

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE BIOMEDICHE: PROGETTO N. 1
“BIOTECNOLOGIE MEDICHE”

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 06/F4

NUOVO SCAFFOLD BIOMIMETICO PER IL
TRATTAMENTO DELLE LESIONI
OSTEOCONDRALE:
STUDIO CLINICO PILOTA

Presentata da: Dr. SILVIO PATELLA

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Marialuisa Zerbini

Prof. Sandro Giannini

Esame finale anno 2012

INDICE	2
INTRODUZIONE	4
CAPITOLO 1	
IL TESSUTO CARTILAGINEO	8
1.1 Generalita'	8
1.2 La biomeccanica della cartilagine articolare	9
CAPITOLO 2	
LE LESIONI CARTILAGINEE	11
2.1 Epidemiologia ed eziologia	11
2.2 Classificazione	14
2.3 Clinica	15
2.4 Diagnosi	16
CAPITOLO 3	
TRATTAMENTO DELLE LESIONI CARTILAGINEE	19
3.1 Trattamenti chirurgici	19
CAPITOLO 4	
TRAPIANTO DI CONDROCITI AUTOLOGHI	21
4.1 Dai primi interventi di trapianto di condrociti autologhi alla nascita della cartilagine bio-ingegnerizzata	21
4.2 Conclusioni	27
CAPITOLO 5	
PRELIEVO DELLA CARTILAGINE E TECNICHE DI IMPIANTO DI HYALOGRAFT C	28
5.1 Innesti osteocondrali compositi bioingegnerizzati	28

<i>5.2 Innovativo scaffold nanostrutturato per il trattamento di difetti osteocondrali.</i>	<i>31</i>
<i>5.3 Studio preclinico su modello animale</i>	<i>34</i>
CAPITOLO 6	
INNOVATIVO SCAFFOLD NANOSTRUTTURATO PER IL TRATTAMENTO DI DIFETTI OSTEOCONDRALE: STUDIO CLINICO PILOTA	36
<i>6.1 Selezione dei pazienti</i>	<i>36</i>
<i>6.2 Metodi valutativi</i>	<i>37</i>
<i>6.3 Tecnica chirurgica</i>	<i>38</i>
<i>6.4 Protocollo riabilitativo</i>	<i>40</i>
<i>6.5 Risultati</i>	<i>41</i>
<i>6.6 Discussione</i>	<i>44</i>
BIBLIOGRAFIA	48

INTRODUZIONE

La ricerca di un efficace trattamento per le lesioni a tutto spessore delle superfici articolari del ginocchio, rappresenta un'importante sfida nell'ambito della chirurgia ortopedica.

Uno studio retrospettivo eseguito da Curl su 31.516 artroscopie di ginocchio, ha mostrato un'incidenza del 63% per lesioni cartilaginee. Nel 41% dei casi presentavano una lesione del III grado di Outerbridge mentre nel 19,2% erano del IV grado. L'età media dei pazienti era di 43 anni e le sedi maggiormente interessate erano il condilo femorale mediale e la patella.¹

Frequentemente il danno cartilagineo ha una natura traumatica ed è stato associato nel 23% dei casi con una lesione del legamento crociato anteriore (LCA) e nel 54% con lassità o instabilità cronica dello stesso.²

Si sostiene inoltre che le lesioni a livello della cartilagine o a quello osteocondrale possano essere degli esiti comuni di un traumatismo acuto o cronico.

È noto che a differenza del tessuto osseo, dotato di grandi capacità rigenerative, la cartilagine ialina è caratterizzata dalla assenza di supporto ematico, linfatico e nervoso, indispensabili per la riparazione tissutale. Infatti, solo le piccole perdite di sostanza vengono colmate da tessuto fibrocartilagineo, mentre quelle di dimensioni maggiori di rado vengono riempite: le lesioni di una certa profondità non hanno possibilità di guarigione spontanea ed a lungo termine progrediscono verso la degenerazione di tipo artrosico della superficie articolare.³

Nessun processo infiammatorio può coadiuvare la riparazione cartilaginea ed i condrociti non possono migrare dal tessuto cartilagineo sano circostante.^{4,5,6} Tutto ciò è legato alla fine architettura della cartilagine articolare, caratterizzata

da piccoli aggregati di condrociti avvolti da una matrice amorfa di sostanza fondamentale che limita le possibilità di collegamento tra di essi.

Negli anni sono state proposte svariate metodiche volte a cercare di ripristinare la porzione di cartilagine articolare danneggiata. Alcune di esse si basavano sulla mobilizzazione passiva continua o su lavaggi endoarticolari senza però rivelarsi efficaci.⁷ Altre tecniche, quali abrasioni, drilling, spongiolizzazioni, perforazioni e microfratture, prevedevano la stimolazione midollare, con lo scopo di facilitare la migrazione delle cellule staminali del midollo osseo nel sito della lesione cartilaginea, stimolando i processi di guarigione.⁸ Con tali trattamenti si otteneva un tessuto di riparazione fibroso o fibrocartilagineo, con collagene di tipo I, fibrociti ed una matrice disorganizzata con caratteristiche biomeccaniche complessivamente diverse dalla cartilagine ialina.^{6, 8, 9} Queste tecniche sono risultate parzialmente soddisfacenti nel controllo del dolore e nel miglioramento della mobilità articolare.

Hangody ha proposto l'utilizzo di innesti osteocondrali autologhi per il trattamento di lesioni singole, sintomatiche, di 4° grado, localizzate a livello della porzione distale del femore. Con tale tecnica è difficile però ottenere la copertura completa del difetto, la stabilità meccanica degli innesti e la ricostruzione di una superficie articolare congruente con la cartilagine sana.

L'utilizzo dell'impianto di condrociti autologhi coltivati in vitro offre un'alternativa alle tecniche precedenti.

L'impiego clinico dei trapianti di condrociti autologhi è iniziato in Svezia nel 1987 ad opera di Brittberg ed al. per trattare i pazienti con sintomatologia cronica causata da lesioni della cartilagine articolare pubblicando risultati a 10 aa di follow-up.⁸

Oltre alle difficoltà connesse alla procedura chirurgica dobbiamo aggiungere quelle legate alla difficoltà di maneggiare la coltura dei condrociti in soluzione liquida e delicata. Per risolvere questi problemi sono stati sviluppati ACI di seconda generazione che usano tecniche di ingegneria tessutale per creare tessuto similcartilagineo in un sistema colturale tridimensionale. L'utilizzo di scaffolds tridimensionali per le colture cellulari in chirurgia open permette già una riduzione dell'esposizione dell'articolazione poiché evita il rivestimento periostale e la sutura. In più per alcuni scaffolds^{10,11,12,13} sono state sviluppate tecniche di impianto artroscopiche. L'applicazione clinica di questo approccio di ingegneria tessutale di seconda generazione è ben documentato per diversi tipi di scaffolds con una valutazione dell'outcome clinico con follow-up a breve – medio termine.

Il trattamento di lesioni di grandi dimensioni, di tipo degenerativo o di difetti osteocondrali è ancor più problematico per il chirurgo ortopedico in quanto coinvolge 2 tessuti, l'osso e la cartilagine, con diverse caratteristiche biochimiche e biomeccaniche. I progressi fatti dalla scienza dei materiali, nella biologia cellulare e nelle nano-tecnologie hanno permesso lo sviluppo di diversi metodi di assemblaggio degli innesti osteocondrali compositi bioingegnerizzati. Seguendo questo rationale il nostro gruppo ha sviluppato un nuovo biomateriale: uno scaffolds osteocondrale costituito da fibre collagene di tipo I nucleate con nano particelle di idrossiapatite in tre diversi gradienti: il primo strato costituito da sole fibre collagene di tipo I, il secondo dal 40% di idrossiapatite e dal 60% di collagene ed il terzo dal 70% di idrossiapatite e dal 30 % di collagene.

Dopo aver eseguito uno studio preclinico su animale (pecore) che ha dimostrato le potenzialità di questo composto

biomimetico nella rigenerazione osteocartilaginea, abbiamo eseguito, in conformità con le norme italiane ed europee vigenti, uno studio pilota su 30 pazienti dei quali abbiamo analizzato l'outcome ad un anno di follow up con risultati molto promettenti.

CAPITOLO 1

IL TESSUTO CARTILAGINEO

1.1 GENERALITÀ

Il tessuto cartilagineo, come il tessuto osseo, appartiene ai tessuti connettivi di sostegno. La cartilagine rappresenta un tessuto connettivo specializzato con le seguenti caratteristiche: presenta cellule di un solo tipo, dette condrociti; ha la sostanza fondamentale amorfa allo stato di *gel*, il che le conferisce una consistenza duro-elastica.¹⁴ Nei mammiferi adulti, la cartilagine ha una limitata distribuzione, mentre nei mammiferi giovani essa è più diffusa poiché forma il modello per la maggior parte dello scheletro osseo in via di sviluppo.^{14,}

15

Il tessuto cartilagineo non possiede nervi, né vasi sanguinei e linfatici ed è rivestito, ad eccezione delle superfici articolari, in modo permanente, da una membrana fibrosa vascolarizzata detta pericondrio.¹⁶ Possiede un trofismo poco attivo e lo scambio di metaboliti tra i condrociti e i tessuti circostanti dipende dalla diffusione di materiale anabolico attraverso i capillari sanguinei posti nel pericondrio. La cartilagine articolare, invece, si nutre prevalentemente per imbibizione dal liquido sinoviale, il cui ricambio attraverso la cartilagine stessa sarebbe favorito, nelle articolazioni portanti, dall'azione di pompa che si attua durante la funzione articolare per l'alternarsi delle pressioni e decompressioni.¹⁷

In base alla distribuzione quantitativa delle fibre collagene ed elastiche presenti nella sostanza fondamentale, possiamo distinguere tre forme diverse di tessuto cartilagineo: ialino, fibroso ed elastico; la cartilagine ialina è il più diffuso tra i tessuti cartilaginei.

1.2 LA BIOMECCANICA DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE¹⁹

La composizione biochimica della cartilagine articolare, rispecchia la sua peculiare funzionalità nel dissipare accuratamente le sollecitazioni dei movimenti scheletrici (fig.1).

Le fibre collagene si dispongono in modo da formare una rete a maglie tridimensionali che offrono un sistema per l'assorbimento e la neutralizzazione delle forze vettoriali di trazione e di taglio.

I proteoglicani sfruttano le loro caratteristiche viscoelastiche per controllare l'armatura fibrosa della cartilagine articolare e mutare il proprio stato, da gel a sol, a seconda delle sollecitazioni biomeccaniche di tipo compressivo.

I glicosaminoglicani, rappresentati dai condroitin solfati e dal cheratan solfato, intervengono nella neutralizzazione e rimozione delle forze di attrito e di frizione, presenti negli strati superficiali della cartilagine articolare.

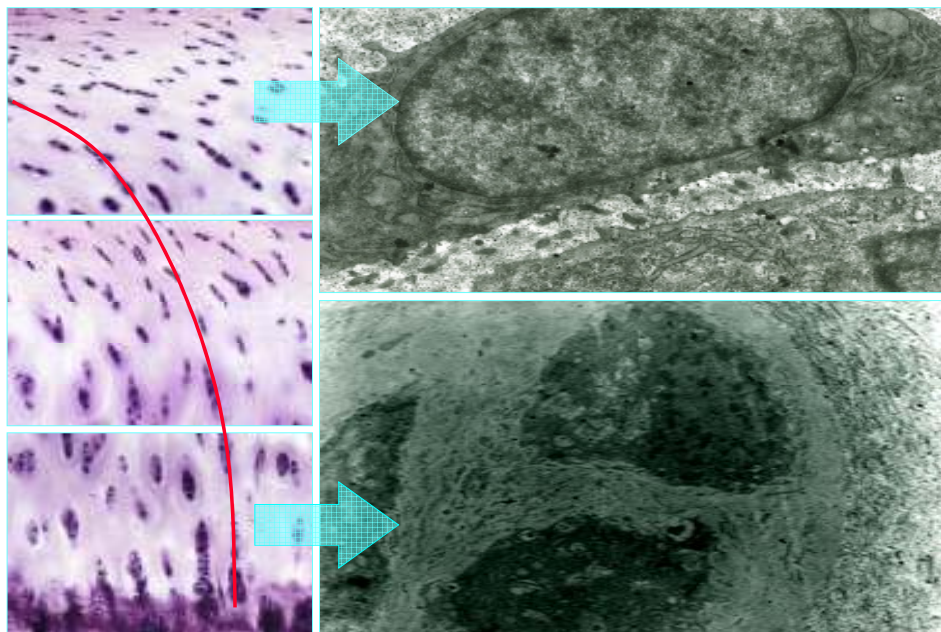


Fig. 1: Struttura della cartilagine articolare¹⁸.

Una lettura in chiave biochimica della cartilagine articolare, consente tuttavia di poter correlare l'attività biomeccanica non soltanto alla sua organizzazione, ma anche al suo importante ruolo nel controllo e nel mantenimento dello stato differenziato del tessuto articolare.

