitrega razvoja biotehnologije so na voljo vedno novi materiali za klinično aplikacijo, ki nudijo ugodne pogoje za celično rast. Trenutni razvoj metode ACI se osredotoča na kakovost integracije regeneriranega tkiva na mestu poškodbe, da bi zagotovili stabilno zdravljenje in omogočili zdravljenje kompleksnih hrustančnih sprememb. Kljub spodbudnim predhodnim rezultatom pa je pred uvedbo novih metod v klinično prakso potrebno načrtovati dolgoročne prospektivne randomizirane študije, ki bodo potrdile uspešnost novih metod.

## Legenda pogosto uporabljenih kratic:

ACI	autologous chondrocytes implantation (implantacija avtolognih hrustančnih celic)
AHT	avtologna hondralna transplantacija (ACT – autologous chondral transplantation)
AMIC	autologous matrix induced chondrogenesis (z matriksom sprožena avtologna hondrogeneza)
CACI	collagen covered ACI (kolagensko pokritje ACI)
ECM	zunajcelični matriks ali medceličnina
EMC	embrijske matične celice (ES–embryonic stem cells)
MACI	matrix/membrane ACI (z matriksom incudirana ACI)
MMC	mezenhimske matične celice (MCS–mecenchnal stem cells)
RF	rastni faktorji (GF – growth factors)

## Literatura

- Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 1997; 13: 456–60.
- Hoffmann A, Gross G. Innovative strategies for treatment of soft tissue injuries in human and animal athletes. *Med Sport Sci* 2009; 54: 150–65.
- Detterline AJ, Goldberg S, Bach BR, Jr., Cole BJ. Treatment options for articular cartilage defects of the knee. *Orthop Nurs* 2005; 24: 361–6.
- Lewis PB, McCarty LP, 3rd, Kang RW, Cole BJ. Basic science and treatment options for articular cartilage injuries. *J Orthop Sports Phys Ther* 2006; 36: 717–27.
- Nazem K, Safdarian A, Fesharaki M, Moulavi F, Motifard M, Zarezadeh A, et al. Treatment of full thickness cartilage defects in human knees with Autologous Chondrocyte Transplantation. *J Res Med Sci* 2011; 16: 855–61.
- Harris JD, Siston RA, Pan X, Flanigan DC. Autologous chondrocyte implantation: a systematic review. *J Bone Joint Surg Am* 2010; 92: 2220–33.
- Giannoni P, Cancedda R. Articular chondrocyte culturing for cell-based cartilage repair: needs and perspectives. *Cells Tissues Organs* 2006; 184: 1–15.
- Aigner T, Sachse A, Gebhard PM, Roach HI. Osteoarthritis: pathobiology-targets and ways for therapeutic intervention. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 128–49.
- Bruckner P, van der Rest M. Structure and function of cartilage collagens. *Microsc Res Tech*. 1994; 28: 378–84.
- Hayes DW, Jr., Brower RL, John KJ. Articular cartilage. Anatomy, injury, and repair. *Clinics in podiatric medicine and surgery*. [Review]. 2001; 18: 35–53.
- Uchio Y, Ochi M. Biology of articular cartilage repair—present status and prospects. *Clinical calcium* 2004; 14: 22–7.
- Redman SN, Oldfield SF, Archer CW. Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater* 2005; 9: 23–32.
- Hildner F, Albrecht C, Gabriel C, Redl H, van Griensven M. State of the art and future perspectives of articular cartilage regeneration: a focus on adipose-derived stem cells and platelet-derived products. *J Tissue Eng Regen Med* 2011; 5: e36–51.
- Radosavljevič D DM, Gorenšek M, Koritnik B, Kregar-Velikovanja N. Operativno zdravljenje okvar sklepne hrustanca v sklepu. *Med Razgl* 2003, 42: 47–57.
- Drobnič M, Kregar-Velikonja N, Radosavljevič D, Gorenšek M, Koritnik B, Malicev E, et al. The outcome of autologous chondrocyte transplantation treatment of cartilage lesions in the knee. *Cellular & molecular biology letters* 2002; 7: 361–3.
- Minas T. Autologous chondrocyte implantation for focal chondral defects of the knee. *Clin Orthop Relat Res* 2001; S349–61.
- Stock UA, Vacanti JP. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med* 2001; 52: 443–51.



