

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Doktorský studijní program: Experimentální chirurgie



**MUDr. Pavel Neckař**

Moderní terapie chondrálních defektů kloubů

*Aplikace kultivovaných kmenových buněk z kostní dřeně v terapii fokálního chrupavčitého defektu kolenního kloubu*

Modern therapy of chondral defects

*Application of cultured bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of focal cartilage defect of the knee joint*

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Vojtěch Havlas, Ph.D.

Praha, 2023



## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem řádně uvedl/a a citoval/a 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, 18.09.2023

## Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval všem svým kolegům a blízkým, kteří se podíleli na mém odborném vzdělávání a osobním růstu, především emeritnímu primáři Ortopedického oddělení Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem, MUDr. Vladimíru Benešovi. Obrovský dík patří prof. MUDr. Vojtěchu Havlasovi, Ph.D., současnému přednostovi Ortopedické kliniky 2. LF UK, za jeho přístup, podporu a dohled nad mou vědeckou a publikační aktivitou.

Děkuji všem dobrovolným dárcům kostní dřeně za jejich odvalu a spolupráci. Dále pak patří velký dík pracovníkům společnosti Bioinova, a.s., kteří se na projektu podíleli, jmenovitě Ing. Ivaně Drahorádové, RNDr. Kateřině Růžičkové, Ph.D. a zejména Mgr. Haně Potočkové, Ph.D. a MUDr. Peteru Bauerovi, Ph.D. kteří mi pomáhali s metodikou a analýzou laboratorních výsledků experimentální části práce.

V neposlední řadě patří nejvřelejší poděkování své rodině, manželce Lence, která mě podporuje v mé práci a statečně zvládá péči o naše děti a rodinné zázemí.

## **Abstrakt**

Práce se zabývá aplikací kultivovaných kmenových buněk kostní dřene v terapii fokálního chondrálního defektu kolenního kloubu. V experimentální části práce bylo cílem kvantitativní a kvalitativní porovnání dvou odběrových míst monocytárních aspirátů kostní dřene, z ilické kosti a proximální tibie, za účelem určení vhodného buněčného zdroje pro moderní buněčnou terapii. Analýza vzorků prokázala, že množství monocytárních buněk i výtěžnost kmenových buněk ze získaného aspirátu byla signifikantně vyšší z kostní dřene lopaty kosti kyčelní. Neprokázali jsme signifikantní kvalitativní rozdíly mezi oběma zdroji kmenových buněk. V klinické práci uvádím popis chirurgického postupu a výsledky ročního sledování pacientů po implantaci kultivovaných kmenových buněk z kostní dřene pánevní kosti, pod označením BiCure<sup>®</sup>orthoMSCp (Bioinova, Praha, Česká republika), fixovaných na komerčně dostupném 3D nosiči Chondrotissue<sup>®</sup> (BioTissue AG, Ženeva, Švýcarsko) pomocí koagulované autologní obohacené plazmy. Primární cíl klinické studie zahrnoval vyhodnocení krátkodobé a dlouhodobé bezpečnosti aplikovaného medicínského produktu. Sekundárním cílem práce bylo posoudit účinnost terapie pomocí dotazníkového šetření a posouzení strukturální změny ošetřeného defektu pomocí magnetické rezonance 1 rok od operace. Práce prokazuje bezpečnost a velmi dobrý klinický výsledek léčby fokálního chrupavčitého defektu kolenního kloubu pomocí kultivovaných kmenových buněk z kostní dřene.

## **Klíčová slova**

buněčná terapie, defekt chrupavky, kolenní kloub, kmenové buňky, kostní dřeň

## **Abstract**

The thesis describes the application of cultured bone marrow stem cells in the therapy of focal chondral defect of the knee joint. In the experimental part of the work, the goal was to quantitatively and qualitatively compare two sampling sites of bone marrow monocytic aspirates, the iliac crest bone and the proximal tibia, in order to determine a suitable cell source for advanced cell therapy. The sample analysis showed that the amount of monocytic cells and the yield of stem cells from the aspirate obtained were significantly higher in the bone marrow from the iliac crest. We did not find significant qualitative differences between the two sources of stem cells. In the clinical part of the work, I present a description of the surgical procedure and the results of a 1-year follow-up of patients after the implantation of cultured stem cells from the bone marrow, under the name BiCure<sup>®</sup> orthoMSCp (Bioinova, Prague, Czech Republic), fixed on a commercially available 3D scaffold Chondrotissue<sup>®</sup> (BioTissue AG, Geneva, Switzerland) using coagulated autologous platelet-rich plasma. The primary objective of the clinical study included the evaluation of the short-term and long-term safety of the applied medical product. The secondary objective of the work included the assessment of the effectiveness of the therapy using a questionnaire survey and the assessment of structural changes in the treated defect using magnetic resonance 1 year after the operation. The work demonstrates the safety and very good clinical result of the treatment of a focal cartilaginous defect of the knee joint using cultured stem cells from the bone marrow.

## **Key words**

bone marrow, cartilage defect, cell therapy, mesenchymal stem cells, knee joint

## Seznam zkratek

<b>ACI</b>	Implantace autologních chondrocytů (z angl. autologous chondrocyte implantation)
<b>AEs</b>	Nežádací příhody (z angl. adverse events)
<b>AMIC</b>	Indikovaná chondrogenéza pomocí implantované matrix (z angl. autologous matrix-induced chondrogenesis)
<b>BM-MSCs</b>	Mesenchymální kmenové buňky z kostní dřeně (z angl. bone marrow)
<b>ECM</b>	Extracelulární matrix
<b>HA</b>	Hyaluronová kyselina (z angl. hyaluronic acid)
<b>HLP</b>	Hodnocený léčivý přípravek
<b>KD</b>	Kostní dřeň
<b>KOOS</b>	Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score
<b>MNCs</b>	Mononukleární buňky (z angl. mononuclear cells)
<b>MOCART</b>	Magnetic Resonance Observation of Cartilage Repair Tissue score
<b>MSCs</b>	Mesenchymální kmenové buňky (z angl. mesenchymal stem cells)
<b>OATS</b>	Mozaiková plastika (z angl. osteochondral autologous transplantations)
<b>OCD</b>	Osteochondrosis dissecans
<b>PDt</b>	Doba zdvojení populace buněk (z angl. population doubling time)
<b>PI</b>	Propium Iodid
<b>PrP</b>	Obohacená plazma (z angl. platelet rich plasma)
<b>VAS</b>	Visuální škála bolesti (z angl. visual analogue scale)

## Obsah

<i>Prohlášení:</i> .....	3
<i>Poděkování</i> .....	4
<i>Abstrakt</i> .....	5
<i>Abstract</i> .....	6
<i>Seznam zkratek</i> .....	7
<b>1 Úvod</b> .....	<b>12</b>
<b>2 Historie léčby kloubní chrupavky</b> .....	<b>14</b>
<b>3 Anatomie a histologie chrupavky</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1 Hyalinní chrupavka</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2 Elastická chrupavka</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3 Vazivová chrupavka</b> .....	<b>17</b>
<b>4 Histologické složení hyalinní chrupavky</b> .....	<b>18</b>
<b>4.1 Chondrocyty a jejich charakteristika</b> .....	<b>18</b>
<b>4.2 Mezibuněčná hmota</b> .....	<b>20</b>
<b>4.3 Histologické vrstvy chrupavky</b> .....	<b>23</b>
<b>5 Fyziologie a patofyziologie hyalinní chrupavky</b> .....	<b>25</b>
<b>5.1 Metabolismus hyalinní chrupavky</b> .....	<b>26</b>
<b>5.2 Patofyziologie, reakce chrupavky na poranění</b> .....	<b>26</b>
5.2.1 Regenerace chrupavky.....	27
5.2.2 Stárnutí chrupavky.....	27
<b>5.3 Pohyb a biomechanické vlastnosti chrupavky</b> .....	<b>29</b>
5.3.1 Tlaková síla.....	29
5.3.2 Tahová síla.....	30
5.3.3 Smykové napětí.....	30
5.3.4 Tření a opotřebení chrupavky.....	30
<b>6 Diagnostika poruchy chrupavky</b> .....	<b>31</b>



6.1	<b>Rentgenologické změny .....</b>	<b>31</b>
6.2	<b>Magnetická rezonance.....</b>	<b>32</b>
6.3	<b>Biochemická analýza .....</b>	<b>32</b>
7	<b><i>Patologické stavy chrupavky .....</i></b>	<b>33</b>
7.1	<b>Revmatoidní artritida.....</b>	<b>33</b>
7.2	<b>Osteoartróza.....</b>	<b>33</b>
7.2.1	Primární osteoartróza.....	34
7.2.2	Sekundární osteoartróza .....	35
7.3	<b>Traumatické poškození chrupavky.....</b>	<b>36</b>
7.4	<b>Klasifikace poranění chrupavky .....</b>	<b>38</b>
7.5	<b>Osteochondrosis dissecans .....</b>	<b>39</b>
8	<b><i>Terapie defektů chrupavky.....</i></b>	<b>41</b>
8.1	<b>Konzervativní terapie.....</b>	<b>41</b>
8.2	<b>Operační terapie.....</b>	<b>42</b>
8.2.1	Artroplastika .....	42
8.3	<b>Chirurgická terapie fokálních defektů chrupavky.....</b>	<b>42</b>
8.3.1	Abrasivní chondroplastika .....	44
8.3.2	Dřeň stimulující techniky .....	44
8.3.3	Implantace strukturálních nosičů .....	46
8.3.4	Mozaiková plastika.....	47
8.3.5	Implantace čerstvě zmražených osteochondrálních aloštěpů.....	48
8.3.6	Implantace autologních chondrocytů.....	49
8.3.7	Kmenové buňky.....	52
9	<b><i>Experimentální část práce.....</i></b>	<b>54</b>
9.1	<b>Cíle a hypotézy experimentální práce.....</b>	<b>54</b>
9.2	<b>Materiál a metodika .....</b>	<b>55</b>
9.2.1	Soubor analyzovaných dárců kostní dřeně .....	55
9.2.2	Odběr kostní dřeně.....	55
9.2.3	Izolace a kultivace MSCs .....	56
9.2.4	Průtoková cytometrie.....	56

9.2.5	Metodika hodnocení a statistická analýza .....	57
<b>9.3</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>57</b>
9.3.1	Bezpečnost a proveditelnost odběru .....	57
9.3.2	Kvantitativní analýza buněk .....	57
9.3.3	Kvalitativní analýza buněk .....	58
9.3.4	Odpovědi na stanovené výzkumné otázky.....	62
<b>9.4</b>	<b>Diskuze k experimentu .....</b>	<b>63</b>
<b>9.5</b>	<b>Závěry experimentální části práce.....</b>	<b>66</b>
<b>10</b>	<b><i>Klinická část práce.....</i></b>	<b>67</b>
<b>10.1</b>	<b>Úvod do klinické práce .....</b>	<b>67</b>
10.1.1	Zdroj buněk .....	68
10.1.2	Nosič.....	69
10.1.3	Tkáňové inženýrství v reparaci chrupavky .....	69
<b>10.2</b>	<b>Cíle klinického experimentu .....</b>	<b>70</b>
10.2.1	Cíle klinického experimentu.....	70
<b>10.3</b>	<b>Metodika .....</b>	<b>71</b>
10.3.1	Design klinické studie .....	71
10.3.2	Charakteristika souboru pacientů.....	71
10.3.3	Sledování a hodnocení skupiny pacientů.....	73
10.3.4	Odběr kostní dřeně a periferní krve .....	73
10.3.5	Příprava autologních BM-MSCs .....	73
10.3.6	Příprava autologního PrP .....	74
10.3.7	Finalizace a kontrola kvality BiCure® orthoMSCp.....	74
10.3.8	Metodika hodnocení a statistická analýza .....	74
<b>10.4</b>	<b>Operace kolena a podání BiCure® orthoMSCp.....</b>	<b>75</b>
<b>10.5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>76</b>
10.5.1	Vyhodnocení bezpečnosti.....	76
10.5.2	Výsledek klinické účinnosti.....	77
10.5.3	Hodnocení MRI and RTG .....	78
<b>10.6</b>	<b>Diskuze ke klinickým výsledkům studie .....</b>	<b>80</b>
<b>10.7</b>	<b>Závěr klinické práce.....</b>	<b>83</b>
<b>11</b>	<b><i>Souhrn.....</i></b>	<b>84</b>

<i>12</i>	<i>Summary</i> .....	<b>85</b>
<i>13</i>	<i>Literatura</i> .....	<b>86</b>
<i>14</i>	<i>Přílohy</i> .....	<b>119</b>
14.1	EudraCT Number:.....	<b>119</b>
14.2	Prohlášení .....	<b>119</b>
14.3	Obrazová dokumentace jednotlivých kroků operace .....	<b>119</b>
14.4	Účinnost terapie – dotazníky, data jednotlivých pacientů.....	<b>123</b>

# 1 Úvod

Hojení defektu kloubní chrupavky je stále nevyřešeným problémem ortopedie<sup>1</sup>. Nové moderní technologie nám dávají možnosti využití současných poznatků z oblasti experimentální medicíny a tkáňového inženýrství a tyto aplikovat do klinické praxe léčby defektu chrupavky. Inspirací k uskutečnění této práce mi byla společenská aktuálnost tématu využití kmenových buněk v medicíně a setkání s mým školitelem. Díky jeho vedení jsem prošel náročnou cestu preklinického výzkumu a klinické aplikace kmenových buněk kostní dřeně. Výsledky několikaleté práce předkládám v této disertační práci.

Ohraničeným defektem chrupavky rozumíme částečně nebo plně separovaný chondrální nebo osteochondrální fragment. Defekt chrupavky nebo osteochondrální fragment je nejčastěji lokalizovaný v nosné zóně takto postiženého kloubu. Mezi nejčastěji postižené klouby patří kolenní, hlezenný a kyčelní kloub. Inkongruence kloubního povrchu vede k rozvoji sekundární artrózy se všemi klinickými projevy v běžném životě pacienta.

Standartně používané operační terapeutické postupy nevedou k plné a dlouhodobé spokojenosti pacientů a restauraci kloubního povrchu, ve smyslu histologické kvality a biomechanických vlastností regenerované chrupavky (Knutsen et al. 2004; Horas et al. 2003a). V současné době patří mezi nejvíce používané, nejdostupnější a ekonomicky nejméně náročné metody, operační metoda mikrofraktur (Mithoefer et al. 2009). Při hlubším poškození subchondrální kosti má své platné místo metoda mozaikové plastiky, což je metoda transplantace autologní osteochondrální jednotky do defektu povrchu kloubu (Hangody et al. 2008). V zámoří je u větších defektů široce užívaná metodika léčby pomocí čerstvého alogenního osteochondrálního transplantátu (Lai et al. 2022a). Vedle výše uvedených jednoduchých operačních metod došlo v posledních letech k rozvoji techniky a znalostí v oboru tkáňového inženýrství, tento fakt vedl k využití léčebné metody založené na implantaci kultivovaných autologních chondrocytů do ohraničeného defektu kloubního

---

<sup>1</sup>„Cartilage and bone are indeed fundamentally the same things. Thus neither cartilage nor bone, when once cut off, grows again“

Aristoteles (384-322 BCCE), Greek philosopher and science

povrchu (De Franceschi et al. 2005; Brittberg et al. 1994; Lars Peterson et al. 2003; Giannoni et al. 2005; Niemeyer et al. 2014).

Bohužel ani tato finančně a technicky náročná metoda léčby nevede k očekávaným dlouhodobým klinickým a histologickým výsledkům (Horas et al. 2003b; Knutsen et al. 2007). Výsledkem je vznik méně kvalitní vazivové nebo „hyaline-like“ chrupavky. Méně kvalitní chrupavčitý povrch není schopen odolávat působícím biomechanickým vlivům na povrchu kolenního kloubu. Toto vede k rozvoji degenerativního procesu osteoartrózy.

Mezenchymální kmenové neboli stromální buňky (MSCs) byly dlouho navrhovány jako potenciální buněčný zdroj pro regeneraci muskuloskeletální tkáně. V oblasti léčby poranění chrupavky bylo vynaloženo několik snah vyvinout nové terapeutické strategie, které by využívaly MSCs (B et al. 2013). Obecně lze MSCs terapie rozdělit do dvou kategorií: ty, které používají čerstvě izolované buňky, a ty, které používají jednovrstvé expandované buňky. Toto rozlišení přináší významné důsledky jak z hlediska regulačních požadavků, tak z hlediska mechanismu působení. Z vědeckého hlediska existují dva hlavní problémy, které zpozdily využití MSCs v klinické praxi. Nedostatečné nástroje pro adekvátní charakterizaci získaných buněčných populací a nedostatečný výzkum v metodice implantace a účinku implantovaných buněk (Dominici et al. 2006b).

V experimentální části práce jsem se zaměřil na analýzu monocytárního aspirátu kostní dřeně ze dvou různých zdrojů s cílem posouzení jejich kvantitativních a kvalitativních parametrů. Experimentální práce měla určit místo odběru, které nejlépe splňuje kritéria vhodného buněčné zdroje směrem k jeho využití pro kultivaci mezenchymálních kmenových buněk.

V klinické části práce jsem se zaměřil na výběr dostupného buněčného nosiče a metodiky fixace autologních kultivovaných mezenchymálních kmenových buněk kostní dřeně v indikaci operační terapie ohraničeného defektu chrupavky kolenního kloubu. Tato práce měla primárně za cíl zhodnotit bezpečnost aplikace moderní buněčné terapie kultivovanými kmenovými buňkami a sekundárně posoudit klinický výsledek léčby včetně analýzy kvality primární a sekundární fixace použitého implantátu. Tyto klinické parametry byly hodnoceny za pomoci dotazníkových šetření v ročního sledování skupiny pacientů a pomocí radiologických vyšetření.

## 2 Historie léčby kloubní chrupavky

Chirurgie patří k základním klinickým oborům medicíny. Ortopedie se oddělila jako samostatný chirurgický obor v polovině XX. století. Na základě přísného dodržení Listerových principů, rozvoje anestezie a objevení rentgenového záření začala mít kostěná a kloubní operativa své první úspěchy, které předtím omezovala zejména raná infekce. Mezi zakladatele kostěné traumatologie lze považovat francouzské resp. belgické chirurgy jako např. A. Lambotta, kteří se snažili řešit kostní traumata jednoduchou osteosyntézou. Postupně docházelo k vývoji chirurgických postupů ošetření poranění pohybového aparátu. Mezi průkopnické a inovátorské metody v této oblasti lze považovat metodu nitrodřeňové osteosyntézy. Tento postup byl prvotřídně rozpracován G. Küntscherem (Bartoniček 2010). S technickým rozvojem kostěné chirurgie se začala rozvíjet i oblast operací velkých kloubů. První úspěšné kovové kloubní náhrady provedené v roce 1938 jsou spojeny se jmény M. Smith-Petersen, Phil. Wilese (Gomez and Morcuende 2005). Se zlatým obdobím inovací a rozvojem endoprotetiky jsou spojena jména sira J. Charnleye a prof. M.E. Müllera, který provedl v roce 1961 první implantaci totální endoprotézy v Evropě (J. Jackson 2012). V poslední době se operační techniky v ortopedii rozvíjí zejména směrem k šetrné, biologické operativě, mininvazivně přístupů a cílem operací je zachování a obnova povrchu kloubu a nitrokloubních struktur. Tyto principy stojí za rozmachem rekonstrukční artroskopické operační techniky velkých kloubů. Díky artroskopiím je dnes možné provádět diagnostiku i léčbu poraněné chrupavky nejen kolenního kloubu v časných stádiích poškození. V operačních technikách rekonstrukce kloubní chrupavky se v posledních desetiletích využívá nových technologií, které umožňují aplikaci poznatků z oboru tkáňového inženýrství do praxe. Operační technika, implantace kultivovaných buněk, zejména autologních chondrocytů na acelulárním nosiči, se rychle rozšířila a nyní má více než dvacetiletou historii. Tento léčebný postup je spojen s osobou prof. L. Petersona, prof. M. Brittberga (Brittberg et al. 1994). Pracoviště prof. Trče a mého školitele prof. Havlase, Ortopedická klinika, 2. LF UK, FN Motol, se historicky řadí mezi průkopníky buněčné terapie v léčbě chondrálních defektů s využitím autologních buněk v Čechách (HANDL et al. 2007). Pražské pracoviště navázalo na první zkušenosti a publikace brněnských kolegů, P. Višni, P. Vališe, L. Paši, kteří publikovali své vynikající výsledky implantace autologních kultivovaných chondrocytů v různých kloubních lokalitách včetně kombinovaných

rekonstrukčních výkonů s náhradou vazů, či menisku (Komárek et al. 2010; Višňa et al. 2004).

V posledním desetiletí se hledají nové zdroje buněčné terapie, které by eliminovaly anebo alespoň snížily nevýhodné vlastnosti kultivovaných chondrocytárních autotransplantátů. Mezi nejčastěji skloňované alternativní zdroje patří kmenové buňky. Pionýrem a propagátorem využití kmenových buněk v různých odvětví medicíny je A. Caplan (Arnold I. Caplan and Dennis 2006). V zásadě jsou dvě možnosti, jak aplikovat kmenové buňky, systémově anebo lokálně. Vědecká opodstatnění využití mezenchymálních kmenových buněk (Mesenchymal Stem Cells – MSCs) v terapii tkáňového poškození jsou dány jejich unikátními vlastnosti. Mezi tyto vlastnosti patří: schopnost migrovat pomocí chemotaxe do tkání, které mají známky zánětu či poškození. Další vlastností je schopnost sekrece cytokinů a růstových faktorů, takto MSCs modulují zánětlivou reakci tkáně a působí imunosupresivně (Schmitt et al. 2012). MSCs jsou schopny se diferencovat v různé buněčné typy dané tkáně, ovlivňují vaskularizaci tkáně, růst buněk poškozené tkáně a jejich diferenciaci (Hernigou et al. 2005). Výhodou, která se využívá v oblasti tkáňového inženýrství a léčbě fokálních chrupavčitých defektů, je možnost kultivace a následná aplikace buněk na 3D nosič (scaffold). Vlastnosti nosiče, které musí daný materiál splňovat jsou: imunokompatibilita, netoxičita, biodegradabilita, solubilita nosiče, mechanické vlastnosti matrice by se měla co nejvíce blížit originální tkáni včetně třídimensionální struktury. Využití nediferencovaných buněčných kultur však s sebou nese i nezodpovězené otázky stran bezpečnosti této buněčné terapie. Proto rozvoj moderních léčebných postupů s využitím kmenových buněk, nejen v terapii kloubních chrupavčitých defektů, je předmětem aktuálního medicínského výzkumu.

### 3 Anatomie a histologie chrupavky

Hyalinní typ chrupavky najdeme nejčastěji v diarthrotických kloubech (Huy et al 2012). Mimo tento typ chrupavky rozeznáváme ještě elastickou a vazivovou chrupavku. Jednotlivé typy se od sebe liší biologickými a chemickými vlastnostmi tkáně. Funkce, kterou má chrupavka zastávat, je určují pro její chemické složení, anatomického uspořádání a mechanické vlastnosti. Kloubní chrupavka jakožto distributor zatížení musí odolat požadovaným biomechanickým nárokům ve smyslu tahu, stříhu a komprese. K tomu je uzpůsobena svým složením jak v buněčné, tak nebuněčné složce tkáně.

Buněčné transplantáty vyrobené in vitro a využívané v léčbě defektu kloubní chrupavky se snaží přiblížit jak svým histochemickým uspořádáním, tak mechanickými vlastnostmi originální hyalinní tkáni.

#### 3.1 Hyalinní chrupavka

Hyalos v řečtině znamená sklo. Hyalinní chrupavka dostala svůj název od kloubní chrupavky, která má svůj charakteristický vzhled od průhledné, po bílou až žlutobílou tkáň v závislosti na jejím věku. Hyalinní chrupavka je nejrozšířenějším typem chrupavky v těle. Nacházíme ji v kloubních spojeních a zde je její funkcí přenos pohybu mezi dvěma plochami se vznikem minimálního tření. Najdeme ji také v oblasti spojení konců žeber, hrtanu, nosu, zde je však kryta perichondriem. Hyalinní chrupavka se v jiné formě nachází v oblasti epifýz a metafýz, růstových zón, kde je zodpovědná za růst kosti do délky. Růstová ploténka je organizována do jednotlivých zón, které se liší diferenciací chondrocytů do sloupového uspořádání. Jednotlivé zóny obsahují nediferencované chrupavčité buňky (resting zone), proliferující buňky (zóna zodpovědná za nárůst objemu), hypertrofické buňky (zóna, kde dochází k zvětšování objemu buněk a tvorbě válců s probíhající apoptózou buněk), kalcifikující buňky (zóna, kde chrupavku nahrazuje kostní tkáň) (Johnston 1997). Defekt nebo poranění růstové ploténky vede ke zkratu poškozené kosti.

Na kloubní ploše se s hyalinní chrupavkou setkáváme v různém množství. V lidském těle je nejčastěji výška kloubní chrupavky kolem 2-4mm a její tloušťka se mění ve vztahu k míře volnosti kloubu a míře přenosu sil mezi jednotlivými kloubními spojeními (Koo and Andriacchi 2007).



Na rozdíl od většiny tkání nemá kloubní chrupavka krevní cévy, nervy ani lymfatické cévy. Vlastní chrupavčitá tkáň se skládá z husté extracelulární matrice (ECM) s nízkou hustotou buněk – chondrocytů, které zaujímají mezi 5-10% objemu tkáně. ECM se v zásadě skládá z vody, kolagenu a proteoglykanů, přičemž další nekolagenní proteiny a glykoproteiny jsou přítomny v menším množství. Tyto složky společně pomáhají zadržovat vodu v ECM, což je zásadní pro udržení výše zmíněných mechanických vlastností (Joseph A. Buckwalter 1998).

### **3.2 Elastická chrupavka**

Elastes znamená v řečtině pružný, flexibilní. Elastická chrupavka má své pojmenování od vysokého obsahu proteinu – tropoelastinu. Tento 65kDa velký protein dává elastické chrupavce její vlastnosti, flexibilitu. Elastin je uspořádán do vláknité sítě a mezi nimi je množství shodně orientovaných chondrocytů. Výzkum ukazuje, že elastická chrupavka vznikla z prekurzorů hyalinní chrupavky ve fetálním období (Sucheston 1969). S elastickou chrupavkou se setkáváme v oblasti laryngu, epiglottis, Eustachově trubici, dále je součástí ušního boltce a některých částí bronchů.

### **3.3 Vazivová chrupavka**

Vláknitá, vazivová chrupavka je tkáň odvozená z latinského „fibra“, vlákno. Je to typ chrupavky, která se liší od hyalinní vyšším zastoupením kolagenu I. typu a menším množstvím kolagenu II. typu. Množství glukosaminoglykanů je také v menším množství než v hyalinní chrupavce. Chondrocyty jsou rozprostřeny v mezibuněčné vláknité hmotě a tím lépe absorbují mechanické nároky. Fibrózní chrupavku nacházíme v oblasti symfýzy, annulus fibrosus meziobratlového disku, temporomandibulárním skloubení a v menisku (Makris, Hadidi, and Athanasiou 2011). Fibrózní chrupavka je tvořena v tkáních poškozeného kloubu, jako náhrada poškozené hyalinní chrupavky, takto opravená tkáň ale nemá odpovídající biomechanické vlastnosti původní hyalinní tkáně.

## 4 Histologické složení hyalinní chrupavky

Jednotlivé kosti těla se liší anatomickým spojením, které mezi sebou utváří. Kloub je typem spojením kostí, které jsou definovány kloubním tvarem, počtem spojení a funkcí. Mezi nejvíce prostudované typy kloubního spojení patří synoviální kloub. Synoviální kloub je nejmobilnějším kloubem. Termín „synoviální“ je synonymem pro diarthrotický kloub. Diarthrotický kloub se skládá z kloubního pouzdra, které na nitrokloubní části obsahuje synoviální membránu. Kloubní pouzdro generuje skrze synoviální membránu krevní ultrafiltrát označovaný jako synoviální tekutina (Ropes, Bennett, and Bauer 1939).

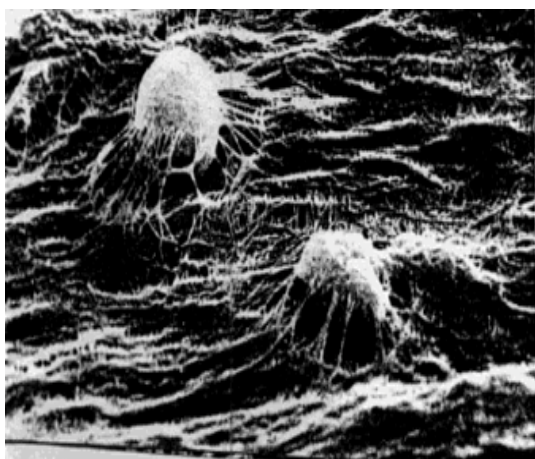
### 4.1 Chondrocyty a jejich charakteristika

V porovnání s ostatními tkáněmi těla je chrupavka výrazně acelulární tkáň. Buňky tvoří necelých 5 % objemu, zbylá část objemu je tvořena extracelulární matrix. Chondrocyt je základní buněčnou a metabolickou jednotkou, určující složení extracelulární matrix a tím také schopnost její remodelace (Henry J. Mankin, Zarins, and Jaffe 1972). Jelikož chrupavka je avaskulární tkáň a chondrocyty jsou izolované v denzní intercelulární matrix, tak buňky získávají hlavní metabolity difúzí ze synoviální tekutiny. Tento proces je facilitován pomocí pohybu kloubu do určitého stresového maxima. Překročením definované stresové hodnoty vede naopak k poškození chrupavčité tkáně (Torzilli et al. 1999). Pro udržení zdravého metabolismu kloubní chrupavky je důležitý pravidelný pohyb kloubů a dynamická zátěž.

Všechny chondrocyty se diferencují z mezenchymálních progenitorových buněk a maturované chondrocyty již dále neproliferují. Fenotyp chondrocytů se liší podle zóny, ve které se nacházejí. Rozdíly se projevují v expresi genetické informace, syntéze intra a extracelulárních molekul a mechanických vlastnostech jednotlivých vrstev (Aydelotte, Greenhill, and Kuettner 1988; Aydelotte and Kuettner 1988; Darling, Hu, and Athanasiou 2004). Tak například chondrocyty v povrchové vrstvě exprimují typicky proteoglykan 4, označovaný jako lubricin nebo protein povrchové zóny (superficial zone protein). Mezi rozdílné biomechanické faktory patří například to, že povrchové chondrocyty pomaleji adherují k plastovému povrchu v tkáňové kultuře (Siczkowski and Watt 1990). Chondrocyty z hluboké vrstvy mají naopak vyšší množství vimentinu, který je chrání vůči kompresním silám a podobně je to s keratansulfátem, který nacházíme spíše v hlubších vrstvách chrupavky (DURRANT et al. 1999; Aydelotte, Greenhill, and Kuettner 1988; Aydelotte and

Kuettner 1988). Morfologické rozdíly chondrocytů jednotlivých zón, kde buňky v povrchové zóně jsou menší, plošší, diskoidní a orientují se podél průběhu kolagenních vláken. Naproti tomu buňky ve střední a hluboké zóně jsou kulatější, mají vyšší syntetickou kapacitu ale menší viskoelastické vlastnosti (Al-Maslamani et al. 2022; Choi et al. 2007).

Chondrocyty jsou známy tím, že ztrácejí jejich fenotypické markery při in vitro kultivaci. Jedná se o jev, který je dokumentován ztrátou morfologické charakteristiky buněk a změn v metabolické aktivitě v jednovrstevné kultuře buněk (Darling, Hu, and Athanasiou 2004; Siczkowski and Watt 1990). Tomuto lze zabránit při kultivaci v třídimensionálním gelu, jako je například agaróza, kde dochází k zachování jejich morfologických vlastností i metabolické aktivitě, syntéze proteoglykanů (Aydelotte and Kuettner 1988; DURRANT et al. 1999; Darling, Hu, and Athanasiou 2004). Pro chondrocyty je typickou vlastností, že dokáží reagovat na mechanické stimuly a podle nich měnit expresi jednotlivých proteinů a vlastní fenotypické vlastnosti. Tato skutečnost je označována jako „mechanotransdukce“ (Gilbert, Bonnet, and Blain 2021). Pericelulární matrix je hmota naléhající na vlastní chondrocyty a liší se od extracelulární matrix tím, že vytváří s buňkami aktivní spoje. Skrze tyto spoje jsou buňky schopny mezi sebou interagovat na mechanické stimuly. Tyto „gap junctions“ jsou dobře zdokumentovány a jsou tvořeny spojením povrchových receptorů s pericelulárními oligopeptidy (tubulin, fibronectin) (Mayan et al. 2015).



Obr. 1 Histologický obraz chondrocytu (pohled scanovým mikroskopem, z materiálu Minnesotské university, se svolením autora: Havlas V., Možnosti léčby defektu hyalinní chrupavky, 2011)

## 4.2 Mezibuněčná hmota

Mezibuněčná hmota chrupavky představuje 60-80 % jejího objemu a je tvořena zejména tkáňovým mokem (vodou, kolageny a proteoglykany) (Guilak and Mow 2000). Mezibuněčnou hmotu lze rozlišit podle vzdálenosti od chondrocytů. Má významný mechanoprotektivní účinek na chondrocyty. Zátěž působící ze zevního prostředí se v jednotlivých vrstvách matrix (interteritoriální, teritoriální a pericelulární) vyčerpá než se dostane k povrchu chondrocytu (Choi et al. 2007). Pericelulární část matrix, jejímž funkčním úkolem je přenos mezibuněčné komunikace pomocí signálních molekul a fibril podle míry zatížení chrupavky. Zátěž se odráží v metabolické aktivitě buněk. Propojení chondrocytů a jejich pericelulární matrix do jednoho celku se někdy označuje jako „chondron“ a vytváří separátní anatomickou, metabolickou a funkční podjednotku chrupavky (Poole, Flint, and Beaumont 1987). Teritoriální matrix obklopuje pericelulární matrix a vytváří ochranou síť kolem buněk. Interteritoriální oblast je nejobjemnější částí matrix. V této zóně se nacházejí různě orientovaná kolagenní vlákna podle jednotlivých vrstev chrupavky spolu s proteoglykany (Muir 1995). Acelulární obsah matrix je produkována chondrocyty, který je zodpovědný nejen za její produkci, ale i údržbu a obnovu (Alford and Cole 2005). Chondrocyty se dokáží svou morfologií přizpůsobovat mechanickým nárokům a vytvářejí kolem sebe mikroprostředí, které se dynamicky mění. Toto mikroprostředí zároveň brání migraci těchto buněk mezi vrstvami. Mezi sebou buňky komunikují a reagují na tlakové a piezoelektrické podněty. Optimálními chemické a mechanické vlastnosti mezibuněčné hmoty určují životnost chondrocytů (J. A. Martin and Buckwalter 2000).

Voda představuje 80% vlhké hmotnosti chrupavky a její zastoupení klesá od povrchové směrem k hluboké vrstvě. Větší množství vody je v extracelulární hmotě. Ve vodě jsou rozpuštěny a transportovány minerály i živiny. V jiné formě vytváří voda v interfibrilárním prostoru gelovitou hmotu a zajišťuje lubrikaci tkáně (A. Maroudas et al. 1991). Mechanismus nízkého tření je dán prouděním vody a tlakováním vody z a do tkáně. Chrupavka tímto získává svou schopnost odolávat zátěži přesahující několiknásobně hmotnost člověka (Guilak and Mow 2000).

Kolagen je nejvíce zastoupeným proteinem v těle. U savců je rozpoznáno více než 28 typu kolagenních proteinů. Kolagen se nachází v pojivové tkáni ve formě vláknité nebo globulární. Vlákenná forma kolagenu je nejvíce zastoupena u typu I, II a XI. Kolagen X je typickým globulárním typem kolagenu. Základní aminokyselinou ve stavební jednotce

kolagenu je prolin, hydroxyprolin a glycin. Kolagen utváří trojšroubovici v endoplazmatickém retikulu a je z buněk transportován pomocí chaperonů a C-peptidů. Toto uspořádání je důležité pro odolnost chrupavky vůči tahovým i smykovým silám a stabilizuje extracelulární matrix (Alice Maroudas 1968; A. Maroudas et al. 1991). K tvorbě hydroxyprolinu, stabilizující troj šroubovici, je nutná přítomnost kyseliny askorbové, resp. její dostatečný přísun v potravě, jelikož tělo si ji nedokáže samo syntetizovat. Kolagen je iniciálně syntetizován ve formě prokolagenu a je sekretován do okolního matrix, kde dochází pomocí enzymů (metaloproteináz) k jeho agregaci do fibril (Leung et al. 1979).