Ciò è dimostrato dal fatto che l'attività motoria può influenzare direttamente l'attività biochimica attraverso un attento controllo del metabolismo e della fisiologia articolare. Innesti periosteali, se sottoposti in vivo a definiti stimoli biomeccanici, possono andare incontro ad un processo differenziativo che porta alla formazione di cartilagine ialina. Questo fenomeno si verifica grazie alla presenza di cellule totipotenti indifferenziate nello strato osteogeno di Ollier nel periostio.

Salter in un modello sperimentale, ha impiantato un innesto periosteale, prelevato dalla superficie anteriore della tibia, nella troclea femorale, dalla quale viene asportato un segmento di cartilagine delle stesse dimensioni del trapianto. Nell'immediato post-operatorio, gli animali vengono sottoposti per 4 settimane alla *continuous passive motion* (CPM). L'esperimento ha mostrato la formazione di cartilagine ialina nel punto in cui è stato effettuato l'impianto.

Attualmente si può soltanto ipotizzare che gli stimoli biomeccanici possano favorire la produzione di particolari fattori di crescita a noi ancora sconosciuti.

CAPITOLO 2

LE LESIONI CARTILAGINEE

2.1 EPIDEMIOLOGIA ED EZIOLOGIA

Le lesioni a livello della cartilagine articolare possono essere isolate oppure associate ad altre patologie.

Le lesioni cartilaginee isolate sono causate di solito da traumi di lieve entità e la loro diagnosi è resa possibile dall'esame artroscopico.²⁰

Studi eseguiti da Noyes et al.²¹, Casteleyen et al.²², e Dehaven²³ hanno evidenziato, indipendentemente, l'associazione tra lesioni cartilaginee e l'emartro acuto del ginocchio. In questi pazienti l'incidenza del danno alla cartilagine variava dal 6 al 20%.

Il tipo di lesione sembra essere correlato con l'età: su 76 ginocchia esaminate, si è visto che le lesioni a tutto spessore erano più frequenti nella terza decade, quelle parziali nella quarta, mentre le fratture osteocondrali nell'adolescenza.²⁴

Curl et al. hanno evidenziato, in 31.516 artroscopie di ginocchio, che le lesioni a livello della cartilagine articolare erano presenti nel 63% dei casi. Nel 41% appartenevano al III° grado (profondità maggiore del 50% dello spessore della cartilagine) e nel 19,2% al IV° grado (lesione a tutto spessore) e l'età media era di 43 anni. Le sedi maggiormente coinvolte erano il condilo femorale mediale e la patella.

Molti meccanismi traumatici che causano le lesioni cartilaginee, provocano allo stesso tempo lesioni meniscali e legamentose.

In uno studio su 14 pazienti, si è notato che 13 presentavano delle lesioni alla cartilagine articolare, associate a lesioni

meniscali dallo stesso lato; ciò sembra dipendere dal fatto che le lesioni del menisco portino secondariamente ad un danno alla cartilagine articolare.²⁵

Inoltre le lesioni della cartilagine sono state associate nel 23% dei casi a lesione del legamento crociato anteriore (LCA) e nel 54% a lassità o instabilità dello stesso.²

Engebresten et al. e Spindler et al. hanno presentato una casistica superiore all'80% dove alla lesione acuta del LCA si associa un *bone bruise* del condilo al controllo RMN.^{26, 27}

Lesioni cartilaginee possono associarsi anche a lesioni del legamento crociato posteriore (LCP). Quando si hanno delle lesioni croniche del LCP, spesse volte le sedi della localizzazione del danno cartilagineo sono il compartimento mediale e femoro rotuleo.^{28, 29}

Infine altre condizioni che possono determinare un danno cartilagineo sono: l'età, l'immobilizzazione, precedenti interventi chirurgici a livello articolare e farmaci come i corticosteroidi e gli antinfiammatori non steroidei (FANS).^{30, 31, 32, 33}

Molti pazienti che presentano lesioni croniche della cartilagine, riferiscono pregressi traumatismi a livello articolare che possono aver causato il danno articolare che, a suo tempo, era passato inosservato.

È difficoltoso correlare un trauma con la lesione cartilaginea basandosi solo sulla storia clinica, sull'esame obiettivo e sulle radiografie. L'uso della risonanza magnetica nucleare (RMN) e soprattutto dell'artroscopia offre notevoli facilitazioni nella diagnosi delle lesioni della cartilagine.

De Haven ha evidenziato con l'artroscopia un 6% di lesioni osteocondrali in ginocchia con emartri acuti.³⁴

Lesioni osteocondrali sono state diagnosticate artroscopicamente da Boberg e Mc Ginty nel 18% di pazienti con ematridi posttraumatici.³⁵

Vellet ha trovato che lesioni del legamento crociato insieme ad ematridi acuti erano associate nel 78% delle ginocchia a fratture occulte subcorticali. Tali fratture, dette anche bone bruises, interessano la parte trabecolata dell'osso subcorticale e sono secondarie a traumi. In base al loro aspetto tali fratture possono essere classificate come segue: reticolari, geografiche o lineari.

Le lesioni geografiche sono state giudicate importanti perché gli esiti osteocondrali sono risultati evidenti nel 63% dei controlli radiografici eseguiti a 6 e 12 mesi dall'evento traumatico. L'osso trabecolare può essere in grado di guarire, ma il tessuto cartilagineo articolare va incontro a condrolisi proporzionalmente alla forza e distribuzione del trauma.³⁶

L'artroscopia e la RMN hanno sensibilmente migliorato la diagnosi e permettono una più precisa analisi della profondità, estensione e localizzazione della lesione cartilaginea e del danno subcondrale conseguente al trauma acuto.

Utilizzando queste informazioni, una valutazione prospettica può aiutare a trovare delle correlazioni tra trauma articolare e lo sviluppo successivo delle alterazioni della cartilagine.

La lesione del LCA può giocare un ruolo importante nello sviluppo di lesioni croniche della cartilagine.

Diversi autori hanno riportato delle associazioni tra la lesione cartilaginea e lesione del crociato anteriore.^{37, 38, 39}

Concludendo, si può considerare il processo degenerativo di tipo artrosico, come un evento ad eziologia multifattoriale in cui danni meniscali e lassità dei legamenti crociati svolgono un ruolo di notevole rilevanza.

2.2 CLASSIFICAZIONE

Vi sono numerose classificazioni per le lesioni della cartilagine.^{40, 41, 42, 43, 57}

Tra le classificazioni quella più utilizzata è quella di Outerbridge.⁴⁴ Essa permette una valutazione della profondità e del diametro della lesione. Prevede la presenza di quattro gradi a gravità crescente.

Il *grado 1* comprende la cartilagine molle ed edematosa.

Il *grado 2* include difetti non a tutto spessore con fissurazioni della superficie che non raggiungono l'osso subcondrale e il diametro non supera 1,5 cm.

Il *grado 3* comprende lesioni che raggiungono l'osso subcondrale con un diametro superiore a 1,5 cm.

Infine nel *grado 4* vi è l'esposizione dell'osso subcondrale.
(Fig. 2)

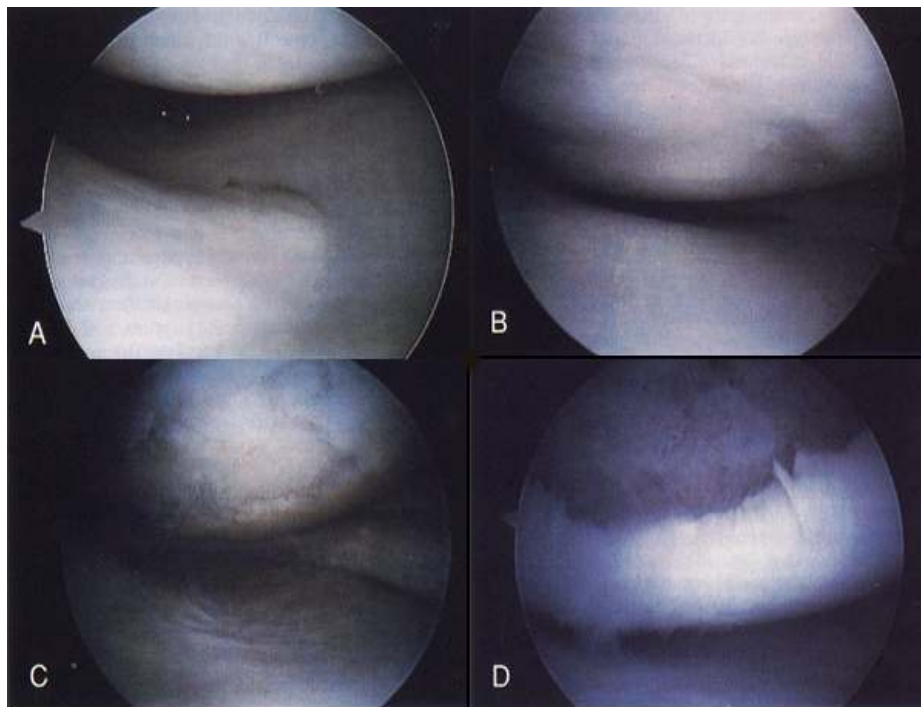


Fig. 2: Classificazione di Outerbridge delle lesioni cartilaginee: A: Grado 1; B: Grado 2; C: Grado 3; D: Grado 4

Nel 1989 Noyes ha proposto una classificazione delle lesioni della cartilagine basandosi sull'aspetto artroscopico.⁴⁵ In questa classificazione si prende in esame il diametro, la sede e la profondità della lesione.

Il grado 1 comprende le lesioni con rammollimento della cartilagine sollevata o non sollevata.

Il grado 2 comprende le lesioni che presentano una fissurazione della superficie articolare, distinto in 2°, in cui la fissurazione non supera il 50 % dello spessore della cartilagine e 2B che la supera.

Il grado 3 viene diviso a sua volta in grado 3A, in cui si ha un'esposizione dell'osso subcondrale mentre 3B comprende i veri e propri difetti osteocondrali.

2.3 CLINICA

Le lesioni osteocondrali non presentano una sintomatologia caratteristica. Il dolore a livello dell'articolazione interessata è solitamente di tipo sordo.

L'origine del sintomo dolore sembra correlato con la perdita di cartilagine della superficie articolare che porta ad un'alterazione della funzione di assorbimento delle sollecitazioni meccaniche. In tale modo l'osso subcondrale viene sottoposto a pressioni elevate con stimolazione dei recettori delle terminazioni nervose a livello periarteriolare. Con il tempo, l'osso può andare incontro a dei fenomeni di tipo degenerativo che si ripercuotono sull'emodinamica del condilo; ciò può dar luogo ad una sensazione di dolore acuto e di fastidi all'articolazione. Parallelamente a ciò, la rottura della cartilagine rilascia enzimi e metaboliti che provocano una sinovite dolorosa ed eventualmente una distensione della capsula articolare.

Il dolore può essere percepito indistintamente sia durante che dopo l'attività fisica ed essere o localizzato o diffuso.

Delle lesioni abbastanza vaste e/o numerose, possono limitare i pazienti sia nell'attività sportiva come anche nelle attività della vita quotidiana.⁴⁶

Hubbard ha evidenziato una correlazione tra la sede della lesione condrale ed il tipo di sintomatologia. Lesioni a livello della femoro-rotulea scaturiscono un dolore anteriore e nessun sintomo di instabilità, mentre lesioni della regione posteriore del condilo del femore possono dare instabilità.⁴⁷

Oltre al dolore possono rendersi manifesti dei segni quali il gonfiore dell'articolazione interessata, scrosci, blocchi, instabilità e versamento intrarticolare. Questi segni obiettivi sono tipici delle lesioni meniscali ma si possono presentare anche nelle lesioni della cartilagine articolare; ciò deve essere tenuto in adeguata considerazione.

Terry et al. hanno riscontrato che il versamento intrarticolare era presente nell'81% dei pazienti con lesioni osteocondrali.⁴⁶

All'esame obiettivo il paziente può lamentare un dolore in corrispondenza dell'interlinea articolare.

Segni poco specifici possono essere il dolore al condilo femorale interessato oppure un'atrofia della componente muscolare della coscia.

2.4 DIAGNOSI

Un paziente con una storia di sintomi quali dolore all'articolazione del ginocchio, scrosci, blocchi e versamenti, fanno sospettare la presenza di un danno a livello della cartilagine articolare.

La *radiologia convenzionale* è il primo esame da eseguire nelle lesioni acute e croniche della cartilagine articolare; anche se è incapace di visualizzare direttamente la cartilagine, è sempre attuale e non deve essere trascurata per le preziose informazioni indirette che ci può fornire; inoltre, è una indagine a basso costo, di semplice esecuzione e con bassa esposizione a sorgenti ionizzanti. Non è assolutamente un'indagine obsoleta, ma il primo approccio nell'iter diagnostico di una lesione cartilaginea.

La *tomografia computerizzata* (TAC) non consente una diretta visualizzazione della cartilagine se non dopo iniezione di mezzo di contrasto. L'avvento di tecniche non invasive, di più rapida esecuzione e di miglior visualizzazione topografica dell'area indagata ha, da tempo, fatto abbandonare tale metodica diagnostica.