18. Elder BD, Athanasiou KA. Synergistic and additive effects of hydrostatic pressure and growth factors on tissue formation. *PLoS One* 2008; 3: e2341.
19. Barlic A, Drobnic M, Malicev E, Kregar-Velikonja N. Quantitative analysis of gene expression in human articular chondrocytes assigned for autologous implantation. *J Orthop Res.* 2008; 26: 847–53.
20. Malicev E, Barlic A, Kregar-Velikonja N, Strazar K, Drobnic M. Cartilage from the edge of a debrided articular defect is inferior to that from a standard donor site when used for autologous chondrocyte cultivation. *J Bone Joint Surg Br* 2011; 93: 421–6.
21. Arora NS, Ramanayake T, Ren YF, Romanos GE. Platelet-rich plasma in sinus augmentation procedures: a systematic literature review: Part II. *Implant Dent* 2010; 19: 145–57.
22. Pei M, He F, Vunjak-Novakovic G. Synovium-derived stem cell-based chondrogenesis. *Differentiation* 2008; 76: 1044–56.
23. Cals FL, Hellingman CA, Koevoet W, Baatenburg de Jong RJ, van Osch GJ. Effects of transforming growth factor-beta subtypes on in vitro cartilage production and mineralization of human bone marrow stromal-derived mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012; 6: 68–76.
24. Rui YF, Du L, Wang Y, Lui PP, Tang TT, Chan KM, et al. Bone morphogenetic protein 2 promotes transforming growth factor beta3-induced chondrogenesis of human osteoarthritic synovium-derived stem cells. *Chin Med J (Engl).* 2010; 123: 3040–8.
25. Mauck RL, Nicoll SB, Seyhan SL, Ateshian GA, Hung CT. Synergistic action of growth factors and dynamic loading for articular cartilage tissue engineering. *Tissue Eng* 2003; 9: 597–611.
26. Sun L, Wang X, Kaplan DL. A 3D cartilage-inflammatory cell culture system for the modeling of human osteoarthritis. *Biomaterials* 2011; 32: 5581–9.
27. Hutmacher DW, Goh JC, Teoh SH. An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications. *Ann Acad Med Singapore* 2001; 30: 183–91.
28. Moutos FT, Guilak F. Composite scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biorheology* 2008; 45: 501–12.
29. Kramer J, Hegert C, Guan K, Wobus AM, Muller PK, Rohwedel J. Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech Dev* 2000; 92: 193–205.
30. Ronziere MC, Perrier E, Mallein-Gerin F, Freyria AM. Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng* 2010; 20: 145–58.
31. Nakayama N, Duryea D, Manoukian R, Chow G, Han CY. Macroscopic cartilage formation with embryonic stem-cell-derived mesodermal progenitor cells. *J Cell Sci* 2003; 116: 2015–28.
32. Richardson SM, Hoyland JA, Mobasheri R, Csaki C, Shakibaei M, Mobasheri A. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: opportunities and challenges for articular cartilage and intervertebral disc tissue engineering. *J Cell Physiol* 2010; 222: 23–32.
33. Shieh AC, Athanasiou KA. Principles of cell mechanics for cartilage tissue engineering. *Ann Biomed Eng* 2003; 31: 1–11.
34. Grad S, Eglin D, Alini M, Stoddart MJ. Physical stimulation of chondrogenic cells in vitro: a review. *Clin Orthop Relat Res* 2011; 469: 2764–72.
35. Sun M, Lv D, Zhang C, Zhu L. Culturing functional cartilage tissue under a novel bionic mechanical condition. *Med Hypotheses* 2010; 75: 657–9.
36. Harris JD, Siston RA, Brophy RH, Lattermann C, Carey JL, Flanigan DC. Failures, re-operations, and complications after autologous chondrocyte implantation—a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 2011; 19: 779–91.
37. Basad E, Ishaque B, Bachmann G, Sturz H, Steinmeyer J. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the treatment of cartilage defects of the knee: a 2-year randomised study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2010; 18: 519–27.
38. Hettrich CM, Crawford D, Rodeo SA. Cartilage repair: third-generation cell-based technologies—basic science, surgical techniques, clinical outcomes. *Sports Med Arthrosc* 2008; 16: 230–5.
39. Schiavone Panni A, Cerciello S, Vasso M. The management of knee cartilage defects with modified amic technique: preliminary results. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011; 24: 149–52.
40. McCormick F, Yanke A, Provencher MT, Cole BJ. Minced articular cartilage—basic science, surgical technique, and clinical application. *Sports Med Arthrosc.* [Review]. 2008; 16: 217–20.