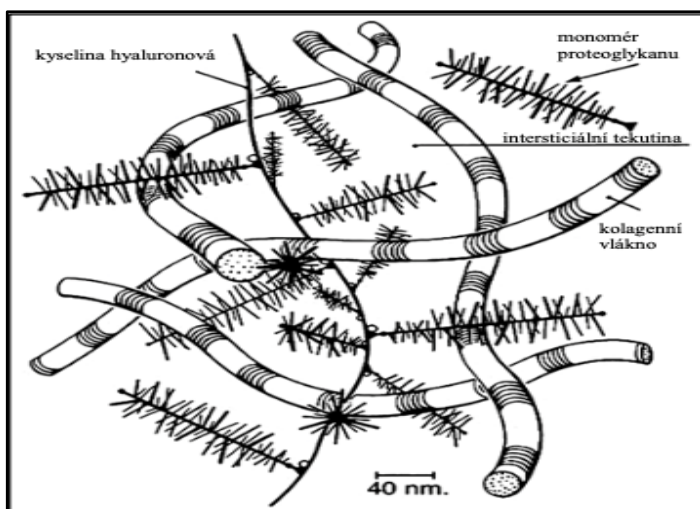
V hyalinní chrupavce je dominantně zastoupen kolagen typu II (cca v 90 %), tvoří více než polovinu suché hmotnosti hyalinní chrupavky. Ostatní kolageny – typu IX a XI vytváří komplexy s kolagenem II. typu a jsou zodpovědné za odolnost vůči tahovým silám a spolu s proteoglykany za odolnost vůči tlakovým silám (Deshmukh and Nimni 1973). Kolagen typu I a typu II také slouží jako znak chrupavčité tkáně, respektive uniformní zastoupení kolagenu typu II určuje hyalinní typ chrupavky. Fibrózní chrupavka obsahuje směs kolagenu typu I a II. Typ kolagenu I se v hyalinní chrupavce prakticky nevyskytuje, vyjma malého množství v povrchové zóně. Naproti tomu v jednovrstvé kultuře buněk chondrocytů nacházíme kolagen typu I ve vysokém množství. Toto je zřejmě dáno dediferenciací chondrocytů v buněčné kultuře (Guilak and Mow 2000; Choi et al. 2007).

Organizace a množství kolagenu se mění dle hloubky chrupavčité tkáně. Množství kolagenu a vody klesá s narůstající vzdáleností od povrchu, a naopak velikost kolagenních fibril narůstá směrem do hloubky chrupavky. Kolagenní fibrily povrchové zóny jsou orientovány tangenciálně, tak aby mohly odolávat stříhové a tlakové síle, naproti tomu střední zóna je víceméně neuspořádaná. Hluboká vrstva obsahuje kolagenní fibrily uspořádané kolmo na povrch chrupavky a penetrují do „tidemark zóny“ respektive do zóny subchondrální kosti. Kolmé uspořádání je důležité pro odolnost vůči stříhové síle mezi vrstvami. V roce 1925 Benninghoff (Benninghoff 1925) poprvé popsal orientaci kolagenních fibril kloubní chrupavky a přirovnal je k arkádám. Isotropní uspořádání potvrdila i pozorování Clarka (1990) (Clark 1990).

Mechanické vlastnosti kolagenní sítě jsou určena množstvím, orientací a provázaností pomocí kolagenních vazeb, tzv. cross linku. Kolagenní vlákna pomocí cross linku, chemicky se jedná o hydroxylaci pyridolinu, navyšují svoji odolnost vůči tahu. Počty cross linkových vazeb narůstají stářím chrupavky, a to vede ke snížení propustnosti kolagenu. Druhým typem

cross linku je chemická reakce na kolagenních aminech, kdy dochází ke vzniku produktů pokročilé glykace. Tento proces vede k charakteristickému nažloutnutí hyalinní chrupavky. Chrupavka se glykací stává tužší, ale také křehčí a může vést k rozvoji degenerativních změn a osteoartróze (He et al. 2022).

Proteoglykany jsou velké makromolekuly složené z proteinového jádra, na které je napojeno mnoho řetězců glykosaminoglykánů (GAGs), které se navzájem odpuzují. Kloubní chrupavka obsahuje různé druhy proteoglykanů (agrekan, dekortin, biglykan). Proteoglykany vytváří síť proplétající se v síti kolagenní vláken. Nejčastějším typem proteoglykanu je agrekan. Agrekan tvoří s GAGs molekuly tvarově podobné štětce na flašky. Mezi nejvíce zastoupené GAGs v chrupavce patří chondroitinsulfát, keratansulfát, dermatansulfát a hyaluronany. Vlastnosti proteoglykanů mají důležitý vliv na mechanickou odolnost chrupavky, zejména díky rovnováze a udržení vody. Tyto molekuly dokáží nasávat tekutinu a udržovat vysoký hydrostatický tlak v mezibuněčném prostoru při zachování nízké propustnosti, a to vede k odolnosti tkáně proti mechanickým změnám působícím na povrch chrupavky při pohybu.



Obr. 2 Struktura a uspořádání kolagenu (zdroj Havlas V., Habilitační práce, Možnosti léčby defektu hyalinní chrupavky, 2011)

Zároveň tekutina vytlačená z intersticia během pohybu zvyšuje lubrikaci a snižuje tření povrchu kloubních ploch. Je prokázáno, že ztráta, čili zvýšená degradace proteoglykanů vede k rozvoji osteoartrózy (Ateshian 2009).

### 4.3 Histologické vrstvy chrupavky

Zonální uspořádání se odráží v morfologii buněk, orientaci kolagenních fibril a biochemickém složení ECM. Rozlišují se 4 vrstvy hyalinní chrupavky: povrchová, střední, hluboká a zóna kalcifikované chrupavky. Uspořádání se také promítá do biologických a mechanických vlastností jednotlivých vrstev. Různé požadavky odolávat určitému typu zátěže (kompresi, stříhové, tahové a hydrostatické síle) vede k různému uspořádání, distribuci a syntetické aktivitě buněk. Složení chrupavčité tkáně se mění během vývoje organismu. Dospělá chrupavka je složena z vody v 70-80 % hmotnostního objemu. Solidní, pevná frakce je složena zejména z kolagenních vláken (50-75 %), proteoglykanů (15-30 % suché hmotnosti). Tento mix kolagenu a proteoglykanů vytváří síť, která umožňuje základní biomechanické vlastnosti chrupavčité tkáně (Darling, Hu, and Athanasiou 2004).

*Povrchová vrstva*, označována jako tangenciální vrstva, je zóna, která je v kontaktu se synoviální tekutinou a pomáhá odolávat tahovým a střížným silám působícím při pohybu na kloubní povrch. Základní funkcí této vrstvy je ochrana hlubších vrstev chrupavky (J. A. Martin and Buckwalter 2000). Tato zóna tvoří 10-20 % tloušťky chrupavky a obsahuje zejména kolagenní vlákna typu II a IX, které jsou paralelně orientované s povrchem chrupavky. Chondrocyty v této vrstvě jsou oploštěné a vrstva má nízkou permeabilitu (Muir 1995).

Chrupavčitý povrch je kryt nefibrózní nanometrovou zónou označovanou jako lamina splendens. Funkcí této vrstvy proteinů a molekul synoviální tekutiny je snížení frikce a ochrana proti opotřebení chrupavky.

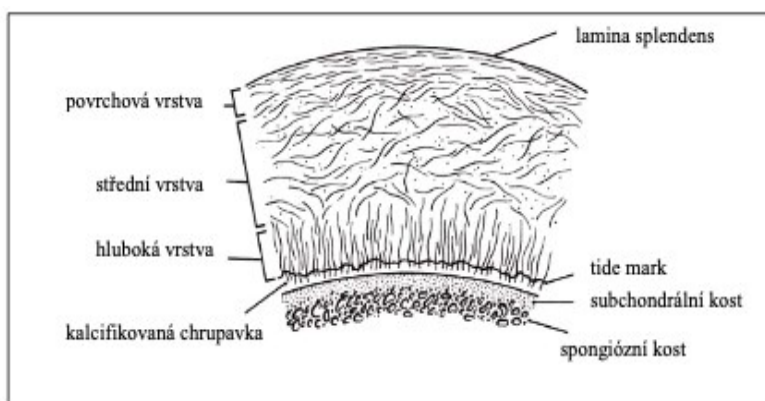
Další vrstvou je *střední, přechodová, zóna chrupavky*. Tato vrstva vytváří jakýsi most mezi povrchovou a hlubokou vrstvou, představuje cca 40–60 % objemu chrupavky a její funkční charakteristikou je tvorba nárazníku odolávající tlakovým silám. Kolagenní vlákna uspořádána do šikmého průběhu, vytváří arkády uvnitř extracelulární matrix. V této vrstvě je také nejvyšší zastoupení proteoglykanů (A. Maroudas et al. 1991). Naproti tomu se zde nachází nízký počet oválních až kulatých chondrocytů.

*Hluboká vrstva*. Hluboká, radiální zóna tvoří 30 % tloušťky chrupavky a je poslední zónou čistě hyalinní chrupavky před kostní tkání. V této zóně se nacházejí velké molekuly kolagenu orientované kolmo na povrch chrupavky, které jsou spojeny se subchondrální kostí (Muir 1995). Tato vrstva odolává zejména stříhovým silám mezi chrupavkou

a subchondrální vrstvou kosti. Densita buněk v této vrstvě je také nejnižší. Buňky zde vytvářejí sloupcovité uspořádání, jsou mírně protažené a orientované v soulase s průběhem kolagenních vláken, tedy kolmo na povrch chrupavky (A. Maroudas et al. 1991).

*Tide mark*, je jemná linie mezi hlubokou zónou a zónou kalcifikované chrupavky (Redler et al. 1975). Tato přechodová zóna zřejmě hraje roli v přenosu stříhových sil mezi hlubokou vrstvou chrupavky a subchondrální kostí. Dále umožňuje výživu nejhlubší vrstvy chrupavky přes její dostupné mikropóry.

*Kalcifikovaná vrstva chrupavky* navazuje na *tide mark* a vytváří propojení chrupavky se subchondrální kostí. V této vrstvě nacházíme ojedinělé hypertrofické chondrocyty.



Obr. 3 Vrstvy chrupavky (volně podle Mankina (J. A. Buckwalter and Mankin 1998)).



## 5 Fyziologie a patofyziologie hyalinní chrupavky

Kloubní chrupavka je vysoce specializovanou pojivovou tkání, jejíž hlavní úlohou je zajistit přenos sil zátěže v diarthrotickém kloubu, s co možná nejnížším koeficientem tření styčných kloubních povrchů. Mechanické chování chrupavčité tkáně je závislé na interakci mezi pevnou a tekutou složkou chrupavky. Jedinečnost a komplexnost chrupavčité tkáně jako celku je faktem, který je nutné respektovat v léčebném přístupu. Chrupavka je vystavena drsnému biomechanickému prostředí, a to bez cévního, lymfatického a nervového zásobení. Toto vede k vysokému riziku jejího poškození s limitní schopností reparace této tkáně. Složité morfologické a fyziologické vlastnosti této tkáně se promítají i do obtížné léčby poškozené chrupavky. Podle všech dosavadních znalostí se zdá, že obnova morfologie a organizované struktury je klíčem k úspěchu v léčbě poškození chrupavčité tkáně. Najít cestu, jak zabránit vzniku a progresi poškození synoviálního kloubu a jak obnovit jeho funkci je jedním z nejtěžších úkolů v ortopedii. V posledním půlstoletí dochází k rozvoji endoprotetiky a tím k úspěšné léčbě bolesti miliónů lidí s poškozením kloubů. Toto lze jednoznačně označit za jeden z největších milníků v historii ortopedie. Žádná náhrada kloubního povrchu se však nedostala tak blízko, aby dokázala replikovat funkci, trvanlivost a pohyb synoviálního kloubu. Synoviální kloub dokáže provádět stabilní bezbolestný pohyb s nízkou frikcí, kterou nedosáhne žádný umělý povrch. Ačkoliv umělé náhrady kloubů u lidí s rozvinutou destrukcí kloubů většinou vedou k efektu bezbolestného pohybu, mají své limitace, kterými jsou zejména vážné a devastující komplikace.

Hyalinní chrupavka je ve funkčních charakteristikách nejdokonalejší tkání, co se týče lubrikační schopnosti a minimalizace zatížení subchondrální kosti. Přes usilovnou snahu se nedaří rozpoznat a určit rizikové faktory, které vedou k poškození kloubu.

Chrupavka nemá nervovou tkáň a cévy, tímto byla považována za relativně inertní tkáň. Identifikace signálních molekulárních mechanismů, které kontrolují její formaci, růst a funkci přesvědčují o opaku. Porozumění fyziologickým a patofyziologickým mechanismům a možnosti časně detekce jejich změn by mohlo vést k včasné léčbě na počátku jejího poškození.

## 5.1 Metabolismus hyalinní chrupavky

Výživa chrupavky probíhá ze synoviální tekutiny a je ovlivněna velikostí, nábojem a molekulárním složením transportovaných látek. Bez přímého přísunu živin z krevních cév nebo lymfatických cév je chondrocyt primárně závislý na anaerobním metabolismu.

Synoviální tekutina jako ultrafiltrát krve a intersticiální tekutiny má za úkol výživu a odstranění produktů metabolické aktivity. Další její kritickou funkcí je, funkce lubrikantu povrchu chrupavky. Synoviální tekutina obsahuje velké množství hyaluronové kyseliny a chová se jako viskózní tekutina, což jí umožňuje se spolupodílet na absorpci mechanického zatížení. Nevýhodou synoviální tekutiny je to, že po zatížení okamžitě snižuje svou viskozitu a při dlouhodobém zatížení řídne. To vede k tomu, že se s nárůstem času je míra zatížení více přenášena na solidní část ECM (Mow et al. 1980). Obnova rovnováhy a udržení těchto mechanismů je důležité pro životnost chrupavčité tkáně.

## 5.2 Patofyziologie, reakce chrupavky na poranění

Reakce buněčné složky závisí na typu poranění a dostupnosti cév do místa poranění. Proto u chondrálních lézí pozorujeme zapojení pouze chondrocytů do reparační aktivity, ostatní buněčné složky nejsou dostupné. Chondrocyty syntetizují ve vyšší míře složky ECM 2 týdny po zranění (DePalma and McKeever 1966; Joseph A. Buckwalter 1998). V důsledku toho lze detekovat stavy, kdy ještě neúplně vyplněný a nematurovaný defekt je plně podroben zátěži a tím dochází k jeho degeneraci a nezhojení defektu (Shapiro et al. 2002). Naproti tomu osteochondrální defekty vedou k delším reparativním procesům, které přesahují výrazně 2 týdny. Na zhojení se podílejí nejen aktivované chondrocyty ale také krevní destičky, které při tvorbě fibrinové zátky uvolňují biologicky aktivní látky stimulující migraci progenitorových, mesenchymálních kmenových buněk do místa poranění. Buňky při reparaci produkují kolageny typu I a typu II. Během 6-8 týdnů je defekt vyplněn a tvoří jej směs hyalinní a vazivové chrupavky (Cheung et al. 1980; Furukawa et al. 1980). Je prokázáno, že po roce od úrazu dochází především k produkci kolagenu typu I. V tomto období převládá v reparativním procesu vazivový typ chrupavky. Kolagen I. typu není schopen odolávat takovým biomechanickým silám jako typ II, který je typický pro hyalinní chrupavku. Při přetížení může postupně dojít k degeneraci a fibrilaci vytvořené chrupavčité tkáně, která vede ke ztrátě proteoglykanů (Squires et al. 2003; Ghadially, Ghadially, and Ghadially 1977) a to vede ke smrti chondrocytů a makroskopicky rozvoji hlubokých

prasklin, které lze makroskopicky pozorovat (Furukawa et al. 1980; Shapiro et al. 2002). Zvláštností je, že tento proces může nastat i u nedospělých jedinců, kde ještě není uzavřena růstová zóna a vaskularizace u nich je na dosah povrchu chrupavky (DePalma and McKeever 1966; Ghadially, Ghadially, and Ghadially 1977). Rozvoj osteoartrózy po poranění byl přesvědčivě doložen a popsán v několika studiích u osteochondrálního defektu, zatímco u chondrálního defektu a mikrofraktur povrchu tento proces nebyl zatím přesně popsán (Natoli and Athanasiou 2008).

### **5.2.1 Regenerace chrupavky**

Možnost sebe obnovy chrupavčité tkáně je výrazně omezena a je definována velikostí, lokací a hloubkou takového defektu (H. Mankin 1982). Je prokázáno, že poranění chrupavky samotné, které nepenetruje do subchondrální kosti nemá schopnost sebe obnovy. Naproti tomu poranění penetrující má určitý reparační potenciál (Hunziker 2002). Někteří vědci prokázali, tzv. kritickou velikost defektu chrupavky, kdy léze menší než 3mm v průměru, je schopna se spontánně zhojit tkání podobné hyalinní chrupavce (Salonius et al. 2019).

Do reparativní schopnosti se promítá nejen zonálním uspořádání chrupavky, ale také vzdálenost od chondrocytů v jednotlivých vrstvách. Chondrocyty udržují charakteristické složení ECM, co se zastoupení kolagenu, proteoglykanů a menších molekul týče, v závislosti na lokalitě jednotlivých vrstev chrupavky. Patologické stavy jako je poranění chrupavky, vedou k poškození homeostázy mezi chondrocyty a složením ECM, jak co do množství vody, tak do složení solidní frakce.

### **5.2.2 Stárnutí chrupavky**

Věk určuje organizaci chondrocytů a také složení extracelulární matrix. Chondrocyty věkem snižují svoji hustotu osídlení povrchové zóny, zatímco hlubší vrstvy chrupavky mají zvýšenou buněčnost (Hardingham and Bayliss 1990). S přibývajícím věkem tedy dochází k přeměně v zonální buněčné distribuci, ale i počtu buněk – chondrocytů (Vojtěch Havlas 2011). Postupem věku dochází k úbytku hydratace ECM a tímto dochází k nárůstu tuhosti a snížení odolnosti vůči tlakovým silám. Tento jev může mít za důsledek konsolidace subchondrální kosti s tvorbou sklerózy ve spojení s kostním edémem, který lze pozorovat na magnetické rezonanci pod poškozenou chrupavkou. Porucha homeostázy ECM je hlavním patofyziologickým dějem degradace chrupavky (J. A. Martin and Buckwalter 2000).

Velikost proteoglykanových agregátů se věkem snižuje. K tomu může dojít snížením vazeb na hyaluronovém řetězci nebo poškozením vazebných míst v důsledku proteolytického poškození tkáně. Nacházíme také snížení velikosti pórů díky agregaci mezibuněčné hmoty s úbytkem chondroitinsulfátů (Zimmermann et al. 2003).

Fyziologické i patofyziologické procesy stárnutí se promítají do cytoskeletu chondrocytů. V eukaryotických buňkách se nacházejí monomerní proteiny, které dokáží polymerizovat a vytvářet uvnitř buněk 3D síť, která propojuje nitrobuněčné komponenty s extracelulárním podněty. Tyto cytoskeletální proteinové molekuly tvoří mikrovlákná aktinu, tubulinu a intermediární vlákna (např. vimentin) (Trickey, Vail, and Guilak 2004; Haudenschild et al. 2011). Tato cytoskeletální síť je důležitá v mnohých buněčných procesech, jako je například mitóza, migrace buněk, tvar buněk, přenos mechanických sil a reakce na mechanické stimuly z okolního prostředí tzv. „mechanotransdukce“. Chondrocyty jsou unikátní v tom, vyjma nej povrchovější vrstvy buněk, že si zachovávají oválný tvar. Tento tvar je fenotypicky zásadní pro chondrocyty (Daniels and Solursh 1991). V jednovrstevné kultuře chondrocyty změni svůj tvar – oploští se a to vede k změně signálních dějů uvnitř buněk a snížení syntézy specifických proteinů cytoskeletu buněk (Darling, Hu, and Athanasiou 2004). Tento jev se promítá do kvality autotransplantátů chondrocytů.

Mechanotransdukce je přenos fyzikální síly (komprese, hydrostatické tlaku, smykového tření) na biochemické děje a procesy uvnitř buněk. Mezi první klasické práce zabývající se pozorováním těchto procesů patří práce Juliuse Wolffa (Frost 1990) o vlivu tlakových a tahových sil na remodelaci kostí. V chrupavce můžeme také pozorovat pravidlo Wolffova zákona, kdy v místě vyššího mechanického stresu je chrupavka tlustší (Shepherd and Seedhom 1999). Mechanotransdukce tímto ovlivňuje a mění genovou expresi, remodeluje extracelulární matrix a proliferační aktivity buněk a zároveň chování buněk vůči okolí (např. schopnost adheze)(Jalouk and Lammerding 2009). Naopak neadekvátní zatížení vede ke spuštění patologických procesů uvnitř buněk, které resultují v poruchu cytoskeletu například na podkladě poruchy iontových kanálů a tím dochází ke změně hydrostatického napětí nitrobuněčného prostředí, které se promítá do patofyziologie homeostázy buněk (Joseph A. Buckwalter, Mankin, and Grodzinsky 2005).

### 5.3 Pohyb a biomechanické vlastnosti chrupavky

Je prokázáno, že pravidelný a přiměřený pohyb napomáhá správné metabolické funkci chondrocytů. Jestliže dojde k nečinnosti kloubu, tak tento děj resultuje k degradaci chrupavky. Chrupavka je specializovaná tkáň pojiva s jedinečnými viskoelastickými vlastnostmi. Je schopna odolávat vysoké cyklické zátěži, aniž by vykazovala známky degradace. Tímto způsobem chrání subchondrální kost a poskytuje kloubu hladký, lubrikovaný povrch s nízkým třením. Kloubní chrupavka je k tomuto specificky složena, jak z tekuté složky, tak suché složky – sítě kolagenů, proteoglykanů a glykoproteinů. Síla působící na povrch kloubu se několikanásobně navyšuje při zatížení pohybem, v kyčli 3,3krát, v kolenu dokonce 3,5krát než je váha vlastního těla a to s frekvencí až 1Hz (Guilak and Mow 2000). Deformační schopnosti chrupavky hrají zásadní roli v mechanických vlastnostech chrupavky. Chrupavku můžeme z mechanického hlediska popsat jako viskoelastickou tkáň (Trickey, Vail, and Guilak 2004). Viskoelastická vlastnost tkáně umožňuje chrupavce rychlé zatížení rozprostřít mezi tekutou a solidní část ECM a absorbovat tak působící energii. Zatížení a vzniklá deformace chrupavky vytváří kombinaci tlakové, tahové a smykové síly působící na chrupavčitou tkáň (Guilak and Mow 2000). Zdravá chrupavka může překonat tento typ zatížení desetiletí bez poruchy struktury nebo selhání její funkce (Trickey, Vail, and Guilak 2004).

#### 5.3.1 Tlaková síla

Tlakové síly jsou jedním z hlavních působících sil na chrupavku při cyklu chůze. Míra komprese chrupavky je řízena primárně pohybem tekutiny uvnitř mezibuněčné složky, která má nízkou porozitu. Pohyb tekutiny je ovlivněn složením solidní matrix, velikosti jejích porů struktury uspořádání a propojení (Mow et al. 1980). Proto porucha struktury ovlivňuje poruchu funkce a opačně. Viskoelastická tkáň ovlivňuje charakteristiku chování tekutiny v tkáni ve vztahu k působení síly v čase. Tlak tekutiny se s působícím časem snižuje a tuhá část matrix musí převzít její funkci (L. A. Setton, Mow, and Howell 1995). Proudění tekutiny je v povrchových vrstvách největší a klesá směrem k subchondrální kosti. Mechanická deformace tkáně není dána jen kompresivní silou působící na tkáň z povrchu, ale je i dána stlačením tekutiny uvnitř tkáně proti subchondrální kosti. Tímto mechanismem dvojnásobně dochází ke konsolidaci chrupavčité tkáně za cenu, že část tekutiny opouští chrupavku. Po odstranění tlaku dochází k opětovnému nasátí tekutiny a obnově

prostorového uspořádání. Toto je dáno elasticitou solidní tkáně a hydrostatickým tlakem uvnitř matrix. Během dne tento mechanismus přesto lehce ztrácí svoji účinnost a to asi o 15-20 % (Mow et al. 1980). Během odpočinku, noci, dokáže organismus množství tekutiny znovu obnovit.

### **5.3.2 Tahová síla**

Tahová síla působí na chrupavku při klouzání dvou povrchů vůči sobě v jednom směru. Druhou možností je vznik tahové síly při zaseknutí nebo kompresi ve směru pohybu. Je důležité podotknout, že při pohybu kloubních povrchů dochází k většímu zatížení v tahu než v kompresi. Při tahovém působení síly dochází k uspořádání kolagenních fibril a protažení jejich vláken v soulase s orientací působící síly. Chrupavka jeví nelineární chování kolagenních fibril uvnitř tkáně. Při vzniku nízkého tahu dochází k vyššímu uspořádání vláken. Do 15 % napětí se udržuje tkáňová rovnováha, poté dochází k poškození vazeb (Akizuki et al. 1986). Vlastnost odolávat tahu je určena zónovým uspořádáním tkáně (povrchová část je tužší než střední a hluboká zóna), densitě a průměru kolagenních fibril, množství cross linků, iontových vazeb a interakcí mezi kolagenem a proteoglykany (Akizuki et al. 1987).

### **5.3.3 Smykové napětí**

Smykové tření se vytváří v tkáních chrupavky na podkladě rotace a translace kloubu. Smykovému tření tkáň odolává zejména díky solidní části extracelulární matrix, bez podílu tekuté části, tedy na podkladě interakce kolagenních vláken a sítě proteoglykanů. Chrupavka se chová jako viskoelastický materiál neneutonského typu, tedy nelineární deformace na míře působící síly (Hayes and Mockros 1971).

### **5.3.4 Tření a opotřebení chrupavky**

Těmito pojmy se zabývá tribologie kloubu (z řeckého tribo – třít). Tribologie je nauka o tření opotřebení a lubrikaci povrchů, které se vůči sobě posouvají. Kloub je komplexní systém, který využívá biomechanických a biochemických vlastností tkáně a synoviální tekutiny, aby snížil otěr materiálu při posunu na minimum. K tomuto přispívá uspořádání povrchu, lubrikace povrchů, vlastnosti lubricinu, hyaluronanů a také schopnost tkáně vytvářet navýšení hydrostatického tlaku v kontaktní ploše (Link et al. 2020).

## 6 Diagnostika poruchy chrupavky

### 6.1 Rentgenologické změny

Detekovatelné změny jsou na podkladě změn hustoty a složení tkáně. Dochází k tvorbě horizontálních a vertikálních prasklin chrupavky, které mají za následek odplavení proteoglykanů. Navýšení fragmentace chrupavky vede k neúměrnému zatížení a tím zvýšenému opotřebení a odhalení subchondrální kosti, kde se mohou tvořit reaktivní změny. Dochází ke změnám v oblasti tide mark, která se stává nepravidelná a vrůstají do ní cévy ze spongiózní kosti. V subchondrální vrstvě kosti dochází k remodelaci a ta se projevuje zvýšením sklerotické vrstvy kosti patrné na RTG snímku. Na rentgenových snímcích lze popisovat subchondrální sklerózu a tvorbou okrajových osteofytů. Buňky, které mohou za tvorbu takovýchto kostní apozic – osteofytů, nejsou přesně známy. Předpokládá se, že se jedná o chondrocyty z okrajových částí chrupavky. Osteofyty vedou ke snížení mobility kloubu a bolesti. Jestliže tlak kloubní tekutiny přesáhne pevnost skeletu, tak může dojít k tvorbě cystických deformit subchondrální kosti. A tyto se postupně rozšiřují, jak tekutina proniká skrze Haverské kanálky (LANDELLS 1953), tento proces lze také pozorovat na RTG snímku.



Obr. 4 Stádia gonartrózy dle Kellgrena a Lawrence (vlastní archiv autora)

## 6.2 Magnetická rezonance

MRI je důležitým nástrojem v hodnocení kloubního povrchu. Chrupavku a subchondrální kost lze zobrazit na MRI s velmi dobrým rozlišením. Lze určit integritu chrupavky, subchondrální a spongiózní kost (Karvonen et al. 1990). Výhodu MRI oproti ostatním zobrazovacím metodám je její nulové zatížení ionizujícím zářením. Standartní pulzní sekvence T1 a T2 odrážejí vlastnosti tkáně. Na T1 vážených snímcích má chrupavka vyšší intenzitu než kloubní tekutina a opak platí pro obrázky v T2 vážené sekvenci. T2 vážené snímky produkují vysoce intenzivní signál, který lze využít k měření-kvantifikaci kolagenové organizace v ECM (Nieminen et al. 2001). Pomocí MRI lze určit také obsah glykosaminoglykánů. Technicky se používá aplikace gadolinia jako kontrastní látky, podané ve vhodné koncentraci, která zkracuje T1 relaxační čas (delayed gadolinium-enhanced MRI). Oblast s nižším zastoupením glykosaminoglykánů představuje zónu poraněné, patologické chrupavky (Bashir et al. 1999).

Jiná technika se používá k určení hodnocení proteoglykanů na podkladě hustoty pevného náboje chrupavky. Nicméně takovéto mapování je velmi náročné a dává rizika vzniku artefaktů v zonálním zobrazení chrupavky (Shapiro et al. 2002).

## 6.3 Biochemická analýza

Známky rozvoje osteoartrózy lze detekovat na molekulární úrovni. Tohoto jevu se využívá v kontrole účinnosti léčiv ovlivňující zánět a léčiv modifikujících rozvoj osteoartrózy (DMOADs, disease modifying osteoarthritis drugs). Při patologickém stavu dochází k zvýšení koncentrace katabolických biomarkerů (keratan sulfátu, oligosacharidů hyaluronanu, C-terminálního peptidu kolagenu, COMP (cartilage oligomeric matrix protein) fragmentů, metaloproteináz. Tyto markery lze detekovat v řádu měsíců v synoviální tekutině, ale i v krvi pacientů, naproti tomu změny viditelné na rentgenu lze pozorovat v řádu let od poranění (Petersson et al. 1997; L. S. Lohmander, Saxne, and Heinegard 1994).

Buněčná smrt chondrocytů může být detekovatelná mnohem dříve než degradační změny v ECM. Vzhledem k nulovým možnostem fagocytózy v chrupavčité tkáni, dochází při apoptóze díky lokaci chondrocytů v avaskulárních lakunách k navýšení koncentrace tumor necrosis faktoru (TNF) a rozvoji prozánětlivé kaskády (Polzer, Schett, and Zwerina 2007).



## 7 Patologické stavy chrupavky

Pochopení a výzkum v oblasti patologie a patofyziologie chrupavky povede k využití těchto poznatků ke zlepšení léčby poškozeného kloubu a pomůže od bolesti a invalidity miliónům lidí. Najít cestu, jak včas zasáhnout do procesu destrukce kloubu a jak obnovit biologické vlastnosti chrupavky, by bylo jedním z milníků medicíny.

### 7.1 Revmatoidní artritida

Jedná se o onemocnění, kterým trpí cca 1 % populace a jeho příčinou je autoimunitně zprostředkovaný zánět, který vede k destrukci kloubu. Jedná se o systémový zánět, jehož spouštěč není zcela znám a v kloubu vede k rozvoji synovialitidy. Za nejčastější spouštěče bývají označovány tyto faktory: životního prostředí, nezdravý životní styl (kouření), infekce a expozice chemickým a antigenním látkám. Ženy jsou postiženy dvakrát častěji než muži a je to zřejmě dáno z důvodu estrogenového působení na T-lymfocyty (Pernis 2007).

Pacienty s revmatoidní artritidou lze rozdělit na dvě skupiny. Rozdělení je určeno podle přítomnosti revmatoidního faktor (RF), což jsou protilátky proti Fc části lidského imunoglobulinu typu G. Přítomnost RF u revmatoidní artritidy dává diagnostické a prognostické faktory. RF není specifický pro revmatoidní artritidu. Nově je možno detekovat u pacientů také jiné protilátky, které dávají informace o riziku vypuknutí nemoci několik před prvními kloubními symptomy. Mezi tyto protilátky patří ACPA (anti-citrullinated protein antibodies). Nález ACPA má větší specifitu pro revmatoidní artritidu, než-li pozitivní nález RF (van Delft and Huizinga 2020). Díky výzkumu a znalostem patofyziologie synovialitidy kloubu, vznikají nové léky cílené na léčbu patologických podskupin imunitních buněk a fibroblastů. Jedná se o cílenou biologickou léčbu RA (Scherer, Häupl, and Burmester 2020).

### 7.2 Osteoartróza

Nejběžnějším typem artritidy je osteoartróza. Prevalence osteoartrózy se zvýšila díky prodloužení délky života. Určit incidenci osteoartrózy je problematické. Lze přepokládat, že je vyšší, než je udáváno, protože jsou evidováni jen symptomatictí pacienti. Ve skupině nad 45let lze nalézt údaje o incidenci 27,8 % pro osteoartrózu kolenního kloubu a 27,0 % u kyčle. Ve skupině nad 65 let již trpí nějakou formou osteoartrózy 80 % populace (Garriga et al.

2020). Při porušení tkáně dochází k postupným erozím povrchu chrupavky a synoviální tkáně a ta postupně způsobuje u pacientů bolest a ztrátu funkce. Patofyziologie osteoartrózy není dostatečně prostudována a v současné době neexistuje žádná adekvátní léčba, která by nemocnění zcela zastavila. Jedinou možností odstranění nemoci zůstává náhrada kloubu-endoprotéza. Primárním rizikovým faktorem osteoartrózy je věk. Proto je klinický výzkum zaměřen na popis procesu stárnutí chrupavky a jeho roli při vzniku osteoartrózy. Garriga et al. (Garriga et al. 2020) popisuje, že jedna pětina populace v USA ve věku 45 let má osteoartrózu a polovina populace nad 65 let je postižena tímto onemocněním, větší prevalence je u žen. Osteoartróza snižuje kvalitu života a to má své socioekonomické dopady ve společnosti. Během progresu osteoartrózy dochází ke snížení kolagenu a proteoglykanů, naproti tomu dochází k navýšení objemu vody v intersticiu a tím dochází ke změnám biomechanických parametrů chrupavky (Lori A. Setton, Elliott, and Mow 1999). Makroskopicky lze pozorovat na povrchu chrupavky fibrilace a praskliny, které postupují do plochy a hloubky směrem k subchondrální kosti. Osteoartrózu lze rozdělit podle různých faktorů například podle počtu postižených kloubů na oligoartrikulární nebo generalizovanou, nebo podle příčiny na primární – idiopatickou, u které není jasná příčina a na sekundární-následkem zjistitelného důsledku (poranění kloubu, na podkladě osových deformit či z metabolických příčin). Toto rozdělení má i své praktické důsledky, jelikož při léčbě je nutné se zaměřit na hledání takovýchto sekundárních příčin a dle toho volit vhodnou terapii.

### **7.2.1 Primární osteoartróza**

Faktor věku je jistě přispěvatelem k rozvoji osteoartrózy, ale stále není jednoznačně určeno, zda je příčinou, nebo jen důsledkem akumulace množství opotřebení kloubu dané časem.

Fyziologicky dochází časem k nahromadění koncových produktů pokročilé glykace chrupavky (Advance Glycation Endproducts - AGEs) (Sacitharan 2019), které vedou ke snížení odolnosti matrix chrupavky. Zůstává otázkou, zda věkem snížená metabolická aktivita chondrocytů, vede k většímu riziku poranění a tím i rozvoji osteoartrózy. Je nutné podotknout, že nejen akumulace opotřebení – tedy strukturální porucha, ale také porucha funkce – snížení pohybu, vedou k degeneraci a osteoartróze (Joseph A. Buckwalter, Mankin, and Grodzinsky 2005). Osteoartróza není onemocněním jen kloubního povrchu, ale také

synovie (rozvoj katabolických procesů), onemocnění subchondrální kosti (sklerotizace) a to vede k domněnce, že příčina osteoartrózy je spíše multifaktoriální.

V literatuře lze zaznamenat stoupající sílu evidentních podkladů, že genetika hraje hlavní roli ve výčtu možných příčin idiopatické osteoartrózy. Ve zdánlivě fenotypicky normální chrupavce jsou pravděpodobně složité rozdíly v exprese jednotlivých genů a tyto, když dostoupí v určité kombinaci, tak mohou vést k zvýšení rizika časného rozvoje osteoartrózy (Sandell 2012).