La *risonanza magnetica nucleare* (RMN), con il suo superiore contrasto nello studio delle parti molli e le capacità di studio multiplanare, ha risolto molti problemi nell'imaging della cartilagine articolare. Infatti la RMN può fornire, in modo non invasivo, informazioni sia morfologiche che biochimiche sullo stato della cartilagine. Le informazioni morfologiche fornite dalla RMN includono sia le lesioni focali o diffuse della cartilagine - che possono anche essere evidenziate da altre tecniche, ma invasive, quali l'artroscopia - che le informazioni riguardanti lo spessore, il volume e la morfologia tridimensionale della cartilagine. Le informazioni biochimiche sono rappresentate dalla possibilità di conoscere il contenuto di acqua, di proteoglicani, di collagene e di sodio.

Sia le sequenze pesate in T1 che in T2 sono utili per lo studio di lesioni che interessino la morfologia della superficie cartilaginea, perché la cartilagine ha un'alta intensità di segnale relativamente al liquido articolare nelle immagini in

T1-pesate e bassa intensità di segnale, relativamente al liquido sinoviale nelle sequenze in T2-pesate.

Nonostante la RMN abbia sensibilmente migliorato la diagnosi delle lesioni, potrebbe ancora sotto/sopravalutarle a causa della loro sensibilità e specificità. La letteratura riporta dei valori che oscillano tra il 75% e il 93%.⁴⁷ (Fig. 3)

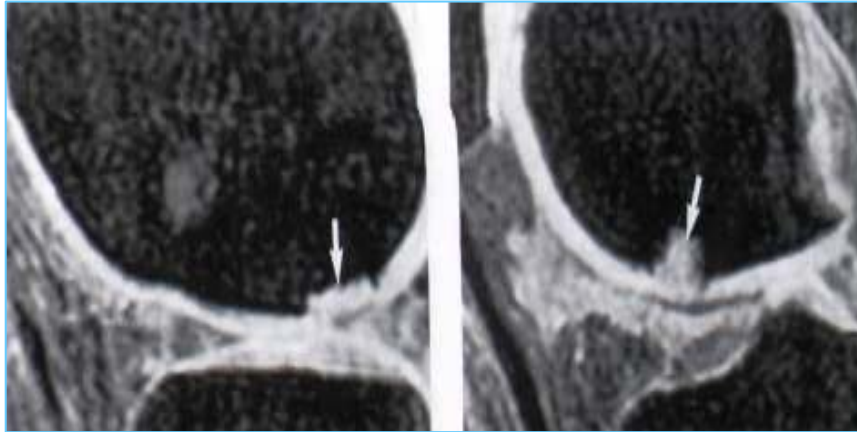


Fig. 3: RMN di lesione cartilaginea del condilo femorale

L'esame artroscopico rimane attualmente il gold standard per la valutazione della superficie articolare.

CAPITOLO 3

TRATTAMENTO DELLE LESIONI CARTILAGINEE

3.1 TRATTAMENTI CHIRURGICI

I trattamenti chirurgici si avvalgono di diverse tecniche alcune delle quali possono riparare la lesione cartilaginea mentre altre hanno come obiettivo la ricostruzione del sito danneggiato.^{48, 51, 52, 54, 55, 56}

Tra le prime possiamo ricordare il debridement o il lavaggio articolare, lo shaving e le tecniche di stimolazione midollare quali le perforazioni, le abrasioni e le microfratture.

Tra le seconde sono da menzionare le tecniche di ricostruzione del difetto cartilagineo con materiale autologo: il trapianto osteocondrale massivo, la mosaicoplastica, il trapianto di pericondrio o periostio ed infine il trapianto di condrociti autologhi.

Trattamenti senza ricostruzione del difetto

o tecniche riparative:

-Debridement o il lavaggio articolare^{49, 53}

-Shaving⁵⁰

-Perforazioni⁵⁷

-Abrasioni^{58, 59, 60, 61, 62}

-Microfratture^{63, 64}

Trattamenti con ricostruzione del difetto:

1) con materiale autologo

-Trapianto osteocondrale massivo^{65, 66, 67}

-Mosaicoplastica^{68, 69}

-Trapianto di pericondrio o periostio^{70, 71, 73, 74, 75}

-Trapianto di condrociti autologhi^{72, 76, 77}

2) con materiale omologo o sintetico:

-Omotrapianti cartilaginei o osteocartilaginei

-Fibre di carbonio

-Polimeri

Le tecniche riparative sono indicate nelle lesioni della cartilagine articolare del I, II, e III grado di Outerbridge.

Il trattamento delle lesioni di notevole dimensione del III e IV di Outerbridge e le gravi perdite osteocondrali, sono le indicazioni più significative per l'utilizzo di metodiche atte alla ricostruzione del difetto.

CAPITOLO 4

TRAPIANTO DI CONDROCITI AUTOLOGHI

4.1 DAI PRIMI INTERVENTI DI TRAPIANTO DI CONDROCITI AUTOLOGHI, ALLA NASCITA DELLA CARTILAGINE BIO-INGEGNERIZZATA

L'utilizzo dei trapianti di condrociti autologhi è iniziato nei primi anni del '80.

Numerosi studi hanno dimostrato la possibilità di stimolare la riproduzione di condrociti in vitro⁷⁶ e studi su animali hanno dimostrato la produzione di tessuto di riparazione simil-ialino, dopo che le colture di condrociti venivano impiantate.⁹

Nel 1987, in Svezia, Brittberg et al. hanno iniziato dei *trials* clinici sull'uomo per trattare le lesioni sintomatiche a tutto spessore della cartilagine articolare del ginocchio, con i condrociti autologhi ed il lembo periostale.

I primi risultati clinici sono stati pubblicati nel 1994 e hanno dato degli esiti molto soddisfacenti, con esami bioptici che rivelavano la presenza di un tessuto di riparazione simil-ialino.

Da quando è stato introdotto in Svezia, il trapianto di condrociti autologhi ha ottenuto un'attenzione sempre maggiore come tecnica di ricostruzione delle lesioni cartilaginee.

Nel 1998 al *Congresso Annuale dell'American Academy of Orthopedic Surgeons*, il Dr. Lars Peterson ha presentato i risultati a 2-10 anni in 219 pazienti trattati con questa tecnica, sostenendo il miglioramento del quadro clinico nell' 89% dei casi con lesioni isolate dei condili femorali, nel 74% in caso di lesione del condilo femorale associata alla lesione del legamento crociato anteriore (LCA), nell' 84% in caso di osteocondrite dissecante , e nel 69% delle condropatie rotulee.

Gli studi di Minas⁷⁷ confermano una buona percentuale di risultati incoraggianti a 12 e 24 mesi dall'intervento.

Più recentemente Peterson⁹ ha mostrato dei risultati clinici a più lunghi tempi di follow-up dopo l'impianto di condrociti autologhi. Infatti dopo 2 anni 50 pazienti su 61 avevano ottenuto risultati buoni od eccellenti e, dopo un periodo di follow-up più lungo, compreso tra 5 e 11 anni, i risultati clinici soddisfacenti erano ancora di 51 su 61. Una valutazione artroscopica dell'area innestata, ha mostrato che nel 90% dei casi la cartilagine aveva una consistenza simile a quella sana.

I risultati clinici proposti hanno dimostrato che i pazienti in grado di ritornare ad un livello normale di attività vanno dall'84% al 91%.

Sgaglione⁷⁸ ha affermato che l'impianto di condrociti autologhi è un trattamento sicuro, efficace e riproducibile, che deve essere considerato come un'opzione per il trattamento delle lesioni della cartilagine con dimensioni maggiori di 2 cm² in pazienti giovani che vogliono riprendere un buon livello di attività.

Il trapianto di condrociti autologhi rappresenta sicuramente uno strumento terapeutico molto interessante, non però privo di notevoli svantaggi.

La sospensione liquida di condrociti in coltura non è facile da maneggiare durante la procedura chirurgica, e necessita di un *lembo periostale* come copertura, che rende senza dubbio più indaginoso la procedura. La sutura del lembo periostale è una procedura chirurgica difficile e lunga (Fig. 4) e necessita la realizzazione di un'ampia esposizione dell'articolazione con un rischio maggiore di complicanze quali rigidità articolare o artrofibrosi ed infezioni.

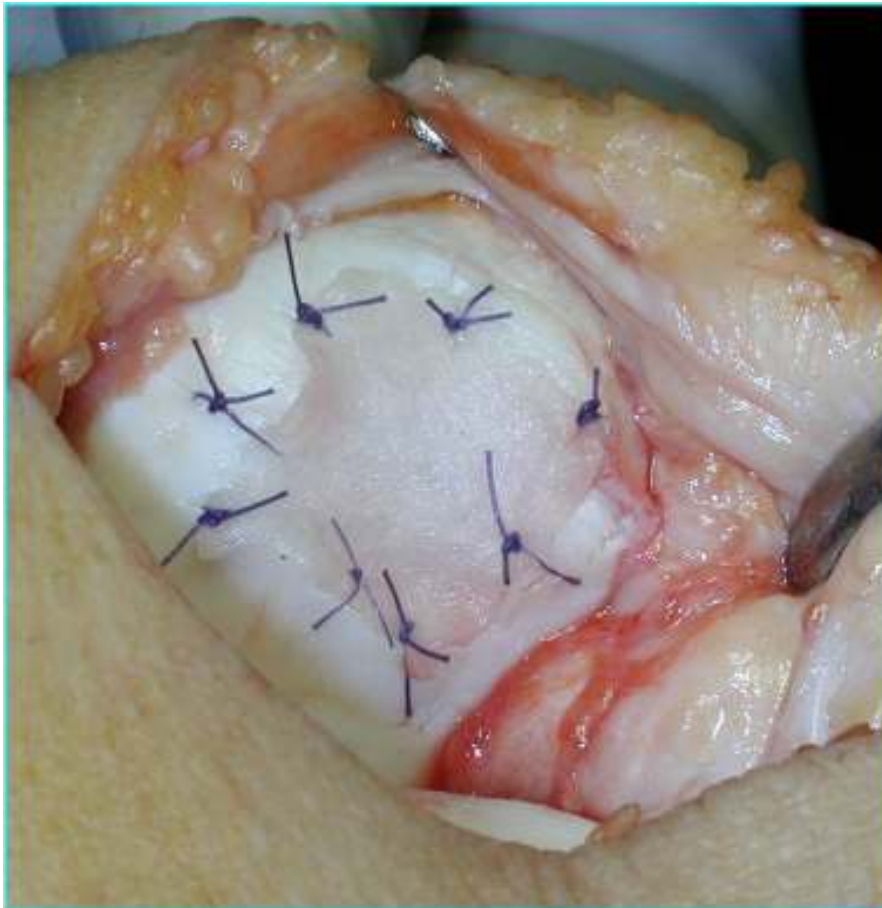


Fig. 4: Tecnica chirurgica di Impianto di Condrociti Autologhi e sutura di flap periostale di copertura alla cartilagine circostante: visualizzazione intraoperatoria.

Micheli et al nel 2001⁷⁹ e più recentemente altri Autori^{80, 81, 82} hanno registrato la necessità di reintervento per rigidità articolare nel 42% dei casi.

L'ipertrofia del lembo periostale rappresenta una frequente complicanza di questo tipo di trattamento che spesso necessita di un reintervento.^{80, 81, 82}

Un'ulteriore difficoltà di questa procedura è legata alla creazione di una pressione negativa all'interno della tasca sotto il lembo periostale, che eviti la fuoriuscita della soluzione liquida della coltura dei condrociti durante le prime fasi della mobilizzazione dell'arto e la ripresa graduale del carico.

Oltre alle difficoltà connesse alla procedura chirurgica dobbiamo aggiungere quelle legate alla difficoltà di

maneggiare la coltura dei condrociti in soluzione liquida e delicata.

Si è notato, inoltre, che il mantenimento del fenotipo tipico del condrocita risulti critico durante una prolungata crescita in coltura in monostrato. In queste condizioni i condrociti tendono a perdere la loro capacità di produrre sostanza fondamentale amorfa e collagene di tipo II.⁶

Un altro problema riguarda la distribuzione tridimensionale che le cellule vanno ad assumere nell'area del difetto cartilagineo.⁶

Per risolvere questi problemi sono stati sviluppati ACI di seconda generazione. Gli ACI di seconda generazione usano tecniche di ingegneria tessutale per creare tessuto similcartilagineo in un sistema colturale tridimensionale con l'obiettivo di superare tutte le complicità correlate alla coltura cellulare e alle tecniche chirurgiche.

Essenzialmente, il concetto si basa sull'utilizzo di scaffolds polimerici temporanei e biodegradabili per la crescita in vitro di cellule vitali che poi vengono successivamente impiantate nel sito della lesione. Mentre i condrociti in colture cellulari bidimensionali alterano il loro fenotipo e si differenziano in cellule fibroblastiche che non possiedono a lungo la capacità di produrre collagene tipo II e proteoglicani⁸³, è stato dimostrato che l'utilizzo di scaffolds tridimensionali favorisce il mantenimento di un fenotipo differenziato^{84, 85, 86} di condrociti.

Alcune proprietà fondamentali di questi scaffolds includono la biocompatibilità e la biodegradabilità attraverso vie biochimiche sicure ad intervalli di tempo adeguati. Scaffolds solidi sono provvisti di un substrato sul quale le cellule possono aderire mentre la funzione degli scaffolds di gel è quella di intrappolare fisicamente le cellule. Scaffolds

composti di materiali naturali o sintetici in una varietà di forme fisiche (fibre, maglie, gel) sono stati applicati nella fabbricazione del tessuto cartilagineo. I materiali sintetici comunemente usati sono i polilattidi come l'acido polilattico (PLA) e quello poliglicolico (PGA). Le proprietà meccaniche e la degradazione di biomateriali sintetici sono più comunemente modificate rispetto ai polimeri naturali ma la degradazione dei loro prodotti potrebbe causare danni al tessuto nativo ed alle cellule impiantate. Comunque la nuova forma chimica di questi materiali ha migliorato le loro biocaratteristiche e la biocompatibilità.⁸⁷ I materiali naturali utilizzati per produrre gli scaffolds includono agarosio, alginato, acido ialuronico, gelatina, colla di fibrina, derivati del collagene e matrice di collagene acellulare. Questi hanno biocompatibilità impeccabile, possono essere processati in modo affidabile e riproducibile e potrebbero promuovere la performance cellulare. Matrici comunemente utilizzate nella pratica clinica in Europa sono a base di collagene o acido ialuronico. Negli USA non vi è ancora approvazione della FDA per il trapianto di condrociti matrix-assisted nell'uomo.

L'utilizzo di scaffolds tridimensionali per le colture cellulari in chirurgia open permette già una riduzione di esposizione dell'articolazione poiché evita il rivestimento periostale e la sutura. In più per alcuni scaffolds^{10, 11, 12, 13} sono state sviluppate tecniche di impianto artroscopiche. L'applicazione clinica di questo approccio di ingegneria tessutale di seconda generazione è ben documentato per diversi tipi di scaffolds con una valutazione dell'outcome clinico con follow-up a breve e medio termine. Purtroppo gli studi che riportano risultati ad un follow up maggiore sono ancora pochi a causa del recente sviluppo di queste tecniche e della loro reale applicazione clinica iniziata alla fine degli anni novanta.^{13, 88, 89, 90, 91, 92}

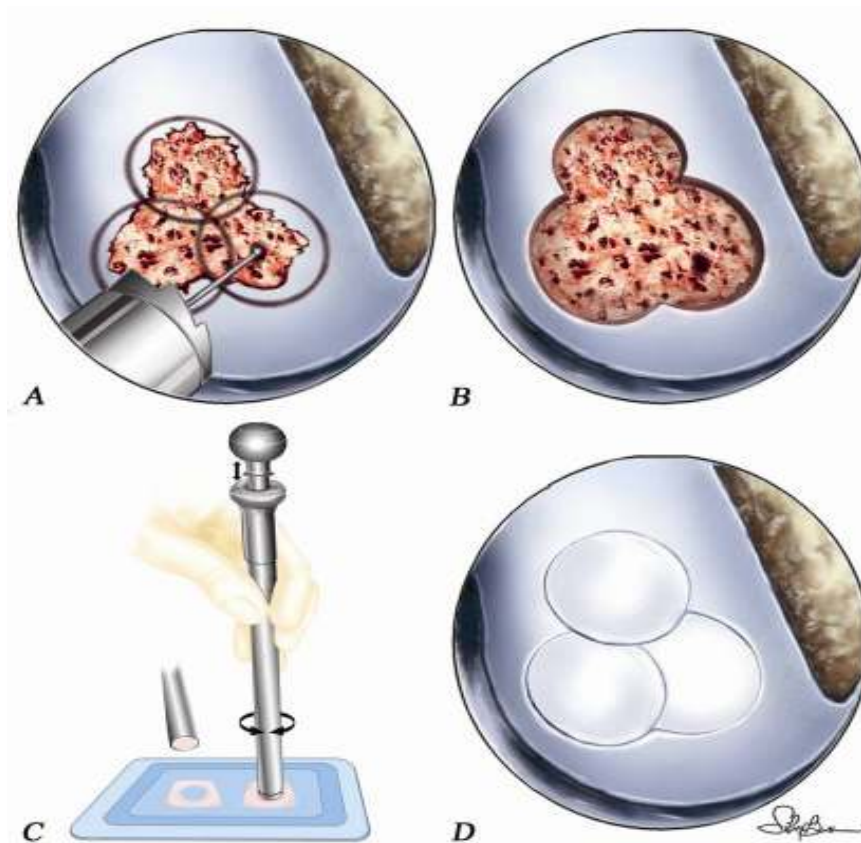


Fig. 5: Schema tecnica chirurgica per impianto artroscopico di ACI di seconda generazione (Hyalograft C) con strumentario dedicato: A-B preparazione del sito di lesione; C prelievo di condrociti dal supporto a base di acido ialuronico; D impianto di condrociti nel sito di lesione



Fig. 6: Visualizzazione intraoperatoria di impianto artroscopico di Hyalograft C: innesto prima e dopo il rilascio del tourniquet

4.2 CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati pubblicati, l'impianto di condrociti autologhi su scaffold tridimensionale garantisce risultati comparabili con la tecnica ACI tradizionale, ma riduce la morbilità della procedura ed evita l'uso di un flap periostale con vantaggi sia da un punto di vista biologico che chirurgico. I migliori risultati sono stati riportati per le lesioni post traumatiche in giovani pazienti attivi. Nel trattamento dei difetti cartilaginei articolari devono essere corrette comorbidity significative come danni meniscali, lassità ligamentose e malallineamenti dell'articolazione tibio-femorale o patello-femorale. Pochi studi riportano i risultati circa il trattamento di lesioni cartilaginee dell'articolazione patello-femorale con ACI di seconda generazione, ma i risultati sembrano essere più incoraggianti rispetto al trattamento con altre metodiche. I risultati di queste tecniche nella patologia degenerativa articolare sono pochi ed ancora molto controversi. Si deve porre attenzione al fatto che nessun prodotto di condrociti autologhi di seconda generazione è indicato nei disturbi articolari degenerativi generalizzati. Riassumendo questo metodo potrebbe essere utilizzato per il trattamento di importanti lesioni condrali in una popolazione di giovani attivi ed in atleti professionisti ma saranno necessari studi controllati e randomizzati a lungo termine a conferma dell'affidabilità di queste procedure.

Ci si aspetta in breve tempo una serie di miglioramenti a conferma della crescente conoscenza della coltura cellulare e del comportamento evolutivo dei condrociti con lo scopo di fornire una tecnica chirurgica ancor più affidabile ed un miglior outcome clinico.

CAPITOLO 5

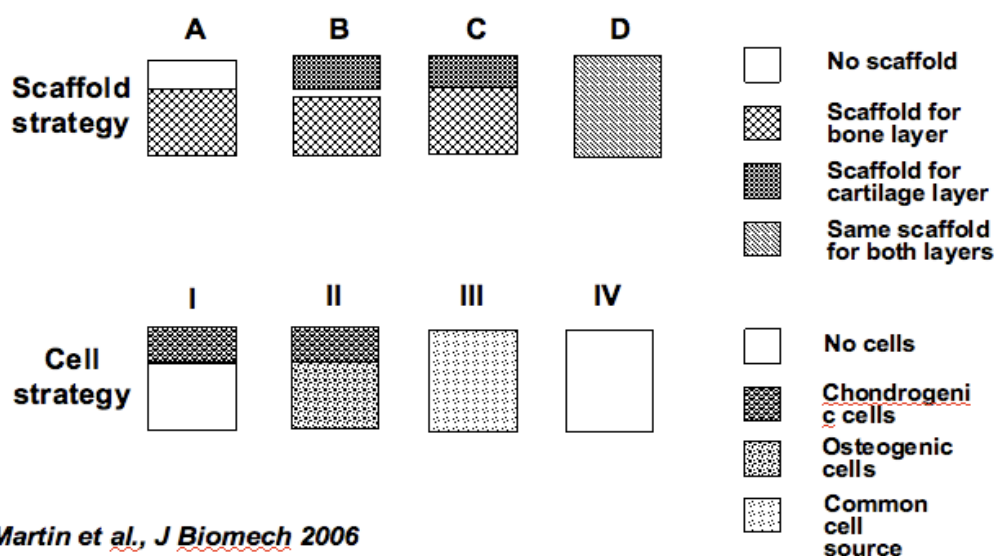
INGEGNERIA TISSUTALE PER LA RICOSTRUZIONE OSTEOCONDRALE.

5.1 INNESTI OSTEOCONDRALE COMPOSITI BIOINGEGNERIZZATI

Il trattamento delle lesioni osteocondrali è ancor più problematico per il chirurgo ortopedico in quanto coinvolge 2 tessuti con diverse caratteristiche biochimiche e biomeccaniche.

I progressi fatti dalla scienza dei materiali, nella biologia cellulare e nelle nano-tecnologie hanno permesso lo sviluppo di diversi metodi di assemblaggio di innesti osteocondrali compositi bioingegnerizzati. Essi possono essere classificati sulla base delle combinazioni finora proposte tra scaffolds e linee cellulari (Fig. 7).⁹³

Fig. 7⁸: combinazioni finora proposte tra scaffolds e linee cellulari



Martin et al., *J Biomech* 2006

Come si evince dalla figura: nella soluzione “A” si utilizza un solo scaffold per la componente ossea sopra la quale viene direttamente coltivata la matrice condrale. Nella soluzione “B” si utilizzano due diversi scaffold: uno per la matrice ossea e l’altro per la matrice cartilaginea successivamente assemblati. La soluzione “C” prevede l'utilizzo di un unico scaffold composito ed eterogeneo, con una parte ossea ed una condrale; differente dalla soluzione “D” dove si utilizza lo stesso scaffold per entrambi gli strati.

Le linee cellulari utilizzate per la colonizzazione degli scaffolds, possono derivare da un singolo citotipo avente capacità condrogeniche (I), da due citotipi, uno con capacità condrogeniche e l'altro con capacità osteogeniche (II) o da un singolo citotipo contemporaneamente con capacità sia osteogeniche che condrogeniche (III). E' possibile anche un approccio cell free (IV).

È evidente che da un punto di vista chirurgico, l’impiego di un innesto “cell-free” è preferibile, considerando che lo stesso sarebbe disponibile immediatamente annullandosi il doppio tempo chirurgico e la coltura cellulare.

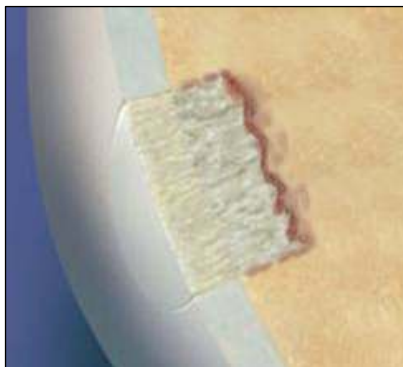


Fig. 8
Schema di impianto di scaffold su
difetto osteocondrale

Data la struttura delle matrici, è auspicabile che la neoformazione ossea sia confinata nella porzione più profonda del

costrutto e non interessi lo strato superficiale all'interno del quale invece dovrebbe attivarsi un processo di formazione connettivale simil-cartilaginea (Fig. 8).

I metodi fino ad ora studiati per la fabbricazione degli innesti osteocondrali cell-free, sono stati sviluppati con l'obiettivo di fornire specifici segnali "rigeneratori" alle cellule mesenchimali provenienti dal midollo osseo.^{94, 95} Naturalmente, occorre che l'impianto sia sufficientemente "intelligente" da stimolare la proliferazione cellulare attesa e, quindi la formazione di due diversi tipi di tessuto (osseo e cartilagineo) con qualità biomeccaniche sovrapponibili a quelle naturali.

Può essere utile includere anche un componente supplementare che impedisca che la rapida crescita del tessuto osseo e dei vasi invada il compartimento di competenza cartilaginea.

Attualmente, l'orientamento della bioingegneria tissutale nella riparazione delle lesioni osteocondrali segue due grandi linee d'azione:

1) La riparazione del difetto attraverso l'innesto multiplo di matrici cilindriche, come avviene negli innesti osteocondrali plurimi, che però presenta una limitata capacità di integrazione Ed una certa discontinuità della superficie articolare (responsabile dell'incremento della pressione di contatto).

2) L'utilizzo di composti osteocondrali su misura con una forma anatomica che riproduce il contorno della superficie articolare e che potenzialmente riduce l'interfaccia fra le superfici articolari e ristabilisce la distribuzione del normale asse di carico nell'articolazione. In linea di principio, tale concetto è molto interessante, ma risulta essere di difficile realizzazione nella pratica clinica.