### **7.2.2 Sekundární osteoartróza**

Dietní chyby (alkoholismus), metabolické choroby (diabetes mellitus, dna) mohou vést k zvýšené tvorbě krystalů v tkáních, tedy i v chrupavce, a tím k rozvoji osteoartrózy. Nejčastěji se formují krystaly ze solí vápníku a kyseliny močové. Uložené krystaly v chrupavce vedou k mechanickému poškození struktury chrupavčité tkáně a tvorbě otěrových částic. Tím se aktivuje kaskáda zánětu kloubu, synovie (Muehleman et al. 2008). Další patologie spojené s tvorbou krystalů lze zařadit do skupiny genetických poruch.

Sekundární osteoartróza na podkladě poruchy biomechaniky, osy kloubu. V tomto případě vzniká na podkladě poruchy souhry biomechanických a biochemických faktorů extracelulární matrix (ECM). Fyziologické prostředí ECM je udržováno chondrocyty na základě vhodné míry a frekvence zátěže. Naopak při abnormálním zatížení dochází k opotřebení a zániku chondrocytů a tím k tvorbě prozánětlivých faktorů (Healy et al. 2005).

Biomechanický faktor je nejvíce prozkoumán v oblasti kolenního kloubu ve vztahu k chůzi a zatížení jednotlivých částí kloubu zejména ve vztahu k zvýšení tonu adduktorů která vede k osové varózní deformitě kloubu (Miyazaki et al. 2002). Tento děj vede k rozvoji osteoartrózy mediálního kondylu femuru a tibie. Ne překvapivě 60-80 % pacientů přicházejících k výměně kloubu má postižený zejména mediální kompartement kolenního kloubu (T. P. Andriacchi 1994). Změny v biomechanice vedou k histologické změně tkáně a složení ECM a to zejména ve ztrátě proteoglykanů, což vede ke snížení schopnosti odolávat kompresivním silám a ke snížení výšky chrupavky (Hudelmaier et al. 2006).

Ke změně biomechaniky může dojít ale i při poruše stability kloubu. Příkladem je poranění předního zkříženého vazy (LCA), které vede k abnormálnímu přetížení určité části okrsku chrupavky a tím k rozvoji osteoartrózy (Thomas P. Andriacchi and Dyrby 2005; Palmieri-

Smith and Thomas 2009). Role menisku v rozvoji osteoartrózy je dána jeho mechanickou funkcí v kloubu, kterou je zvýšení kontaktní zóny a vyrovnání drobných poruch kongruence kloubních ploch mezi femurem a tibíí. Poranění nebo ztráta menisku operačním zákrokem vede k rozvoji osteoartrózy. Při částečné meniskektomii dochází přetížení přiléhající chrupavky o 50-100 % a při kompletní meniskektomii narůstá kontakt až o 270 % (Peña et al. 2005).

Obezita je další specifický rizikový faktor, který vede k rozvoji osteoartrózy na podkladě porušení fyziologie chrupavky z nadměrné zátěže. Obezita je silně spojena s rozvojem osteoartrózy v kolenním kloubu (Browning and Kram 2007; Garriga et al. 2020). Opotřebením povrchové zóny je dáno ztrátou schopnosti povrchových chondrocytů produkovat povrchový protein (superficial zone protein – SZP), lubricin. Tento jev je patrný při nadměrném zatížení u pacientů s nadváhou (Jay et al. 2007).

### **7.3 Traumatické poškození chrupavky**

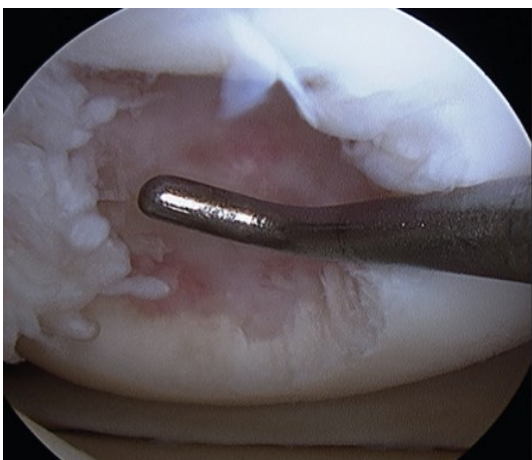
Poškození povrchu chrupavky na podkladě přímého poranění, anebo volným tělískem v kloubu. Poškození chrupavky lze rozdělit na tři typy: chondrální poranění, osteochondrální poškození a mikrofraktury (nemá nic společného s chirurgickou technikou). Každý typ má svou specifickou změnu v tkáni, složení a biomechanických vlastnostech, včetně buněčné reakce. Chondrální a osteochondrální defekt je viditelný prostým okem, naproti tomu mikrofraktury nejsou makroskopicky viditelné. Mikrofraktury chrupavky jsou typem poškození, které nevedou k okamžitému poškození chrupavky viditelným prostým okem. Jedná se o poškození subchondrální kosti, vzniku mikrofraktury, která se zhojí sklerotizací. Toto vede k poškození kolagenní sítě ECM chrupavky s odezvou poruchy preoglykanů, kterou lze pozorovat až v povrchové zóně. Je zajímavé, že i když dojde ke zhojení subchondrální trabekulární fraktury, tak negativní biochemické a biomechanické změny v chrupavce přetrvávají (Radin et al. 1978).



Obr. 5 Artroskopický obraz traumatického chondrálního defektu mediálního kondylu femuru (vlastní archiv autora), stupeň III dle Ouerbridge.

Chondrální praskliny a defekty jsou typem poškození povrchu chrupavky, které nezasahují do subchondrální kosti. Tyto defekty jsou viditelné pouhým okem a mohou vznikat na podkladě traumatu, nebo z nepřiměřeného zatížení, ale také působením volných tělísek, anebo jako progresse mikrofraktur.

Osteochondrální léze jsou typem poškozením, kdy dochází k poškození chrupavky jdoucí do hloubky směrem k tide mark zóně a poškození penetruje do subchondrální kosti. Ačkoliv toto poranění zasahuje do vaskulárně bohaté tkáň subchondrální kosti, tak přesto vzniká biomechanicky nedostatečná tkáň, kde na místo hyalinní chrupavky nacházíme vazivový typ chrupavky v místě zhojeného defektu. Tento stav poté resultuje v rozvoj osteoartrózy (Burr and Gallant 2012).



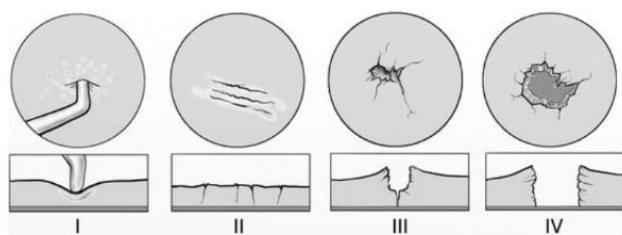
Obr. 6 Artroskopický obraz osteochondrální defekt kondylu femuru (vlastní archiv autora)

Incidence poranění chrupavky je nejasná, jelikož k ošetření dochází jen symptomatictí pacienti. Widuchowski et al. (Widuchowski, Widuchowski, and Trzaska 2007) analyzoval ve své studii přes 25 tisíc artroskopických nálezů a uvádí, že chondrální defekt byl nalezen u 60 % pacientů, z toho 67 % zařadili do skupiny fokálních chondrálních nebo osteochondrálních lézí, 29 % do skupiny osteoartrity, 2 % osteochondritis dissecans. Izolované chondrální léze našli u 30 % pacientů, ostatní byly nejčastěji v kombinaci s poraněním menisku nebo předního zkříženého vazy.

#### 7.4 Klasifikace poranění chrupavky

Všeobecně přijímaná klasifikace by měla mít parametry nejen popisné, ale měla by také mít klinicky a terapeuticky relevantní konsekvence. Popis stavu by měl také odrážet možnost určit efekt léčby poraněné chrupavky.

Klasifikace dle Outerbridge (Outerbridge 1961) je používána k popisu poškození chrupavky. Stupeň 0 reprezentuje chrupavku bez poškození, stupeň I označuje změknutí a otok chrupavky bez viditelného defektu. Stupeň II je stav, kdy dochází k tvorbě prasklin chrupavky, ale tyto praskliny nezasahují až k subchondrální kosti a defekt je menší než 1,5cm v průměru. Druhý stupeň je také nejčastěji se vyskytujícím typem poškození (Widuchowski, Widuchowski, and Trzaska 2007). Třetí stupeň je při stavu, kdy fisura dosahuje k subchondrální kosti, nebo defekt má průměr větší než 1,5cm. Posledním nejtěžším poškozením je IV. stupeň, kdy je poškozena i subchondrální kost. Bylo prokázáno, že Outerbridgeho klasifikace koreluje s histologickými a histochemickými stupni poškození chrupavčité tkáně (H. J. Mankin 1971).



Obr. 7 Outerbridgeova klasifikace defektu chrupavky (volně podle Outerbridge (Outerbridge 1961))

S rozvojem artroskopie publikovali Noyes a Stabler v roce 1989 (Noyes and Stabler 1989) jednoduchou a reprodukovatelnou artroskopickou klasifikaci. Tato klasifikace poškození chrupavky je vytvořena na základech Outerbridgeovy klasifikace, byla původně třístupňová s tím, že 3. stupeň byl rozdělen na defekt jdoucí k subchondrální kosti (3A typ), nebo defekt zasahující do subchondrální kosti (3B typ).

Často užívanou popisnou klasifikací nejen poškození, ale i reparativního procesu hojení chrupavky, je ICRS klasifikace (International Cartilage Repair Society). Tato klasifikace je založena na popisu hloubky, velikosti a anatomické lokalizace poškozené části a je možné ji používat i při popisu artroskopických nálezů (Dwyer et al. 2017).

## **7.5 Osteochondrosis dissecans**

König (König 1888) definoval v roce 1887 termín „osteochondrosis dissecans“. Ačkoliv je dnes jiný názor na etiopatogenezi tohoto onemocnění, tak se název stále udržel.

Osteochondritis dissecans (OCD) a juvenilní forma osteochondritis dissecans (JOCD) je klinickou hádankou a trvají debaty o etiologických faktorech a incidenci obou klinických stavů onemocnění. Je stále nejasno zda OCD vychází z JOCD, nebo zda OCD je samostatným onemocněním, které vzniká na podkladě čistě traumatické etiopatogeneze. Etiopatogeneze JOCD je výsledkem kumulace stresu na subchondrální kost, vedoucí k subchondrální stresové zlomenině, ostatní příčiny jsou spíše velice spóře podpořeny vědeckými daty (Lindén 1976). Obě formy onemocnění jsou často spojována s endokrinopatiemi, familiárním výskytem, akcesorní osifikačním centrem, osteonekrózou a například i výskytem karpálního tunelu (Uozumi et al. 2009). V etiopatogenezi je často zmiňován společný jmenovatel a tím je „dlouhodobá historie závodní sportovní aktivity“ (Kocher et al. 2006; Cruz, Shea, and Ganley 2016).

Časté jsou i debaty o indikacích k operační terapii a dlouhodobých výsledcích operační a konzervativní léčby u pacientů s JOCD v před finální fází uzávěru růstové štěrbiny kondylu stehenní kosti. Část těchto nejasností vychází také z toho, že v literatuře jsou obě onemocnění promiskue spojovány stran incidence, prevalence, terapie a výsledků léčby (Cahill 1995; Robertson, Kelly, and Green 2003). Rozhodující rozdíl mezi OCD a JOCD není věk pacienta, ale míra uzávěru fyzární růstové zóny kondylu femuru. Jednoznačně z literatury vyplývá, že po uzávěru fyzární štěrbiny je horší prognóza a výsledek léčby jak v klinických, tak radiologických parametrech (Cruz, Shea, and Ganley 2016; Kocher et al.

2006). Po uzávěru růstové epifýzy se stav OCD zřídka zhojí bez operační intervence (Yellin et al. 2017). Typickou lokalitou pro výskyt onemocnění je mediální kondyl femuru, zejména posterolaterální část (Kessler et al. 2014), postižení obou kolenních kloubů je uváděn v rozmezí 3-30 % (Cooper et al. 2015). Je nutné zmínit fakt, že až 40 % případů JOCD může být asymptomatických (Masquijo and Kothari 2019).

Rozhodnutí o typu léčby není jednoduché ani v dnešní době. Historický vývoj doporučené léčby JOCD je takřikajíc od postupu „nic nedělání“, až po druhý extrém operace v každém případě. Je to dáno již zmíněným stavem zaměňování případů JOCD a OCD. Čísla některých případových studií jsou malá a nejsou studie s možnými kontrolními skupinami. Není jednoznačný odborný konsenzus v typu a načasování operačního zákroku. Obecně lze rozdělit typy operační léčby na dvě skupiny na reparativní a rekonstrukční. POSNA (Pediatric Orthopaedic Society of North America) doporučuje provést operaci v případě, že se jedná o nestabilní lézi JOCD, nebo je-li léze stabilní, ale není-li ústup potíží a zlepšení radiologického obrazu po 3 měsících konzervativní léčby (Yellin et al. 2017). Pooperačně je důležité dodržet dobu odlehčení došlapu, standardně se doporučuje 6 týdnů až 3 měsíce dle lokality a rozsahu léze.

Jestliže je pacient bez příznaků a kontrolní MRI nejeví známky poruchy subchondrál ní kosti, ve smyslu separace fragmentu, tak je možný návrat k závodnímu sportu, za předpokladu, že se symptomy v tréninku nevracejí (Eismann et al. 2014).



## 8 Terapie defektů chrupavky

Terapie poškozené chrupavky by měla být z biologického pohledu co nejkomplesnější. Za defektem chrupavky může stát porucha osy končetiny, stability kloubu, nebo nadměrné mechanické zatížení. Jestliže nejsou tyto základní „pilíře“ v pořádku, nelze očekávat dobrý výsledek léčby chrupavky jako samotné.

### 8.1 Konzervativní terapie

O této možnosti léčby se zmíním jen okrajově. Možnosti nechirurgické terapie závisí na míře poškození kloubu a příčině poškození. Pro idiopatické stejně tak pro sekundární osteoartritické postižení je příznačným symptomem bolest kloubu. Bolestivé stavy jsou nejčastěji léčeny analgetiky, v tomto případě nesteroidními antirevmatiky (NSAIDs), aby došlo nejen ke snížení bolesti, ale také známek zánětu. Změna životního stylu, obsahující snížení váhy, preskripce vhodné, přiměřené a pravidelné pohybové aktivity vede nejen ke zlepšení celkové zdatnosti, ale také zejména síly periartrikulárního svalstva, což je spojené se zlepšením stability kloubu a snížením bolesti v kloubu. Efektivita pohybové terapie byla prokázána při postižení kolenního kloubu v několika studiích (Jenkinson et al. 2009; Christensen et al. 2007). Fyzikální terapie užívané v rámci rehabilitačních procedur mají různou účinnost. Mezi ty s doloženým efektem patří zahřívání nebo chlazení, které vede ke snížení bolesti a zlepšení funkce (Zhang et al. 2007), ostatní terapie mají různě velký placebo efekt.

Mezi nechirurgické terapie lze zařadit také užívání různých doplňků stravy, přírodních léčiv a léků. EULAR (European League Against Rheumatism) v roce 2016 upravila svá doporučení stran léčby časně osteoartrity vzhledem k užívání chondroitin a glukosaminsulfátu (Combe et al. 2017). Glukosaminsulfát by mohl mít efekt u léčby osteoartrózy kolenního kloubu, ale není doporučen u osteoartrózy kyčelního kloubu (Zhang et al. 2007).

Viskosuplementace, zejména aplikace hyaluronové kyseliny (HA) a kortikoidů mají vliv na snížení bolesti, ale je nutné podotknout, že steroidní injekce mají negativní vliv na kvalitu zbylé chrupavky. Intraartikulární injekce HA může zlepšit kvalitu života a vést ke snížení bolesti u osteoartrózy kolenního kloubu a může zlepšit funkci kloubu v horizontu minimálně půlroku (Campbell, Erickson, et al. 2015; Zhang et al. 2007). Hyaluronová kyselina má

bezpečný profil a její intraartikulární používání je doporučeno v časných stádiích osteoartrózy. U jiných kloubů je průkaz její účinnosti slabý.

Nitrokloubní injekční aplikace obohacené plazmy (PRP, platelet rich plasma) patří mezi poslední dobou sledované nechirurgické terapie. Zdá se, že tato terapie má potenciál vést k úlevě od symptomů bolesti až na 12 měsíců. Nemá jednoznačnou evidenci nad ostatními používanými léčivými a je nutné podotknout, že existuje zvýšené riziko lokálních nežádoucích reakcí. Nitrokloubní injekce PRP by mohla mít lepší symptomatickou úlevu u pacientů s časnou osteoartrózou kolena a její použití by však mělo být vždy zváženo (Campbell, Saltzman, et al. 2015).

## **8.2 Operační terapie**

### **8.2.1 Artroplastika**

Totální endoprotéza (TEP) je konečným řešením problému poruchy kloubního povrchu. Tento typ operační léčby se neustále zdokonaluje, jak po stránce materiálu používaných komponent, tak po stránce implantační techniky a fixace ve skeletu. Snahou endoprotetiky je maximální přiblížení k fyziologické míře tření styčných kloubních povrchů. Je to dáno tím, že otěrová nemoc, která vzniká z uvolněných partikul kloubních implantátů vede k imunitní reakci periartrikulárních tkání a je nejčastější příčinou uvolnění kloubní náhrady z kostního lůžka. Další příčinou uvolnění implantátu jsou rozdílné mechanické vlastnosti mezi implantátem a okolní kostí. Čím je implantát pevnější, tužší tím může nést větší zatížení. Ale to na druhou stranu, není-li plně osteointegrovan do skeletu, vede k rozvoji osteolýzy, nestability a uvolnění implantátu. Rozdíly v tuhosti mezi umělým a biologickým materiálem mohou vést k periprotetické zlomenině. Endoprotéza není vhodným řešením u dětí a adolescentů vzhledem k vývoji jejich skeletu a vzhledem k jejich věku. TEP také není vhodná u fokálních lézí kloubního povrchu, které se častěji vyskytují následkem sportovního úrazu.

### **8.3 Chirurgická terapie fokálních defektů chrupavky**

Pomocí fokálních náhrad lze léčit ohraničené defekty chrupavky, nelze tímto způsobem léčit osteoartrózu. Možnosti chirurgické léčby fokálních defektů chrupavky jsou různé a závisí na věku pacienta, anatomické lokalizaci, velikosti a hloubce defektu, přidružených poraněních kloubu. Cílem operační terapie snížení bolesti pacienta a obnovení plné funkce

kloubu. Mezi nejčastější, klinicky ověřené a používané operační techniky patří mikrofraktury (Steadman et al. 2003), mozaiková plastika (Hangody and Füles 2003), implantace kultivovaných autologních chondrocytů (Autologous Chondrocyte Implantation, ACI) (Brittberg et al. 1994), alogení osteochondrální transplantace (Lai et al. 2022b; Gross and McKee 1983), recentně využití autologních kmenových buněk (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) z různých zdrojů – kostní dřeň, tuku, synoviálních buněk (A.I. Caplan et al. 1997; Solchaga, Goldberg, and Caplan 2001; Erickson et al. 2002; S. Y. Lee, Nakagawa, and Reddi 2010). Všechny operační techniky mají jedno společné a tím je odstranění poškozené, nekrotické tkáně a následný určitý operační výkon, který buď stimuluje tkáň k regeneraci anebo transplantuje buněčnou složku tkáně do místa defektu. Dnešní operační zákroky se snaží plně anebo částečně využít miniinvazivního artroskopického přístupu, je-li to technicky možné. Tkáňové inženýrství je velmi slibným oborem, který by mohl hrát důležitou roli v obnově kloubního povrchu a funkci synoviálního kloubu jako celku. Zlepšení kvality zobrazovacích technik určujících poškození chrupavky nám dává lepší možnosti popisu stavu chrupavky a celého kloubu, jak co do struktury, tak i charakteru složení jednotlivých vrstev.

Samotná operace kloubního povrchu může být bez efektu, není-li obnovena stabilita a osa končetiny. Porucha osy končetiny vede k neúměrnému zvýšení tlaku na kontaktní plochu. Tento fakt lze ovlivnit vhodným typem osteotomie. Osteotomie může být provedena nezávisle na terapii povrchu kloubní chrupavky a tím vést k zamezení rozvoje dalšího poškození kloubu. Podobně je s ohledem na stabilitu, tedy funkci vazivového aparátu kolena. Operací stabilizujících kolenní kloub, jako je plastika předního zkříženého vazy, se snižuje riziko rozvoje chrupavčitého defektu a riziko rozvoje osteoartrózy (Fok and Yau 2013).

Rehabilitace před a po operaci může v jisté míře ovlivnit výsledek terapie. Proto je třeba těmto postupům věnovat pozornost. Obecně doporučené principy a návody je nutné dodržovat a dle přidružených operačních zákroků tyto postupy individuálně upravit (Reinold et al. 2006). Imobilizace kloubu je spojována s inhibicí hojení kloubní chrupavky a naproti tomu jsou důkazy, že pasivní kontinuální pohyb (Continual Passive Motion, CPM) vede ke stimulaci hojení poškozené chrupavky (Knapik et al. 2013; Alfredson and Lorentzon 1999). Tyto vlivy jsou zřejmě dány tím, že CPM vede ke zlepšení proudění kloubní tekutiny a tím také nutrientů mezi kloubními povrchy a stimuluje metabolismus chondrocytů. Naproti tomu aktivní pohyb, ve smyslu plné zátěže v došlapu, může být pro implantované nosiče

a buňky příliš zatěžujícím a může vést k zamezení tvorby nové tkáně anebo dokonce selhání implantátu (Ikenoue et al. 2003; M. S. Lee et al. 2003).

### **8.3.1 Abrasivní chondroplastika**

Abrasivní chondroplastika je operační metoda, kdy je defekt chrupavky zarovnán a jsou odstraněny nestabilní okraje defektu, tak aby byl obnoven hladký povrch a odstraněny delaminované části. Abrazie spodiny chondrálního defektu nezasahuje pod zónu kalcifikované chrupavky. Tato technika může být využívána zejména pro chondrální defekty menší velikosti (do 2 cm<sup>2</sup>) nebo u pacientů s osteoartrózou. Je možné ji využít i u osteochondrálních defektů, kde se doporučuje odstranit i sklerotické okraje a spodinu defektu. Při takto rozšířeném zákroku do subchondrální kosti, se pak ale spíše jedná o dřev stimulující techniku (viz dále). Výsledkem artroskopického debridementu je vytvoření vazivové chrupavky, jejíž dobrá funkce a klinicky efekt mohou přetrvávat i několik let. Jsou reportovány velmi dobré výsledky studií, kdy je s výhodou využito rychlé rekonvalescence (do 3 měsíců) s vědomím kratší efektivity této terapie (Levy et al. 1996). Tuto operační techniku lze využít v různých anatomických oblastech, u kolenního kloubu (R. W. Jackson, Gilbert, and Sharkey 1997), loketního kloubu (Desmoineaux et al. 2019), hlezna (Powers, Dowd, and Giza 2021), ramenního kloubu (Skelley et al. 2015).

### **8.3.2 Dřev stimulující techniky**

Tyto operační techniky mají jedno společné a tím je snaha přivést kostní dřev na povrch kloubního defektu. Tyto techniky jsou primárně určeny k léčbě chondrálních a osteochondrálních defektů. První výsledky této techniky publikoval Pridie et al. (Pridie 1959) v roce 1959 a určil tím na desetiletí směr terapie chondrálních defektů, kdy vycházel z tvrzení vědců, že chrupavka se může zahojit jen při otevření subchondrální kosti, čili vaskularizací tkáně (R. Martin and Jakob 2022). Pridie vytvářel pomocí návtů do spodiny očištěného a zarovnaného defektu chrupavky komunikaci se subchondrální kostí s cílem vytvoření krevní sraženiny na spodině defektu, která bude obsahovat z části i progenitorové buňky a tyto umožní reparaci tkáně. Postupem času byly návtvy nahrazeny mikrofrakturami, tedy drobnými milimetrovými záseky do subchondrální kosti (Steadman et al. 2003). Operační technika mikrofraktur (fORAGE) patří dnes mezi nejužívanější dřev stimulující techniku v cílené léčbě chondrálních defektů kloubů. Tato operační technika byla

s úspěchem použita v oblasti kolena (Mithoefer et al. 2005), ramena (Saltzman, Leroux, and Cole 2017), hlezna (Thomas, Jordan, and Hamborg-Petersen 2016). Mezi její výhody patří, že ji lze provést miniinvazivně pomocí artroskopických nástrojů, kdy po debridement defektu a odstranění kalcifikované zóny chrupavky na spodině defektu jsou provedeny náseky do subchondrální kosti. Tyto mikrofraktury by měly být 4 mm hluboké, od sebe vzdáleny 3-4 mm a měly by být jak po obvodě, tak v centru defektu. Krev vytvoří na spodině fibrinovou zátku a tato začne stimulovat hojení tkáně, atrahovat progenitorové buňky ze subchondrální dřeně. Primární zátka se po 8-12 týdnech přetvoří na fibrokartilaginózní tkáň. Nově vytvořená náhradní tkáň je méně robustní a méně odolná než původní hyalinní typ chrupavky. Efekt této operační techniky je menší zejména u pacientů starších 40 let a u těch, kde je defekt větší než  $2,5\text{cm}^2$  (Kreuz et al. 2006).



Obr. 8 Artroskopický obraz, provedené mikrofraktury v chondrálním defektu kondylu femuru (vlastní archiv autora)

S cílem zlepšení výsledků operační metody mikrofraktur se postupně přidala kombinace mikrofraktury a „záplaty“. Tato technika je někdy označována jako „microfracture plus“ nebo jako AMIC technika (Autologous Matrix Induced Chondrogenesis). U těchto metod se využívá vlastností nosiče buněk, použitého materiálu, který podporuje, či stimuluje hojení chrupavky. Tyto implantáty podléhají přísné legislativní restrikci nadnárodních a národních lékových agentur (FDA, EMA, SÚKL).

### 8.3.3 Implantace strukturálních nosičů

Do této skupiny patří operace, u kterých provedeme chirurgický debridement defektu, nebo dřeh stimulační operační zákrok a následně provedeme implantaci vhodného biokompatibilního, nejčastěji biologicky konduktivního, induktivního materiálu. Materiály, které mohou vyplňovat defekt, můžeme systematicky rozdělit do 3 skupin. Prvním typem je materiál, který se časem rozpustí a stane se součástí regenerátu, mezi tyto biologické materiály aplikované do místa defektu patří např. kolagenní membrány, syntetické polymery, které jsou primárně ve formě tekuté, gelové nebo v pevně síťované polymerní. V klinické praxi se nejprve defekty kryly pomocí periostálního laloku (Siebold, Lichtenberg, and Habermeyer 2003), následně se praxe dostaly nosiče vyrobené z chitosanu (Hoemann et al. 2007), kolagenu (Dorotka et al. 2005), nebo hyaluronanu (Erggelet et al. 2009). Výsledky AMIC terapie dávají v prospektivních studiích lepší výsledky než samotné mikrofraktury (Steinwachs et al. 2019). AMIC metoda je bezpečná, funkční a efektivní u malých až středně velkých (do 4-5 cm<sup>2</sup>) defektů chrupavky, zejména v oblasti kolenního kloubu. K těmto polymerním materiálům patří např. Chondrotissue<sup>®</sup> (implantát na podkladě kyseliny polyglykolové kyselina), Hyalofast<sup>®</sup> (esterifikovaná hyaluronová kyselina), Novocart<sup>®</sup> (kolagen) (Elisseeff et al. 1999; Silverman et al. 1999).

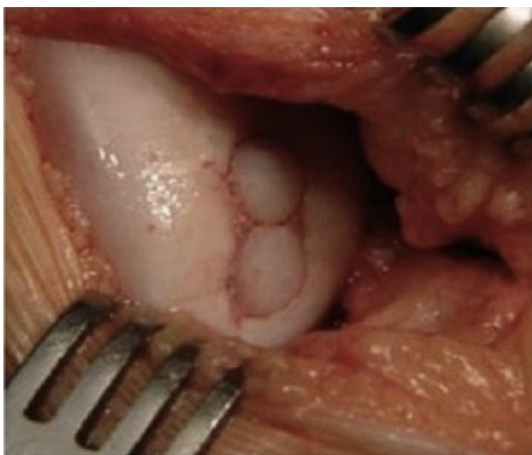
Druhým typem materiálu je inertní typy implantátů, které mají funkci spíše insertu, bez snahy o propojení s okolní tkání. Takovýto insert vytváří „stop-gap“ formaci mezi implantátem a nativní tkání, kdy udržení v místě defektu je dáno primární fixací, takovýto implantát nevrůstá do okolní tkáně (Lange et al. 2006; McNickle, Provencher, and Cole 2008).

Třetí možností jsou tzv. umělé implantáty – „off the shelf“ implantáty. Tyto syntetické implantáty představují náhrady chrupavky, které fungují jako inserty. Konstrukce insertu vyplňuje defekt s jistou mechanickou pevností a nízkým povrchovým třením. Tyto acelulární konstrukce prakticky překlenou dobu než dojde u pacienta k úplnému poškození kloubu a kloub bude muset být nahrazen (McNickle, Provencher, and Cole 2008). Tyto implantáty jsou dobře definované svými rozměry a vlastnostmi. Mezi implantáty, které mají prokázáný dobrý klinický efekt řadíme např. Agili-C<sup>TM</sup> (kalcium karbonát, aragonit) (Kon et al. 2021; Altschuler et al. 2023), nebo MaioRegen<sup>TM</sup> je implantátem kompozitní matrix

složené z krystalů hydroxyapatitu a kolagenních vláken typu I (alogeního, equinního původu) (Kon et al. 2018).

### **8.3.4 Mozaiková plastika**

Mozaiková plastika patří mezi etablované metody léčby zejména při osteochondrálních defektech. Tuto metodu popularizoval Hangody (Hangody et al. 2004). V anglosaské literatuře ji nalezneme často pod zkratkou OATS (Osteochondral Autologous Transplantation, OATS). Mozaiková plastika je charakterem operační techniky, kdy se přenáší autologní implantát z nezářžové nebo málo zářžové zóny kloubu do místa vzniklého chondrálního, nebo osteochondrálního defektu. V defektu vzniká „mozaika“ sazenic autologních transplantátů. Tato technika se může používat v různých kloubech, typicky v kolenním kloub, zářžové zóně kloubu kondylů femuru (Hangody et al. 2008), kloubní plochy lokte (Iwasaki et al. 2009) anebo talu (Baltzer and Arnold 2005). Při operaci se odebere čip – sazenice, která obsahuje všechny vrstvy chondrální a subchondrální části kloubu a tato se přenesse do tvarem připraveného lůžka. OATS terapie potřebuje dostupnost zdravé tkáně pro odběr transplantátu. Toto je zároveň limitací celé léčebné metody. Velikost, tvar a dostupnost tkáně pro odběr limituje možnosti ošetření defektu. U menších kloubů (loketní kloub, hlezno) je nutné využít jako zdroje jiný kloub (nejčastěji ipsilaterální kolenní kloub). Nevýhodou mozaikové plastiky je přenos tkáně, která má jiné biomechanické vlastnosti do místa s jinými nároky na zářž. Další nevýhodou je riziko poruchy hojení v odběrovém místě, v anglickém písemnictví odznačované jako „donor side morbidity“. U mozaikové plastiky se udává, že až 50 % pacientů má nespecifické potíže v kloubu z místa odběru. Toto by mohlo být eliminováno velikostí odběrového bloku pod tzv. kritickou velikost 7 mm („critical defect“). V místě odběrové zóny vždy vzniká vazivová chrupavka, která má horší vlastnosti a mohla by časem degradovat do trvalého defektu a tím vést k rozvoji osteoartrózy. Většina dosavadních studií se tímto problémem nezabývala. Výhodou mozaikové plastiky je přítomnost živých chondrocytů v místě ošetřeného defektu, které by měly mít schopnost jisté remodelace. Další nespornou výhodou je, že se jedná o jednodobou a ekonomicky nenáročnou metodu oproti buněčným transplantacím.



Obr. 9 Peroperační nálezn po provedené mozaikové plastice (vlastní archiv autora)

### 8.3.5 Implantace čerstvě zmražených osteochondrálních aloštěpů

Alogenní osteochondrální transplantace (Osteochondral Allograft – OCA) je alternativou pro autologní mozaikovou plastiku. Alogenní zejména čerstvě zmražené a podchlazené transplantáty mají určité místo v klinické praxi. Je nutné mít legislativní oporu k provedení takového zákroku a rozvinutý transplantační program zakomponovaný do lokálního zdravotnického systému. Tento typ operací a funkční transplantační systém a je velmi dobře rozpracován a funguje v USA, kde alogenní transplantáty jsou využívány zejména k ošetření velikých osteochondrálních defektů (v průměru až 8cm<sup>2</sup>) z indikace potraumatické léze chrupavky, osteonekrózy nebo osteochondritis dissecans (Lai et al. 2022b). Nevýhodou této metody je riziko imunitní reakce na transplantát a riziko přenosu nemoci na příjemce. Humorální odpověď, tvorba cytotoxických protilátek na HLA-antigen v místě inkorporace transplantátu byla po implantaci OCA jednoznačně prokázána (Lai et al. 2022b). Navíc na rozdíl od jiných forem alogenní transplantace, čerstvé OCA nejsou testovány na kompatibilitu HLA a krevní skupiny dárce a příjemce. Zavedení testování by mohlo do budoucna zlepšit výsledky této metody. Na druhou stranu ve studii Hunta et al. (Hunt et al. 2014) zkoumající vztah mezi klinickým výsledkem a mírou imunitní reakce na transplantát, nebyly nalezeny rozdíly mezi skupinou tvořící protilátky proti HLA antigenu a u těch, kde protilátky přítomny nebyly. V této studii se však našla korelace mezi rizikem cytotoxické reakce a velikostí použitého alotransplantátu.



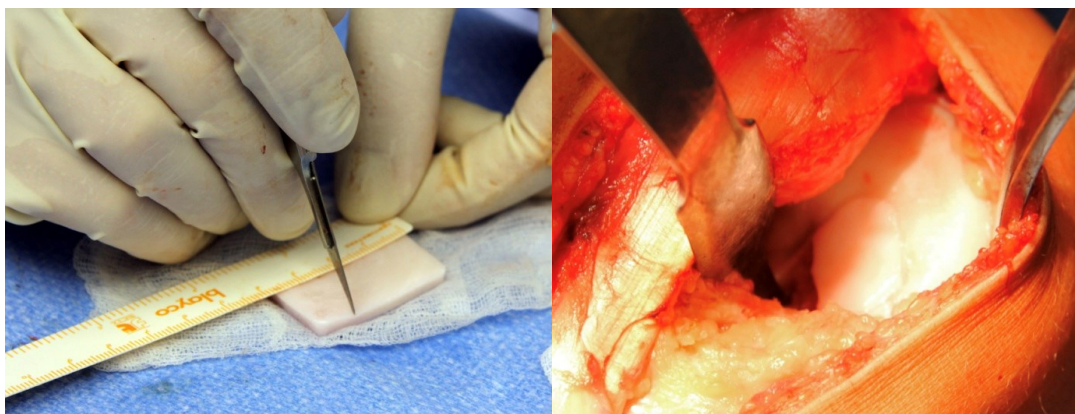
Xenogenní transplantace se do klinické praxe nedostaly. Ačkoliv se očekával jejich úspěch, jelikož chrupavka je avaskulární a alymfatická tkáň, tak že by se měla chovat jako imunoprivilegovaná tkáň, opak byl pravdou. Aplikace xenogenních materiálů do kloubu je obtížná pro jejich imunitní reakce hostitele vůči štěpu (Pei et al. 2010).

### **8.3.6 Implantace autologních chondrocytů**

Terapie autologními chondrocyty (Autologous Chondrocyte Implatation, ACI) má jasný cíl. Využit vlastností ortotopních autologních buněk k obnovení kloubní chrupavky tak, aby co nejvíce odpovídala originální hyalinní chrupavce svým složením, uspořádáním a následně i biomechanickými vlastnostmi. První zkušenosti sahají do konce 60. let. První kroky vedly k využití metodou transplantace autologních chondrocytů metodou „minced cartilage“ (Chesterman and Smith 1968). Renesanci této techniky zažíváme v současné době (McNickle, Provencher, and Cole 2008; Salzmann et al. 2021). Později se díky pokroku v tkáňovém inženýrství podařilo provést rozvolnění chondrocytů z ECM a následně jejich kultivování v prostředí in vitro. Snaha o klinické využití kultivovaných autologních chondrocytů sahá do 80. let, kdy Peterson v roce 1984 (L Peterson et al. 1984) publikoval své experimenty a vytvořil podmínky pro klinický výzkum využití kultivovaných autologních chondrocytů v léčbě chondrálních defektů. V roce 1994 byly Britbergem et al. (Brittberg et al. 1994) publikovány první výsledky implantace kultivovaných autologních chondrocytů fixovaných periostálním lalokem v místě chrupavčitého defektu. ACI představuje dvoudobou operační techniku, při které se nejprve odebere vzorek autologní chrupavčité tkáně (200-300 mg) z nezářezové zóny kloubu. Tkáň se histochemicky, enzymaticky rozvolní, vyberou se viabilní chondrocyty, které se 2-3 týdny kultivují a posléze se transplantují zpět pacientovi do místa chondrálního defektu. Defekt se při implantaci zbaví detritu a zarovná se okraje, tak aby okraje tvořila makroskopicky zdravá hyalinní chrupavka. Publikované klinické výsledky této operační metody byly vynikající. Při dlouhodobém sledování pacientů, kde byla použita operační technika ACI, byl dokládán vynikající/velmi dobrý dlouholetý efekt v 80-90% případů v klinickém skóre i po více než 2 letech od implantace a udržení kvality života pacienta i po 9 letech od implantace (Lars Peterson et al. 2002).

Později však byly také publikovány články, které tak přesvědčivé výsledky nehlásily a jako důvod udávaly uvolnění periostálního laloku fixující koncentrát implantovaných

chondrocytů. Hledaly se nové možnosti fixace a vznikla II. generace nosičů, která využívala krytí pomocí kolagenních membrán. S příchodem III. generace nosičů, které jsou pro chirurga jednodušší k manipulaci a fixaci, včetně toho, že se buňky jednodušeji suspendují přímo do nosiče v rámci in vitro výroby implantátu. Tento krok odstranil také celkem častý výskyt hypertrofických osteofytů v místě okraje ošetřeného defektu krytého periostální membránou (Niemeyer et al. 2008). Technika III. generace ACI, označovaná jako MACI (Matrix Induced Autologous Chondrocytes Implantation) se celkem široce a rychle rozšířila s velmi dobrými dlouhodobými výsledky (Ehmann et al. 2023; Mistry et al. 2017). Jedná se o techniku, kdy buňky jsou rozprostřeny v různých polymerních maticích již při výrobě „in vitro“. Mezi klinicky používané implantáty s velmi dobrými výsledky patří nosiče polymerů polylaktidové kyseliny, BioSeed®-C (Biotissue Technologies, Freiburg, Německo), hyaluronové kyseliny, Hyalograft-C® (Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Itálie), nosič prasečí nebo ovčí kolagenní membrány typu I/III CaReS® (Arthro Kinetics, Esslingen, Německo) nebo Chondrokin® (Orthogen, Düsseldorf, Německo). V České republice byl široce používán NTC Chondrograft® (PrimeCell, ČR). Jedná se o autologní kultivované chondrocyty fixované ve fibrinu. T.č. nemá výrobce (Národní centrum tkání a buněk a.s.) povolení k výrobě tohoto léčebného prostředku.



Obr. 10 Příprava a implantace NTC Chondrograftu® (transplantát autologních chondrocytů), vlevo úprava transplantátu do požadované velikosti, vpravo stav po implantaci do defektu chrupavky (vlastní archiv autora)

Postupem času se začaly objevovat i hlasy skeptiků, kteří prokazovali ve svých skupinách pacientů horší výsledky než první publikované práce, včetně prací hodnotící výrobní cenu a kvalitativní výsledek léčby (Mundi et al. 2016; Kraeutler et al. 2018; Vasiliadis and Wasiak 2010). Kvalita regenerátů po implantaci ACI byla zkoumána v dalších klinických studiích. Ačkoliv většina studií neprokázala přímou korelaci mezi histologickým nálezem regenerátu a klinickým stavem pacienta, tak přesto je uváděno, že ACI dosahuje kvalitativního vrcholu kolem 2. roku od implantace a poté začíná výrazně klesat (DiBartola et al. 2016; Enea et al. 2012).

Práce Robertse et al. (Roberts et al. 2009), který zkoumal histochemické složení regenerované chrupavky po ACI prokazuje pouze u 15 % pacientů po ACI dominanci kolagenu typu II, naproti tomu u 65 % pacientů se jednalo o vazivový typ regenerátu s dominancí kolagenu typu I. Také biomechanické vlastnosti nejsou tak dokonalé jako originální chrupavky. Vasara et al. (Vasara et al. 2005) ve své studii prokazuje 1 rok od implantace ACI u 30 pacientů kvalitativní pevnost regenerátu na úrovni 62 % okolní hyalinní chrupavky. V klinickém hodnocení uvádí, že 47 % pacientů po ACI dosáhlo uspokojivého funkčního stavu. Hodnocení magnetickou rezonancí sice prokazuje doplnění proteoglykanů v místě defektu, ale testy tuhosti vedou k závěru, že se jedná o regenerát vazivové chrupavky.

V českém písemnictví Podškubka et al. (Podškubka, Povisil, and Kubes 2006) prokazuje 1 rok od implantace ACI vazivový typ chrupavky u 3 z 8 pacientů při kontrolní artroskopii, resp. histologickém vyšetření odebraného vzorku.

Také se objevují práce, které kriticky porovnávají ACI s ostatními operačními metodami. Knutsen et al. (Knutsen et al. 2007) prokazuje podobné výsledky u obou skupin 40 pacientů léčených ACI a mikrofrakturami, jak stran klinické spokojenosti, tak i stran vývoje osteoartrózy po 5 letech (1/3 pacientů měla známky osteoartrózy). Práce Horase et al. (Horas et al. 2003b), který porovnával ACI a OATS u 30 pacientů 2 roky po implantaci, ukazuje na horší histologické výsledky u skupiny ACI. Posledními modifikacemi využití autologních chondrocytů jsou aplikace štěpů autologní chrupavky v gelovitém nosiči autologního fibrinu (PACI, particulated articular cartilage implantation). Implantovaná mechanicky rozštěpená hyalinní chrupavka může být autologní, nebo alogenní, obsahující juvenilní chondrocyty (Farr et al. 2012; Yanke et al. 2015).

Výraznou nevýhodou ACI zůstává její ekonomická náročnost, dvoudobý operační výkon a odběr zdravé chrupavky, která s sebou přináší až u 15 % pacientů bolesti z místa odběru dárcovské tkáně (Matricali, Dereymaeker, and Luyten Frank 2010). Dalším problémem, který je s technikou ACI spojován, je obtížná in vitro expanze chondrocytů. Obtížnost kultivace se zachováním kvality a kvantity získaných a následně implantovaných buněk (Hickery et al. 2003).

### **8.3.7 Kmenové buňky**

V dnešní době se dostává v regenerativní medicíně do popředí terapie pomocí kmenových buněk. Z dále uvedených objektivních důvodů je terapie kmenovými buňkami pod drobnohledem odborných lékařských společností ale i veřejných médií. Jejím širšímu využití brání etické a legislativní omezení.

Kmenové buňky jsou buňky schopné se diferencovat v různé typy dospělých buněk. Celou skupinu lze rozdělit na dvě základní podskupiny, a to 1. embryonální (ESCs), fetální a indukované pluripotentní buňky (iPSC) a 2. multipotentní dospělé buňky, které se nacházejí v každém dospělém organismu v kostní dřeni, tukové tkáni, čichovém epitelu, ale i v pupečníku a placentě. Embryonální kmenové buňky se nacházejí v organismu jen ve fázi raného vývoje a jen tyto buňky jsou ve smyslu slova pluripotentní. Tyto buňky mají vysokou proliferační aktivitu, a proto jsou atraktivní pro tkáňové inženýrství. Naproti tomu buňky získané z dospělého organismu např. mezenchymální (stromální) kmenové buňky (MSCs) jsou multipotentní a mají chondrogenní, osteogenní a adipogenní potenciál, t.j. jsou schopny se diferencovat především do buněk mezenchymální řady, jmenovitě chrupavek, šlach a kostí (Arnold I. Caplan and Correa 2011). Pro použití MSCs v klinické praxi hovoří zejména to, že nejsou teratogenní, mohou být použity jak autologní tak i alogenní. MSCs lze získat z kostní dřene, tukové tkáně, synoviální tkáně atd. Věk a pohlaví dárce MSCs jsou faktory, které se zdají bez vlivu na schopnost expanze MSCs. Větší vliv mohou mít podmínky a množství pasáží in vitro kultivace MSCs k jejich dostatečné multiplikaci, což je určující v počtu aplikovaných buněk (Baxter et al. 2004). Poznání faktorů, které ovlivňují množství a kvalitu MSCs může minimalizovat čas v kultuře, zlepšit jejich viabilitu a urychlit přípravu pro klinické užití a zmenšit riziko infekce.

Mesenchymální kmenové buňky splňují očekávání “biologické artroplastiky” v in vitro testech (Chen et al. 2009; Sudo et al. 2007), na zvířecích modelech (Fortier et al. 2010)

i v prvních klinických testech u lidí (S. Wakitani et al. 2002; Nejadnik et al. 2010; Gobbi et al. 2011; Giannini et al. 2009). Bylo prokázáno, že kmenové buňky z kostní dřeně (bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs) mají vyšší schopnost chondrogenní diference, než kmenové buňky získané z tukového lipoaspirátu (V. Havlas et al. 2011). MSCs z kostní dřeně také produkují signifikantně více kolagenu typu II a glykosaminoglykanu než kmenové buňky získané z tuku (Afizah et al. 2007; Beane and Darling 2012). Mesenchymální kmenové buňky aplikované do poškozeného kloubu ovlivňují celou homeostázu kloubu. Výsledkem je omezení buněčné apoptózy lokální tkáně, stimulace angiogeneze, stimulace proliferace endogenních buněk a snížení zánětlivé reakce tkáně poškozeného kloubu (Arnold I. Caplan and Dennis 2006; Arnold I. Caplan and Correa 2011; Gnecci et al. 2008; Prockop 2009). Využití poznatků o vlastnostech kmenových buněk vedlo k rozvoji buněčné terapie chondrálních defektů. Klinické výsledky u těchto prací jsou srovnatelné či lepší s výsledky dosavadních operačních technik (Giannini et al. 2009; Nejadnik et al. 2010; S. Wakitani et al. 2002). Nejadnik et al. (Nejadnik et al. 2010) porovnával výsledky aplikovaných BM-MSC s terapií autologního chondrocytárního implantátu (ACI) při ošetření defektů chrupavky kolena v celé její výšce. Jeho práce prokázala, že terapie BM-MSCs je stejně efektivní, u starší populace nad 45 let dokonce efektivnější než terapie pomocí ACI. Podobné výsledky vykazuje ve své práci i Gobbi et al. (Gobbi et al. 2011), který zhodnotil výsledky po dvou letech u 25 pacientů po aplikaci monocytárního aspirátu kostní dřeně krytých kolagenní matrix, která slouží k udržení koncentrace buněk v oblasti defektu chrupavky. Gobbiho práce však kombinuje různé přidružené operační techniky řešení chondrálního defektu a tím nelze jednoznačně určit míru efektu samotné buněčné terapie na výsledek léčby. Z uvedených poznatků lze usuzovat, že operační procedury s využitím kmenových buněk kostní dřeně mají pozitivní efekt na výsledek léčby fokálních chrupavčitých defektů.

## 9 Experimentální část práce

Pozorovaný krátkodobý efekt dřeň stimulujících technik v léčbě fokálních chrupavčitých defektů kolenního kloubu u věkové skupiny nad 40 let, vedl k vytvoření pracovní hypotézy, že důvodem je buď nízká nabídka anebo kvalita progenitorových buněk v místě fokálního chrupavčitého defektu kolenního kloubu. Jestliže by byl nalezen kvalitní zdroj progenitorových buněk bez ohledu na věk a pohlaví, tak by jeho využití mohlo vést ke zlepšení klinických výsledků léčby.

### 9.1 Cíle a hypotézy experimentální práce

Hlavním cílem experimentální části disertační práce bylo porovnat dva anatomicky dobře dostupné zdroje aspirátu kostní dřene s ohledem na jejich využití při klinické aplikaci kultivovaných kmenových buněk v léčbě chrupavčitého defektu kolenního kloubu.

#### Dílčí cíle práce:

Cílem experimentální práce je získat odpovědi na následující výzkumné otázky.

- (1) Zda jsou odběry v obou lokalitách (pánevní kosti, proximální tibie) bezpečné, technicky proveditelné a získané množství aspirátu lze použít pro kultivaci mezenchymálních kmenových buněk.
- (2) Zda se liší buněčný aspirát kostní dřene z různých anatomických míst, z pánevní kosti a proximální tibie, kvantitou a kvalitou zastoupených mononukleárních buněk (MNCs), respektive mezenchymálních kmenových buněk (MSCs).

#### Hypotézy experimentální práce:

Hypotéza  $H0_1$ : Oba zdroje se neliší v počtu komplikací při odběru a v získaném objemu aspirátu kostní dřene pro kultivaci mezenchymálních kmenových buněk.

*V případě, že se vyskytne větší počet komplikací u odběru z jedné lokality nebo se budou lišit zdroje získaným objemem aspirátu, pak bude nulová hypotéza  $H0_1$  zamítnuta.*

Hypotéza H0<sub>2</sub>: Získané MNCs z obou zdrojů se neliší v kvantitativních parametrech.

*V případě, že se množství MNCs z obou zdrojů budou statisticky lišit v kvantitativních parametrech, pak bude nulová hypotéza H0<sub>2</sub> zamítnuta.*

Hypotéza H0<sub>3</sub>: Získané MSCs z obou zdrojů se neliší v kvalitativních parametrech.

*V případě, že se bude kvalita MSCs z obou zdrojů statisticky lišit ve stanovených hodnotících parametrech lišit, pak bude nulová hypotéza H0<sub>3</sub> zamítnuta.*

## **9.2 Materiál a metodika**

### **9.2.1 Soubor analyzovaných dárců kostní dřeně**

Celkem 10 náhodně vybraných pacientů Ortopedického oddělení Masarykovy nemocnice o.z., Krajské zdravotní a.s. podstoupilo, po vyslovení informovaného souhlasu s účastí ve studii, odběr kostní dřeně z lopaty kyčelní a proximální metafýzy tibie v rámci prováděné plánované totální náhrady kolenního kloubu. Studie byla financována z interního grantového zdroje Krajské zdravotní a.s.

Vstupními kritérii byl věk nad 40 let a osteoartróza kolenního kloubu indikovaná k totální endoprotéze kolenního kloubu. Vstupní laboratorní hematologické testy krevního obrazu a koagulace byly provedeny maximálně 3 týdny před zákrokem a jejich výsledky musely spadat do populačních norem referenční laboratoře. Vybraní pacienti museli být bez anamnézy příjmu nebo odběru krevních derivátů v posledních 3 měsících před plánovanou trepanobiopsií. Studie byla schválena etickou komisí Krajské zdravotní a.s.

### **9.2.2 Odběr kostní dřeně**

Aspirát kostní dřeně jsem získal trepanobiopickou jehlou ze dvou zdrojů: z anterolaterální hrany lopaty kosti kyčelní a z oblasti proximální metafýzy tibie operovaného kolenního kloubu (interkondylické eminence tibie). Z každého odběrového místa bylo odebráno celkem 13-15 ml aspirátu kostní dřeně. Materiál byl transportován k certifikovanému výrobcí léčivých přípravků moderní terapie, společnosti Bioinova, a.s., kde bylo provedeno další zpracování kostní dřeně, včetně izolace mononukleárních buněk, kultivace

a imunofenotypizace mesenchymálních kmenových buněk. Buňky z obou zdrojů byly navzájem porovnány z pohledu viability a výtěžnosti MSCs.

### 9.2.3 Izolace a kultivace MSCs

K odebraným aspirátům byl přidán Gelofusin (B. Braun) pro vytvoření frakce MNCs. Koncentrace MNCs před i po sedimentaci v Gelofusinu byla stanovena pomocí hematologického analyzátoru ABX Micros 60 (HORIBA Medical). Získaná frakce MNCs byla nasazena na kultivační láhev o koncentraci  $1,2-1,6 \times 10^5$  MNCs/cm<sup>2</sup> a kultivována v médiu Alpha MEM (Lonza) s 5% suplementem Stemulate (Cook General BioTechnology) a 1% antibiotiky/antimykotiky (Penicilin, Streptomycin, Amfotericin B; Thermo Fisher Scientific) při teplotě 37°C a v atmosféře obsahující 5% CO<sub>2</sub>. Po 24-48 h byly suspenzní buňky odstraněny oplachem PBS (Phosphate Buffered Saline (Lonza)) a k adhezivním buňkám bylo přidáno čerstvé kultivační médium. Kultivované MSCs byly pasážovány při dosažení 80-90% konfluency v rámci buněčných kolonií za použití enzymů TrypLE (Life Technologies) a opět vysety. Počet buněk v 1. i 2. pasáži byl stanoven pomocí přístroje Luna-II Cell Counter (Logos Biosystems).

### 9.2.4 Průtoková cytometrie

Kultivované MSCs izolované z lopaty kosti kyčelní a kolenního kloubu byly na úrovni 2. pasáže analyzovány na znaky MSCs dle dříve publikovaných parametrů a na viabilitu (13-20 dní kultivace, 80-90% konfluency). Buněčná suspenze byla inkubována s konjugovanými monoklonálními lidskými protilátkami: CD105-PE, CD45-PB, CD14-PB, CD19-PB (Exbio), CD90-APC, CD73-PerCP/Cy5.5, CD34-PB (Biolegend) a HLA-DR-FITC (Beckman Coulter). Apoptotické a nekrotické buňky byly značeny pomocí propidium jodidu (PI) (Exbio). Samotná analýza, z které byly vyloučeny buňky v dubletu (FSC-A×FSC-H) a buněčná debris (FSC-A×SSC-A) byla provedena průtokovým cytometrem BD FACS Canto II (BD Biosciences). Neznačený vzorek buněčné suspenze byl použit jako negativní kontrola a značené kompenzační kuličky (BD Biosciences) byly použity pro výpočet kompenzační matice. Získaná data od všech 10 dárců byla hodnocena jednotlivě a na závěr sloučena a vyhodnocena pomocí programů FlowJo (Tree Star) a FSC Express (De Novo Software).



## 9.2.5 Metodika hodnocení a statistická analýza

Doba zdvojení populace MSCs (Population doubling time, PDt) byla stanovena mezi 1. a 2. pasáží pomocí rovnice  $PDt = \frac{t}{\frac{\log N - \log N_0}{0.301}}$ , kde t= doba mezi 1. a 2. pasáží [h],  $N_0$ = počet buněk v 1. pasáži určených pro kultivaci, N= počet buněk v 2. pasáži na konci kultivace. Obrázky morfologie buněk byly pořízeny pomocí mikroskopu EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific) a upraveny programem ImageJ (National Institutes of Health, USA). Získaná data byla vyhodnocena pomocí programu SigmaPlot (Systat Software).

Rozdíly ve výtěžnosti a kvalitě buněk mezi oběma místy odběru byly porovnány pomocí jednostranného t-testu. Za statisticky významnou byla považována hodnota hladiny významnosti  $p < 0,05$ . Údaje získané z odběru z lopaty kosti kyčelní byly považovány za výchozí. Případné vyšší hodnoty získané z odběru kolenního kloubu nebyly hodnoceny jako statisticky významné (ns, non-significant).

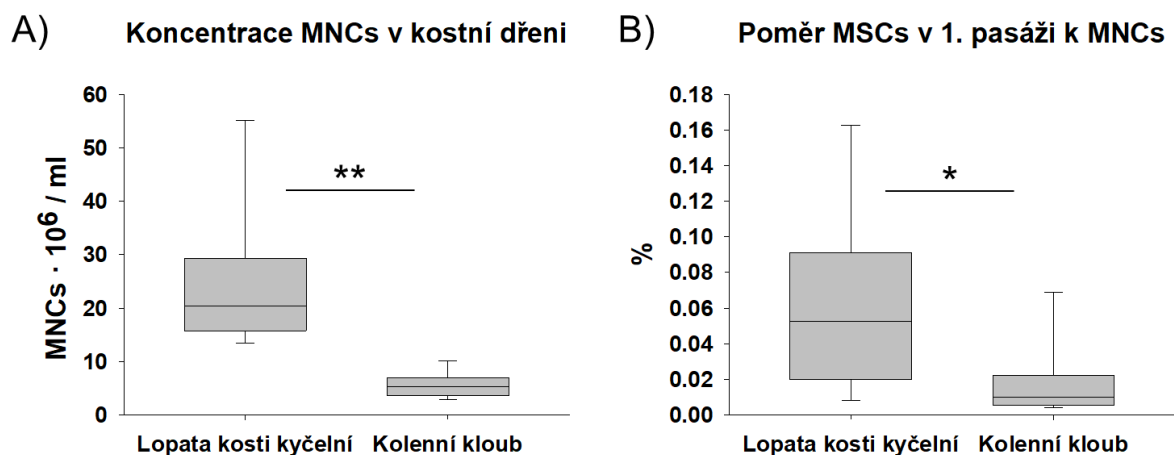
## 9.3 Výsledky

### 9.3.1 Bezpečnost a proveditelnost odběru

Při provedených odběrech nebyla zaznamenána komplikace při zavedení trepanobioptické jehly, anebo aspiraci požadovaného množství kostní dřevě v obou posuzovaných anatomických lokalitách. U všech pacientů bylo odebráno požadované množství aspirátu kostní dřevě, které umožnilo provést následnou kultivaci MSCs. Sledovaní pacienti si neztěžovali na bolest nebo jiný diskomfort v oblasti místa odběru aspirátu kostní dřevě.

### 9.3.2 Kvantitativní analýza buněk

Koncentrace MNCs byla signifikantně vyšší u aspirátu kostní dřevě odebraného z lopaty kosti kyčelní. Medián získaných MNCs z tibie po sedimentaci byl  $5,4 \times 10^6$  MNCs/ml, zatímco u odběru z lopaty kosti kyčelní  $20,5 \times 10^6$  MNCs/ml (Obr. 1 A). Výtěžnost kultivovaných MSCs byla stanovena jako poměr počtu MSCs v 1. pasáži a počtu MNCs, které byly použity pro kultivaci. Měření ukázalo statistickou významnost a větší podíl MSCs k počtu MNCs pocházejících z lopaty kosti kyčelní (5,2 %), zatímco u kolenního kloubu byl podíl pouze 1,0 % (Obr. 11).

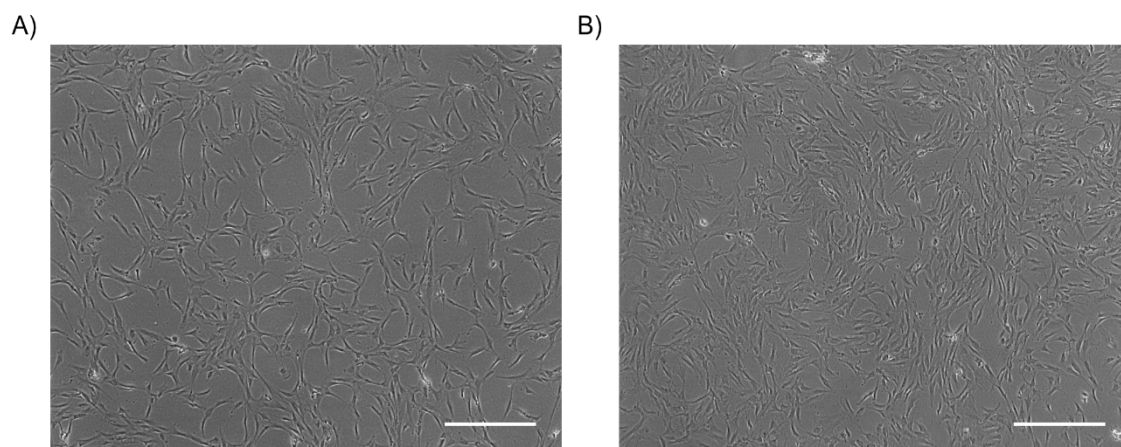


Obr. 11 Výtěžnost buněk. Krabicové grafy zobrazují koncentraci MNCs v aspirátu kostní dřeni z obou odběrových míst (A) a poměr získaných MSCs v 1. pasáži k počtu odebraných MNCs u obou odběrových míst (B). Data jsou zobrazená včetně mediánu (n=10; p=0,001-0,01 \*\*; 0,01-0,05 \*; chybové úsečky představují kvartily – 5-25% a 75-95%).

### 9.3.3 Kvalitativní analýza buněk

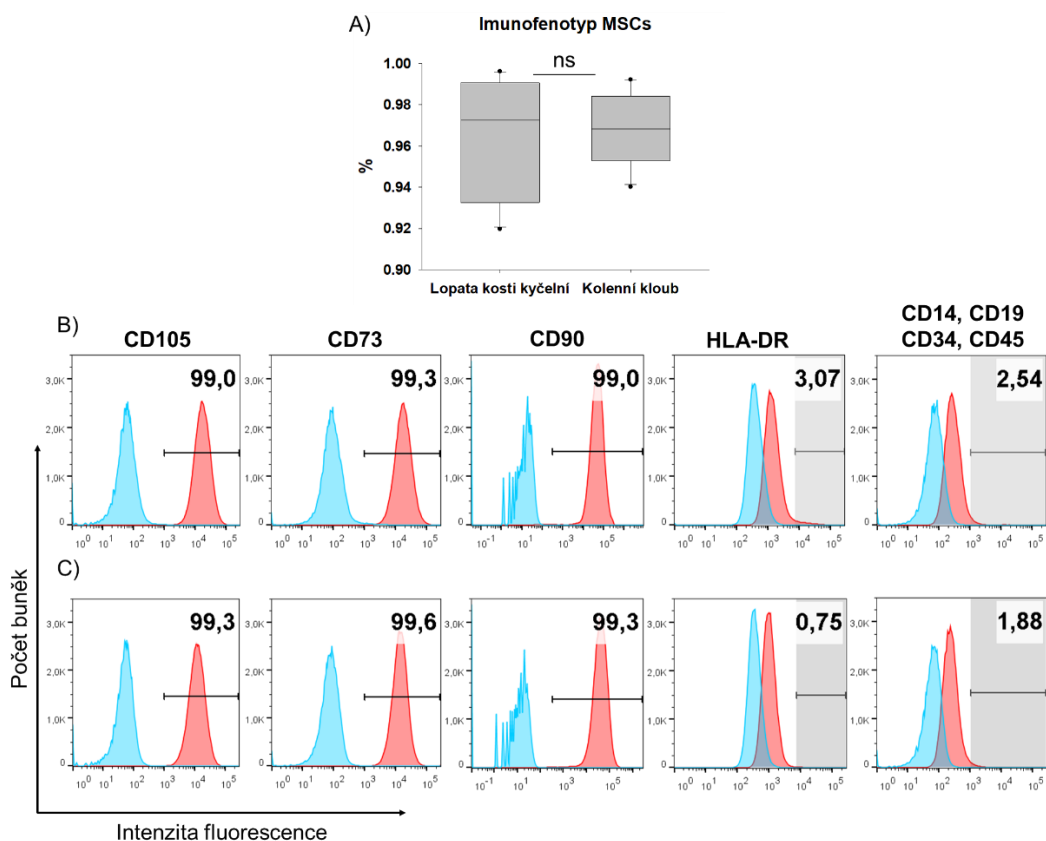
Kvalitativní analýza zaměřující se na imunofenotypizaci, viabilitu, PDt MSCs populace, případně morfologii (Obr. 12), vycházela srovnatelně u MSCs z obou odběrových míst.

Pro stanovení imunofenotypu kultivovaných MSCs z obou odběrových míst byla data od všech dárců analyzována pomocí průtokové cytometrie na přítomnost specifických povrchových znaků MSCs (Dominici et al. 2006b).



Obr. 12 Mikroskopický snímek zachycující morfologii buněk MSCs odebraných z lopaty kosti kyčelní (A) a kolenního kloubu (B) od téhož dárce během kultivace mezi 1. a 2. pasáží. Měřítko odpovídá 500  $\mu\text{m}$ .

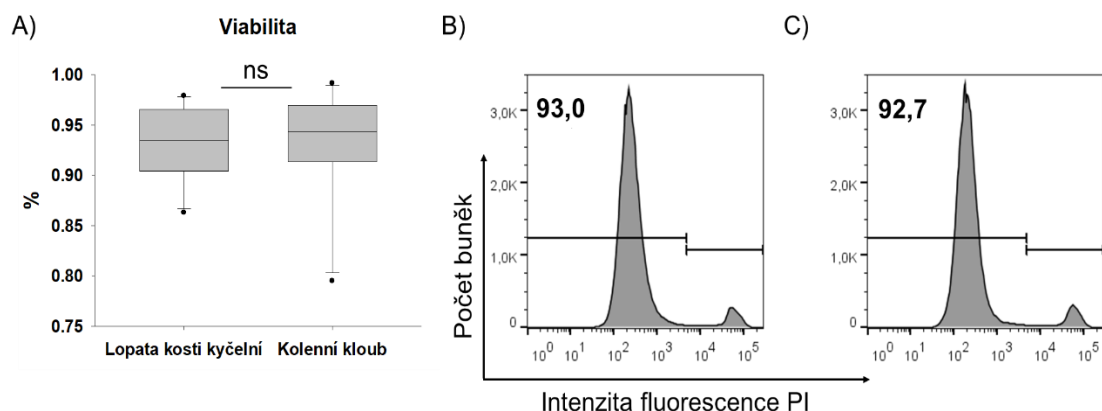
Za populaci MSCs byly považovány buňky pozitivní na přítomnost znaků CD105, CD90, CD73 a současně nevykazující přítomnost negativních znaků CD45, CD34, CD14, CD19 a HLA-DR. Medián procentuálního zastoupení MSCs v celkové populaci kultivovaných buněk u odběru z lopaty kosti kyčelní byl 97,3 %, v případě odběru z kolenního kloubu 96,8 % (Obr. 13A). Naměřená data všech dárců byla sloučena a analyzována na každý specifický povrchový znak odděleně. V tomto případě vykazuje populace buněk pocházejících z lopaty kosti kyčelní o 0,3 % menší procentuální zastoupení buněk pozitivních na povrchové znaky CD105, CD73 a CD90 v porovnání s buňkami izolovanými z kolenního kloubu. U negativních znaků výsledky ukazují vyšší hodnoty nežádoucích příměsí v případě buněk z lopaty kosti kyčelní a to o 2,3 % u HLA-DR a o 0,7 % u CD14, CD19, CD34 a CD45 v porovnání s populací buněk pocházejících z kolenního kloubu (Obr. 13B, C). Tyto výsledky však neukazují statisticky významné rozdíly.



Obr. 13 Imunofenotypizace MSCs. (A) Krabicový graf ukazuje srovnatelný fenotyp u obou odběrových míst včetně odlehklých hodnot a mediánu (n=10; ns, nesignifikantní; chybové úsečky představují kvartily – 5-25% a 75-95%). Obrázky B) a C) zobrazují porovnání imunofenotypu buněk izolovaných z lopaty kosti kyčelní (B) a kolenního kloubu (C) vzhledem k negativní kontrole. Histogram na levé straně (modře) reprezentuje neznačenou (negativní) kontrolu, histogram na pravé straně (červeně) ukazuje značenou (pozitivní) populaci buněk. Hodnota nad úsečkou udává procentuální podíl populace pozitivní na daný znak.

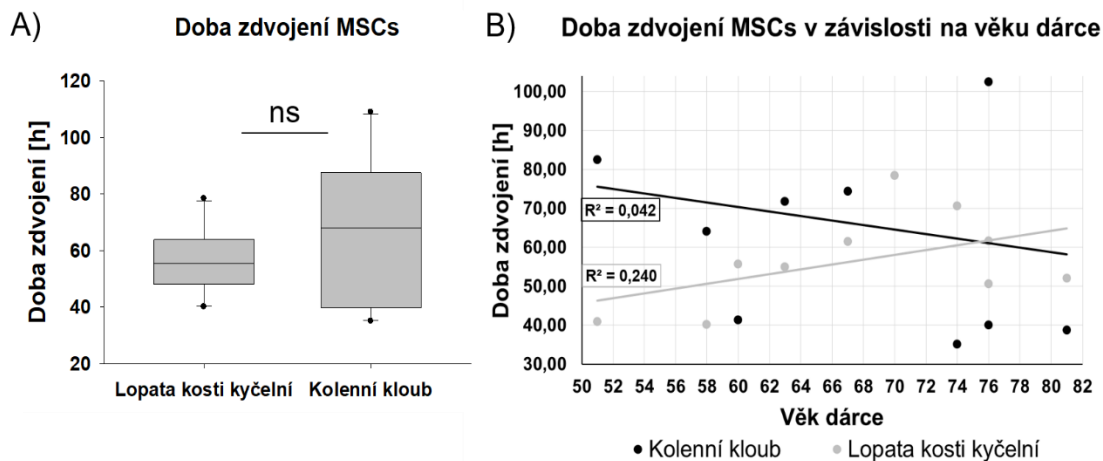
Viabilita kultivovaných MSCs byla měřena průtokovou cytometrií bezprostředně po 2. pasáži pomocí značení PI, který prostupuje pouze do buněk s porušenou buněčnou membránou, jak je tomu v případě apoptózy nebo nekrózy. PI-negativní buňky představují viabilní populaci. V rámci porovnání procentuálního zastoupení viabilních buněk je medián měření 93,5 % v případě buněk lopaty kosti kyčelní a 94,4 % v případě buněk z proximální tibie. Graf na Obrázku 4A znázorňuje různorodost získaných dat jednotlivých dárců. Alternativním přístupem vyhodnocení bylo sloučení dat všech dárců a zobrazení celkového

procentuálního zastoupení jednotlivých populací pozitivních a negativních na PI. Viabilní populace představovala 93 % celkových získaných buněk z lopaty kosti kyčelní a 92,7 % buněk z kolenního kloubu (Obr. 14B, C). Ani jeden z těchto přístupů nevykazuje statisticky významný rozdíl.



Obr. 14 Viabilita MSCs. (A) Krabicový graf poukazuje na statisticky nevýznamný rozdíl mezi viabilitou buněk izolovaných z lopaty kosti kyčelní a z kolenního kloubu u všech dárců včetně odlehých hodnot a mediánu (n=10; ns, nesignifikantní; chybové úsečky představují kvartily – 5-25% a 75-95%). Histogramy ukazují oddělené populace buněk pozitivních a negativních na značení PI v případě buněk z lopaty kosti kyčelní (B) a kolenního kloubu (C). Číselné údaje uvádění procentuální zastoupení.

PDt je jedním ze sledovaných parametrů u MSCs v rámci přípravy buněčných léčivých přípravků pro klinické použití. Hodnota PDt je důležitým kvalitativním znakem, který určuje proliferativní schopnost buněk, na jehož základě je možné určit kvalitu (zdraví) buněk, které jsou pacientům aplikovány (Kundrotas et al. 2016; Wagner et al. 2010). MSCs izolované z proximální tibie vykazovaly vysokou variabilitu v PDt oproti buňkám z kyčelní kosti (Obr. 15A). Medián hodnot PDt u buněk z kyčelní kosti byl 55,4 h, u buněk z kolenního kloubu pak 68,0 h. Přestože jsou od sebe tyto hodnoty vzdálené, statistický test neprokázal významný rozdíl.



Obr. 15 Doba zdvojení MSCs. A) Krabicový graf ukazující dobu zdvojení (PDt) MSCs izolovaných z lopaty kosti kyčelní a kolenního kloubu včetně odlehlých hodnot a mediánu (n=10; ns, nesignifikantní; chybové úsečky představují kvartily – 5-25% a 75-95%). B) Graf závislosti hodnoty PDt na věku dárce pro MSCs odebrané z lopaty kosti kyčelní (šedě) a kolenního kloubu (černě) včetně hodnoty spolehlivosti  $R^2$ . Korelační koeficient pro lopatu kosti kyčelní je roven hodnotě 0,49, pro kyčelní kloub -0,20.

Pro stanovení korelace věku dárce s množstvím MNCs v kostní dřeni nebo korelace kvality MSCs s věkem dárce je počet vzorků pro analýzu nízký a v souboru se vyskytuje mnoho odlehlých hodnot, především u odběru z proximální tibie. Nicméně byla pozorována mírná tendence růstu závislosti PDt na věku dárce u MSCs získaných z lopaty kosti kyčelní a naopak mírný pokles u MSCs z kolenního kloubu (Obr. 15B).