Nonostante l'ampia varietà dei metodi trattati finora, in merito agli innesti osteocondrali bioingegnerizzati, si è ancora lontani dal raggiungimento di risultati concreti. Attualmente l'orientamento è quello di trattare lesioni di piccole dimensioni con un approccio con scaffold osteocondrali cell-free, mentre nel caso di lesioni più estese si ritiene necessaria la presenza di fattori di crescita per il reclutamento in loco delle cellule. Nella scelta delle strategie specifiche per il montaggio degli innesti osteocondrali bioingegnerizzati, gli studi animali possono essere importanti per la valutazione della sicurezza e delle tecniche chirurgiche o per verificare le capacità riparative del tessuto stesso. Tali studi non tengono però conto di variabili quali il tipo, la sede e le dimensioni della lesione nonché delle caratteristiche biochimiche e biomeccaniche che differenziano uomo ed animale, che potrebbero modificare i risultati clinici.

La bioingegneria tissutale apre quindi nuove possibilità suscitando un notevole interesse, ma è necessario protrarre la valutazione nel tempo per verificare l'effettiva efficacia di tali procedure rispetto alle altre metodiche di trattamento e la loro capacità di offrire risultati qualitativamente e quantitativamente validi e duraturi.

In conclusione si può ritenere che gli scaffold bioingegnerizzati costituiscano un valido approccio nel trattamento di lesioni osteocondrali e condrali, tuttavia saranno necessarie ulteriori valutazioni per confermare questi risultati preliminari.

5.2 INNOVATIVO SCAFFOLD NANOSTRUTTURATO PER IL TRATTAMENTO DI DIFETTI OSTEOCONDRALE.

La logica con cui questo scaffold è stato progettato si basa essenzialmente su alcuni principi consolidati nell'ambito della rigenerazione di tessuti del sistema scheletrico e degli annessi tessuti molli, in particolare del comparto anatomico osteocartilagineo, tali principi si possono ricondurre nella ricerca di strutture affini al tessuto da rigenerare in termini di composizione chimica, biologica e morfologica.

L'idrossiapatite è un materiale ampiamente utilizzato in neurochirurgia, chirurgia maxillo-facciale, odontoiatria ed ortopedia come sostituto osseo sintetico di comprovata efficacia mentre il collagene, essendo un componente fondamentale della matrice extracellulare (ECM), è noto avere un ruolo strutturale importante nella rigenerazione dei connettivi complessi come l'osso e la cartilagine. Infatti, la letteratura riporta l'impiego abbastanza diffuso di scaffolds a base di collagene o suoi derivati nella rigenerazione di molteplici tipi di connettivo. Il collagene utilizzato per la realizzazione dello scaffold oggetto dello studio è di tipo I di derivazione equina, opportunamente modificato chimicamente al fine di escludere ogni reazione immunologica e prolungare il tempo di permanenza sul distretto anatomico.

La matrice tridimensionale o dispositivo sostituto osteocondrale è costituita da un gradiente multistrato la cui percentuale di idrossiapatite risulta prevalente (70%) in direzione dello strato più profondo (sito subcondrale) della matrice, diminuisce nello strato intermedio (40%) fino a scomparire nello strato superficiale costituito di solo collagene di tipo I in modo da "mimare" il comparto cartilagineo (Fig. 9-10). La conformazione dello scaffold è in grado di promuovere la neo-formazione di tessuto cartilagineo e di tessuto osseo sub-condrale in maniera guidata nel rispetto della struttura biochimica, morfologica e geometrica del comparto anatomico

osteocartilagineo, pertanto può essere definito come scaffold con proprietà biomimetiche. Gli elementi che conferiscono tali caratteristiche di biomimetismo al dispositivo possono essere così sintetizzate:

- elevata porosità (oltre 80%);
- dimensione dei pori e architettura interna, adeguate all'alloggiamento delle cellule progenitrici per il successivo differenziamento in cellule competenti alla sintesi di matrice minerale o cartilaginea (osteoblasti e condrociti);
- permeabilità ai fluidi biologici;
- adeguate proprietà idrofiliche;
- biocompatibilità;
- biodegradazione.

Il dispositivo si presenta come una struttura assolutamente flessibile che ne consente elevata maneggevolezza, possibilità di adattamento in funzione delle dimensioni della lesione e facile applicazione chirurgica.

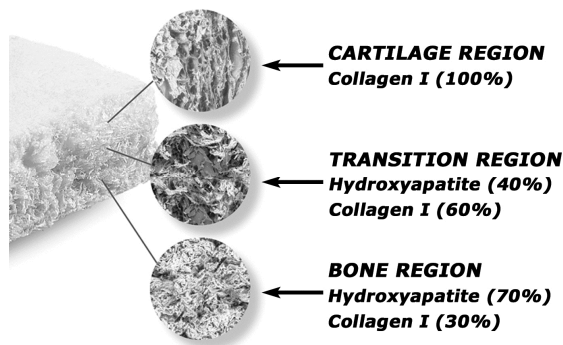


Fig. 9

Gradiente 1: strato superficiale di collagene di tipo I

Gradiente 2: strato intermedio di collagene di tipo I/idrossiapatite in rapporto 60%-40%

Gradiente 3: strato profondo di collagene di tipo I/idrossiapatite in rapporto 30%-70%



Fig. 10

Scaffold MaioRegen prima dell'utilizzo in sala operatoria: si noti lo strato superficiale "liscio" costituito di solo Collagene e lo strato profondo "ruvido" composto in prevalenza di Idrossiapatite

5.3 STUDIO PRECLINICO SU MODELLO ANIMALE

Nello studio preclinico in vivo da noi condotto in conformità con le norme italiane ed europee vigenti, abbiamo utilizzato lo scaffolds osteocondrale costituito da fibre collagene di tipo I nucleate con nanoparticelle di idrossiapatite in tre diversi gradienti per il trattamento di lesioni osteocondrali del condilo femorale della pecora.

E' stata eseguita una lesione osteocondrale sul condilo femorale mediale ed una su quello laterale della zampa posteriore destra in sedici pecore, per un totale di trentadue lesioni. Le lesioni avevano un diametro di sette millimetri ed una profondità di nove millimetri. Gli animali sono stati assegnati a quattro diversi gruppi di trattamento: il primo gruppo è stato trattato con l'impianto dello scaffold cell free (Fig. 11), il secondo con l'innesto coltivato in vitro con condrociti autologhi, il terzo gruppo con lo scaffold arricchito di PRP autologo e gli animali in cui i difetti osteocondrali non sono stati trattati sono stati utilizzati come gruppo controllo.

A sei mesi di follow up gli animali sono stati sacrificati e si è proceduto alla valutazione macroscopica (modified L.A. Fortier Score, G.G. Niederaurer Score), radiologica ed istologica (G.G. Niederaurer Score) (Fig. 12). In tutti i gruppi trattati si è constatato una buona integrazione dello scaffold osteocondrale con una buona continuità della superficie articolare. Abbiamo osservato risultati significativamente migliori nella rigenerazione ossea e cartilaginea nei gruppi in cui è stato utilizzato lo scaffold cell free e lo scaffold con condrociti autologhi, senza differenze significative tra i due gruppi. Quando invece è stato utilizzato lo scaffold arricchito di PRP si è evidenziata una rigenerazione ossea incompleta ed una superficie cartilaginea irregolare. Il tessuto neoformato nelle lesioni osteocondrali del gruppo controllo era di natura fibrosa senza alcuna rigenerazione ossea e cartilaginea.⁹⁶

Si può quindi affermare che lo studio conferma le potenzialità di questo biomateriale nel trattamento delle lesioni focali del tessuto osteocondrale anche senza utilizzo di cellule coltivate.

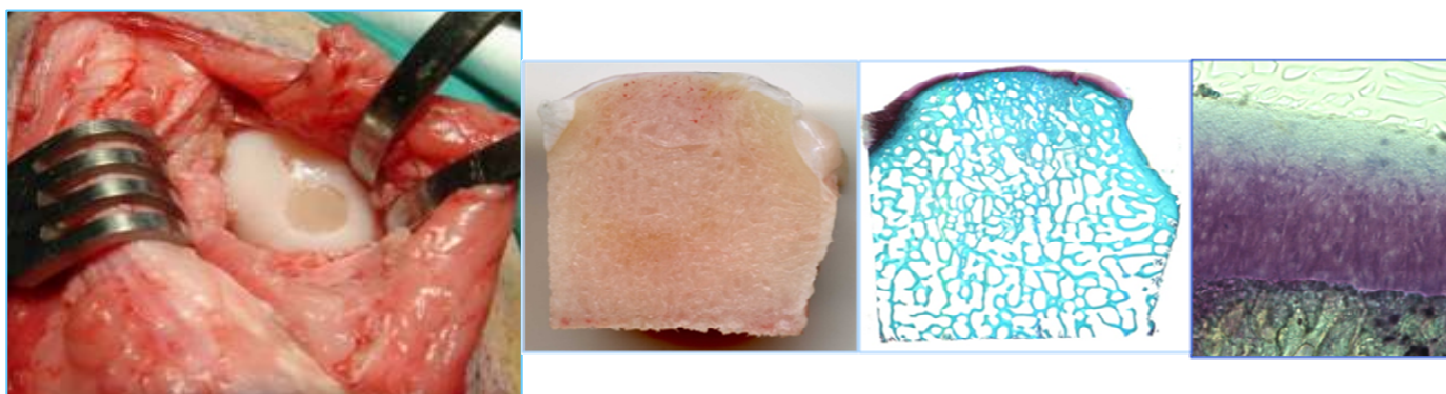


Fig. 11:

Impianto di MaioRegen su condilo femorale di pecora

Fig. 12:

Valutazione macroscopica ed istologica del MaioRegen impiantato cell-free su condilo femorale di pecora. Particolare istologico su tessuto cartilagineo neoformato

CAPITOLO 6
NUOVO SCAFFOLD BIOMIMETICO PER IL
TRATTAMENTO DELLE LESIONI OSTEOCONDRALE:
STUDIO CLINICO PILOTA

6.1 SELEZIONE DEI PAZIENTI

La sperimentazione clinica è stata avviata dopo l'approvazione del Comitato Etico dell' *Istituto Ortopedico Rizzoli*, ed a tutti i pazienti è stato richiesto il consenso informato prima di ogni intervento.

Nel nostro studio abbiamo valutato in modo prospettico 30 pazienti consecutivi operati da Febbraio 2007 a Luglio 2007 e sottoposti ad impianto dello scaffold osteocondrale. Dei pazienti arruolati, 27 su 30 hanno raggiunto un follow up di 48 mesi. Per due pazienti non è stato possibile eseguire il follow up per rifiuto da parte degli stessi già a 36 mesi a proseguire lo studio, mentre per un paziente non è stato ancora possibile eseguire il suddetto follow up.

Dei 27 pazienti dello studio valutati a 48 mesi di follow up, il ginocchio sinistro era maggiormente interessato rispetto al destro con un rapporto di 15/12. Le lesioni trattate erano singole in 22 casi e multiple in 5 casi per un totale di 32 lesioni. La localizzazione delle lesioni era in 13 casi a livello dell' articolazione femoro - rotulea (10 sulla rotula, 3 sulla troclea); in 7 casi sui condili femorali (5 sul CFM, 2 sul CFL); 5 casi erano lesioni multiple ad eziopatogenesi degenerativa (2 casi con 1 lesione sulla troclea e 1 lesione sul CFM, 2 casi con 1 lesione sulla troclea e 1 sul CFL, 1 caso con 1 lesione sulla rotula e 1 sul CFL); in 2 casi vi erano delle lesioni del piatto

tibiale esterno conseguenti ad una pregressa frattura del piatto tibiale. La dimensione media delle lesioni era di 2,4 cm² (1,1 - 6 cm²). L'eziologia delle lesioni era degenerativa in 21 casi, traumatica in 3 casi, mentre 3 pazienti erano affetti da osteocondrite dissecante (OCD).

Considerando il totale dei pazienti inizialmente arruolati nello studio, l'età media era di 34,9 anni con un range compreso tra 16 e 59; i pazienti che praticavano sport a livello professionistico o agonistico erano 4, gli amatori 14 mentre 12 praticavano sport raramente o per nulla.

Avevano subito interventi chirurgici precedenti 20 pazienti: 7 meniscectomie, 3 ricostruzioni di LCA, e 10 trattamenti riparativi della cartilagine, ovvero shaving, debridement, microfratture, 3 riduzioni e osteosintesi di fratture del piatto tibiale, 1 riallineamento rotuleo.

14 pazienti sono stati sottoposti ad interventi chirurgici associati all'impianto di cartilagine bio-ingegnerizzata: 3 riallineamenti rotulei, 2 lateral release, 1 plastica rotulea, 3 osteotomie valgizzanti di tibia, 1 osteotomia varizzante di femore, 1 tenorrafia del tendine rotuleo, 1 ricostruzione del LCA, 1 meniscectomia e 1 trapianto di menisco esterno allograft.

6.2 METODI VALUTATIVI

Prima dell'intervento chirurgico, i pazienti introdotti nello studio sono stati valutati clinicamente ed hanno portato in visione una RMN del ginocchio interessato; successivamente è stata eseguita una valutazione prospettica ad un follow-up a 6, 12, 24, 36 e 48 mesi.