### 9.3.4 Odpovědi na stanovené výzkumné otázky

- (1) Práce prokázala, že odběry v obou lokalitách (pánevní kosti, proximální tibie) jsou bezpečné, technicky proveditelné a získané množství aspirátu lze použít pro kultivaci MSCs (viz ověření hypotézy níže).

Hypotéza  $H_{01}$ : Oba zdroje se neliší v počtu komplikací při odběru, získaném objemu aspirátu kostní dřeni pro kultivaci mezenchymálních kmenových buněk.

*Práce prokázala nulový výskyt komplikací při odběru aspirátu z obou zdrojů. Vždy byl odebrán požadovaný objem aspirátu kostní dřeni z obou zdrojů. Proto hypotézu  $H_{01}$  nelze zamítnout.*

(2) Práce prokázala, že buněčný aspirát kostní dřevě z různých anatomických míst, z pánevní kosti a proximální tibie, se statisticky liší kvantitou MNCs resp. MSCs, ale statisticky se neliší kvalitou mezenchymálních kmenových buněk (MSCs) v testovaných kvalitativních parametrech (viz ověření hypotéz níže).

*Hypotéza H0<sub>2</sub>: Získané MNCs z obou zdrojů se neliší v kvantitativních parametrech.*

*Práce prokázala, že získané MNCs z obou zdrojů se statisticky liší v kvantitativních parametrech ( $p=0,01-0,05$ ). Proto je hypotéza H0<sub>2</sub> zamítnuta.*

*Hypotéza H0<sub>3</sub>: Získané MSCs z obou zdrojů se neliší v kvalitativních parametrech.*

*Práce neprokázala statisticky významný rozdíl v kvalitativních parametrech kultivovaných MSCs z obou zdrojů. Proto hypotézu H0<sub>3</sub> nelze zamítnout.*

Praktický význam těchto zjištění je podrobně diskutován níže.

#### **9.4 Diskuze k experimentu**

Vzhledem k neuspokojivým výsledkům dřevě stimulujících technik se do popředí zájmu dostala buněčná terapie, jejíž základní biologické aspekty byly předmětem experimentální práce. Nevyřešenou otázkou zůstává, zda je nízká dostupnost progenitorových buněk výsledkem nedostatečné distribuce do místa defektu chrupavky, anebo zda je tento stav dán věkem pacienta a celkově nízkou proliferační aktivitou progenitorových buněk.

Kostní dřevě v oblasti pánve a metafýzy velkých kostí (distálního femuru, proximální tibie) obsahuje mononukleární buňky, jejichž subpopulace disponuje všemi charakteristickými znaky MSCs podle kritérií Mezinárodní společnosti pro buněčnou a genovou terapii (International Society for Cell & Gene Therapy, ISCT) včetně adherence k plastu, specifické imunofenotypizace a potenciálu k diferenciaci v alespoň tři typy buněk (chondro-, adipo- a osteocyty) (Dominici et al. 2006b). V naší studii jsme analyzovali MSCs na úrovni 2. pasáže, kdy je již doba v kultivaci dostatečná pro odstranění nežádoucích buněčných příměsí a zároveň jsou MSCs v nejlepší kondici z hlediska proliferace a morfologie. Pro

buněčnou terapii se nejčastěji používají buňky ve 3.-4. pasáži především z důvodu terapeuticky relevantního počtu. Vyšší pasáže již nejsou doporučované z důvodu nižší schopnosti proliferace buněk, vyšší hodnoty PDt, horší morfologie buněk (větší velikost a tím menší celkový počet buněk) a v kultuře se mohou začít vyskytovat senescentní buňky (Kundrotas et al. 2016).

Kultivované buňky z obou testovaných zdrojů kostní dřene našich pacientů (z pánevní kosti a proximální tibie) vykazovaly podobné imunofenotypy ve smyslu exprese povrchových znaků CD90, CD105, CD73. Spolu s absencí specifických hematopoetických znaků (CD34 a CD45) a leukocytárních markerů jsme byli schopni s velkou pravděpodobností identifikovat získané buňky jako MSCs (Dominici et al. 2006b). Nalezené povrchové znaky jsou membránové markery, které nalézáme také u endoteliálních buněk a dávají nám možnost uvažovat o aktivitě MSCs v procesu angiogeneze a regenerace tkáně s poruchou krevního zásobení (např. hojení pakloubu, avaskulární nekrózy) (Hernigou et al. 2005; Schmitt et al. 2012)

Domnívám se, že získané poznatky nás opravňují uvažovat o jedinečné možnosti využití MSCs v terapii chondrálních defektů. Výskyt MSCs v populaci jaderných buněk kostní dřene je velice nízký, udává se četnost kolem 1:10 000 až 1:100 000 buněk. Kostní dřeň pánevní kosti je nejbohatším zdrojem MNCs a tím také zdrojem MSCs po celou dobu života (Beitzel et al. 2013; McIntyre et al. 2018). V literatuře není příliš prací, které by se zabývaly výskytem MSCs v kostní dřeni v jiných anatomických lokalitách u člověka. McLain et al. (McLain et al. 2009) porovnal aspiráty kostní dřene obratlových těl a pánevní kosti. Závěr jeho studie ukázal vyšší koncentraci MNCs ze vzorku z obratlového těla ( $19,8 \times 10^6/\text{ml}$ ) v porovnání s ilickou kostí ( $16,9 \times 10^6/\text{ml}$ ). Mazzoca et al. (Mazzocca et al. 2010) porovnával koncentrace MNCs z oblasti proximálního humeru při defektu rotátorové manžety a zjistil jejich průměrnou koncentraci ( $12,1 \times 10^6/\text{ml}$ ). Beitzel et al. (Beitzel et al. 2013) zkoumal koncentraci MNCs z metafýzy distálního femuru při operaci předního zkříženého vazy a zaznamenal hodnotu  $13,5 \times 10^6/\text{ml}$ . Námi zjištěné průměrné koncentrace MNCs ze získaného aspirátu z ilické kosti a proximální tibie byly  $24,8 \times 10^6/\text{ml}$  respektive  $5,5 \times 10^6/\text{ml}$ . Hodnoty koncentrace v našem souboru byly obecně nižší, než je uváděno v literatuře a je to dáno zřejmě vyšším věkem pacientů našeho souboru.

Došli jsme k podobnému závěru jako práce Narbona-Carcelesa et al. (Narbona-Carceles et al. 2014), který porovnal množství MNCs z aspirátu z ilické kosti, distálního femuru



a proximální tibie u pacientů indikovaných k totální endoprotéze. Prokázal, že nejbohatším zdrojem je pánevní kosti bez ohledu na věk pacienta. Snižování množství a schopnosti proliferace MNCs se zvyšujícím se věkem člověka bylo pozorováno v několika dalších studiích (Cavallo et al. 2022; Zaim et al. 2012).

Cílem naší studie bylo analyzovat výtěžnost a kvalitu MSCs kultivovaných z kostní dřevě obou zdrojů u vzorku populace ČR, dle našich znalostí, nebyla tato data nikdy analyzována a publikována. Zdroj aspirátu KD tibie byl vybrán z praktického důvodu. Kdyby byl zdroj z tibie ekvivalentní pánevní kosti, tak by bylo možné provést aspiraci KD z oblasti kolenního kloubu přímo během artroskopického zákroku, tedy v okamžiku diagnostiky chondrálního defektu. Získané buňky by bylo možné použít k terapii chrupavčité léze kolenního kloubu.

Oproti jiným publikacím jsme v našem souboru nenašli signifikantní rozdíl mezi množstvím získaných MNCs a jejich viabilitou, jak se někteří autoři domnívají (Wagner et al. 2010).

Z naší studie tedy vyplývá, že lze uvažovat o metafýze proximální tibie jako o alternativním zdroji kultivovaných MSCs. Jeho výhodou je jednoduchá přístupnost, anatomická bezpečnost odběru a možnost odběru během artroskopického výkonu. Je nutné ale dodat, že tento zdroj dává nižší počet MNCs pro zvažované "one-step" operační terapie (bone marrow aspiration and implantation), kdy by byly implantovány nekultivované MNCs. I přes značné množství publikací stále neexistuje shoda ohledně množství MSCs potřebných k léčbě fokální chondrální léze. V čem se s výsledky publikovaných prací shodujeme je fakt, že je nutné MSCs kultivovat, abychom dosáhli dostatečného množství progenitorových buněk a tyto buňky implantovat v rámci další operace.

Tato studie má jistě své limity, mezi které patří nízký počet probandů (celkem 10 zkoumaných odběrů ze dvou zdrojů) a dále vyšší věk pacientů (průměr 55 let), což ale bylo dáno designem studie. Zároveň jsme nebyli schopni posoudit bolestivost odběru z tibie, míru možných komplikací samotného odběru kostní dřevě z proximální tibie vůči odběru z pánevní kosti (hematom, otok, dysestezie, septické komplikace atd.), jelikož skupinu tvoří pacienti s implantovanou totální endoprotézou kolenního kloubu. Pooperační stav nám hodnocení bolesti a ostatních kvalit v lokalitě kolena neumožnil.

## 9.5 Závěry experimentální části práce

Výsledky experimentální práce ukazují, že odběr aspirátu kostní dřeně z obou lokalit je bezpečný, reprodukovatelný a lze získat dostatečné množství MNCs, respektive MSCs.

Práce dále prokazuje, že kostní dřen z kyčelní kosti je vhodnějším zdrojem MNCs a MSCs pro různé buněčné terapie. Aspirát kostní dřeně ilické kosti je v porovnání s aspirátem kostní dřeně proximální tibie bohatší na MNCs a MSCs. Vybrané kvalitativní znaky: imunofenotypizace, viabilita, PDt, morfologie buněk však neukazují statisticky významný rozdíl mezi MSCs izolovanými z obou zdrojů. Z tohoto důvodu je možné považovat kostní dřen v oblasti proximální metafýzy tibie za vhodný alternativní zdroj pro izolaci MNCs a následnou kultivaci MSCs s cílem buněčné terapie chondrálních defektů, nicméně je nezbytné buňky kultivovat až do 3. - 4. pasáže pro získání dostatečného počtu MSCs.

Klinický dopad získaných výsledků experimentální práce lze shrnout do několika doporučení ve vztahu k léčbě fokálního chrupavčitého defektu kolenního kloubu. Získané výsledky nás opravňují učinit doporučení, že pro jednodobou buněčnou terapii (bone marrow aspiration and implantation) je vhodnějším zdrojem MNCs aspirát z pánevní kosti. Budeme-li uvažovat o dvoudobém zákroku (odběr plus kultivace MSCs a následná implantace), pak je možné využít proximální tibie, jako alternativního zdroje buněk.

## 10 Klinická část práce

### 10.1 Úvod do klinické práce

Přestože operační zákroky stimulující kostní dřeň jsou nejrozšířenější operační technikou, výsledky jsou stále neuspokojivé. Technika mikrofraktur, vycházející z Pridieho návrtů se stala široce užívanou metodou k ošetření chondrálních defektů kloubů včetně kolena, ramene a hlezna (Pridie 1959; Siebold, Lichtenberg, and Habermeyer 2003; Mithoefer et al. 2009). Novotvořená fibrózní chrupavka vzniklá přeměnou koagula v ošetřeném defektu však nemá dlouhodobý klinický efekt, udává se 2-5 let (Mithoefer et al. 2009). Ke zlepšení výsledku se začala používat technika mikrofraktur s překrytím defektu periostálním lalokem, chitosanem, kolagenem nebo syntetickými materiály např. z kyseliny polyglykolové, anebo kyseliny hyaluronové (Gao et al. 2019; Dorotka et al. 2005). Výsledkem této terapie je také často regenerát na pomezí vazivové a hyalinní chrupavčité tkáně. Většina klinických randomizovaných studií udává, že buněčná terapie (autologními chondrocyty) dává stejné nebo lepší výsledky mozaiková plastika (McNickle, Provencher, and Cole 2008; Richter et al. 2016). Z tohoto důvodu je do tkáňového inženýrství vkládána naděje, že by mohla být vytvořena konstrukce, která by trvale funkčně a mechanicky odolala nárokům zatížení povrchu kloubu a využila výhody buněčného implantátu in vivo.

Po předchozí experimentální práci, která byla popsána výše, jsme získali zkušenosti s odběry, manipulací a přípravou kultivovaných mezenchymálních kmenových buněk z kostní dřene (MSCs). Závěry experimentální části práce nás opravňují k tvrzení, že: (a) odběr aspirátu kostní dřene (KD) z lopaty kosti pánevní je bezpečný, (b) prokázali jsme reprodukovatelnost odběru aspirátu KD, (c) velmi dobrou výtěžnost zdroje pro MNCs, resp. MSCs, kde získané kmenové buňky mají velmi dobrou viabilitu a schopnost reprodukce, bez výrazného vlivu věku pacienta na jejich biologické vlastnosti.

Využití kultivovaných kmenových buněk oproti kultivovaným autologním chondrocytům v terapii chrupavčitého defektu kolenního kloubu, má z mého pohledu následující výhody: (a) méně invazivní procedura k získání MSCs oproti odběru nativních chondrocytů, (b) minimální nebo žádná bolestivost z odběrového místa zdroje buněčné terapie, (c) jeden operační zákrok na postiženém kolenním kloubu, (d) MSCs mají vyšší proliferační kapacitu než chondrocyty, která výrazně neklesá s věkem pacienta (A.I. Caplan et al. 1997).

K uskutečnění efektivní terapie pomocí metodiky tkáňového inženýrství je nutné definovat léčebný postup pomocí moderní buněčné terapie ve třech souvisejících částech. Mezi tyto tři oblasti patří: zdroj buněk, design nosiče a typ fixace nosiče s buňkami na kloubním povrchu.

### **10.1.1 Zdroj buněk**

V současné době převládají studie, které prokazují, že použití buněk v terapii chondrálního nebo osteochondrálního defektu vede k lepším výsledkům, než bezbuněčná terapie (Tatebe et al. 2005). V mezinárodní odborné společnosti pro léčbu chrupavky (International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society, ICRS) je brána terapie autologními chondrocyty za „zlatý standard“ buněčné léčby větších chondrálních a osteochondrálních defektů. Volba typu buněk závisí na několika faktorech, ale tím nejdůležitějším je kondice chrupavky, jako zdroje. Tam, kde je významné opotřebení tkáně, nejsou autologní chondrocyty, vzhledem k omezené viabilitě buněk, dobrým zdrojem reparace poškozené chrupavky. Jak bylo uvedeno již v předchozí kapitole uvedeno: „při využití kultivovaných autologních chondrocytů bylo pozorováno zrychlené zkracování telomer s věkem, které se projeví během expanze buněk v in vitro prostředí, tím že dochází k jejich rediferenciaci“ (Yanada et al. 2006; Parsch et al. 2004).

Pro použití MSCs v terapii fokálního defektu chrupavky hovoří zejména to, že věk a pohlaví dárce nehrají výrazný vliv na schopnost expanze MSCs. Větší vliv mohou mít podmínky a množství pasáží k dosažení dostatečné multiplikace buněk (Baxter et al. 2004). Naše předchozí zkušenosti a znalosti faktorů, které ovlivňují množství a kvalitu MSCs, mohou minimalizovat čas kultivace a urychlit výrobu buněčného přípravku pro klinické užití. Z uvedených důvodů a získaných zkušeností z experimentu s kultivovanými kmenovými buňkami kostní dřeně, jsme zvolili kultivované MSCs kostní dřeně z pánevní kosti jako buněčný zdroj implantovaných buněk v naší klinické aplikaci pro léčbě fokálního defektu chrupavky kolenního kloubu.

### 10.1.2 Nosič

Stran výběru nosiče je nutné vždy dodržet základní obecně platná doporučení a charakteristiky. Nosič by měl mít následující charakteristiky: imunokompatibilitu, netoxicitu, biodegradabilitu, solubilitu. Mechanická vlastnost matrix, by se měla blížit originální tkáni, zejména v třídimenzionální struktuře (Kerker, Leo, and Sgaglione 2008).

Při rozhodování o výběru nosiče je možné vycházet ze základního materiálového rozdělení, kdy se jedná buď o přírodní, syntetické nebo hybridní materiál. Použitý nosič by si měl zachovávat středně dobé až dlouhodobé vlastnosti v rámci procesu reparace tkáně a jeho integrace do tkáně příjemce je jednou z nejobtížnějších částí terapie buněčné terapie.

Jedním z předpokladů úspěchu je umístění MSCs in situ, protože spontánně buňky nepřilnou k místu defektu a mají tendenci uniknout (Sittinger, Hutmacher, and Risbud 2004). Proto použití nosiče může teoreticky výrazně zlepšit terapeutický výsledek tím, že poskytne podporu implantovaným buňkám a umožní jejich začlenění do okolní tkáně a obráceně buněk z okolní chrupavky a subchondrální kosti do implantátu (W. Y. wai Lee and Wang 2017). Pro naši klinickou studii jsme vybrali komerčně dostupný 3D nosič Chondrotissue<sup>®</sup> (BioTissue AG, Geneva, Switzerland), který splňuje výše uvedené definice.

### 10.1.3 Tkáňové inženýrství v reparaci chrupavky

Výše uvedené složky (buňky a nosič) je nutné zakomponovat do celku, který by odolal fyzikálním vlivům působících na kloubním povrchu při pohybu. Kloubní povrch dynamicky reaguje na biologické i mechanické stimuly. Kloub musí zvládat mechanickou zátěž, určitá míra zátěže jej stimuluje, nadměrná dokáže vést k destrukci a žádná vede k atrofii chrupavky (Vanwanseele et al. 2002; Darling, Hu, and Athanasiou 2004). Z chirurgického hlediska je kritickým krokem tkáňová integrace nové konstrukce do okolní tkáně. Tedy zajištění dostatečně pevné primární stability implantátu a umožnit mu integraci s okolní tkání, aniž by došlo výraznému narušení integrity implantátu. Touto integrací do okolní tkáně vzniká tzv. sekundární stabilizace implantátu.

Možností je nahradit složité fyziologické vazby chrupavčité tkáně a kloubu, které se nacházejí „in vivo“ a přenést je do prostoru „in vitro“. Tato snaha vyústila do konstrukce složitých „bioreaktorů“, které simulují fyziologické prostředí kloubu stran zátěže a chemického prostředí kloubu. Důvodem proč se zkouší vytvořit takovéto biologické

inkubátory je, aby vznikající tkáňová konstrukce měla čas biologické a mechanické maturace. Výhodou tvorby „nové chrupavky“ v laboratorních bioreaktorech je kontrolovatelnost celého procesu, jak stran nutričních potřeb, biologických a mechanických stimulů. Nevýhodou je náročnost celého procesu a aproximace komplexního celku fyziologického kloubu do laboratorních podmínek.

Druhou možností je využít vlastní „in vivo“ prostředí k maturaci implantované konstrukce. Mezi výhody aplikace metod tkáňového inženýrství do prostředí „in vivo“ patří: (a) obsahuje všechny důležité růstové faktory, biologicky aktivní molekuly, (b) působení mechanických stimulů, (c) prostředí „in vivo“ stimuluje hojení defektu také skrze parakrinní a autokrinní působení buněk okolních tkání. Z výše uvedených důvodů jsme se rozhodli pro tento typ procesu aplikace buněk na komerčně dostupný nosič v prostředí „in vivo“. Dle znalostí autora nebyla doposud podobná práce v ČR publikována.

## **10.2 Cíle klinického experimentu**

Klinická práce má charakter monocentrické prospektivní otevřené studie. Laboratorní část byla provedena ve spolupráci se společností Bioinova, a.s., klinická část studie byla provedena na pracovišti autora.

### **10.2.1 Cíle klinického experimentu**

Hlavním cílem klinického části disertační práce je zhodnotit bezpečnost a proveditelnost chirurgické implantace kultivovaných kmenových buněk z kostní dřevě na 3D komerčně dostupném nosiči v léčbě fokálního chrupavčitého defektu kolenního kloubu.

*Dílčí cíle klinického experimentu:*

1. Zjistit, zda aplikace kultivovaných MSCs z kostní dřeně na nosiči Chondrotissue<sup>®</sup> je klinicky bezpečná.
2. Zjistit, zda stanovený chirurgický postup je reprodukovatelný a opakovatelný.
3. Zjistit, zda zvolená fixace buněčného implantátu (BiCure<sup>®</sup> orthoMSCp aplikovaného na Chondrotissue<sup>®</sup>) pomocí fibrinového lepidla je primárně (v době implantace) dostatečně pevná a vede k sekundární integraci s okolní tkání.
4. Zhodnotit klinický efekt léčby pomocí dotazníkových šetření a klinického sledování pacientů po dobu 1 roku od operace.

### **10.3 Metodika**

#### **10.3.1 Design klinické studie**

Studie byla navržena jako prospektivní, otevřená, monocentrická studie. Byla schválena Státním ústavem pro kontrolu léčiv ČR (Online zdroj 1). Byla provedena na základě etických zásad vycházejících z Helsinské deklarace a souladu se schváleným protokolem a správnou klinickou praxí. Studie byla přezkoumána a schválena Etickou komisí Masarykovy nemocnice, Ústí nad Labem, Krajská zdravotní a.s., Česká republika (Online zdroj 2).

#### **10.3.2 Charakteristika souboru pacientů**

Do klinické studie bylo zařazeno 6 pacientů se symptomatickou fokální chondrální lézí kolenního kloubu. Kritéria pro zařazení a vyloučení pro zápis do studie jsou uvedena v Tabulce 1. Demografické údaje sledované skupiny pacientů jsou shrnuty v Tabulce 2. Pacienta s označením OR01 jsme museli vyřadit z důvodu artroskopického nálezu poranění předního zkříženého vazů. Tento stav byl diagnostikován během artroskopického zákroku před plánovanou implantací buněk a pacient tedy není dále ve výsledcích uváděn.

Tab. 1 Zařazovací a vylučovací kritéria studie

<p><b>Zařazovací kritéria</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Symptomatický chondrální defekt kolenního kloubu, III.-IV. stupně dle Outerbridge</li> <li>2) Velikost chondrálního defektu do 6 cm<sup>2</sup></li> <li>3) Věk 18-60 let</li> <li>4) Osteoartróza do III. stupně dle Kellgrena a Lawrence na rtg snímku ne starším 3 měsíců</li> <li>5) Body mass index &lt; 30 kg/m<sup>2</sup></li> </ol> <p><b>Vylučovací kritéria</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Předchozí operační léčba totožného chondrálního defektu</li> <li>❖ Osová deformita kolenního kloubu nad 5st.</li> <li>❖ Vazivová nestabilita kolenního kloubu</li> <li>❖ Hematopoetické onemocnění, nebo příjem krevních derivátů v posledních 3 měsících</li> <li>❖ Nádorové onemocnění</li> <li>❖ Těhotenství</li> </ul>
--

Tab. 2 Data pacientů ve sledovaném souboru

Charakteristika	Data- počty
Pohlaví	Ženy, n= 2
	Muži, n= 4
Věk	48 +/- 7 let
BMI	26,5 +/- 2,1



### 10.3.3 Sledování a hodnocení skupiny pacientů

Aby se posoudila bezpečnost a účinnost léčby, byla provedena kontrola pacientů a hodnocení jejich zdravotního stavu s odstupem tří týdnů, šesti, devíti a 12 měsíců od operace. Během každé návštěvy byly zaznamenány potenciální nežádoucí příhody (AEs - Adverse Events) do Case Report Forms a byl hodnocen kauzální vztah k operaci a aplikaci HLP (hodnocený léčivý prostředek). Ty zahrnovaly pozorování potenciální intolerance lokální (stav léčeného kolena) a systémové intolerance přípravku BiCure<sup>®</sup> orthoMSCp, jakož i laboratorních testů, které zahrnovaly kompletní krevní obraz a biochemickou analýzu séra.

Účinnost léčby byla hodnocena pomocí Lysholmovy škály (Lysholm Knee Scoring Scale (Lysholm score)), KOOS škály (Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS)), Visuální škály bolesti (Visual Analogue Scale (VAS)) v 6 a 12 měsících po operaci a hodnoty byly porovnány s daty před léčbou.

Předoperační RTG snímky byly korelovány s těmi po 6 a 12 měsících od operace a kvantifikovány dle Kellgren-Lawrenceho klasifikace (Kellgren and Lawrence 1957). 12 měsíců po operaci byla provedena MRI analýza, aby se zhodnotila kvalita fixace implantátu a jeho integrace do okolní tkáně. Výsledky byly kvantifikovány pomocí Magnetic Resonance Observation of Cartilage Repair Tissue (MOCART) skóre 2.0 (Schreiner et al. 2019).

### 10.3.4 Odběr kostní dřeně a periferní krve

Pacienti podstoupili sérologické vyšetření k vyloučení infekcí (HBV, HCV, HIV, and *Treponema pallidum*) podle požadavků správného výrobního postupu (Good Manufacturing Procedure (GMP)). Kostní dřeň byla odebrána tak, jak je popsáno v protokolu studie a to tři až čtyři týdny před operací (Neckař et al. 2020). Během tohoto postupu bylo také odebráno 32-36 ml periferní krve do dvou odběrových sad předem naplněných roztokem ACD-A (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg von der Höhe, Německo).

### 10.3.5 Příprava autologních BM-MSCs

Izolace a expanze BM-MSCs byly provedeny v čistých prostorách třídy A/B v zařízení společnosti Bioinova, a.s. v režimu GMP. Aspirát kostní dřeně byl smíchán s Gelofusinem (B. Braun, Melsungen, Německo), aby byla získána frakce mononukleárních buněk

(MonoNuclear Cells (MNCs)). Pro expanzi BM-MSCs bylo nasazeno  $0.9\text{--}1.6 \times 10^5$  MNCs/cm<sup>2</sup> do lahví pro tkáňové kultury a kultivováno v médiu Alpha MEM medium (Lonza, Basel, Švýcarsko) doplněné 5% Stemulate (Sexton Biotechnologies, Indianapolis, IN, USA) ve vlhké atmosféře při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Médium bylo měněno každé 2-4 dny, dokud konfluence buněk nedosáhla >80%, poté byly buňky pasážovány. Buňky byly sklizeny při třetí pasáži. Vysušená buněčná peleta byla resuspendována v autologní PrP (platelet-rich-plasma), aby se dosáhlo konečné koncentrace  $3.5\text{--}6.5 \times 10^6$  buněk/mL.

### **10.3.6 Příprava autologního PrP**

Periferní krev byla centrifugována při 150 g po dobu devíti minut (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Brea, CA, USA), aby se oddělily krevní buňky a plazma. Supernatant (plazma) byl poté znovu centrifugován při 750 g po dobu 16 minut. PrP byl zmražen při -80 °C a rozmražen, aby došlo k rozrušení krevních destiček. Materiál byl poté udržován zmrazený při -80 °C až do finalizace HLP.

### **10.3.7 Finalizace a kontrola kvality BiCure® orthoMSCp**

Čerstvě sklizené BM-MSCs byly resuspendovány v PrP. Kritéria pro uvolnění šarže zahrnovala přítomnost alespoň 90 % buněk se znaky : CD105+/CD90+/CD73+/CD45-/CD34-/CD19-/CD14-/HLA-DR- cells (Dominici et al. 2006a) a více než 85 % životaschopných buněk v produktu. Sterilita produktu byla sledována stran kontaminace bakteriemi, plísněmi a mykoplazmaty během celého výrobního procesu.

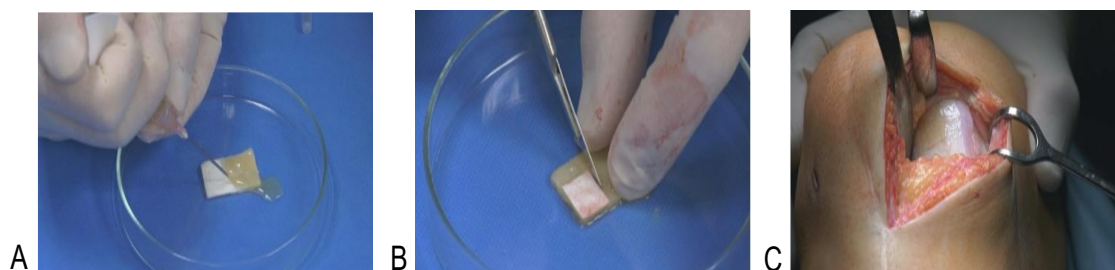
### **10.3.8 Metodika hodnocení a statistická analýza**

Bezpečnostní analýzy byly založeny na popisné statistice nežádoucích účinků se změnami oproti výchozí hodnotě, pokud to bylo možné.

Hodnoty získané pomocí Lysholmova skóre, KOSS a VAS byla porovnána s hodnotami před léčbou pomocí oboustranného Wilcoxon Signed-Rank testu s použitím softwaru Statistics Kingdom software (Melbourne, Austrálie). Rozdíl mezi hodnotami srovnáními byl považován za statisticky významný, pokud  $p < 0.05$ .

#### 10.4 Operace kolena a podání BiCure® orthoMSCp

Operace byla provedena přibližně čtyři týdny po odběru kostní dřeně, načasování bylo dáno přípravou HLP. Nejprve byla artroskopicky stanovena lokalizace, velikost a Outerbridgova klasifikace (Outerbridge and R. E. 1961) defektu chrupavky. Byly vyloučeny kontraindikované stavy a případně ošetřeny přidružená poranění menisku. Následně byla provedena cílená miniartrotomie, kyretáž poškozené chrupavky a upraveny okraje léze. Dno defektu bylo ošetřeno Pridieho vrtáním pomocí Kirschnerova drátu o průměru 1,2 mm. Pro vyvolání gelovatění PrP v produktu bylo smícháno 1,1 mL HLP s 36 uL Calcium chloratum Bioitika (BB Pharma, Prague, Česká republika) obsahujícího 2,42 mg CaCl<sub>2</sub>. Okamžitě byl celý objem rovnoměrně aplikován na 6 cm<sup>2</sup> proužku Chondrotissue® (BioTissue AG, Geneva, Switzerland) a tento byl umístěn na Petriho misku, což vedlo ke koncentraci buněk 0,98 (± 0,19) x 10<sup>6</sup> buněk na cm<sup>2</sup> povrchu nosiče (Obr. 16A) a bylo inkubováno po dobu 15 minut k dokončení procesu gelovatění. Následně byla vyříznuta vhodná velikost a tvar štěpu s nasazenými buňkami (Obr. 16B). Štěr byl umístěn do léze chrupavky a přilepen pomocí fibrinového lepidla Tisseel fibrin sealant (Baxter, Deerfield, IL, USA) (Obr. 16C). Primární stabilita implantátu *in situ* byla testována několika flexními/extenzními pohyby kloubu a operační rána byla sešita po vrstvách, kloub drénován bez použití aktivního sání na 24 hod od operace. Koleno bylo po operaci fixováno ve 20° flexi po dobu dvou týdnů a po šesti týdnech bylo povoleno plné zatížení došlapem na operovanou končetinu a plný rozsah pohybu. Podrobná obrazová fotodokumentace jednotlivých kroků operace je v zařazena v příloze disertační práce.



Obr. 16A-C. A. Aplikace buněčné suspenze - BiCure® orthoMSCp, na 3D nosič (Chondrotissue®) na operačním sále před finální úpravou nosiče. B. Úprava nosiče na požadovanou velikost a tvar. C. Implantát *in situ* na kondylu femuru

Tab. 3 Přehled odebrané periferní krve a kostní dřeně k přípravě LPMT- BiCure<sup>®</sup> rthoMSCp a množství použitého 3D nosiče (Chondrotissue<sup>®</sup>), včetně velikosti ošetřeného defektu chrupavky kolenního kloubů u jednotlivých pacientů ve studii

Pacient	Množství odebrané kostní dřeně (ml)	Množství odebrané periferní krve (ml)	Velikost aplikovaného 3D nosiče (Chondrotissue <sup>®</sup> ) (% plochy)	Velikost chondrálního defektu (cm <sup>2</sup> )
OR02	2 x 13	2 x 18	20	1,1
OR03	2 x 13	2 x 15	40	2,2
OR04	2 x 15	2 x 18	40	2,2
OR05	2 x 15	2 x 18	45	2,5
OR06	2 x 15	2 x 19	40	2,2
OR07	2 x 15	2 x 18	25	1,4

## 10.5 Výsledky

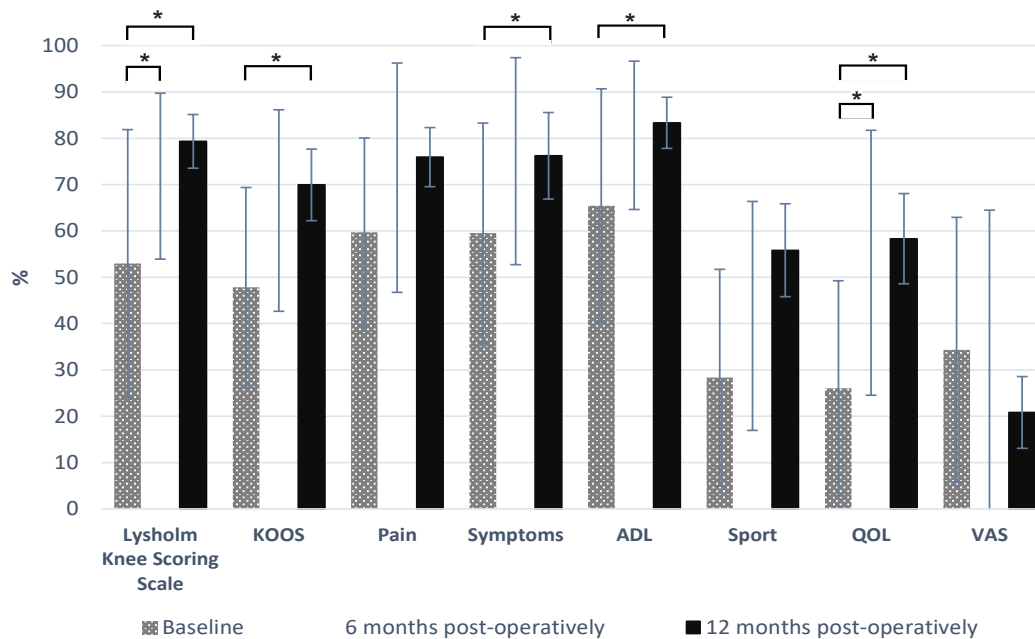
### 10.5.1 Vyhodnocení bezpečnosti

Ve sledované skupině se nevyskytly žádné vážné nežádoucí události. Nejčastější příhodou byl lehký výpotek v operovaném kloubu pozorovaný u pěti pacientů (83 % případů) mezi 6.-44. dnem od operace. Exudáty nevykazovaly žádnou infekci. Cytologická a biochemická analýza punktátů prokázala aseptickou reaktivní odpověď na provedenou operační intervenci ve smyslu zánětlivé odpovědi. Laboratorní rozbory krevních vzorků ve sledovaném období u všech pacientů neprokázaly žádné vážné odchylky ze sledovaných parametrů. Zároveň nebyly pozorovány žádné patologické změny ve sledovaných parametrech životních funkcí (krevní tlak, klidová tepová frekvence, hmotnost, výška, BMI) ani celkového zdravotního stavu.

### 10.5.2 Výsledek klinické účinnosti

Dvanáct měsíců po operaci bylo pozorováno klinicky a statisticky významné zlepšení funkce kolena (Graf 1). Lysholmovo skóre se zlepšilo z průměrné hodnoty  $53,0 \pm 28,9$  na  $79,3 \pm 14,2$  ( $p = 0,03$ ), což odpovídá klinickému zlepšení ze „špatného“ na „dobrý“ (Tegner and Lysholm 1985). Průměrné hodnoty KOOS se zlepšily hodnot  $47,8 \pm 21,6$  na  $69,9 \pm 18,9$  ( $p = 0,03$ ). Oba výsledky představují nárůst o více než 20 bodů, přičemž jsou výrazně nad minimální detekovatelnou změnou odpovídajícího skóre (Collins et al. 2011). Pokud jde o podskupiny škály KOOS, nejlepších výsledků bylo dosaženo v podskupině hodnotící „kvalitu života“ související s funkcí kolenního kloubu, která se zlepšila z  $26,0 \pm 23,2$  na  $58,3 \pm 23,8$  ( $p = 0,04$ ). Významné zlepšení bylo také zaznamenáno v podskupině hodnotící „symptomy a aktivity každodenního života“ KOOS.

Míra vnímání bolesti vykazovala tendenci ke snížení, přičemž průměrná hodnota VAS se zlepšila z  $34,3 \pm 28,6$  na  $20,8 \pm 19,0$ . Tato změna byla statisticky nevýznamná ( $p = 0,31$ ). Na druhé straně se hodnotící podskupina KOOS „bolesti“ zlepšila z  $59,7 \pm 20,3$  na  $75,9 \pm 15,6$  bodu. Rozdíl 16,2 bodu byl rovněž statisticky nevýznamný ( $p = 0,62$ ), nicméně stále výrazně převyšoval minimální detekovatelnou změnu této podskupiny hodnoceného skóre (6–13,4 body) (Collins et al. 2011). Údaje jednotlivých pacientů jsou uvedeny v doplňkových tabulkách (Příloha).



Graf 1. Hodnoty dotazníkových šetření před operací, v 6. měsíci a 12. měsíci od operace. Lysholm-Tegner skóre (0-100% bodu), KOOS skóre (Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score) (0-100% bodu), s výsledky pro jednotlivé oddíly dotazníkového šetření KOOS – Bolest (pain), Symptomy (Other symptoms), Denní aktivity (Function in daily living (ADL)), Sport (Function in sport and recreation), Kvalita života (Knee related Quality (QOL)). VAS (Bez bolesti = 0 mm, Maximum bolesti = 100 mm). Data jsou zobrazená včetně mediánu (n=6;  $p < 0.05^*$ ).

### 10.5.3 Hodnocení MRI and RTG

MRI prokázala dobrou fixaci a integraci implantátů do přilehlé tkáně 12 měsíců po operaci. Průměrná hodnota skóre MOCART byla  $48 \pm 15$  bodů (Tabulka 4). MRI prokázalo u 5 pacientů objem výplně původního chondrálního defektu 75-99% výšky nativní chrupavky, většinou heterogenní struktury (Obr. 17). Hodnotící proměnná „integrace“ do sousední chrupavky odhalila „split-like“ defekt  $< 2$  mm u dvou pacientů, což odpovídá 10 z 15 možných bodů v tomto hodnotícím parametru skóre (Obr. 10). Nejčastější pooperační nálezy snižující výsledné MOCART skóre byly pozorovány u variabilní reakce subchondrální kosti, kde byly pozorován „edém kostní dřene“, korelující s místy provedených návrtů (Obr. 18). Rentgenové snímky za 6 a 12 měsíců po operaci neodhalily u žádného z pacientů progresi osteoartrotických změn dle Kellgrenovy-Lorenzovy klasifikace (Kellgren and Lawrence 1957).



Obr. 17 Pacient OR03, MRI 1 rok od operace, MOCART skóre 50, heterogenní struktura novotvořené tkáně (šipka)



Obr. 18 Pacient ORO6, MRI 1rok od operace, MOCART skóre 55, sagitální pohled, T2 sekvence prokazuje přetrvávající subchondrální edém (hvězdička) a „split-like“ defekt (šipka) v integraci do okolní tkáně chrupavky.

Tab. 4 Hodnoty proměnných MOCART skóre (Magnetic Resonance Observation of Cartilage Repair Tissue) u jednotlivých pacientů 1 rok od implantace.

Pacient (klinické označení)	Objem výplně defektu	Integrace do okolní tkáně	Povrch nové tkáně	Struktura nové tkáně	Intenzita Signálu nové tkáně	Kostěný defekt nebo přerůst	Subchondrální změny	Celkové skóre (bodů)
	(0-20)	(0-15)	(0-10)	(0-10)	(0-15)	(0-10)	(0-20)	(0-100)
OR2	20	15	5	0	10	10	10	70
OR3	20	10	5	0	10	5	0	50
OR4	0	5	0	0	10	0	0	15
OR5	15	5	5	0	10	5	10	50
OR6	15	10	0	0	10	5	15	55
OR7	20	15	0	0	10	5	10	60

## 10.6 Diskuze ke klinickým výsledkům studie

Metaanalýzy prokazují, že chirurgická léčba poškozené chrupavky obecně poskytuje dobré a výborné výsledky terapie. Stále však není možné přesně definovat, který chirurgický postup je lepší a vhodnější pro určitý typ defektu (velikost, umístění, stupeň poškození) a typ pacientů, vzhledem k věku, pohlaví a aktivitám (Zamborsky and Danisovic 2020; Maheshwer et al. 2021). Limitace výzkumu jsou dány možnostmi ověření výsledné regenerace tkáně (Liu et al. 2023). Každý proband v *in vivo* studii představuje stran biomechaniky pohybu a biochemického mikroprostředí kloubu unikátní jednotku.

Chondrotissue® (BioTissue AG, Geneva, Switzerland) je komerčně dostupný acelulární resorbovatelný nosič určený pro reparaci chrupavky. Je složen z kyseliny polyglykolové. Standartní aplikace implantátu je navržena tak, že kombinuje operačním zákrok typu „dřeň stimulační techniky“ např. mikrofrakturami, nebo návrty (Steinwachs et al. 2019) a implantaci Chondrotissue®. Implantát se před aplikací namočí do autologního séra nebo



plazmy bohaté na krevní destičky (PrP). Chondrotissue® byl navržen tak, aby podporoval chondrogenní diferenciaci MSCs, dle dostupných údajů nebyl doposud nikdy použit v klinické studii s kultivovanými MSCs.

Naše data získaná z klinické studie ukazují, že intraartikulární aplikace BiCure® orthoMSCp nasazená na 3D nosič (Chondrotissue®) byla dobře tolerována. Žádná z AEs přímo nesouvisela s HLP. Mírný výpotek kolena krátce po operaci byl nejčastější AE u 83 % pacientů a připisujeme ho stavu po operaci, který je pozorovatelný i v případě jiných nitrokloubních operačních zákroků (Słynarski et al. 2020). Imunopriviligence kloubní chrupavky je dána alymfatickou a avaskulární charakteristikou kloubní chrupavky (Revell and Athanasiou 2009). Samotný chirurgický zákrok vede k otevření synoviální tkáně a kloubního pouzdra, které mohou vést k aktivaci imunitního systému. Toto může být sníženo miniinvazivním přístupem operačního zákroku (Hashimoto et al. 2019a).

Primární i sekundární stabilita implantátu navrženou technikou je funkční. Defekt byl účinně vyplněn u všech léčených pacientů, i když povrch novotvořené tkáně byl nižší než okolní zdravá chrupavka. To lze vysvětlit relativně krátkým časovým obdobím od implantace a zamyšlením nad možností modifikace implantace vrstvením matrix s aplikovanými buňkami v místě defektu. Při srovnání skóre MOCART na základě MRI s daty z jiných prospektivních studií s podobným typem chirurgické léčby a časovým intervalem po implantaci nosiče (Dhollander et al. 2012; Steinwachs et al. 2019), jsme pozorovali podobné hodnoty skóre, které prokazují dobrou fixaci a integraci do okolní tkáně. MRI provedená 12 měsíců po operaci odhalila přetrvávající subchondrální edém v místě návrtů, podobně ve shodě s předchozími studiemi po dřev stimulujícím operačním zákroku (Dhollander et al. 2012).

Hodnocení účinnosti terapie v našem sledovaném souboru má své limitace zejména kvůli nízkému počtu pacientů zařazených do studie. Pozorovali jsme však statisticky významné zlepšení Lysholmova skóre a KOOS. Přes jasnou tendenci ke zmírnění bolesti kolena nebyly výsledky v tomto hodnotícím parametru statisticky významné. Tyto výsledky jsou v souladu s nedávno publikovaným přehledem, metaanalýzou, hodnotící aplikaci MSCs v léčbě poškození chrupavky kolenního kloubu (Maheshwer et al. 2021).

Ve světě publikované studie jednoznačně prokázaly, že aplikace kmenových buněk v terapii fokálních chondrálních defektů je bezpečná a efektivní (S. Wakitani et al. 2002; Nejadnik et al. 2010; Gobbi et al. 2011; Hashimoto et al. 2019b). Dle recentních publikovaných dat má

použití kultivovaných BM-MSCs ve srovnání s implantací autologními chondrocyty (ACI) podobné nebo i lepší výsledky (Migliorini et al. 2022). Jiná randomizovaná klinická studie s použitím matrix indukovaných BM-MSCs a ACI prokázala po 2letém sledování významně lepší funkční výsledky ve skupině BM-MSCs v hodnocení KOOS, VAS a Lysholmova skóre (Akgun et al. 2015). V literatuře jsou zatím ojedinělé publikace, které by hodnotily dlouhodobé výsledky léčby pomocí kultivovaných MSCs (Shigeyuki Wakitani et al. 2011; Teo et al. 2019). Teo et al. (Teo et al. 2019) popsal srovnání dvou kohort, každou z 36 pacienty léčených BM-MSCs (podanými v rámci periostálního krytí aplikovaných buněk) nebo p-ACI a jejich sledování po dobu 10 let. Oba přístupy se ukázaly být stejně účinné. Naproti tomu lze častěji najít publikace hodnotící výsledky léčby pomocí autologních chondrocytů, které popisují velmi dobré výsledky i v dlouhodobém sledování 10-20 let od implantace (Lars Peterson et al. 2010; Ogura et al. 2017). Tento fakt je z mého pohledu spíše spojen s historickým vývojem buněčné terapie.

Bezpečnost implantovaných kultivovaných MSCs je stále skloňovaným problémem, zejména kvůli jejich předpokládanému tumorigennímu potenciálu po dlouhodobé kultivaci (Røslund et al. 2009). Avšak většina léčivých přípravků na bázi MSCs používá k terapii buňky po dvou až čtyřech pasážích. Tím tento argument ztrácí na podstatě. Několik studií s dlouhodobým sledováním prokázalo bezpečnost aplikace kultivovaných MSCs, včetně faktu, že dosud nebyl v žádném sledovaném souboru zaznamenán výskyt rakoviny související s tímto typem léčby (Teo et al. 2019; Shigeyuki Wakitani et al. 2011).

Jednou z výhod BM-MSCs ve srovnání s ACI je také parakrinní aktivita buněk. Uvádí se, že sekretom MSCs přispívá k reparaci chrupavky a vytváří mikroprostředí kolem místa poškození, které podporuje nábor endogenních progenitorových buněk (Fahy, Alini, and Stoddart 2018). Dalším přínosem MSCs terapie oproti ACI je možnost účinné kultivace MSCs získaných i od starších pacientů nad 45-50 let věku (James A. Martin and Buckwalter 2003). Tento aspekt je z mého pohledu rozhodující výhodou pro pacienty indikované k buněčné regenerační terapii. Izolace a kultivace MSCs z kostní dřeně je technicky jednodušší než zpracování autologních chondrocytů, které je také spojeno se zvýšenou morbiditou dárcovského místa a nižší proliferací aktivitou chondrocytů u pacientů ve vyšším věku (Dozin et al. 2005; L. Stefan Lohmander et al. 2007).

## 10.7 Závěr klinické práce

Klinická práce prokazuje, že aplikace kultivovaných kmenových buněk z kostní dřeně, BiCure® orthoMSCp, je bezpečná v krátkodobém sledování 1 roku od operace. Popsaný chirurgický zákrok včetně manipulace s HLP je reprodukovatelný a opakovatelný bez zaznamenaných komplikací při stanovené metodice. Práce prokazuje efektivní primární i sekundární fixaci integraci implantátu *in situ* pomocí použitého autologního fibrinu a tkáňového lepidla. Získaná sledovaná dotazníková a klinická data prokazují účinnost HLP (kultivovaných kmenových buněk z kostní dřeně, BiCure® orthoMSCp) v terapii fokálního chrupavčitého defektu kolenního kloubu v hodnoceném časovém období 1 roku.

## 11 Souhrn

Disertační práce ve své experimentální i klinické části prokazatelně potvrzuje bezpečnost odběru a manipulace získaných mesenchymálních buněk z aspirátu kostní dřene s cílem přípravy a aplikace prostředku moderní buněčné terapie v léčbě fokálního chrupavčitého defektu kolenního kloubu.

Získané výsledky experimentální studie opravňují k tvrzení, že výhodnějším zdrojem MNCs respektive kultivace MSCs je aspirát kostní dřene z pánevní kosti. V případě využití alternativních zdrojů je odběr a následná kultivace MSCs možná i z aspirátu kostní dřene z proximální části tibie, a to bez signifikantní změny kvalitativních vlastností výsledného buněčného transplantátu.

Vzhledem k získaným závěrům a zkušenostem z experimentální části byla sestavena klinická monocentrická studie, která primárně hodnotila bezpečnost aplikace kultivovaných kmenových buněk z kostní dřene v místě fokálního chrupavčitého defektu kolenního kloubu u sledovaných pacientů. Sekundárním cílem práce bylo zhodnotit klinický efekt implantace nového léčebného přípravku moderní buněčné terapie, BiCure® orthoMSCp, v kombinaci s jeho aplikací na komerčně dostupný nosič Chondrotissue®.

Klinická studie u 6 pacientů prokázala bezpečnost aplikovaných kultivovaných kmenových buněk z kostní dřene s velmi dobrou primární i sekundární stabilitou implantátu, která byla hodnocena po 1 roce pomocí MRI vyšetření. Klinická studie dále prokázala reprodukovatelnost jak operačního postupu, tak manipulace s léčivým přípravkem moderní buněčné terapie na operačním sále. Získaná data z hodnotících dotazníkových šetření a klinických vyšetření sledovaných pacientů prokazují zlepšení funkce kolenního kloubu po 1 roce od operace a snížení bolesti u všech sledovaných pacientů.

Autor si je vědom faktu, že je nutné další sledování pacientů a rozsáhlejší klinický výzkum v této oblasti k získání robustnějších dat. Práce podporuje další výzkum v oblasti moderní buněčné terapie se zaměřením na implantaci kultivovaných kmenových buněk z kostní dřene v léčbě ohraničeného chrupavčitého defektu kolenního kloubu. Získané výsledky byly konkrétně využity k úspěšné žádosti o další fázi klinického hodnocení HLP BiCure® orthoMSCp, která v současné době probíhá v několika studijních centrech v České republice.

## 12 Summary

The experimental and clinical part of the dissertation proves the safety of collection and manipulation of mesenchymal cells obtained from bone marrow aspirate (BM-MSCs) with the aim of preparing and applying an advanced cell therapy medicinal product in the treatment of focal cartilage defects of the knee joint.

The results of the experimental study justify the claim that bone marrow aspirate from the pelvic bone is a more convenient source for obtaining mononuclear cells (MNCs) or MSCs cultivation. In the case of using alternative sources, the collection and subsequent cultivation of MSCs is also possible from bone marrow aspirate from the proximal part of the tibia, without significantly changing the qualitative properties of the resulting cell transplant.

In view of the findings and experience gained from the experimental part, a clinical monocentric study was designed, which primarily evaluated the safety of the application of cultured stem cells from bone marrow at the site of a focal cartilaginous defect of the knee joint in the studied patients. The secondary objective of the study was to evaluate the clinical effect of implantation of a novel advanced cell therapy medicinal product, BiCure® orthoMSCp, applied in combination with a commercially available Chondrotissue® scaffold.

The clinical study in 6 patients demonstrated the safety of the applied cultured BM-MSCs with very good primary and secondary implant stability, which was evaluated after 1 year by MRI scanning. The clinical study further demonstrated the reproducibility of both the surgical procedure and the handling of the advanced cell therapy medicinal product in the operating room. The data obtained from evaluation questionnaires and clinical examinations of the monitored patients demonstrated an improvement in the function of the knee joint 1 year after the operation and painreduction in all monitored patients.

The author is aware of the fact that further follow-up of patients and more extensive clinical research in this area is necessary to obtain more robust data. This work supports further research in the field of advanced cell therapy with a focus on the implantation of cultured BM-MSCs in the treatment of focal cartilage defects of the knee joint. The results obtained were specifically used for the successful application for the next phase of the BiCure® orthoMSCp clinical trial, which is currently ongoing at several study centers in the Czech Republic.

## 13 Literatura

- Afizah, Hassan, Zheng Yang, James H.P. Hui, Hong Wei Ouyang, and Eng Hin Lee. 2007. "A Comparison between the Chondrogenic Potential of Human Bone Marrow Stem Cells (BMSCs) and Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) Taken from the Same Donors." *Tissue Engineering* 13 (4): 659–66. <https://doi.org/10.1089/TEN.2006.0118>.
- Akgun, Isık, Mehmet C. Unlu, Ozan A. Erdal, Tahir Ogut, Murat Erturk, Ercument Ovali, Fatih Kantarci, Gurkan Caliskan, and Yamac Akgun. 2015. "Matrix-Induced Autologous Mesenchymal Stem Cell Implantation versus Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation in the Treatment of Chondral Defects of the Knee: A 2-Year Randomized Study." *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 135 (2): 251–63. <https://doi.org/10.1007/S00402-014-2136-Z>.
- Akizuki, Shaw, Van C. Mow, Francisco Muller, Julio C. Pita, and David S. Howell. 1987. "Tensile Properties of Human Knee Joint Cartilage. II. Correlations between Weight Bearing and Tissue Pathology and the Kinetics of Swelling." *Journal of Orthopaedic Research* 5 (2): 173–86. <https://doi.org/10.1002/jor.1100050204>.
- Akizuki, Shaw, Van C. Mow, Francisco Müller, Julio C. Pita, David S. Howell, and Daniel H. Manicourt. 1986. "Tensile Properties of Human Knee Joint Cartilage: I. Influence of Ionic Conditions, Weight Bearing, and Fibrillation on the Tensile Modulus." *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 4 (4): 379–92. <https://doi.org/10.1002/JOR.1100040401>.
- Al-Maslamani, Noor A., Rachel Oldershaw, Simon Tew, Jude Curran, Pieter D’Hooghe, Kazuhiro Yamamoto, and Henning F. Horn. 2022. "Chondrocyte De-Differentiation: Biophysical Cues to Nuclear Alterations." *Cells* 11 (24). <https://doi.org/10.3390/cells11244011>.
- Alford, J. Winslow, and Brian J. Cole. 2005. "Cartilage Restoration, Part 1: Basic Science, Historical Perspective, Patient Evaluation, and Treatment Options." *The American Journal of Sports Medicine* 33 (2): 295–306. <https://doi.org/10.1177/0363546504273510>.
- Alfredson, Håkan, and Ronny Lorentzon. 1999. "Superior Results with Continuous Passive Motion Compared to Active Motion after Periosteal Transplantation. A Retrospective

- Study of Human Patella Cartilage Defect Treatment.” *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy: Official Journal of the ESSKA* 7 (4): 232–38. <https://doi.org/10.1007/S001670050154>.
- Altschuler, Nir, Kenneth R. Zaslav, Berardo Di Matteo, Seth L. Sherman, Andreas H. Gomoll, Scott A. Hacker, Peter Verdonk, et al. 2023. “Aragonite-Based Scaffold Versus Microfracture and Debridement for the Treatment of Knee Chondral and Osteochondral Lesions: Results of a Multicenter Randomized Controlled Trial.” *The American Journal of Sports Medicine* 51 (4). <https://doi.org/10.1177/03635465231151252>.
- Andriacchi, T. P. 1994. “Dynamics of Knee Malalignment.” *The Orthopedic Clinics of North America* 25 (3): 395–403. [https://doi.org/10.1016/s0030-5898\(20\)31924-6](https://doi.org/10.1016/s0030-5898(20)31924-6).
- Andriacchi, Thomas P., and Chris O. Dyrby. 2005. “Interactions between Kinematics and Loading during Walking for the Normal and ACL Deficient Knee.” *Journal of Biomechanics* 38 (2): 293–98. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2004.02.010>.
- Ateshian, Gerard A. 2009. “The Role of Interstitial Fluid Pressurization in Articular Cartilage Lubrication.” *Journal of Biomechanics* 42 (9): 1163. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOMECH.2009.04.040>.
- Aydelotte, Margaret B., Robert R. Greenhill, and Klaus E. Kuettner. 1988. “Differences between Sub-Populations of Cultured Bovine Articular Chondrocytes. II. Proteoglycan Metabolism.” *Connective Tissue Research* 18 (3): 223–34. <https://doi.org/10.3109/03008208809016809>.
- Aydelotte, Margaret B., and Klaus E. Kuettner. 1988. “Differences between Sub-Populations of Cultured Bovine Articular Chondrocytes. I. Morphology and Cartilage Matrix Production.” *Connective Tissue Research* 18 (3): 205–22. <https://doi.org/10.3109/03008208809016808>.
- B, Johnstone, Alini M, Cucchiarini M, Dodge GR, Eglin D, Guilak F, Madry H, et al. 2013. “Tissue Engineering for Articular Cartilage Repair--the State of the Art.” *European Cells & Materials* 25 (May): 248–67. <https://doi.org/10.22203/ECM.V025A18>.
- Baltzer, Axel W.A., and Juergen P. Arnold. 2005. “Bone-Cartilage Transplantation from the Ipsilateral Knee for Chondral Lesions of the Talus.” *Arthroscopy - Journal of*

*Arthroscopic and Related Surgery* 21 (2): 159–66.  
<https://doi.org/10.1016/j.arthro.2004.10.021>.

Bartoniček, Jan. 2010. “Early History of Operative Treatment of Fractures.” *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 130 (11): 1385–96. <https://doi.org/10.1007/S00402-010-1082-7/METRICS>.

Bashir, A., M. L. Gray, J. Hartke, and Deborah Burstein. 1999. “Nondestructive Imaging of Human Cartilage Glycosaminoglycan Concentration by MRI.” *Magnetic Resonance in Medicine* 41 (5): 857–65. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1522-2594\(199905\)41:5<857::aid-mrm1>3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/(sici)1522-2594(199905)41:5<857::aid-mrm1>3.0.co;2-e).

Baxter, Melissa A., Robert F. Wynn, Simon N. Jowitt, J. Ed Wraith, Leslie J. Fairbairn, and Ilaria Bellantuono. 2004. “Study of Telomere Length Reveals Rapid Aging of Human Marrow Stromal Cells Following in Vitro Expansion.” *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 22 (5): 675–82. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.22-5-675>.

Beane, Olivia S., and Eric M. Darling. 2012. “Isolation, Characterization, and Differentiation of Stem Cells for Cartilage Regeneration.” *Annals of Biomedical Engineering* 40 (10): 2079–97. <https://doi.org/10.1007/S10439-012-0639-8>.

Beitzel, Knut, Mary Beth R. McCarthy, Mark P. Cote, Thomas J.S. Durant, David M. Chowaniec, Olga Solovyova, Ryan P. Russell, Robert A. Arciero, and Augustus D. Mazzocca. 2013. “Comparison of Mesenchymal Stem Cells (Osteoprogenitors) Harvested from Proximal Humerus and Distal Femur during Arthroscopic Surgery.” *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery: Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 29 (2): 301–8. <https://doi.org/10.1016/J.ARTHRO.2012.08.021>.

Benninghoff, A. 1925. “Form Und Bau Der Gelenkknorpel in Ihren Beziehung Zur Funktion.” *DeutscheZeitschrift Für Chirurgie* 81: 446.

Brittberg, Mats, Anders Lindahl, Anders Nilsson, Claes Ohlsson, Olle Isaksson, and Lars Peterson. 1994. “Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation.” *The New England Journal of Medicine* 331 (14): 889–95. <https://doi.org/10.1056/NEJM199410063311401>.

Browning, Raymond C., and Rodger Kram. 2007. “Effects of Obesity on the Biomechanics



- of Walking at Different Speeds.” *Medicine and Science in Sports and Exercise* 39 (9): 1632–41. <https://doi.org/10.1249/MSS.0B013E318076B54B>.
- Buckwalter, J. A., and H. J. Mankin. 1998. “Articular Cartilage: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions.” *Instructional Course Lectures* 47: 477–86. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9571449/>.
- Buckwalter, Joseph A. 1998. “Articular Cartilage: Injuries and Potential for Healing.” *The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy* 28 (4): 192–202. <https://doi.org/10.2519/JOSPT.1998.28.4.192>.
- Buckwalter, Joseph A., Henry J. Mankin, and Alan J. Grodzinsky. 2005. “Articular Cartilage and Osteoarthritis.” *Instructional Course Lectures* 54: 465–80. <https://doi.org/10.1136/ard.51.9.1028-a>.
- Burr, David B., and Maxime A. Gallant. 2012. “Bone Remodelling in Osteoarthritis.” *Nature Reviews. Rheumatology* 8 (11): 665–73. <https://doi.org/10.1038/NRRHEUM.2012.130>.
- Cahill, Bernard. 1995. “Osteochondritis Dissecans of the Knee: Treatment of Juvenile and Adult Forms.” *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 3 (4): 237–47. <https://doi.org/10.5435/00124635-199507000-00006>.
- Campbell, Kirk A., Brandon J. Erickson, Bryan M. Saltzman, Randy Mascarenhas, Bernard R. Bach, Brian J. Cole, and Nikhil N. Verma. 2015. “Is Local Viscosupplementation Injection Clinically Superior to Other Therapies in the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review of Overlapping Meta-Analyses.” *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery: Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 31 (10): 2036-2045.e14. <https://doi.org/10.1016/J.ARTHRO.2015.03.030>.
- Campbell, Kirk A., Bryan M. Saltzman, Randy Mascarenhas, M. Michael Khair, Nikhil N. Verma, Bernard R. Bach, and Brian J. Cole. 2015. “Does Intra-Articular Platelet-Rich Plasma Injection Provide Clinically Superior Outcomes Compared with Other Therapies in the Treatment of Knee Osteoarthritis? A Systematic Review of Overlapping Meta-Analyses.” *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 31 (11): 2213–21. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2015.03.041>.

- Caplan, A.I., M. Elyaderany, Y. Mochizuki, and S. Wakitani. 1997. "Principles of Cartilage Repair and Regeneration - PubMed." *Clin Orthop Relat. Res.* September 1997. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9308548/>.
- Caplan, Arnold I., and Diego Correa. 2011. "The MSC: An Injury Drugstore." *Cell Stem Cell* 9 (1): 11–15. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2011.06.008>.
- Caplan, Arnold I., and James E. Dennis. 2006. "Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators." *Journal of Cellular Biochemistry* 98 (5): 1076–84. <https://doi.org/10.1002/JCB.20886>.
- Cavallo, Carola, Angelo Boffa, Laura de Girolamo, Giulia Merli, Elizaveta Kon, Luca Cattini, Emma Santo, Brunella Grigolo, and Giuseppe Filardo. 2022. "Bone Marrow Aspirate Concentrate Quality Is Affected by Age and Harvest Site." *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy: Official Journal of the ESSKA*, September. <https://doi.org/10.1007/s00167-022-07153-6>.
- Chen, Wei Hong, Ming Tang Lai, Alexander T.H. Wu, Chia Che Wu, Juri G. Gelovani, Che Tong Lin, Shih Chieh Hung, Wen Ta Chiu, and Win Ping Deng. 2009. "In Vitro Stage-Specific Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells Committed to Chondrocytes." *Arthritis and Rheumatism* 60 (2): 450–59. <https://doi.org/10.1002/ART.24265>.
- Chesterman, P, and A Smith. 1968. "Homotransplantation of Articular Cartilage and Isolated Chondrocytes. An Experimental Study in Rabbits - PubMed." *Joint Bone Joint Surgery Britain* . 1968. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4295962/>.
- Cheung, Herman S., Kenneth L. Lynch, Roger P. Johnson, and Bruce J. Brewer. 1980. "In Vitro Synthesis of Tissue-Specific Type II Collagen by Healing Cartilage. I. Short-Term Repair of Cartilage by Mature Rabbits." *Arthritis and Rheumatism* 23 (2): 211–19. <https://doi.org/10.1002/ART.1780230212>.
- Choi, Jae Bong, Inchan Youn, Li Cao, Holly A. Leddy, Christopher L. Gilchrist, Lori A. Setton, and Farshid Guilak. 2007. "Zonal Changes in the Three-Dimensional Morphology of the Chondron under Compression: The Relationship among Cellular, Pericellular, and Extracellular Deformation in Articular Cartilage." *Journal of Biomechanics* 40 (12): 2596–2603. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOMECH.2007.01.009>.

- Christensen, Robin, Else Marie Bartels, Arne Astrup, and Henning Bliddal. 2007. "Effect of Weight Reduction in Obese Patients Diagnosed with Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Annals of the Rheumatic Diseases* 66 (4): 433–39. <https://doi.org/10.1136/ARD.2006.065904>.
- Clark, J M. 1990. "The Organisation of Collagen Fibrils in the Superficial Zones of Articular Cartilage." *Journal of Anatomy* 171 (August): 117–30. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2081698/>.
- Collins, Natalie J., Devyani Misra, David T. Felson, Kay M. Crossley, and Ewa M. Roos. 2011. "Measures of Knee Function: International Knee Documentation Committee (IKDC) Subjective Knee Evaluation Form, Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS), Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score Physical Function Short Form (KOOS-PS), Knee Ou." *Arthritis Care and Research* 63 (SUPPL. 11). <https://doi.org/10.1002/acr.20632>.
- Combe, Bernard, Robert Landewe, Claire I. Daien, Charlotte Hua, Daniel Aletaha, Jose María Álvaro-Gracia, Margôt Bakkers, et al. 2017. "2016 Update of the EULAR Recommendations for the Management of Early Arthritis." *Annals of the Rheumatic Diseases* 76 (6): 948–59. <https://doi.org/10.1136/ANNRHEUMDIS-2016-210602>.
- Cooper, Trenton, Aaron Boyles, Walter P. Samora, and Kevin E. Klingele. 2015. "Prevalence of Bilateral JOCD of the Knee and Associated Risk Factors." *Journal of Pediatric Orthopedics* 35 (5): 507–10. <https://doi.org/10.1097/BPO.0000000000000323>.
- Cruz, Aristides I., Kevin G. Shea, and Theodore J. Ganley. 2016. "Pediatric Knee Osteochondritis Dissecans Lesions." *Orthopedic Clinics of North America* 47 (4): 763–75.
- Daniels, K., and M. Solursh. 1991. "Modulation of Chondrogenesis by the Cytoskeleton and Extracellular Matrix." *Journal of Cell Science* 100 ( Pt 2) (2): 249–54. <https://doi.org/10.1242/JCS.100.2.249>.
- Darling, Eric M., Jerry C.Y. Hu, and Kyriacos A. Athanasiou. 2004. "Zonal and Topographical Differences in Articular Cartilage Gene Expression." *Journal of Orthopaedic Research* 22 (6): 1182–87. <https://doi.org/10.1016/j.orthres.2004.03.001>.

- Delft, Myrthe A.M. van, and Tom W.J. Huizinga. 2020. "An Overview of Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis." *Journal of Autoimmunity* 110 (June). <https://doi.org/10.1016/J.JAUT.2019.102392>.
- DePalma, A., F., and C.,D. McKeever. 1966. "Process of Repair of Articular Cartilage Demonstrated by Histology and Autoradiography with Tritiated Thymidine - PubMed." *Clin Orthop Relat Res.* 1966. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5334343/>.
- Deshmukh, K., and M. E. Nimni. 1973. "Isolation and Characterization of Cyanogen Bromide Peptides from the Collagen of Bovine Articular Cartilage." *The Biochemical Journal* 133 (4): 615–22. <https://doi.org/10.1042/BJ1330615>.
- Desmoineaux, Pierre, Yacine Carlier, Pierre Mansat, Rémy Bleton, Dominique M. Rouleau, and Fabrice Duparc. 2019. "Arthroscopic Treatment of Elbow Osteoarthritis." *Orthopaedics & Traumatology, Surgery & Research: OTSR* 105 (8S): S235–40. <https://doi.org/10.1016/J.OTSR.2019.09.003>.
- Dhollander, Aad A.M., Peter C.M. Verdonk, Stijn Lambrecht, René Verdonk, Dirk Elewaut, Gust Verbruggen, and Karl Fredrik Almqvist. 2012. "Midterm Results of the Treatment of Cartilage Defects in the Knee Using Alginate Beads Containing Human Mature Allogenic Chondrocytes." *American Journal of Sports Medicine* 40 (1): 75–82. <https://doi.org/10.1177/0363546511423013>.
- DiBartola, Alex C., Joshua S. Everhart, Robert A. Magnussen, James L. Carey, Robert H. Brophy, Laura C. Schmitt, and David C. Flanigan. 2016. "Correlation between Histological Outcome and Surgical Cartilage Repair Technique in the Knee: A Meta-Analysis." *The Knee* 23 (3): 344–49. <https://doi.org/10.1016/J.KNEE.2016.01.017>.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C C. Marini, D.S. S. Krause, R.J. J. Deans, A. Keating, D.J. J. Prockop, and E.M. M. Horwitz. 2006a. "Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement." *Cytotherapy* 8 (4): 315–17. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C Marini, D.S. Krause, R.J. Deans, A. Keating, D.J. Prockop, and E.M. Horwitz. 2006b. "Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement." *Cytotherapy* 8 (4): 315–17.

<https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.

- Dorotka, R., U. Windberger, K. Macfelda, U. Bindreiter, C. Toma, and S. Nehrer. 2005. "Repair of Articular Cartilage Defects Treated by Microfracture and a Three-Dimensional Collagen Matrix." *Biomaterials* 26 (17): 3617–29. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.034>.
- Dozin, Beatrice, Mara Malpeli, Ranieri Cancedda, Paolo Bruzzi, Silvano Calcagno, Luigi Molfetta, Ferdinando Priano, Elisaveta Kon, and Maurilio Marcacci. 2005. "Comparative Evaluation of Autologous Chondrocyte Implantation and Mosaicplasty: A Multicentered Randomized Clinical Trial." *Clinical Journal of Sport Medicine : Official Journal of the Canadian Academy of Sport Medicine* 15 (4): 220–26. <https://doi.org/10.1097/01.JSM.0000171882.66432.80>.
- DURRANT, L. A., C. W. ARCHER, M. BENJAMIN, and J. R. RALPHS. 1999. "Organisation of the Chondrocyte Cytoskeleton and Its Response to Changing Mechanical Conditions in Organ Culture." *Journal of Anatomy* 194 ( Pt 3) (Pt 3): 343–53. <https://doi.org/10.1046/J.1469-7580.1999.19430343.X>.
- Dwyer, Tim, C. Ryan Martin, Rita Kendra, Corey Sermer, Jaskarndip Chahal, Darrell Ogilvie-Harris, Daniel Whelan, Lucas Murnaghan, Aaron Nauth, and John Theodoropoulos. 2017. "Reliability and Validity of the Arthroscopic International Cartilage Repair Society Classification System: Correlation With Histological Assessment of Depth." *Arthroscopy : The Journal of Arthroscopic & Related Surgery : Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 33 (6): 1219–24. <https://doi.org/10.1016/J.ARTHRO.2016.12.012>.
- Ehmann, Yannick J., Thekla Esser, Amr Seyam, Marco Christopher Rupp, Julian Mehl, Sebastian Siebenlist, Andreas B. Imhoff, and Philipp Minzlaff. 2023. "Low Postoperative Complication Rate with High Survival Rate and Good Clinical Outcome 9 Years after Autologous Chondrocyte Transplantation of the Knee Joint." *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 143 (5): 2665–74. <https://doi.org/10.1007/S00402-022-04611-1>.
- Eismann, Emily A., Robert J. Pettit, Eric J. Wall, and Gregory D. Myer. 2014. "Management Strategies for Osteochondritis Dissecans of the Knee in the Skeletally Immature

- Athlete.” *Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy*. Movement Science Media. <https://doi.org/10.2519/jospt.2014.5140>.
- Elisseeff, Jennifer, Kristi Anseth, Derek Sims, Winnette McIntosh, Mark Randolph, Michael Yaremchuk, and Robert Langer. 1999. “Transdermal Photopolymerization of Poly(Ethylene Oxide)-Based Injectable Hydrogels for Tissue-Engineered Cartilage.” *Plastic and Reconstructive Surgery* 104 (4): 1014–22. <https://doi.org/10.1097/00006534-199909040-00017>.
- Enea, Davide, Stefano Cecconi, Alberto Busilacchi, Sandra Manzotti, Rosaria Gesuita, and Antonio Gigante. 2012. “Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation (MACI) in the Knee.” *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy: Official Journal of the ESSKA* 20 (5): 862–69. <https://doi.org/10.1007/S00167-011-1639-1>.
- Erggelet, Christoph, Michaela Endres, Katja Neumann, Lars Morawietz, Jochen Ringe, Kathrin Haberstroh, Michael Sittinger, and Christian Kaps. 2009. “Formation of Cartilage Repair Tissue in Articular Cartilage Defects Pretreated with Microfracture and Covered with Cell-Free Polymer-Based Implants.” *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 27 (10): 1353–60. <https://doi.org/10.1002/JOR.20879>.
- Erickson, Geoffrey R., Jeffrey M. Gimble, Dawn M. Franklin, Henry E. Rice, Hani Awad, and Farshid Guilak. 2002. “Chondrogenic Potential of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells in Vitro and in Vivo.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290 (2): 763–69. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6270>.
- Fahy, Niamh, Mauro Alini, and Martin J. Stoddart. 2018. “Mechanical Stimulation of Mesenchymal Stem Cells: Implications for Cartilage Tissue Engineering.” *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 36 (1): 52–63. <https://doi.org/10.1002/JOR.23670>.
- Farr, Jack, Brian J. Cole, Seth Sherman, and Vasili Karas. 2012. “Particulated Articular Cartilage: CAIS and DeNovo NT.” *The Journal of Knee Surgery* 25 (1): 23–29. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1299652>.
- Fok, August W.M., and W. P. Yau. 2013. “Delay in ACL Reconstruction Is Associated with More Severe and Painful Meniscal and Chondral Injuries.” *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy: Official Journal of the ESSKA* 21 (4): 928–33.