Tutti i pazienti sono stati chiamati a controllo ed intervistati per valutarne la sintomatologia e la funzionalità del ginocchio,

utilizzando la scheda di valutazione soggettiva dell'IKDC. Secondo questo questionario, si può ottenere un punteggio compreso tra 0 e 100, in cui ad uno score alto è associato un alto livello funzionale e una sintomatologia dolorosa di minore entità. La valutazione oggettiva viene effettuata dal chirurgo utilizzando la scheda di valutazione dell'IKDC. Il grado funzionale del ginocchio dipende dalla presenza di edema articolare, dalla presenza di limitazione dell'arco di movimento passivo in flesso-estensione, dalla presenza di crepitii articolari e dalla stabilità legamentosa. Il grado finale può essere classificato come normale (A), simile al normale (B), anormale (C) o severamente anormale (D).

Un controllo RMN del sito di pregressa lesione/impianto dello scaffold è stato eseguito ad ogni follow up, anche se l'adesione dei pazienti stessi all'esame strumentale è andata scemando nel corso dei 4 anni: a 48 mesi di follow up, la RMN è stata eseguita su 18 pazienti per un totale di 23 lesioni.

6.3 TECNICA CHIRURGICA

Il paziente è stato posto in decubito supino ed è stata effettuata un'anestesia generale o loco-regionale. L'arto da operare è stato ischemizzato con tourniquet alla coscia.

La tecnica chirurgica consiste in un' artrotomia mini-invasiva, nella misurazione delle dimensioni del difetto, nella preparazione e nella misurazione dell' alloggiamento per lo scaffold, nella preparazione dello scaffold ed infine nel suo impianto.

L'entità dell'esposizione dipende dalle dimensioni e dalla sede del difetto: l'incisione pararotulea mediale è preferita nelle lesioni del condilo mediale del femore e della cartilagine

della rotula, mentre l'incisione pararotulea laterale si esegue se la lesione interessa il compartimento laterale.

Una completa visualizzazione della lesione cartilaginea, è fondamentale per riuscire ad eseguire un' adeguata preparazione del difetto. Si deve: prima rimuovere tutto il tessuto fibrocartilagineo generatosi nel sito di lesione, poi, con una fresa appositamente disegnata, bisogna approfondirsi nell'osso subcondrale per 8 mm - profondità pari allo spessore dello scaffold imbibito di sangue dopo rilascio del tourniquet - lasciando dei margini netti di cartilagine vitale.

(Fig. 13)

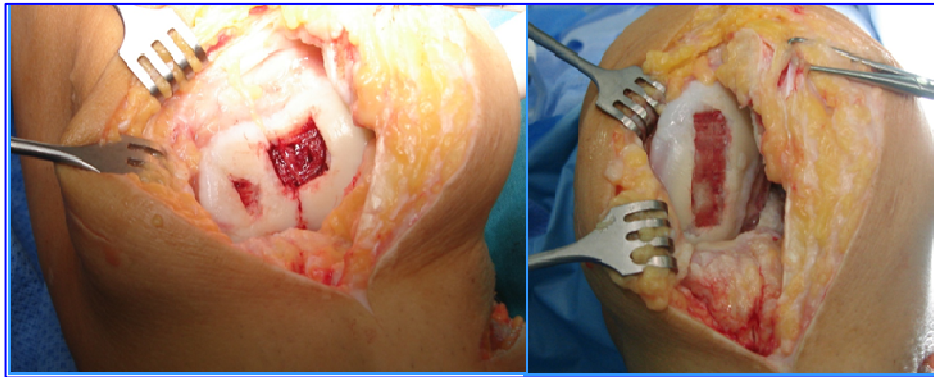


Fig. 13:
Preparazione dell' alloggiamento nel quale sarà impiantato lo scaffold. Visualizzazione intraoperatoria.

L'alloggiamento così preparato viene quindi misurato e sulla base di tali dimensioni modellato lo scaffold che successivamente vi viene impiantato. (Fig. 14)



Figura 14: preparazione dello scaffold durante l' intervento chirurgico.

Durante l'impianto dello scaffold è importante evitare che esso debordi, pena una sua scarsa stabilità e possibile mobilizzazione. (Fig. 15)

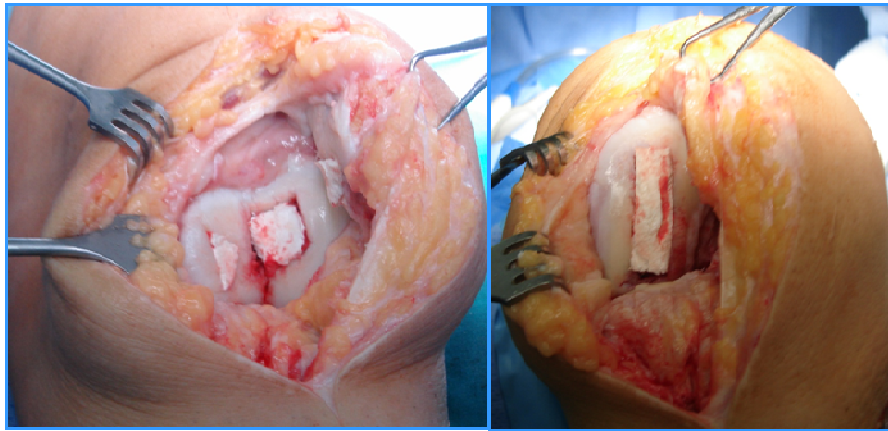


Figura 15: Impianto dello scaffold. Visualizzazione intraoperatoria.

Dopo l'impianto si rimuove il tourniquet in modo che lo scaffold, altamente idrofilico, si imbibisca di sangue midollare espandendosi fino ad aderire alle pareti del sito di lesione precedentemente preparato.

Si eseguono quindi dei cicli di flessione-estensione dell'articolazione del ginocchio per valutare la stabilità dell'impianto.

Infine si posizionano i drenaggi e le ferite vengono suturate con tecnica standard.

6.4 PROTOCOLLO RIABILITATIVO

Il protocollo di riabilitazione post-operatorio prevede la crioterapia, il mantenimento dell'arto in scarico ed in posizione elevata, la compressione con bendaggio e la mobilizzazione passiva continua (CPM). La CPM inizia in seconda giornata e viene impostata in modo da permettere delle escursioni di movimento da 0° fino a 90°. Tale mobilizzazione viene adottata per stimolare il rimodellamento

della cartilagine neoformata e ridurre la possibilità delle aderenze intrarticolari. Esercizi di stretching e contrazioni isometriche del quadricipite favoriscono il potenziamento e la ripresa del normale tono muscolare dell'arto.

Nelle prime 4-6 settimane dall'intervento viene concesso il carico sfiorante con ausilio di due antibrachiali, mentre il carico completo non è permesso.

Si consiglia una graduale ripresa del carico a partire dalla 4-5 settimana dall'intervento: inizialmente si eseguono degli esercizi in piscina per poi proseguire anche fuori dall'acqua consentendo la ripresa delle normali fasi della deambulazione. Se compaiono intolleranza al carico, blocchi articolari, idrarti, il carico stesso ed il livello di attività vengono ridotti fino al livello tollerato dal paziente.

La pratica di attività che richiedano un discreto coinvolgimento muscolare sono concesse a partire dalla 7 settimana.

La ripresa di attività fisiche quali per esempio il tennis e gli sports di contatto, viene permessa a partire dagli 8-12 mesi dall'impianto.

6.5 RISULTATI

Durante il periodo di osservazione non si sono verificate complicazioni connesse con l'impianto, nè eventi avversi maggiori; 7 pazienti hanno lamentato gonfiore dell'articolazione nel post-operatorio, risoltosi spontaneamente dopo circa 1 mese.

Secondo la scheda di valutazione soggettiva dell'IKDC (Fig. 16), i 27 pazienti che hanno raggiunto un follow-up di 48 mesi avevano un valore soggettivo medio preoperatorio di 40,3 ($\pm 14,6$) e a 12 mesi un valore di 71,6 ($\pm 14,3$): la percentuale

era marcatamente aumentata, esattamente dell' 88%. E' documentato un ulteriore miglioramento nel follow-up a 24 mesi, mentre in quello a 36 si registra una lieve flessione non significativa.

Nel follow-up a 4 anni ritroviamo una crescita fra le valutazioni soggettive pari a 75,7 ($\pm 15,7$) questo a dimostrare un miglioramento significativo nel punteggio soggettivo medio postoperatorio, rispetto a quello preoperatorio (T-Test: $P < 0,0005$). Si è notato che l'età dei pazienti al momento dell'intervento, eventuali interventi chirurgici pregressi al ginocchio (ricostruzioni LCA, meniscectomie, condroabrasioni, debridements) e l'eziologia, non hanno influito in modo statisticamente significativo sul miglioramento medio e sul valore soggettivo medio ai diversi follow-up rispetto al preoperatorio, mentre, nei pazienti con un livello di attività sportiva pre-lesione più elevato, si è riscontrato un miglioramento statisticamente significativo rispetto ai pazienti non sportivi (Test non parametrico di Mann-Whitney).

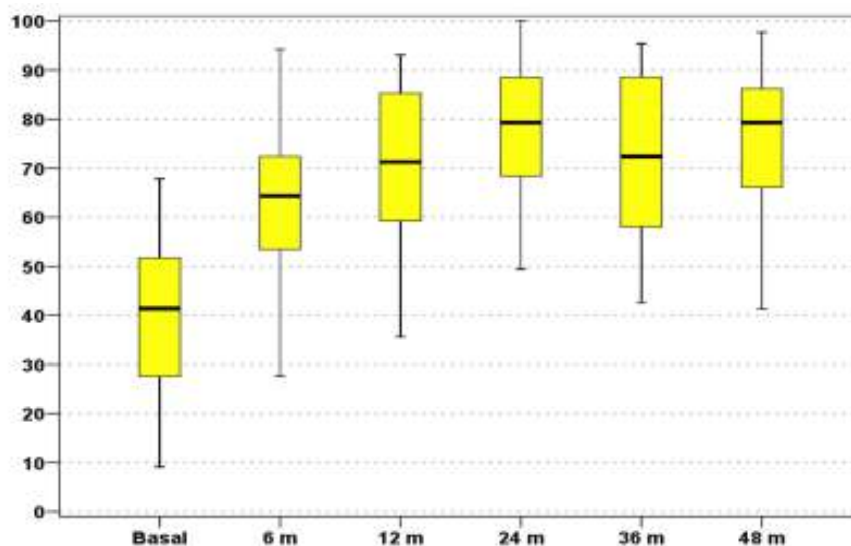


Fig. 16: IKDC-soggettivo.

In base alla scheda di valutazione oggettiva IKDC le ginocchia nel preoperatorio si presentavano così: 6 severamente anormali, 10 anormali e 14 quasi normali. Al controllo a 48 mesi, secondo la stessa scheda di valutazione, 19 erano le ginocchia percepite come normali, 5 quasi normali, 3 anormali (88.8% di ginocchia percepite come normali o quasi normali).

Il TEGNER-score, utilizzato per valutare il ritorno all'attività sportiva ed all'esercizio fisico dei pazienti, a 48 mesi è risultato di $4,6 \pm 2,2$ (valore preoperatorio di $1,6 \pm 1,1$); questi risultati dimostrano un significativo miglioramento ($P < 0,0005$) dallo stadio preoperatorio a 4 anni di follow-up; tuttavia il nuovo livello di attività sportiva è risultato comunque minore rispetto a quello precedente la lesione. (Fig. 17)

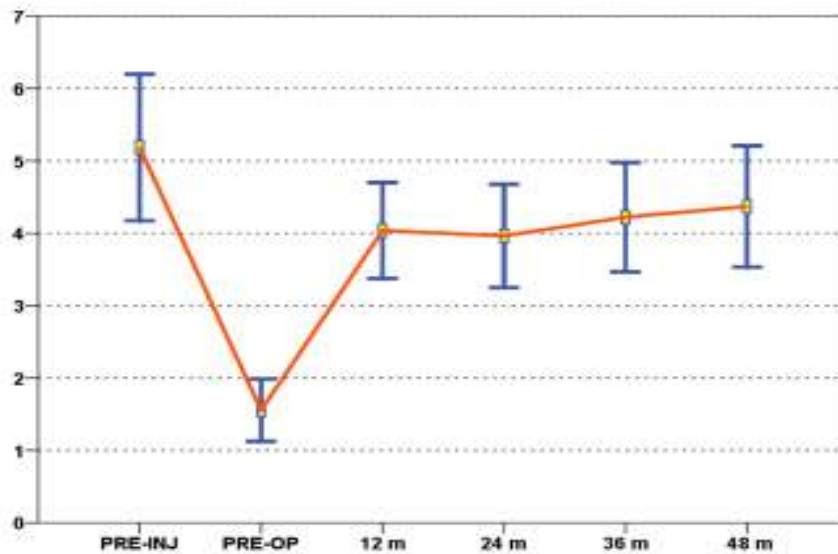


Fig. 17: TEGNER-score

La valutazione clinico-funzionale a 48 mesi è stata eseguita sui 27 pazienti oggetto dello studio; il controllo RMN al medesimo follow up è stato invece eseguito su 18 pazienti (23 lesioni) e l'analisi è stata eseguita tramite MOCART scoring system: 87% delle lesioni hanno mostrato un riempimento

completo del difetto; l'integrazione cartilaginea è risultata completa nel 65%; edema subcondrale è risultato ancora presente solo nel 43% dei siti di lesione.