<https://doi.org/10.1007/S00167-012-2027-1>.

- Fortier, Lisa A., Hollis G. Potter, Ellen J. Rickey, Lauren V. Schnabel, Li Foong Foo, Leroy R. Chong, Tracy Stokol, Jon Cheetham, and Alan J. Nixon. 2010. "Concentrated Bone Marrow Aspirate Improves Full-Thickness Cartilage Repair Compared with Microfracture in the Equine Model." *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 92 (10): 1927–37. <https://doi.org/10.2106/JBJS.I.01284>.
- Franceschi, Luciana De, Brunella Grigolo, Livia Roseti, Andrea Facchini, Milena Fini, Gianluca Giavaresi, Matilde Tschon, and Roberto Giardino. 2005. "Transplantation of Chondrocytes Seeded on Collagen-Based Scaffold in Cartilage Defects in Rabbits." *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 75 (3): 612–22. <https://doi.org/10.1002/JBM.A.30471>.
- Frost, H M. 1990. "Skeletal Structural Adaptations to Mechanical Usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's Law: The Remodeling Problem." *The Anatomical Record* 226 (4): 414–22. <https://doi.org/10.1002/ar.1092260403>.
- Furukawa, T., D. R. Eyre, S. Koide, and M. J. Glimcher. 1980. "Biochemical Studies on Repair Cartilage Resurfacing Experimental Defects in the Rabbit Knee." *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 62 (1): 79–89. <https://doi.org/10.2106/00004623-198062010-00012>.
- Gao, Liang, Patrick Orth, Magali Cucchiari, and Henning Madry. 2019. "Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis: A Systematic Review of the Clinical Evidence." *The American Journal of Sports Medicine* 47 (1): 222–31. <https://doi.org/10.1177/0363546517740575>.
- Garriga, Cesar, Maria T. Sánchez-Santos, Andrew Judge, Deborah Hart, Tim Spector, Cyrus Cooper, and Nigel K. Arden. 2020. "Predicting Incident Radiographic Knee Osteoarthritis in Middle-Aged Women Within Four Years: The Importance of Knee-Level Prognostic Factors." *Arthritis Care & Research* 72 (1): 88–97. <https://doi.org/10.1002/ACR.23932>.
- Ghadially, J. A., R. Ghadially, and F. N. Ghadially. 1977. "Long-Term Results of Deep Defects in Articular Cartilage. A Scanning Electron Microscope Study." *Virchows Archiv. B, Cell Pathology* 25 (2): 125–36. <https://doi.org/10.1007/BF02889427>.

- Giannini, Sandro, Roberto Buda, Francesca Vannini, Marco Cavallo, and Brunella Grigolo. 2009. "One-Step Bone Marrow-Derived Cell Transplantation in Talar Osteochondral Lesions." *Clinical Orthopaedics and Related Research* 467 (12): 3307–20. <https://doi.org/10.1007/S11999-009-0885-8>.
- Giannoni, Paolo, A. Pagano, E. Maggi, R. Arbicò, N. Randazzo, M. Grandizio, R. Cancedda, and B. Dozin. 2005. "Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) for Aged Patients: Development of the Proper Cell Expansion Conditions for Possible Therapeutic Applications." *Osteoarthritis and Cartilage* 13 (7): 589–600. <https://doi.org/10.1016/J.JOCA.2005.02.015>.
- Gilbert, Sophie Jane, Cleo Selina Bonnet, and Emma Jane Blain. 2021. "Mechanical Cues: Bidirectional Reciprocity in the Extracellular Matrix Drives Mechano-Signalling in Articular Cartilage." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (24). <https://doi.org/10.3390/IJMS222413595>.
- Gnecchi, Massimiliano, Zhiping Zhang, Aiguo Ni, and Victor J. Dzau. 2008. "Paracrine Mechanisms in Adult Stem Cell Signaling and Therapy." *Circulation Research* 103 (11): 1204–19. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.176826>.
- Gobbi, Alberto, Georgios Karnatzikos, Celeste Scotti, Vivek Mahajan, Laura Mazzucco, and Brunella Grigolo. 2011. "One-Step Cartilage Repair with Bone Marrow Aspirate Concentrated Cells and Collagen Matrix in Full-Thickness Knee Cartilage Lesions: Results at 2-Year Follow-Up." *Cartilage* 2 (3): 286–99. <https://doi.org/10.1177/1947603510392023>.
- Gomez, Pablo F., and Jose A. Morcuende. 2005. "Early Attempts at Hip Arthroplasty: 1700s to 1950s." *The Iowa Orthopaedic Journal* 25: 25. [/pmc/articles/PMC1888777/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1888777/).
- Gross, A.E., and N.H. McKee. 1983. "Reconstruction of Skeletal Deficits at the Knee. A Comprehensive Osteochondral Transplant Program - PubMed." *Clin Orthop Relat Res*. 1983. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6339146/>.
- Guilak, Farshid, and Van C. Mow. 2000. "The Mechanical Environment of the Chondrocyte: A Biphase Finite Element Model of Cell-Matrix Interactions in Articular Cartilage." *Journal of Biomechanics* 33 (12): 1663–73. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(00\)00105-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(00)00105-6).



- HANDL, M., T. TRČ, M. HANUS, E. ŠŤASTNÝ, M. FRICOVÁ-POULOVÁ, J. NEUWIRTH, J. ADLER, D. HAVRANOVÁ, and F. VARGA. 2007. “Transplantace Kultivovaných Autologních Chondrocytů Hlezenného Kloubu.” *Http://Achet.Cz/Doi/10.55095/Achet2007/004.Html* 74 (1): 29–36. <https://doi.org/10.55095/ACHOT2007/004>.
- Hangody, László, and Péter Füles. 2003. “Autologous Osteochondral Mosaicplasty for the Treatment of Full-Thickness Defects of Weight-Bearing Joints: Ten Years of Experimental and Clinical Experience.” *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 85-A Suppl 2 (SUPPL. 1): 25–32. <https://doi.org/10.2106/00004623-200300002-00004>.
- Hangody, László, Gábor K. Ráthonyi, Zsófia Duska, Gábor Vásárhelyi, Péter Füles, and László Módis. 2004. “Autologous Osteochondral Mosaicplasty.” *Journal of Bone and Joint Surgery* 86 (SUPPL. 1): 65–72. <https://doi.org/10.2106/00004623-200400001-00009>.
- Hangody, László, Gábor Vásárhelyi, László Rudolf Hangody, Zita Sükösd, György Tibay, Lajos Bartha, and Gábor Bodó. 2008. “Autologous Osteochondral Grafting-Technique and Long-Term Results.” *Injury* 39 (1 SUPPL.): 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2008.01.041>.
- Hardingham, Tim, and Michael Bayliss. 1990. “Proteoglycans of Articular Cartilage: Changes in Aging and in Joint Disease.” *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 20 (3 Suppl 1): 12–33. [https://doi.org/10.1016/0049-0172\(90\)90044-G](https://doi.org/10.1016/0049-0172(90)90044-G).
- Hashimoto, Yusuke, Yohei Nishida, Shinji Takahashi, Hiroaki Nakamura, Hisashi Mera, Kaori Kashiwa, Shinichi Yoshiya, et al. 2019a. “Transplantation of Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells under Arthroscopic Surgery with Microfracture versus Microfracture Alone for Articular Cartilage Lesions in the Knee: A Multicenter Prospective Randomized Control Clinical Trial.” *Regenerative Therapy* 11 (December): 106–13. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.06.002>.
- . 2019b. “Transplantation of Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells under Arthroscopic Surgery with Microfracture versus Microfracture Alone for Articular Cartilage Lesions in the Knee: A Multicenter Prospective Randomized Control Clinical Trial.” *Regenerative Therapy* 11 (December): 106–13.

<https://doi.org/10.1016/J.RETH.2019.06.002>.

Haudenschild, Dominik R., Jianfen Chen, Nina Pang, Nikolai Steklov, Shawn P. Grogan, Martin K. Lotz, and Darryl D. D’Lima. 2011. “Vimentin Contributes to Changes in Chondrocyte Stiffness in Osteoarthritis.” *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 29 (1): 20–25. <https://doi.org/10.1002/JOR.21198>.

Havlas, V., P. Kos, P. Jendelová, P. Lesný, T. Trč, and E. Syková. 2011. “[Comparison of Chondrogenic Differentiation of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells with Cultured Chondrocytes and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells].” *Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Cechoslovaca* 78 (2): 138–44. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21575557/>.

Havlas, Vojtěch. 2011. “Možnosti Léčby Defektů Hyalinní Kloubní Chrupavky .” *Habilitační Práce, Universita Karlova v Praze*.

Havlas, Vojtěch, J Kotaška, P Koníček, and T Trč. 2015. “[Use of Cultured Human Autologous Bone Marrow Stem Cells in Repair of a Rotator Cuff Tear: Preliminary Results of a Safety Study] - PubMed.” *Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologica Cechoslovaca*. March 2015. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26317295/>.

Hayes, W. C., and L. F. Mockros. 1971. “Viscoelastic Properties of Human Articular Cartilage.” *Journal of Applied Physiology* 31 (4): 562–68. <https://doi.org/10.1152/JAPPL.1971.31.4.562>.

He, C. P., C. Chen, X. C. Jiang, H. Li, L. X. Zhu, P. X. Wang, and T. Xiao. 2022. “The Role of AGEs in Pathogenesis of Cartilage Destruction in Osteoarthritis.” *Bone & Joint Research* 11 (5): 292. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.115.BJR-2021-0334.R1>.

Healy, Zachary R., Norman H. Lee, Xiangqun Gao, Mary B. Goldring, Paul Talalay, Thomas W. Kensler, and Konstantinos Konstantopoulos. 2005. “Divergent Responses of Chondrocytes and Endothelial Cells to Shear Stress: Cross-Talk among COX-2, the Phase 2 Response, and Apoptosis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (39): 14010–15. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0506620102>.

- Hernigou, Philippe, A. Poignard, O. Manicom, G. Mathieu, and H. Rourd. 2005. "The Use of Percutaneous Autologous Bone Marrow Transplantation in Nonunion and Avascular Necrosis of Bone." *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 87 (7): 896–902. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.87B7.16289>.
- Hickery, Mark S., Michael T. Bayliss, Jayesh Dudhia, Joanne C. Lewthwaite, Jo C.W. Edwards, and Andrew A. Pitsillides. 2003. "Age-Related Changes in the Response of Human Articular Cartilage to IL-1 $\alpha$  and Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ): Chondrocytes Exhibit a Diminished Sensitivity to TGF- $\beta$ ." *Journal of Biological Chemistry* 278 (52): 53063–71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209632200>.
- Hoemann, C. D., J. Sun, M. D. McKee, A. Chevrier, E. Rossomacha, G. E. Rivard, M. Hurtig, and M. D. Buschmann. 2007. "Chitosan-Glycerol Phosphate/Blood Implants Elicit Hyaline Cartilage Repair Integrated with Porous Subchondral Bone in Microdrilled Rabbit Defects." *Osteoarthritis and Cartilage* 15 (1): 78–89. <https://doi.org/10.1016/J.JOCA.2006.06.015>.
- Horas, U., D. Pelinkovic, G. Herr, T. Aigner, and R. Schnettler. 2003a. "Autologous Chondrocyte Implantation and Osteochondral Cylinder Transplantation in Cartilage Repair of the Knee Joint. A Prospective, Comparative Trial." *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 85 (2): 185–92. <https://doi.org/10.2106/00004623-200302000-00001>.
- . 2003b. "Autologous Chondrocyte Implantation and Osteochondral Cylinder Transplantation in Cartilage Repair of the Knee Joint. A Prospective, Comparative Trial." *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 85 (2): 185–92. <https://doi.org/10.2106/00004623-200302000-00001>.
- Hudelmaier, Martin, C. Glaser, A. Hausschild, R. Burgkart, and F. Eckstein. 2006. "Effects of Joint Unloading and Reloading on Human Cartilage Morphology and Function, Muscle Cross-Sectional Areas, and Bone Density - a Quantitative Case Report." *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions* 6 (3): 284–90. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17142951/>.
- Hunt, Harold E., Kamran Sadr, Allison J. Deyoung, Simon Gortz, and William D. Bugbee. 2014. "The Role of Immunologic Response in Fresh Osteochondral Allografting of the Knee." *The American Journal of Sports Medicine* 42 (4): 886–91.

<https://doi.org/10.1177/0363546513518733>.

- Hunziker, E. B. 2002. "Articular Cartilage Repair: Basic Science and Clinical Progress. A Review of the Current Status and Prospects." *Osteoarthritis and Cartilage* 10 (6): 432–63. <https://doi.org/10.1053/joca.2002.0801>.
- Ikenoue, Takashi, Michael C.D. Trindade, Mel S. Lee, Eric Y. Lin, David J. Schurman, Stuart B. Goodman, and R. Lane Smith. 2003. "Mechanoregulation of Human Articular Chondrocyte Aggrecan and Type II Collagen Expression by Intermittent Hydrostatic Pressure in Vitro." *Journal of Orthopaedic Research* 21 (1): 110–16. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(02\)00091-8](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(02)00091-8).
- Iwasaki, Norimasa, Hiroyuki Kato, Jyunichi Ishikawa, Tatsuya Masuko, Tadanao Funakoshi, and Akio Minami. 2009. "Autologous Osteochondral Mosaicplasty for Osteochondritis Dissecans of the Elbow in Teenage Athletes." *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 91 (10): 2359–66. <https://doi.org/10.2106/JBJS.H.01266>.
- Jaalouk, Diana E., and Jan Lammerding. 2009. "Mechanotransduction Gone Awry." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (1): 63–73. <https://doi.org/10.1038/NRM2597>.
- Jackson, John. 2012. "Father of the Modern Hip Replacement: Professor Sir John Charnley (1911–82)." [Http://Dx.Doi.Org/10.1258/Jmb.2011.011021](http://Dx.Doi.Org/10.1258/Jmb.2011.011021) 19 (4): 151–56. <https://doi.org/10.1258/JMB.2011.011021>.
- Jackson, R. W., J. E. Gilbert, and P. F. Sharkey. 1997. "Arthroscopic Debridement versus Arthroplasty in the Osteoarthritic Knee." *The Journal of Arthroplasty* 12 (4). [https://doi.org/10.1016/S0883-5403\(97\)90204-7](https://doi.org/10.1016/S0883-5403(97)90204-7).
- Jay, G. D., J. R. Torres, M. L. Warman, M. C. Laderer, and K. S. Breuer. 2007. "The Role of Lubricin in the Mechanical Behavior of Synovial Fluid." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (15): 6194–99. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0608558104>.
- Jenkinson, Claire M., Michael Doherty, Anthony J. Avery, Anna Read, Moira A. Taylor, Tracey H. Sach, Paul Silcocks, and Kenneth R. Muir. 2009. "Effects of Dietary Intervention and Quadriceps Strengthening Exercises on Pain and Function in Overweight People with Knee Pain: Randomised Controlled Trial." *BMJ (Clinical*

- Research Ed.*) 339 (7721): 606–9. <https://doi.org/10.1136/BMJ.B3170>.
- Johnston, S. A. 1997. “Osteoarthritis. Joint Anatomy, Physiology, and Pathobiology.” *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 27 (4): 699–723. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(97\)50076-3](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(97)50076-3).
- Karvonen, Robert L., William G. Negendank, Susan M. Fraser, Maureen D. Mayes, Teisa An, and Felix Fernandez-Madrid. 1990. “Articular Cartilage Defects of the Knee: Correlation between Magnetic Resonance Imaging and Gross Pathology.” *Annals of the Rheumatic Diseases* 49 (9): 672–75. <https://doi.org/10.1136/ARD.49.9.672>.
- Kellgren, J. H., and J. S. Lawrence. 1957. “Radiological Assessment of Osteo-Arthrosis.” *Annals of the Rheumatic Diseases* 16 (4): 494–502. <https://doi.org/10.1136/ard.16.4.494>.
- Kerker, Jordan T., Andrew J. Leo, and Nicholas A. Sgaglione. 2008. “Cartilage Repair: Synthetics and Scaffolds: Basic Science, Surgical Techniques, and Clinical Outcomes.” *Sports Medicine and Arthroscopy Review* 16 (4): 208–16. <https://doi.org/10.1097/JSA.0B013E31818CDBAA>.
- Kessler, Jeffrey I., Hooman Nikizad, Kevin G. Shea, John C. Jacobs, Judith D. Bechuk, and Jennifer M. Weiss. 2014. “The Demographics and Epidemiology of Osteochondritis Dissecans of the Knee in Children and Adolescents.” *The American Journal of Sports Medicine* 42 (2): 320–26. <https://doi.org/10.1177/0363546513510390>.
- Knapik, Derrick M., Joshua D. Harris, Garrett Pangrazzi, Michael J. Griesser, Robert A. Siston, Sudha Agarwal, and David C. Flanigan. 2013. “The Basic Science of Continuous Passive Motion in Promoting Knee Health: A Systematic Review of Studies in a Rabbit Model.” *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery: Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 29 (10): 1722–31. <https://doi.org/10.1016/J.ARTHRO.2013.05.028>.
- Knutsen, Gunnar, Jon Olav Drogset, Lars Engebretsen, Torbjørn Grøntvedt, Vidar Isaksen, Tom C. Ludvigsen, Sally Roberts, Eirik Solheim, Torbjørn Strand, and Oddmund Johansen. 2007. “A Randomized Trial Comparing Autologous Chondrocyte Implantation with Microfracture. Findings at Five Years.” *The Journal of Bone and*

*Joint Surgery. American Volume* 89 (10): 2105–12.  
<https://doi.org/10.2106/JBJS.G.00003>.

- Knutsen, Gunnar, Vidar Isaksen, Oddmund Johansen, Lars Engebretsen, Tom C. Ludvigsen, Jon Olav Drogset, Torbjørn Grøntvedt, Eirik Solheim, Torbjørn Strand, and Sally Roberts. 2004. “Autologous Chondrocyte Implantation Compared with Microfracture in the Knee. A Randomized Trial.” *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 86 (3): 455–64. <https://doi.org/10.2106/00004623-200403000-00001>.
- Kocher, Mininder S., Rachael Tucker, Theodore J. Ganley, and John M. Flynn. 2006. “Management of Osteochondritis Dissecans of the Knee: Current Concepts Review.” *American Journal of Sports Medicine* 34 (7): 1181–91.
- Komárek, J, P Vališ, M Repko, R Chaloupka, M Krbec, Na Práci Se, A Šprláková, Z Pavlovský, and B Kubešová. 2010. “291/ ACTA CHIRURGIAE ORTHOPAEDICAE ET TRAUMATOLOGIAE ČECHOSL Léčba Osteochondrálních Defektů Kolenního Kloubu Metodou Implantace Solidního Chondrograftu-Dlouhodobé Výsledky Treatment of Deep Cartilage Defects of the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation: Long-Term Results” 77: 291–95.
- Kon, Elizaveta, Giuseppe Filardo, Mats Brittberg, Maurizio Busacca, Vincenzo Condello, Lars Engebretsen, Stefan Marlovits, et al. 2018. “A Multilayer Biomaterial for Osteochondral Regeneration Shows Superiority vs Microfractures for the Treatment of Osteochondral Lesions in a Multicentre Randomized Trial at 2 Years.” *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy: Official Journal of the ESSKA* 26 (9): 2704–15. <https://doi.org/10.1007/S00167-017-4707-3>.
- Kon, Elizaveta, Berardo Di Matteo, Peter Verdonk, Matej Drobnic, Oliver Dulic, Gordan Gavrilovic, Jenel M. Patrascu, et al. 2021. “Aragonite-Based Scaffold for the Treatment of Joint Surface Lesions in Mild to Moderate Osteoarthritic Knees: Results of a 2-Year Multicenter Prospective Study.” *American Journal of Sports Medicine* 49 (3): 588–98. <https://doi.org/10.1177/0363546520981750>.
- König, F. 1888. “Über Freie Körper in Den Gelenken.” *Dtsch. Zeitschrift Für Chir.* 27 (1): 90–109.
- Koo, Seungbum, and Thomas P. Andriacchi. 2007. “A Comparison of the Influence of Global Functional Loads vs. Local Contact Anatomy on Articular Cartilage Thickness

at the Knee.” *Journal of Biomechanics* 40 (13): 2961–66.  
<https://doi.org/10.1016/J.JBIOMECH.2007.02.005>.

Kraeutler, Matthew J., John W. Belk, Justin M. Purcell, and Eric C. McCarty. 2018. “Microfracture Versus Autologous Chondrocyte Implantation for Articular Cartilage Lesions in the Knee: A Systematic Review of 5-Year Outcomes.” *American Journal of Sports Medicine* 46 (4): 995–99. <https://doi.org/10.1177/0363546517701912>.

Kreuz, Peter C., Christoph Erggelet, Matthias R. Steinwachs, Stefanie J. Krause, Andreas Lahm, Philipp Niemeyer, Nadir Ghanem, Markus Uhl, and Norbert Südkamp. 2006. “Is Microfracture of Chondral Defects in the Knee Associated With Different Results in Patients Aged 40 Years or Younger?” *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 22 (11): 1180–86. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2006.06.020>.

Kundrotas, Gabrielis, Evelina Gasperskaja, Grazina Slapsyte, Zivile Gudleviciene, Jan Krasko, Ausra Stumbryte, and Regina Liudkeviciene. 2016. “Identity, Proliferation Capacity, Genomic Stability and Novel Senescence Markers of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Low Volume of Human Bone Marrow.” *Oncotarget* 7 (10): 10788–802. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.7456>.

Lai, Wilson C, Hunter L Bohlen, Nathan P Fackler, and Dean Wang. 2022a. “Osteochondral Allografts in Knee Surgery: Narrative Review of Evidence to Date.” *Orthopedic Research and Reviews* 14: 263–74. <https://doi.org/10.2147/ORR.S253761>.

———. 2022b. “Osteochondral Allografts in Knee Surgery: Narrative Review of Evidence to Date.” *Orthopedic Research and Reviews* 14: 263–74. <https://doi.org/10.2147/ORR.S253761>.

LANDELLS, J. W. 1953. “The Bone Cysts of Osteoarthritis.” *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 35-B (4): 643–49. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.35B4.643>.

Lange, J., N. Follak, T. Nowotny, and H. Merk. 2006. “[Results of SaluCartilage Implantation for Stage IV Chondral Defects in the Knee Joint Area].” *Der Unfallchirurg* 109 (3): 193–99. <https://doi.org/10.1007/S00113-005-1025-X>.

Lee, Mel S., Takashi Ikenoue, Michael C.D. Trindade, Neal Wong, Stuart B. Goodman, David J. Schurman, and R. Lane Smith. 2003. “Protective Effects of Intermittent

- Hydrostatic Pressure on Osteoarthritic Chondrocytes Activated by Bacterial Endotoxin in Vitro.” *Journal of Orthopaedic Research* 21 (1): 117–22. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(02\)00085-2](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(02)00085-2).
- Lee, Sang Yang, Toshiyuki Nakagawa, and A. Hari Reddi. 2010. “Mesenchymal Progenitor Cells Derived from Synovium and Infrapatellar Fat Pad as a Source for Superficial Zone Cartilage Tissue Engineering: Analysis of Superficial Zone Protein/Lubricin Expression.” *Tissue Engineering. Part A* 16 (1): 317–25. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEA.2009.0104>.
- Lee, Wayne Yuk wai, and Bin Wang. 2017. “Cartilage Repair by Mesenchymal Stem Cells: Clinical Trial Update and Perspectives.” *Journal of Orthopaedic Translation*. Elsevier (Singapore) Pte Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2017.03.005>.
- Leung, M. K., L. I. Fessler, D. B. Greenberg, and J. H. Fessler. 1979. “Separate Amino and Carboxyl Procollagen Peptidases in Chick Embryo Tendon.” *The Journal of Biological Chemistry* 254 (1): 224–32. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)30295-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)30295-8).
- Levy, Andrew S., John Lohnes, Sean Sculley, Michael LeCroy, and William Garrett. 1996. “Chondral Delamination of the Knee in Soccer Players.” *The American Journal of Sports Medicine* 24 (5): 634–39. <https://doi.org/10.1177/036354659602400512>.
- Lindén, Bjarne. 1976. “The Incidence of Osteochondritis Dissecans in the Condyles of the Femur.” *Acta Orthopaedica* 47 (6): 664–67. <https://doi.org/10.3109/17453677608988756>.
- Link, Jarrett M., Evelia Y. Salinas, Jerry C. Hu, and Kyriacos A. Athanasiou. 2020. “The Tribology of Cartilage: Mechanisms, Experimental Techniques, and Relevance to Translational Tissue Engineering.” *Clinical Biomechanics (Bristol, Avon)* 79 (October). <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOMECH.2019.10.016>.
- Liu, Yufeng, Ning Ma, Zhe Zhao, and Quanyi Guo. 2023. “Mid- to Long-Term Clinical Outcomes of Cartilage Restoration of Knee Joint with Allogenic Next-Generation Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation (MACI).” *Orthopaedic Surgery* 15 (2): 549–62. <https://doi.org/10.1111/OS.13662>.
- Lohmander, L. S., T. Saxne, and D. K. Heinegard. 1994. “Release of Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) into Joint Fluid after Knee Injury and in Osteoarthritis.” *Annals*



- of the Rheumatic Diseases* 53 (1): 8–13. <https://doi.org/10.1136/ARD.53.1.8>.
- Lohmander, L. Stefan, P. Martin Englund, Ludvig L. Dahl, and Ewa M. Roos. 2007. “The Long-Term Consequence of Anterior Cruciate Ligament and Meniscus Injuries: Osteoarthritis.” *The American Journal of Sports Medicine* 35 (10): 1756–69. <https://doi.org/10.1177/0363546507307396>.
- Maheshwer, Bhargavi, Evan M. Polce, Katlynn Paul, Brady T. Williams, Theodore S. Wolfson, Adam Yanke, Nikhil N. Verma, Brian J. Cole, and Jorge Chahla. 2021. “Regenerative Potential of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Knee Osteoarthritis and Chondral Defects: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*. W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2020.05.037>.
- Makris, Eleftherios A., Pasha Hadidi, and Kyriacos A. Athanasiou. 2011. “The Knee Meniscus: Structure-Function, Pathophysiology, Current Repair Techniques, and Prospects for Regeneration.” *Biomaterials* 32 (30): 7411–31. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.06.037>.
- Mankin, H. J. 1971. “Biochemical and Metabolic Aspects of Osteoarthritis.” *Orthopedic Clinics of North America* 2 (1): 19–31. [https://doi.org/10.1016/s0030-5898\(20\)31137-8](https://doi.org/10.1016/s0030-5898(20)31137-8).
- Mankin, H. 1982. “The Response of Articular Cartilage to Mechanical Injury - PubMed.” *Journal of Bone and Joint Surgery*. March 1982. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6174527/>.
- Mankin, Henry J., Antra Zarins, and William L. Jaffe. 1972. “The Effect of Systemic Corticosteroids on Rabbit Articular Cartilage.” *Arthritis & Rheumatism* 15 (6): 593–99. <https://doi.org/10.1002/art.1780150605>.
- Maroudas, A., E. Wachtel, G. Grushko, E. P. Katz, and P. Weinberg. 1991. “The Effect of Osmotic and Mechanical Pressures on Water Partitioning in Articular Cartilage.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1073 (2): 285–94. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(91\)90133-2](https://doi.org/10.1016/0304-4165(91)90133-2).
- Maroudas, Alice. 1968. “Physicochemical Properties of Cartilage in the Light of Ion Exchange Theory.” *Biophysical Journal* 8 (5): 575–95. <https://doi.org/10.1016/S0006->

3495(68)86509-9.

- Martin, J. A., and J. A. Buckwalter. 2000. "The Role of Chondrocyte-Matrix Interactions in Maintaining and Repairing Articular Cartilage." *Biorheology* 37 (1–2): 129–40.
- Martin, James A., and Joseph A. Buckwalter. 2003. "The Role of Chondrocyte Senescence in the Pathogenesis of Osteoarthritis and in Limiting Cartilage Repair." *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 85-A Suppl 2 (SUPPL. 1): 106–10. <https://doi.org/10.2106/00004623-200300002-00014>.
- Martin, Robin, and Roland P. Jakob. 2022. "Review of K.H. Pridie (1959) on 'A Method of Resurfacing Osteoarthritic Knee Joints.'" *Journal of ISAKOS: Joint Disorders & Orthopaedic Sports Medicine* 7 (1): 39–46. <https://doi.org/10.1016/J.JISAKO.2021.11.001>.
- Masquijo, Javier, and Alpesh Kothari. 2019. "Juvenile Osteochondritis Dissecans (JOCD) of the Knee: Current Concepts Review." *EFORT Open Reviews* 4 (5): 201–12. <https://doi.org/10.1302/2058-5241.4.180079>.
- Matricali, Giovanni, Greta Dereymaeker, and Luyten Frank. 2010. "Donor Site Morbidity after Articular Cartilage Repair Procedures: A Review - PubMed." *Acta Othopaedica Belgica*. October 2010. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21138224/>.
- Mayan, Maria D., Raquel Gago-Fuentes, Paula Carpintero-Fernandez, Patricia Fernandez-Puente, Purificacion Filgueira-Fernandez, Noa Goyanes, Virginijus Valiunas, Peter R. Brink, Gary S. Goldberg, and Francisco J. Blanco. 2015. "Articular Chondrocyte Network Mediated by Gap Junctions: Role in Metabolic Cartilage Homeostasis." *Annals of the Rheumatic Diseases* 74 (1): 275–84. <https://doi.org/10.1136/ANNRHEUMDIS-2013-204244>.
- Mazzocca, Augustus D., Mary Beth R. McCarthy, David M. Chowaniec, Mark P. Cote, Robert A. Arciero, and Hicham Drissi. 2010. "Rapid Isolation of Human Stem Cells (Connective Tissue Progenitor Cells) from the Proximal Humerus during Arthroscopic Rotator Cuff Surgery." *The American Journal of Sports Medicine* 38 (7): 1438–47. <https://doi.org/10.1177/0363546509360924>.
- McIntyre, James A., Ian A. Jones, Bo Han, and C. Thomas Vangsness. 2018. "Intra-Articular Mesenchymal Stem Cell Therapy for the Human Joint: A Systematic Review." *The*

*American Journal of Sports Medicine* 46 (14): 3550–63.  
<https://doi.org/10.1177/0363546517735844>.

McLain, Robert F., Cynthia A. Boehm, Candace Rufo-Smith, and George F. Muschler. 2009. “Transpedicular Aspiration of Osteoprogenitor Cells from the Vertebral Body: Progenitor Cell Concentrations Affected by Serial Aspiration.” *The Spine Journal : Official Journal of the North American Spine Society* 9 (12): 995–1002.  
<https://doi.org/10.1016/J.SPINEE.2009.08.455>.

McNickle, Allison G., Matthew T. Provencher, and Brian J. Cole. 2008. “Overview of Existing Cartilage Repair Technology.” *Sports Medicine and Arthroscopy Review* 16 (4): 196–201. <https://doi.org/10.1097/JSA.0B013E31818CDB82>.

Migliorini, Filippo, Nicola Maffulli, Jörg Eschweiler, Christian Götze, Frank Hildebrand, and Marcel Betsch. 2022. “Prognostic Factors for the Management of Chondral Defects of the Knee and Ankle Joint: A Systematic Review.” *European Journal of Trauma and Emergency Surgery : Official Publication of the European Trauma Society*, November.  
<https://doi.org/10.1007/s00068-022-02155-y>.

Mistry, Hema, Martin Connock, Joshua Pink, Deepson Shyangdan, Christine Clar, Pamela Royle, Rachel Court, Leela C. Biant, Andrew Metcalfe, and Norman Waugh. 2017. “Autologous Chondrocyte Implantation in the Knee: Systematic Review and Economic Evaluation.” *Health Technology Assessment (Winchester, England)* 21 (6): V–160.  
<https://doi.org/10.3310/HTA21060>.

Mithoefer, Kai, Timothy Mcadams, Riley J. Williams, Peter C. Kreuz, and Bert R. Mandelbaum. 2009. “Clinical Efficacy of the Microfracture Technique for Articular Cartilage Repair in the Knee: An Evidence-Based Systematic Analysis.” *The American Journal of Sports Medicine* 37 (10): 2053–63.  
<https://doi.org/10.1177/0363546508328414>.

Mithoefer, Kai, Riley J. Williams, Russell F. Warren, Hollis G. Potter, Christopher R. Spock, Edward C. Jones, Thomas L. Wickiewicz, and Robert G. Marx. 2005. “The Microfracture Technique for the Treatment of Articular Cartilage Lesions in the Knee: A Prospective Cohort Study.” *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A* 87 (9 I): 1911–20. <https://doi.org/10.2106/JBJS.D.02846>.

Miyazaki, T., M. Wada, H. Kawahara, M. Sato, H. Baba, and S. Shimada. 2002. “Dynamic

- Load at Baseline Can Predict Radiographic Disease Progression in Medial Compartment Knee Osteoarthritis.” *Annals of the Rheumatic Diseases* 61 (7): 617–22. <https://doi.org/10.1136/ARD.61.7.617>.
- Mow, V. C., S. C. Kuei, W. M. Lai, and C. G. Armstrong. 1980. “Biphasic Creep and Stress Relaxation of Articular Cartilage in Compression? Theory and Experiments.” *Journal of Biomechanical Engineering* 102 (1): 73–84. <https://doi.org/10.1115/1.3138202>.
- Muehleman, Carol, Jun Li, Thomas Aigner, Lev Rappoport, Eric Mattson, Carol Hirschmugl, Koichi Masuda, and Ann K. Rosenthal. 2008. “Association between Crystals and Cartilage Degeneration in the Ankle.” *The Journal of Rheumatology* 35 (6): 1108–17. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18412302/>.
- Muir, Helen. 1995. “The Chondrocyte, Architect of Cartilage. Biomechanics, Structure, Function and Molecular Biology of Cartilage Matrix Macromolecules.” *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 17 (12): 1039–48. <https://doi.org/10.1002/BIES.950171208>.
- Mundi, Raman, Asheesh Bedi, Linda Chow, Sarah Crouch, Nicole Simunovic, Elizabeth Sibilsky Enselman, and Olufemi R. Ayeni. 2016. “Cartilage Restoration of the Knee: A Systematic Review and Meta-Analysis of Level 1 Studies.” *The American Journal of Sports Medicine* 44 (7): 1888–95. <https://doi.org/10.1177/0363546515589167>.
- Narbona-Carceles, Javier, Javier Vaquero, Susana B.S. Suárez-Sancho, Francisco Forriol, and Maria Eugenia Fernández-Santos. 2014. “Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Aspirates from Alternative Sources: Is the Knee as Good as the Iliac Crest?” *Injury* 45 Suppl 4 (S4): S42–47. [https://doi.org/10.1016/S0020-1383\(14\)70009-9](https://doi.org/10.1016/S0020-1383(14)70009-9).
- Natoli, Roman M., and Kyriacos A. Athanasiou. 2008. “P188 Reduces Cell Death and IGF-I Reduces GAG Release Following Single-Impact Loading of Articular Cartilage.” *Journal of Biomechanical Engineering* 130 (4). <https://doi.org/10.1115/1.2939368>.
- Neckař, P., V. Havlas, D. Lykova, J. Braniř, J. Kvızova, and P. O. Bauer. 2020. “Comparison of Bone Marrow Stromal Cells from Different Anatomical Locations for Evaluation of Their Suitability for Potential Clinical Applications.” *Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Cechoslovaca* 87 (3): 183–90. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32773019/>.