6.6 DISCUSSIONE

Le lesioni della superficie articolare rappresentano una patologia invalidante con un elevato impatto sociale e il trattamento di tali difetti è ad oggi una sfida per il chirurgo ortopedico. Le caratteristiche biologiche del tessuto cartilagineo spiegano il suo basso potenziale di guarigione e quindi sono stati sviluppati numerosi trattamenti per affrontare tali difetti. Non esiste però una chiara evidenza scientifica sulla superiorità di una procedura chirurgica rispetto alle altre.

Ogni procedura ha indicazioni e percentuali di successo in relazione all'età del paziente, alla sua attività, alla localizzazione, all'entità ed alla profondità della lesione.

Tra le numerose tecniche proposte per il trattamento dei difetti della superficie articolare le microfratture rappresentano una procedura interessante perché poco costosa ed eseguibile in artroscopia. Questa tecnica offre buoni risultati anche a distanza⁹⁷ nel trattamento di piccole lesioni senza un profondo coinvolgimento dell'osso subcondrale.

Un'altra procedura che si è rivelata efficace nel trattare non solo difetti a tutto spessore della cartilagine articolare, ma anche lesioni coinvolgenti il sottostante osso subcondrale è la mosaicoplastica, che prevede la ricostruzione del difetto mediante più cilindri di piccole dimensioni prelevati da zone di non carico.⁹⁸ Le dimensioni della lesione e le dimensioni del plug rimangono comunque il problema principale di questa tecnica. Wang riporta infatti scarsi risultati nell'utilizzo di trapianti osteocondrali autologhi per il trattamento di lesioni

superiori a 6 cm².⁹⁹ Anche altri autori dimostrano la validità della tecnica per ripristinare la superficie articolare, ma consigliano l'utilizzo di questo approccio terapeutico per lesioni di piccole dimensioni, con un innesto di un ridotto numero di plug.¹⁰⁰

Molti autori raccomandano l'utilizzo del trapianto osteocondrale omologo per il trattamento di grandi difetti articolari. Nonostante siano stati ottenuti buoni risultati anche a medio lungo follow-up questa procedura non è però scevra di svantaggi. La relativa scarsa disponibilità di donatori, la difficoltà nel reperire e processare tempestivamente il tessuto e la possibilità di trasmissione di patologie costituiscono degli importanti limiti nell'utilizzo clinico del trapianto osteocondrale omologo fresco.

Le tecniche rigenerative sono state sviluppate e sono emerse come interessanti opzioni terapeutiche con il potenziale di superare questi limiti. Il trapianto di condrociti autologhi di prima generazione ha portato a risultati buoni e duraturi anche a follow up a lungo termine, grazie alla rigenerazione di una cartilagine di tipo ialino simile, meccanicamente e funzionalmente stabile, in grado inoltre di integrarsi con l'adiacente superficie articolare. Purtroppo anche con l'utilizzo di questa tecnica si sono verificate complicanze che sono state però superate dallo sviluppo degli ACI di seconda generazione. Le nuove tecniche di bioingegneria tessutale, attraverso il prelievo, la coltura ed il reimpianto di condrociti autologhi su scaffold tridimensionali, hanno consentito di ripristinare la superficie condrale con un tessuto simil-ialino, semplificando la tecnica chirurgica con minor morbilità e minor rischio di complicanze. Vari polimeri biodegradabili per il trapianto di condrociti autologhi come collagene, acido ialuronico, colla di fibrina e altri polimeri biosintetici sono

stati sviluppati durante gli ultimi anni e usati in clinica con risultati molto promettenti. Purtroppo questo tipo di approccio necessita di due procedimenti chirurgici con problematiche gestionali e conseguenti alti costi ed inoltre consente il ripristino della sola superficie cartilaginea. Il trattamento di lesioni di natura degenerativa e di lesioni osteocondrali è ancor più problematico per il chirurgo ortopedico in quanto il danno si estende anche all'osso subcondrale coinvolgendo due tessuti con diverse caratteristiche biologiche e capacità di guarigione.

Nel trattamento di questo tipo di lesioni infatti con l'utilizzo di ACI di seconda generazione non sono stati ottenuti risultati soddisfacenti. Considerando quanto detto sia da un punto di vista chirurgico che commerciale una nuova tecnica per la rigenerazione osteocondrale con i vantaggi di una "one step surgery" è molto allettante. Seguendo questo razionale il nostro gruppo ha sviluppato un nuovo scaffold osteocondrale costituito da fibre collagene di tipo I nucleate con nano particelle di idrossiapatite in tre diversi gradienti: il primo strato costituito da sole fibre collagene di tipo I, il secondo dal 40% di idrossiapatite e dal 60% di collagene ed il terzo dal 70% di idrossiapatite e dal 30 % di collagene.

Abbiamo testato questo nuovo biomateriale in studi preclinici in vitro e in studi su modello animale ottenendo buoni risultati nella rigenerazione della cartilagine e del tessuto osseo. All'analisi macroscopica, istologica e radiografica i risultati ottenuti nell'utilizzo dello scaffold "cell-free" e dello scaffold "cell-seeded" erano sovrapponibili. Il biomateriale in entrambi i casi ha indotto infatti una rigenerazione in situ attraverso le cellule staminali provenienti dal midollo osseo.⁶

Dopo lo studio preclinico su animale (pecore) che ha dimostrato le potenzialità di questo composto biomimetico nella rigenerazione osteocartilaginea, abbiamo eseguito, in conformità con le norme italiane ed europee vigenti, uno studio pilota su 30 pazienti affetti da lesioni cartilaginee degenerative o osteocondrali. Tutti i pazienti sono stati trattati con l'impianto dello scaffold "cell-free" e 27 di questi hanno raggiunto un follow-up di 48 mesi. La loro valutazione ha evidenziato un miglioramento statisticamente significativo in tutti gli Score utilizzati.

Dall'analisi statistica dei risultati si è rilevato che il livello di attività sportiva ha influito in modo significativo sul decorso post-operatorio. Questo probabilmente perché motivando il paziente al recupero della pregressa attività funzionale, ne ha migliorato la compliance al protocollo riabilitativo favorendo in questo modo gli effetti benefici dello stimolo meccanico sulla rigenerazione del tessuto sia osseo che cartilagineo. Per tutti gli altri parametri analizzati come la sede della lesione, l'evento acuto o cronico, gli interventi pregressi e la chirurgia associata all'innesto non si sono evidenziate variazioni significative dell'outcome dei pazienti a 12 mesi di follow up.

Tutti i pazienti sono tornati al livello di attività precedente l'inizio dei sintomi.

I risultati clinici ottenuti dai 27 pazienti parte dello studio e valutati a follow-up di 48 mesi continuano a rivelarsi molto incoraggianti nel rispetto del trend di miglioramento già evidenziatosi nei primi 36 mesi dopo il trattamento chirurgico, dimostrando l'efficacia di questo nuovo scaffold nanostrutturato nella rigenerazione osteocartilaginea.

Sono comunque necessari studi a più lungo termine per confermare la validità di questa tecnica chirurgica.

BIBLIOGRAFIA

1. **CURL WW, KROME J, GORDON ES, RUSHING J, SMITBP, POEHLING GG:** Cartilage injuries: A review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 1997; 13: 456-460
2. **INDELICATO PA, BITTAR ES:** A perspective of lesions associated with ACL insufficiency of the knee: A review of 100 cases. *Clin Orthop* 1985; 198: 77-80
3. **BUCKWALTER JA, ROSENBERG LC, HUNZIGER EB:** Articular Cartilage: Composition, structure, response to injury and methods of repair. In: **ERWIN JW**, ed. Articular cartilage and knee joint function: basic science and arthroscopy. New York: *Raven Press* 1990; 19-56
4. **BUCKWALTER JA, MANKIN HJ:** Articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 1997; 79A (4): 600-611
5. **BUCKWALTER JA, MANKIN HJ:** Articular cartilage. Part II: Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *J Bone Joint Surg* 1997; 79A (4): 612-632
6. **OCHI M, UCHIO Y, KAWASAKI K, WAKITANI S, IWASA J.** Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br.* 2002 May; 84 (4) : 571-8
7. **SGAGLIONE NA, MINIACI A, GILLOGLY SD, CARTER TR.** Update on advanced surgical techniques in the treatment of traumatic focal

- articular cartilage lesions in the knee. *Arthroscopy* 2002 Feb, 18 (2 Suppl 1) : 9-32
8. **PETERSON L, MINAS T, BRITTBERG M, NILSSON A, SJOGREN-JANSSON E, LINDHAL A.** Two-to 9-years outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop* 2000 May; (374) : 212-34
 9. **PETERSON L, BRITTBERG M, KIVIRANTA I, AKERLUND EL, LINDHAL A.** Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med.* 2002 Jan-Feb; 30 (1) : 2-12
 10. **MARCACCI M, ZAFFAGNINI S, KON E, ET AL.** Arthroscopic autologous chondrocyte transplantation: technical note. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2002 May;10(3):154-9. Epub 2002 Jan 31.
 11. **ERGGELET C, SITTINGER M, LAHM A.** The arthroscopic implantation of autologous chondrocytes for the treatment of full-thickness cartilage defects of the knee joint. *Arthroscopy.* 2003 Jan;19(1):108-10.
 12. **RONGA M, GRASSI FA, BULGHERONI P.** Arthroscopic autologous chondrocyte implantation for the treatment of a chondral defect in the tibial plateau of the knee. *Arthroscopy.* 2004 Jan;20(1):79-84.
 13. **GIANNINI S, BUDA R, VANNINI F, ET AL.** Arthroscopic Autologous Chondrocyte Implantation in Osteochondral Lesions of the Talus: Surgical Technique and Results. *Am J Sports Med.* 2008 Jan 28.

14. **MONESI V.** *Istologia.*
15. **BURKIT, YOUNG, HEATH.** *Istologia ed anatomia microscopica. Testo atlante.* Casa Editrice Ambrosiana Milano 1998; 170-173
16. **AZZALI G.** *Atlante di citologia, istologia e anatomia microscopica.* Casa Editrice Ambrosiana Milano. 1977; 40-41
17. **CAMPANACCI M.** *Clinica ortopedica.* 1989 Bologna Patron Editore; pag. 31.
18. **HUNTER W.** On structure and disease of articulating cartilage. *Philos Trans R Soc Lond* 1743; 24B: 514-521
19. **PATELLA V, MORETTI B, BERNARDI S.** La microbiomeccanica della cartilagine articolare. *Giot* 1990 vol. 16, Suppl. 1, 5-17
20. **DANDY DJ, JACKSON RW.** The impact of arthroscopy on the management of the disorders of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 1975; 57B: 346-8
21. **NOYES FR, BASSET RW, GROOD ES, BUTLER DL.** Arthroscopy in acute hemarthrosis of the knee. Incidence of anterior cruciate tears and other injuries. *J Bone Joint Surg* 1980; 62A: 687-695
22. **CASTELEYN PP, HANDELBERG F, OPDECAM P.** Traumatic haemarthrosis of the knee. *J Bone Joint Surg* 1988; 70B: 404-406
23. **DEHAVEN KE.** Diagnosis of acute knee injuries with hemarthrosis. *Am J Sports Med.* 1988; 4: 72-80
24. **JOHNSON-NURSE C, DANDY DJ.** Fracture separation of articular cartilage in the adult knee. *J Bone Joint Surg Br.* 1985; 26: 42-3

25. **FAHMY NRM, WILLIAMS EA, NOBLE J.** Meniscal pathology and osteoarthritis of the knee. *J Bone Joint Surg Br.* 1993; 24: 114-9
26. **ENGBRETSSEN L, LEW WD, FRITTS HM.** Osteochondral lesions and cruciate ligament injuries: MRI in 18 knee. *Acta orthop Scand.* 1993; 434-6
27. **SPINDLER KB, SPRITZER CE, GOLDNER JL, GARRET WE.** Magnetic resonance imaging of traumatic knee articular injuries. *Am Sports Med.* 1991; 19: 396-402
28. **AROEN A, STRAND T, MOLSTER A.** Primer suture av bakre korsband. *T Nor Leg.* 1992; 1582-4 (Norwegian)
29. **DEJOUR H, WALCH J, PEYROT J, EBERHARD PH.** The natural history of rupture of the posterior cruciate ligament. *Fr J Ortho Surg.* 1988; 2: 112-20
30. **COLLIER S, GHOSH P.** Comparison of the effects on nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proteoglycan synthesis by articular cartilage explants and chondrocyte monolayer cultures. *Biochem Pharm.* 1991; 41: 1375-84
31. **KIVIRANTA I, TAMMI M, JURVELIN J, SAAMANEN A-M, HELMINEN HJ.** Moderate running exercise augment glycosaminoglycans and thickness of articular cartilage in the knee joint of young beagle dogs. *J Orthop Res* 1988; 62: 18-24
32. **LIVINE E, WEISS A, SILBERMAN M.** Articular chondrocytes lose their proliferative activity with aging yet can be restimulated by PTH

- (1-84), PGE and dexamethasone. *J Bone Miner Res* 1989; 4: 539-48
33. **PALMOSKI M, PERRICONE E, BRANDT KD.** Development and reversal of a proteoglycan aggregation defect in normal canine knee cartilage after immobilization. *Arthritis Rheum* 1979; 22: 507-17
34. **DE HAVEN KE.** Diagnosis of acute knee injuries with hemarthrosis. *Am J Sports Med* 1980; 8: 9-14
35. **BOBERG BD, MCGINTY JB.** Acute hemarthrosis of the knee: indication for diagnostic arthroscopy. *Arthroscopy* 1990; 6:221-5
36. **MANKIN HJ.** Current concepts review. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 1982; 64: 460-5
37. **ARNOLD ET AL.** Natural history of anterior cruciate tears. *Am J Sports Med* 1979; 7: 305-13
38. **FETTO, MARSHALL.** The natural history and diagnosis of anterior cruciate ligament insufficiency. *Clin Orthop* 1980; 147-29
39. **NOYES ET AL.** The symptomatic anterior cruciate deficient knee. *J. Bone Joint Surg Am* 1983; 65: 154-62
40. **BALFORS B.** The course of knee-ligament injuries. *Acta Orthop Scand [Suppl]* 1982; 7: 198
41. **BAUER M, JACKSON RW.** Chondral lesions of the femoral condyles: a system of arthroscopic classification. *Arthroscopy* 1988; 4: 97-102
42. **DZIOBA RB.** The classification and treatment of acute articular cartilage lesions. *Arthroscopy* 1988; 4: 72-80

43. **GOODFELLOW J, HUNGERFORD DS, WOODS C.** Patello-femoral joints mechanics and pathology. *J Bone Joint Surg Br* 1976; 58: 291-9
44. **CASSCELLS SW.** Outerbridge ridges. *Arthroscopy* 1990; 6: 253
45. **NOYES FR, STABLER CL.** A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy. *Am J Sports Med* 1989; 17: 505-13
46. **TERRY GC, FLANDRY F, VAN MANEN JW, NORWOOD L.** Isolated chondral fractures of the knee. *Clin Orthop* 1988; 234: 170-7
47. **LINKLATER JM, POTTER HG.** Imaging of chondral defects. *Op Tech Orthop* 1997; 7: 279-88
48. **JACKSON RW, MARANS HJ, SILVER RS.** Arthroscopic treatment of degenerative arthritis of the knee. *J Bone Joint Surg* 1988; 70B: 332
49. **BAUMGARTNER MR, CANNON WD, VITTORI JM, SCHMIDT ES, MAURER RC.** Arthroscopic debridment of the arthritic knee. *Clin Orthop* 1990; 253: 197-202
50. **BERT JM, MASCHKA K.** The arthroscopic treatment of unicompartmental gonarthrosis: A five-year follow-up study of abrasion arthroplasty plus arthroscopic debridment and arthroscopic debridment alone. *Arthroscopy* 1989 5: 25-32
51. **TIMONEY JM, KNEISL JS, BARRACK RL, ALEXANDER AH.** Arthroscopy in the osteoarthritic knee: Long term follow-up. *Orthop Rev* 1990; 19: 371-3
52. **RANDL JA.** Role of arthroscopy in osteoarthritis of the knee. *Arthroscopy* 1991; 7: 358-363

53. **HUBBARD MJ.** Articular debridment versus washout for degeneration of the medial femoral condyle: A five-years study. *J Bone Joint Surg* 1996; 78B: 217-19
54. **MESSNER K, MALETIUS W.** The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee. *Acta Orthop Scand* 1996; 67: 65-68
55. **SALTER RB.** The biological concept of continuous passive motion of synovial joints: The first 18 years of basic research and its clinical application. *Clin Orthop* 1989; 242: 12-25
56. **SHIMUZU T, VIDEMAN T, SHIMAZAKI K, MOONEY V.** Experimental study on the repair of full thickness articular defects: Effects of a periods of continuous passive motion, cage activity and immobilisation. *J Orthop Res* 1987; 5: 187-97
57. **DZIOBA R.** The classification and treatment of acute articular cartilage lesions. *Arthroscopy* 1988; 4: 72-80
58. **JOHNSON LL.** Arthroscopic abrasion arthroplasty. In: McGinty JB (ed), *Operative Arthroscopy*, pp 341-360. *New York* 1991 Raven Press
59. **JOHNSON LL.** Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective. *Arthroscopy* 1985; 67B: 42-43
60. **OGILVIE-HARRIS DJ, FITSIALOS DP.** Arthroscopic management of the degenerative knee. *Arthroscopy* 1991; 7: 151-7

61. **JOHNSON LL.** Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathological perspective: Present status. *Arthroscopy* 1989; 2: 54-69
62. **FRIEDMAN MJ, BERASI CC, FOX JM, DELPIZZO W, SNYDER SJ, FERKEL RD.** Preliminary results with abrasion arthroplasty in the osteoarthritic knee. *Clin Orthop* 1984; 182: 200-205
63. **RODRIGOMJJ, STEADMAN JR, SILLIMAN JF, FULSTONE HA.** Improvement of full-thickness chondral defect healing in the human knee after debridment and microfracture using continuous passive motion. *Am J Knee Surg* 1994; 7: 109-16
64. **STEADMAN JR, RODKEY WG, SINGLETON SB, BRIGGS KK.** Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results. *Op Tech Orthop* 1997; 7: 300-4
65. **MATSUSUE Y, YAMAMURO T, HAMA H.** Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy* 1993; 9: 318-21
66. **YAMASHITA F, SAKAKIDA K, SUZU F, TAKAI S.** The transplantation of an autogenic osteochondral fragment for osteochondritis dissecans of the knee. *Clin Orthop* 1985; 201: 43-50
67. **BOBIC V.** Arthroscopic osteochondral autograft transplantation in anterior cruciate ligament reconstruction: A preliminary clinical study. *Knee*

Surg Sports Traumatol Arthroscopy 1996; 3: 262-264

68. **HANGODY L, KISH G, KARPATI Z, UDVARHELYI I, SZIGETI I, BELY M.** Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: Application in clinical practice. *Orthopedics* 1998; 21 (7) : 751-56
69. **HANGODY L, FECZKO P, BARTHA L, BODO G, KISH G.** Mosaicplasty for the treatment of articular defects of the knee and ankle. *Clin Orthop Rel Res* 2001; 391S: 326-36
70. **HOMMINGA GN, BULSTRA SK, BOUWMEESTER PSM, VAN DER LINDEN AJ.** Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg* 1990; 72B: 1003-7
71. **HOMMINGA GN.** Long-term follow-up of perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *Cartilage Repair Symposium, Bermuda* August 1997
72. **MINAS T.** Articular cartilage regeneration: Chondrocyte transplantation and other technologies. Presented at the meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, San Francisco, CA, February, 1997
73. **O'DRISCOLL SW, KEELEY FW, SALTER RB.** The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biologic resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion: An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg* 1986; 208: 131-40

74. **O'DRISCOLL S.** Periosteal transplantation: Articular cartilage regeneration: Chondrocyte transplantation and other technologies. Presented at the annual meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, San Francisco, CA, February, 1997
75. **ANGERMANN P, RIEGELS-NIELSEN P.** Osteochondritis dissecans of the femoral condyle treated with periosteal transplantation: A preliminary clinical study of 14 cases. *Orthop Int* 1994; 2: 425-428
76. **BRITTBERG M, TALLHEDEN T, SJOGREN-JANSSON B, LINDHAL A, PETERSON L.** Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clin Orthop* 2001 Oct; (391 Suppl): S 337-48
77. **MINAS T, PETERSON L.** Chondrocyte transplantation. *Operative Techniques in Orthopedics* 1997; vol 7,n 4 (October): 323-33
78. **SGAGLIONE NA, MINIACI A, GILLOGLY SD, CARTER TR.** Update on advanced surgical techniques in the treatment of traumatic focal articular cartilage lesions in the knee. *Arthroscopy* 2002 Feb; 18 (2 Suppl 1): 9-32
79. **MICHELI LJ, BROWNE JE, ERGGELET C, FU F, MANDELBAUM B, MOSELEY JB, ZURAKOWSKI D.** Autologous chondrocytes implantation of the knee: Multicenter experience and minimum 3-years follow-up. *Clin J Sport Med* 2001 Oct; 11 (4): 223-8

80. **ANDERSON AF, FU FH, BERT RM, ET AL.** A controlled study of autologous implantation versus microfracture for articular cartilage lesions of the femur: 70 AAOS annual meeting proceedings, February 5-9, 2003, New Orleans, Louisiana.
81. **COLE BJ, NHO SJ, BEDDOW SA, ET AL.** Prospective evaluation of autologous chondrocytes implantation. 70 AAOS annual meeting proceedings, February 5-9, 2003, New Orleans, Louisiana
82. **MOSELEY JB, MICHELI LJ, ERGGELET C, ET AL.** 6-years patient outcomes with autologous chondrocyte implantation. 70 AAOS annual meeting proceedings, February 5-9, 2003, New Orleans, Louisiana
83. **VON DER MARK K, GAUSS V, VON DER MARK H ET AL.** Relationship between cell shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 1977; 267:531-2.
84. **FEED LE, MARQUIS JC, NOHRIA A, ET AL.** Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res.* 1993 Jan;27(1):11-23.
85. **VAN SUSANTE JL, BUMA P, VAN OSCH GJ ET AL.** Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels. *Acta Orthop Scand.* 1995 Dec;66(6):549-56.
86. **GRIGOLO B, LISIGNOLI G, PIACENTINI A, ET AL.** Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based

- biomaterial (HYAff 11): molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials*. 2002 Feb;23(4):1187-95.
87. **CATERSON EJ, NESTI LJ, LI WJ, ET AL.** Three-dimensional cartilage formation by bone marrow-derived cells seeded in polylactide/alginate amalgam. *J Biomed Mater Res*. 2001 Dec 5;57(3):394-403.
88. **BEHRENS P, BITTER T, KURZ B, ET AL.** Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MATC/MACI)-5-year follow-up. *The knee*. 2006;13:194-202.
89. **MARCACCI M, BERRUTO M, BROCCHETTA D, ET AL.** Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results. *Clin Orthop Relat Res*. 2005 Jun;(435):96-105.
90. **MARCACCI M, KON E, ZAFFAGNINI S, ET AL.** Arthroscopic second generation autologous chondrocyte implantation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2007 May;15(5):610-9.
91. **THERMANN H, DRISSEN A, BECHER C, ET AL.** Autologous chondrocyte transplantation in the treatment of articular cartilage lesions of the talus. *Orthopade*. 2008 Mar.
92. **NEHRER S, DOMAYER S, DOROTKA R, ET AL.** Three-year clinical outcome after chondrocyte transplantation using a hyaluronan matrix for cartilage repair. *European Journal of Radiology*. 2006; 57:3-8.

93. **IVAN MARTIN, SYLVIE MIOT, ANDREA BARBERO, MARCEL JACOB, DAVID WENDT.** *Osteochondral tissue engineering. Journal of Biomechanics*, 2007.
94. **X. WANG, S.P. GROGAN, F. RIESER, V. WINKELMANN, V. MAQUET, M.L. DERGE AND P. MAINIL-VARLET,** Tissue engineering of biphasic cartilage constructs using various biodegradable scaffolds: an in vitro study, *Biomaterials* **25** (2004) (17), pp. 3681–3688.
95. **T.B. WOODFIELD, J.MALDA, J. DE WIJN, F. PETERS, J. RIESLE AND C.A. VAN BLITTERSWIJK,** Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fiber-deposition technique, *Biomaterials* **25** (2004) (18), pp. 4149–4161.
96. **E. KON, M. DELCOGLIANO, G. FILARDO, M. FINI, G. GIAVARESI, S. FRANCIOLI, I. MARTIN, D. PRESSATO, E. ARCANGELI, R. QUARTO, A. TAMPIERI AND M. MARCACCI,** Orderly Osteochondral Regeneration In A Sheep Model Using A Novel Nano Composite Multi-Layered Biomaterial, Osteoarthritis and Cartilage, Submission
97. **STEADMAN J.R. et al.** Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11 - year follow-up. *Arthroscopic* **2003; 19(5):477-84. Review.**

98. **HANGODY L. et al.** Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full – thickness defects of weight – bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J. Bone Joint Surg Am* **2003;85_A, Suppl 2:25-32.**
99. **WANG C.J. et al.** Treatment of focal articular cartilage lesions of the knee with autogenous osteochondral grafts: a 2 to 4 years follow up study. *Arch Orthop Trauma Surg* **2002; 122:169-72.**
100. **HORAS U. et al.** Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint: a prospective, comparative trial. *J. Bone Joint Surg Am* **2003;85:185-192.**