- Nejadnik, Hossein, James H. Hui, Erica Pei Feng Choong, Bee Choo Tai, and Eng Hin Lee. 2010. "Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells versus Autologous Chondrocyte Implantation: An Observational Cohort Study." *The American Journal of Sports Medicine* 38 (6): 1110–16. <https://doi.org/10.1177/0363546509359067>.
- Niemeyer, Philipp, Jan M. Pestka, Peter C. Kreuz, Christoph Erggelet, Hagen Schmal, Norbert P. Suedkamp, and Matthias Steinwachs. 2008. "Characteristic Complications after Autologous Chondrocyte Implantation for Cartilage Defects of the Knee Joint." *The American Journal of Sports Medicine* 36 (11): 2091–99. <https://doi.org/10.1177/0363546508322131>.
- Niemeyer, Philipp, Stella Porichis, Matthias Steinwachs, Christoph Erggelet, Peter C. Kreuz, Hagen Schmal, Markus Uhl, Nadir Ghanem, Norbert P. Suedkamp, and Gian Salzmann. 2014. "Long-Term Outcomes after First-Generation Autologous Chondrocyte Implantation for Cartilage Defects of the Knee." *American Journal of Sports Medicine* 42 (1): 150–57. <https://doi.org/10.1177/0363546513506593>.
- Nieminen, Miika T., Jarno Rieppo, Juha Töyräs, Juhana M. Hakumäki, Johanna Silvennoinen, Mika M. Hyttinen, Heikki J. Helminen, and Jukka S. Jurvelin. 2001. "T2 Relaxation Reveals Spatial Collagen Architecture in Articular Cartilage: A Comparative Quantitative MRI and Polarized Light Microscopic Study." *Magnetic Resonance in Medicine* 46 (3): 487–93. <https://doi.org/10.1002/MRM.1218>.
- Noyes, Frank R., and Craig L. Stabler. 1989. "A System for Grading Articular Cartilage Lesions at Arthroscopy." *The American Journal of Sports Medicine* 17 (4): 505–13. <https://doi.org/10.1177/036354658901700410>.
- Ogura, Takahiro, Brian A. Mosier, Tim Bryant, and Tom Minas. 2017. "A 20-Year Follow-up After First-Generation Autologous Chondrocyte Implantation." *The American Journal of Sports Medicine* 45 (12): 2751–61. <https://doi.org/10.1177/0363546517716631>.
- Outerbridge, R. E. 1961. "The Etiology of Chondromalacia Patellae." *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 43-B (November): 752–57. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.43B4.752>.
- Outerbridge, and R. E. 1961. "The Etiology of Chondromalacia Patellae." *The Journal of*

- Bone and Joint Surgery. British Volume* 43-B (November): 752–57. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.43b4.752>.
- Palmieri-Smith, Riann M., and Abbey C. Thomas. 2009. “A Neuromuscular Mechanism of Posttraumatic Osteoarthritis Associated with ACL Injury.” *Exercise and Sport Sciences Reviews* 37 (3): 147–53. <https://doi.org/10.1097/JES.0B013E3181AA6669>.
- Parsch, Dominik, Jörg Fellenberg, Tim H. Brümmendorf, Anna Maria Eschlbeck, and Wiltrud Richter. 2004. “Telomere Length and Telomerase Activity during Expansion and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells and Chondrocytes.” *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 82 (1): 49–55. <https://doi.org/10.1007/S00109-003-0506-Z>.
- Pei, Ming, Zuoqin Yan, Mark Shoukry, and Brandon M. Boyce. 2010. “Failure of Xenoinplantation Using Porcine Synovium-Derived Stem Cell-Based Cartilage Tissue Constructs for the Repair of Rabbit Osteochondral Defects.” *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 28 (8): 1064–70. <https://doi.org/10.1002/JOR.21096>.
- Peña, E., B. Calvo, M. A. Martínez, D. Palanca, and M. Doblaré. 2005. “Finite Element Analysis of the Effect of Meniscal Tears and Meniscectomies on Human Knee Biomechanics.” *Clinical Biomechanics (Bristol, Avon)* 20 (5): 498–507. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOMECH.2005.01.009>.
- Pernis, Alessandra B. 2007. “Estrogen and CD4+ T Cells.” *Current Opinion in Rheumatology* 19 (5): 414–20. <https://doi.org/10.1097/BOR.0B013E328277EF2A>.
- Peterson, L, D Menche, D Grande, M Klein, G Burmester, J Pugh, and M Pitman. 1984. “Chondrocyte Transplantation—an Experimental Model in the Rabbit.” *Trans Orthop Res Soc.* 9: 218–218.
- Peterson, Lars, Mats Brittberg, Illka Kiviranta, Evy Lundgren Åkerlund, and Anders Lindahl. 2002. “Autologous Chondrocyte Transplantation. Biomechanics and Long-Term Durability.” *The American Journal of Sports Medicine* 30 (1): 2–12. <https://doi.org/10.1177/03635465020300011601>.
- Peterson, Lars, Tom Minas, Mats Brittberg, and Anders Lindahl. 2003. “Treatment of Osteochondritis Dissecans of the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation:

- Results at Two to Ten Years.” *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 85-A Suppl 2 (SUPPL. 1): 17–24. <https://doi.org/10.2106/00004623-200300002-00003>.
- Peterson, Lars, Haris S. Vasiliadis, Mats Brittberg, and Anders Lindahl. 2010. “Autologous Chondrocyte Implantation: A Long-Term Follow-Up.” *The American Journal of Sports Medicine* 38 (6): 1117–24. <https://doi.org/10.1177/0363546509357915>.
- Petersson, Ingemar F., Lars Sandqvist, Björn Svensson, and Tore Saxne. 1997. “Cartilage Markers in Synovial Fluid in Symptomatic Knee Osteoarthritis.” *Annals of the Rheumatic Diseases* 56 (1): 64–67. <https://doi.org/10.1136/ARD.56.1.64>.
- Podskubka, Ales, Cyril Povisil, and Radek Kubes. 2006. “Treatment of Deep Cartilage Defects of the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation on a Hyaluronic Acid Ester Scaffolds (Hyalograft C).” *Acta Chirurgica Orthopaedica Traumatologica Czechoslovaca* 73 (4): 251–63.
- Polzer, Karin, Georg Schett, and Jochen Zwerina. 2007. “The Lonely Death: Chondrocyte Apoptosis in TNF-Induced Arthritis.” *Autoimmunity* 40 (4): 333–36. <https://doi.org/10.1080/08916930701356721>.
- Poole, C. Anthony, Michael H. Flint, and Brent W. Beaumont. 1987. “Chondrons in Cartilage: Ultrastructural Analysis of the Pericellular Microenvironment in Adult Human Articular Cartilages.” *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 5 (4): 509–22. <https://doi.org/10.1002/JOR.1100050406>.
- Powers, Robert T., Thomas C. Dowd, and Eric Giza. 2021. “Surgical Treatment for Osteochondral Lesions of the Talus.” *Arthroscopy : The Journal of Arthroscopic & Related Surgery : Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 37 (12): 3393–96. <https://doi.org/10.1016/J.ARTHRO.2021.10.002>.
- Pridie, K., H. 1959. “A Method of Resurfacing Osteoarthritic Knee Joints.” *J Bone Joint Surg Br* 41: 618–19.
- Prockop, Darwin J. 2009. “Repair of Tissues by Adult Stem/Progenitor Cells (MSCs): Controversies, Myths, and Changing Paradigms.” *Molecular Therapy : The Journal of*

*the American Society of Gene Therapy* 17 (6): 939–46.  
<https://doi.org/10.1038/MT.2009.62>.

- Radin, E. L., M. G. Ehrlich, R. Chernack, P. Abernethy, I. L. Paul, and R. M. Rose. 1978. “Effect of Repetitive Impulsive Loading on the Knee Joints of Rabbits.” *Clinical Orthopaedics and Related Research* 131 (131): 288–93.  
<https://doi.org/10.1097/00003086-197803000-00047>.
- Redler, I., V. C. Mow, M. L. Zimny, and J. Mansell. 1975. “The Ultrastructure and Biomechanical Significance of the Tidemark of Articular Cartilage.” *Clinical Orthopaedics and Related Research* 112 (112): 357–62.  
<https://doi.org/10.1097/00003086-197510000-00038>.
- Reinold, Michael M., Kevin E. Wilk, Leonard C. Macrina, Jeffrey R. Dugas, and E. Lyle Cain. 2006. “Current Concepts in the Rehabilitation Following Articular Cartilage Repair Procedures in the Knee.” *The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy* 36 (10): 774–94. <https://doi.org/10.2519/JOSPT.2006.2228>.
- Revell, Christopher M., and Kyriacos A. Athanasiou. 2009. “Success Rates and Immunologic Responses of Autogenic, Allogenic, and Xenogenic Treatments to Repair Articular Cartilage Defects.” *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 15 (1): 1–15.  
<https://doi.org/10.1089/TEN.TEB.2008.0189>.
- Richter, Dustin L., Robert C. Schenck, Daniel C. Wascher, and Gehron Treme. 2016. “Knee Articular Cartilage Repair and Restoration Techniques: A Review of the Literature.” *Sports Health* 8 (2): 153–60. <https://doi.org/10.1177/1941738115611350>.
- Roberts, S., J. Menage, L. J. Sandell, E. H. Evans, and J. B. Richardson. 2009. “Immunohistochemical Study of Collagen Types I and II and Procollagen IIA in Human Cartilage Repair Tissue Following Autologous Chondrocyte Implantation.” *The Knee* 16 (5): 398–404. <https://doi.org/10.1016/J.KNEE.2009.02.004>.
- Robertson, William, Bryan T. Kelly, and Daniel W. Green. 2003. “Osteochondritis Dissecans of the Knee in Children.” *Current Opinion in Pediatrics* 15 (1): 38–44.
- Ropes, Marian W., Granville A. Bennett, and Walter Bauer. 1939. “THE ORIGIN AND NATURE OF NORMAL SYNOVIAL FLUID.” *The Journal of Clinical Investigation* 18 (3): 351–72. <https://doi.org/10.1172/JCI101050>.



- Røsland, Gro Vatne, Agnete Svendsen, Anja Torsvik, Ewa Sobala, Emmet McCormack, Heike Immervoll, Josef Mysliwicz, et al. 2009. “Long-Term Cultures of Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Frequently Undergo Spontaneous Malignant Transformation.” *Cancer Research* 69 (13): 5331–39. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4630>.
- Sacitharan, Pradeep Kumar. 2019. “Ageing and Osteoarthritis.” *Sub-Cellular Biochemistry* 91: 123–59. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-3681-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3681-2_6).
- Salonius, Eve, Lassi Rieppo, Mikko J. Nissi, Hertta J. Pulkkinen, Harold Brommer, Anne Brünott, Tuomo S. Silvast, et al. 2019. “Critical-Sized Cartilage Defects in the Equine Carpus.” *Connective Tissue Research* 60 (2): 95–106. <https://doi.org/10.1080/03008207.2018.1455670>.
- Saltzman, Bryan M., Timothy Leroux, and Brian J. Cole. 2017. “Management and Surgical Options for Articular Defects in the Shoulder.” *Clinics in Sports Medicine* 36 (3): 549–72. <https://doi.org/10.1016/j.csm.2017.02.009>.
- Salzmann, Gian M., Robert Ossendorff, Ron Gilat, and Brian J. Cole. 2021. “Autologous Minced Cartilage Implantation for Treatment of Chondral and Osteochondral Lesions in the Knee Joint: An Overview.” *Cartilage* 13 (1\_suppl): 1124S-1136S. <https://doi.org/10.1177/1947603520942952>.
- Sandell, Linda J. 2012. “Etiology of Osteoarthritis: Genetics and Synovial Joint Development.” *Nature Reviews. Rheumatology* 8 (2): 77–89. <https://doi.org/10.1038/NRRHEUM.2011.199>.
- Scherer, Hans Ulrich, Thomas Häupl, and Gerd R. Burmester. 2020. “The Etiology of Rheumatoid Arthritis.” *Journal of Autoimmunity* 110 (June). <https://doi.org/10.1016/J.JAUT.2019.102400>.
- Schmitt, Andreas, Martijn Van Griensven, Andreas B. Imhoff, and Stefan Buchmann. 2012. “Application of Stem Cells in Orthopedics.” *Stem Cells International* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/394962>.
- Schreiner, Markus M., Marcus Raudner, Stefan Marlovits, Klaus Bohndorf, Michael Weber, Martin Zalaudek, Sebastian Röhrich, et al. 2019. “The MOCART (Magnetic Resonance Observation of Cartilage Repair Tissue) 2.0 Knee Score and Atlas.” *Cartilage*.

<https://doi.org/10.1177/1947603519865308>.

- Setton, L. A., V. C. Mow, and D. S. Howell. 1995. "Mechanical Behavior of Articular Cartilage in Shear Is Altered by Transection of the Anterior Cruciate Ligament." *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 13 (4): 473–82. <https://doi.org/10.1002/JOR.1100130402>.
- Setton, Lori A., Dawn M. Elliott, and Van C. Mow. 1999. "Altered Mechanics of Cartilage with Osteoarthritis: Human Osteoarthritis and an Experimental Model of Joint Degeneration." *Osteoarthritis and Cartilage* 7 (1): 2–14. <https://doi.org/10.1053/JOCA.1998.0170>.
- Shapiro, Erik M., Arijitt Borthakur, Alexander Gougoutas, and Ravinder Reddy. 2002. "23Na MRI Accurately Measures Fixed Charge Density in Articular Cartilage." *Magnetic Resonance in Medicine* 47 (2): 284–91. <https://doi.org/10.1002/MRM.10054>.
- Shepherd, D. E.T., and B. B. Seedhom. 1999. "Thickness of Human Articular Cartilage in Joints of the Lower Limb." *Annals of the Rheumatic Diseases* 58 (1): 27–34. <https://doi.org/10.1136/ARD.58.1.27>.
- Siczkowski, M., and F. M. Watt. 1990. "Subpopulations of Chondrocytes from Different Zones of Pig Articular Cartilage. Isolation, Growth and Proteoglycan Synthesis in Culture." *Journal of Cell Science* 97 ( Pt 2) (2): 349–60. <https://doi.org/10.1242/JCS.97.2.349>.
- Siebold, R., S. Lichtenberg, and P. Habermeyer. 2003. "Combination of Microfracture and Periosteal-Flap for the Treatment of Focal Full Thickness Articular Cartilage Lesions of the Shoulder: A Prospective Study." *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy : Official Journal of the ESSKA* 11 (3): 183–89. <https://doi.org/10.1007/S00167-003-0363-X>.
- Silverman, Ronald P., David Passaretti, Wynne Huang, Mark A. Randolph, and Michael J. Yaremchuk. 1999. "Injectable Tissue-Engineered Cartilage Using a Fibrin Glue Polymer." *Plastic and Reconstructive Surgery* 103 (7): 1809–18. <https://doi.org/10.1097/00006534-199906000-00001>.
- Sittinger, Michael, Dietmar W. Hutmacher, and Makarand V. Risbud. 2004. "Current Strategies for Cell Delivery in Cartilage and Bone Regeneration." *Current Opinion in*

- Biotechnology*. *Curr Opin Biotechnol*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.08.010>.
- Skelley, Nathan W., Surena Namdari, Aaron M. Chamberlain, Jay D. Keener, Leesa M. Galatz, and Ken Yamaguchi. 2015. "Arthroscopic Debridement and Capsular Release for the Treatment of Shoulder Osteoarthritis." *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery: Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 31 (3): 494–500. <https://doi.org/10.1016/J.ARTHRO.2014.08.025>.
- Słynarski, Konrad, Willem Cornelis de Jong, Martyn Snow, Jeanine Anna Alphonse Hendriks, Clayton Ellis Wilson, and Peter Verdonk. 2020. "Single-Stage Autologous Chondrocyte-Based Treatment for the Repair of Knee Cartilage Lesions: Two-Year Follow-up of a Prospective Single-Arm Multicenter Study." *American Journal of Sports Medicine* 48 (6): 1327–37. <https://doi.org/10.1177/0363546520912444>.
- Solchaga, L. A., V. M. Goldberg, and A. I. Caplan. 2001. "Cartilage Regeneration Using Principles of Tissue Engineering." *Clinical Orthopaedics and Related Research* 391 (391 Suppl). <https://doi.org/10.1097/00003086-200110001-00016>.
- Squires, Ginette R., Sharon Okouneff, Mirela Ionescu, and A. Robin Poole. 2003. "The Pathobiology of Focal Lesion Development in Aging Human Articular Cartilage and Molecular Matrix Changes Characteristic of Osteoarthritis." *Arthritis and Rheumatism* 48 (5): 1261–70. <https://doi.org/10.1002/ART.10976>.
- Steadman, J. Richard, Karen K. Briggs, Juan J. Rodrigo, Mininder S. Kocher, Thomas J. Gill, and William G. Rodkey. 2003. "Outcomes of Microfracture for Traumatic Chondral Defects of the Knee: Average 11-Year Follow-Up." *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 19 (5): 477–84. <https://doi.org/10.1053/jars.2003.50112>.
- Steinwachs, Matthias R., Justus Gille, Martin Volz, Sven Anders, Roland Jakob, Laura De Giromlamo, Piero Volpi, et al. 2019. "Systematic Review and Meta-Analysis of the Clinical Evidence on the Use of Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis in the Knee." *Cartilage*. <https://doi.org/10.1177/1947603519870846>.
- Sucheston, Martha. 1969. "Variation in the Appearance of Human Elastic Cartilage." *Ohio Journal of Science* 69: 366–71.

- Sudo, Kazuhiro, Megumi Kanno, Kenichi Miharada, Saeri Ogawa, Takashi Hiroyama, Kaoru Saijo, and Yukio Nakamura. 2007. "Mesenchymal Progenitors Able to Differentiate into Osteogenic, Chondrogenic, and/or Adipogenic Cells in Vitro Are Present in Most Primary Fibroblast-like Cell Populations." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 25 (7): 1610–17. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2006-0504>.
- Tatebe, M., R. Nakamura, Hideaki Kagami, K. Okada, and M. Ueda. 2005. "Differentiation of Transplanted Mesenchymal Stem Cells in a Large Osteochondral Defect in Rabbit." *Cytotherapy* 7 (6): 520–30. <https://doi.org/10.1080/14653240500361350>.
- Tegner, Y, and J Lysholm. 1985. "Rating Systems in the Evaluation of Knee Ligament Injuries - PubMed." *Clin Orthop Relat Res.* 1985. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4028566/>.
- Teo, Alex Quok An, Keng Lin Wong, Liang Shen, Jia Ying Lim, Wei Seong Toh, Eng Hin Lee, and James Hoi Po Hui. 2019. "Equivalent 10-Year Outcomes After Implantation of Autologous Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells Versus Autologous Chondrocyte Implantation for Chondral Defects of the Knee." *American Journal of Sports Medicine* 47 (12): 2881–87. <https://doi.org/10.1177/0363546519867933>.
- Thomas, M., M. Jordan, and E. Hamborg-Petersen. 2016. "[Arthroscopic Treatment of Chondral Lesions of the Ankle Joint. Evidence-Based Therapy]." *Der Unfallchirurg* 119 (2): 100–108. <https://doi.org/10.1007/S00113-015-0136-2>.
- Torzilli, P. A., R. Grigiene, J. Borrelli, and D. L. Helfet. 1999. "Effect of Impact Load on Articular Cartilage: Cell Metabolism and Viability, and Matrix Water Content." *Journal of Biomechanical Engineering* 121 (5): 433–41. <https://doi.org/10.1115/1.2835070>.
- Trickey, Wendy R., T. Parker Vail, and Farshid Guilak. 2004. "The Role of the Cytoskeleton in the Viscoelastic Properties of Human Articular Chondrocytes." *Journal of Orthopaedic Research* 22 (1): 131–39. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(03\)0150-5](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(03)0150-5).
- Uozumi, Hiroaki, Takehiko Sugita, Toshimi Aizawa, Atsushi Takahashi, Masahiro Ohnuma, and Eiji Itoi. 2009. "Histologic Findings and Possible Causes of Osteochondritis Dissecans of the Knee." *The American Journal of Sports Medicine* 37 (10): 2003–8. <https://doi.org/10.1177/0363546509346542>.

- Vanwanseele, F. Eckstein, H. Knecht, E. Stüssi, and A. Spaepen. 2002. "Knee Cartilage of Spinal Cord-Injured Patients Displays Progressive Thinning in the Absence of Normal Joint Loading and Movement." *Arthritis and Rheumatism* 46 (8): 2073–78. <https://doi.org/10.1002/ART.10462>.
- Vasara, Anna I., Miika T. Nieminen, Jukka S. Jurvelin, Lars Peterson, Anders Lindahl, and Ilkka Kiviranta. 2005. "Indentation Stiffness of Repair Tissue after Autologous Chondrocyte Transplantation." *Clinical Orthopaedics and Related Research* 433 (433): 233–42. <https://doi.org/10.1097/01.BLO.0000150567.00022.2E>.
- Vasiliadis, Haris S, and Jason Wasiak. 2010. "Autologous Chondrocyte Implantation for Full Thickness Articular Cartilage Defects of the Knee." *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2010 (10). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003323.PUB3>.
- Višňa, P., L. Paša, I. Čižmář, R. Hart, and J. Hoch. 2004. "Treatment of Deep Cartilage Defects of the Knee Using Autologous Chondrograft Transplantation and by Abrasive Techniques--a Randomized Controlled Study." *Acta Chirurgica Belgica* 104 (6): 709–14. <https://doi.org/10.1080/00015458.2004.11679648>.
- Wagner, Wolfgang, Simone Bork, Günther Lepperdinger, Sylvia Jousen, Nan Ma, Dirk Strunk, and Carmen Koch. 2010. "How to Track Cellular Aging of Mesenchymal Stromal Cells?" *Aging* 2 (4): 224–30. <https://doi.org/10.18632/AGING.100136>.
- Wakitani, S., K. Imoto, T. Yamamoto, M. Saito, N. Murata, and M. Yoneda. 2002. "Human Autologous Culture Expanded Bone Marrow-Mesenchymal Cell Transplantation for Repair of Cartilage Defects in Osteoarthritic Knees." *Osteoarthritis and Cartilage* 10 (3): 199–206. <https://doi.org/10.1053/joca.2001.0504>.
- Wakitani, Shigeyuki, Takahiro Okabe, Shuji Horibe, Tomoki Mitsuoka, Masanobu Saito, Tsuyoshi Koyama, Masashi Nawata, et al. 2011. "Safety of Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation for Cartilage Repair in 41 Patients with 45 Joints Followed for up to 11 Years and 5 Months." *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 5 (2): 146–50. <https://doi.org/10.1002/TERM.299>.
- Widuchowski, W., J. Widuchowski, and T. Trzaska. 2007. "Articular Cartilage Defects: Study of 25,124 Knee Arthroscopies." *The Knee* 14 (3): 177–82. <https://doi.org/10.1016/J.KNEE.2007.02.001>.

- Yanada, S., M. Ochi, K. Kojima, P. Sharman, Y. Yasunaga, and E. Hiyama. 2006. "Possibility of Selection of Chondrogenic Progenitor Cells by Telomere Length in FGF-2-Expanded Mesenchymal Stromal Cells." *Cell Proliferation* 39 (6): 575–84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2006.00397.x>.
- Yanke, Adam B., Annemarie K. Tilton, Nathan G. Wetters, David B. Merkow, and Brian J. Cole. 2015. "DeNovo NT Particulated Juvenile Cartilage Implant." *Sports Medicine and Arthroscopy Review* 23 (3): 125–29. <https://doi.org/10.1097/JSA.0000000000000077>.
- Yellin, Joseph L., Itai Gans, James L. Carey, Kevin G. Shea, and Theodore J. Ganley. 2017. "The Surgical Management of Osteochondritis Dissecans of the Knee in the Skeletally Immature: A Survey of the Pediatric Orthopaedic Society of North America (POSNA) Membership." *Journal of Pediatric Orthopaedics* 37 (7): 491–99. <https://doi.org/10.1097/BPO.0000000000000696>.
- Zaim, Merve, Serap Karaman, Guven Cetin, and Sevim Isik. 2012. "Donor Age and Long-Term Culture Affect Differentiation and Proliferation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells." *Annals of Hematology* 91 (8): 1175–86. <https://doi.org/10.1007/S00277-012-1438-X>.
- Zamborsky, Radoslav, and Lubos Danisovic. 2020. "Surgical Techniques for Knee Cartilage Repair: An Updated Large-Scale Systematic Review and Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials." *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 36 (3): 845–58. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2019.11.096>.
- Zhang, W., R. W. Moskowitz, G. Nuki, S. Abramson, R. D. Altman, N. Arden, S. Bierma-Zeinstra, et al. 2007. "OARSI Recommendations for the Management of Hip and Knee Osteoarthritis, Part I: Critical Appraisal of Existing Treatment Guidelines and Systematic Review of Current Research Evidence." *Osteoarthritis and Cartilage* 15 (9): 981–1000. <https://doi.org/10.1016/J.JOCA.2007.06.014>.
- Zimmermann, S, M Voss, S Kaiser, U Kapp, C F Waller, and U M Martens. 2003. "Lack of Telomerase Activity in Human Mesenchymal Stem Cells." *Leukemia* 17 (6): 1146–49. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402962>.

## 14 Přílohy

### 14.1 EudraCT Number:

Trial registration number and date of registration: EudraCT No.: 2018-004067-31; October 18 2018.

### 14.2 Prohlášení

- Experimentální studie byla financována z interního grantového zdroje Krajské zdravotní a.s.
- *Grant Krajské zdravotní a.s. IGA-KZ-2018-1-5, pro období 2018-2020. Název: Využití multipotentních kmenových buněk kostní dřeně v moderní léčbě poranění chrupavky*
- Bioinova a.s. je výrobcem IMP a autor práce byl kompenzován sponzorem jako klinický zkoušející.
- BiCure<sup>®</sup>orthoMSCp IMP je založena na užitém vzoru Bioinova (No. 32739) a patentu (No. 308844).

### 14.3 Obrazová dokumentace jednotlivých kroků operace

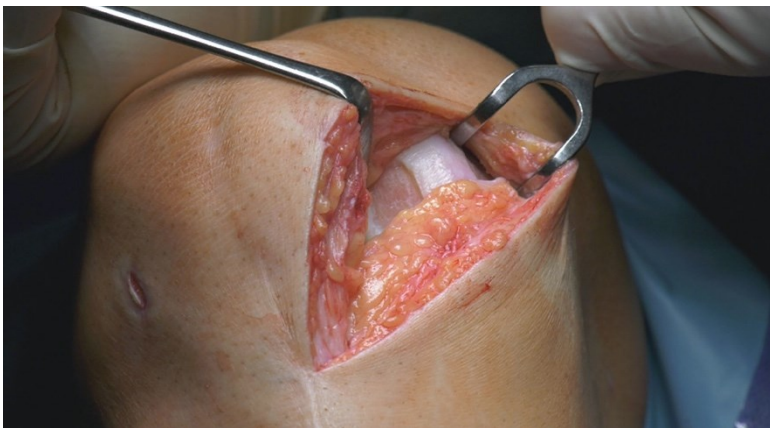
Zdroj: archiv autora



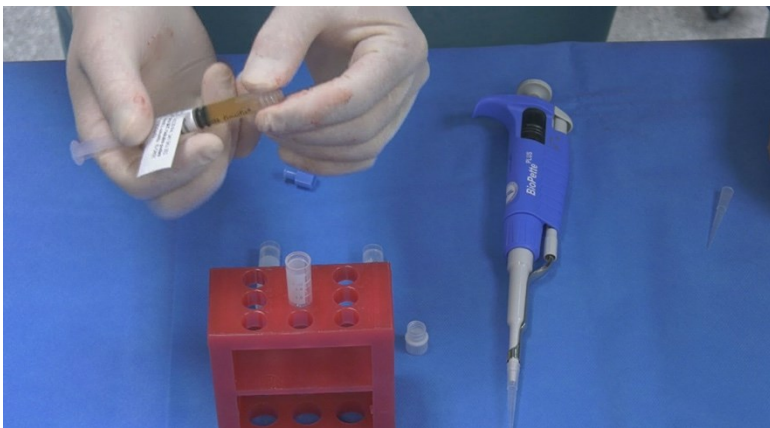
Obr. 1 Diagnostická artroskopie před implantací kultivovaných MSCs.



Obr. 2 Miniartrotomie kolena a debridement defektu chrupavky kyretou.



Obr. 3 Chondrální defekt kondylu femuru, připravený k implantaci nosiče s kultivovanými MSCs.

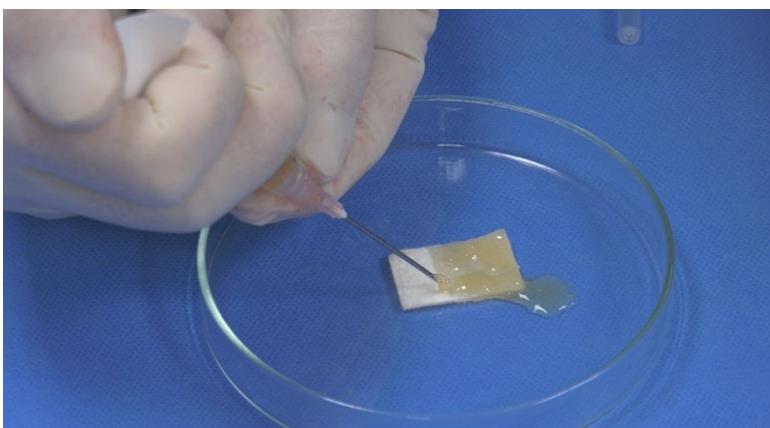


Obr. 4 Přípravek moderní buněčné terapie, suspenze autologních kultivovaných kmenových buněk kostní dřeně (BiCure® orthoMSCp) v autologní PrP (obohacená plazma) na operačním sále v rukou operátora.

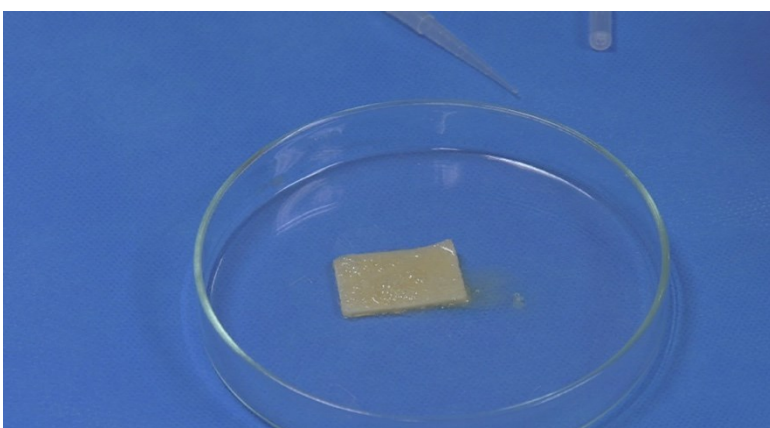




Obr. 5 Pro vyvolání gelovatění, je do suspenze buněk přidán  $\text{CaCl}_2$  (BB Pharma, Prague, Česká republika).



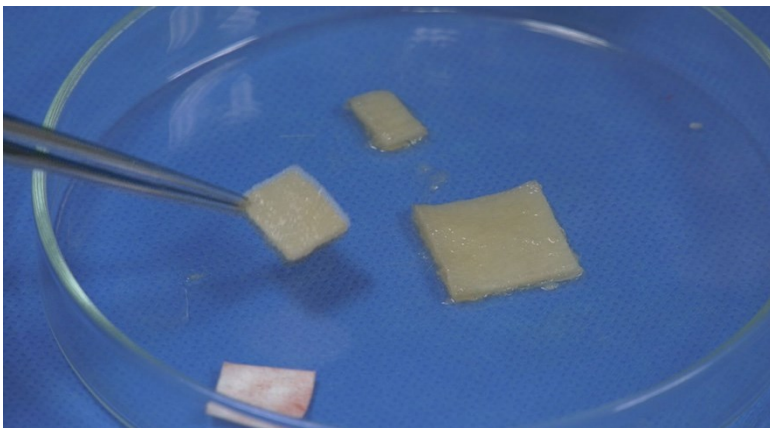
Obr. 6 Aplikace celého objemu suspenze rovnoměrně na  $6 \text{ cm}^2$  proužku Chondrotissue<sup>®</sup> (BioTissue AG, Geneva, Switzerland) a tento byl umístěn na Petriho misku



Obr. 7 Výsledný stav, po 15 min. je dokončeno gelovatění a implantát se suspenzí buněk je připraven k další úpravě do finálního tvaru a velikosti.



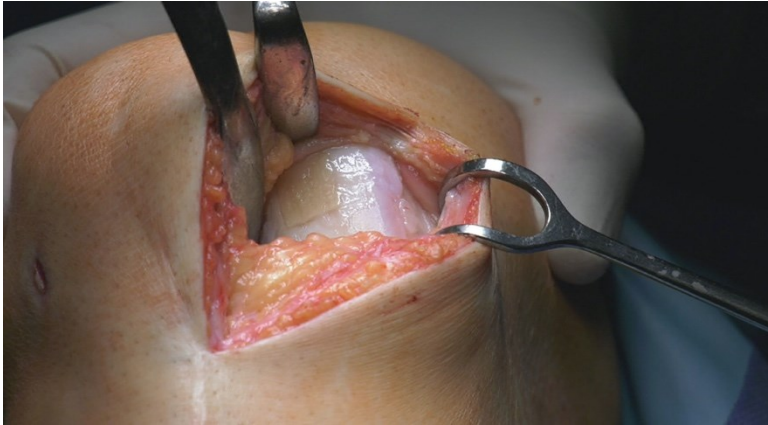
Obr. 8 Příprava vzoru, podle kterého se vyřízne finální tvar a velikost implantátu.



Obr. 9 V pinzetě je finální velikost a tvar implantátu. Na Petriho misce zůstává zbytek Chondrotissue a vzor defektu.



Obr. 10 Aplikace fibrinového lepidla Tisseel fibrin sealant (Baxter, Deerfield, IL, USA) po okrajích defektu.



Obr. 11 Finální fixace implantátu na kondylu femuru. Primární stabilita implantátu *in situ* byla testována několika flexními/ extenzními pohyby kloubu



Obr. 12 Uzávěr operační rány. Kloub byl drénován bez použití aktivního sání na 24 hod od operace.

#### 14.4 Účinnost terapie – dotazníky, data jednotlivých pacientů

Tab. 1 Výsledné hodnoty dotazníků u všech sledovaných pacientů pro KOOS

KOOS																		
Subject	7/5 weeks					6 months					12 months							
	Pain	Symptoms	ADL	Sport	QOL	Average	Pain	Symptoms	ADL	Sport	QOL	Average	Pain	Symptoms	ADL	Sport	QOL	Average
OR02	66,7	82,1	92,7	15,0	18,8	55,0	50,0	46,4	76,5	15,0	25,0	42,6	69,4	85,7	94,1	50,0	37,5	67,4
OR03	36,1	35,7	51,5	20,0	18,8	32,4	36,1	42,9	48,5	25,0	43,8	39,3	52,8	46,4	66,2	20,0	37,5	44,6
OR04	55,6	60,7	45,6	25,0	18,8	41,1	89,3	83,3	82,4	70,0	68,8	78,7	75,0	85,7	73,5	50,0	56,3	68,1
OR05	94,4	92,9	98,5	75,0	75,0	87,2	100,0	100,0	98,5	70,0	93,8	92,5	94,4	96,4	100,0	90,0	87,5	93,7
OR06	36,1	25,0	29,4	0,0	0,0	18,1	57,1	83,3	85,3	NA	12,5	47,6	66,7	43,0	70,6	40,0	37,5	51,6
OR07	69,4	60,7	75,0	35,0	25,0	53,0	96,4	94,4	92,7	70,0	75,0	85,7	97,2	100,0	95,6	85,0	93,8	94,3

Tab. 2 Výsledné hodnoty dotazníků u všech sledovaných pacientů pro Lysholmova skóre

<b>Lysholm Knee Scoring Scale</b>			
Subject	-7/5 weeks	6 months	12 months
OR02	51	57	92
OR03	22	47	75
OR04	50	83	68
OR05	90	94	91
OR06	16	60	56
OR07	89	90	94

Tab. 3 Výsledné hodnoty dotazníků u všech sledovaných pacientů pro VAS

<b>VAS</b>			
Subject	-7/5 weeks	6 months	12 months
OR02	13	80	8
OR03	40	75	52
OR04	67	20	33
OR05	1	2	1
OR06	75	8	30
OR07	10	2	1