

Applicazioni dell'ingegneria tissutale: riparazione di lesioni cartilaginee con condrociti autologhi

Tissue engineering applications: cartilage lesions repair by the use of autologous chondrocytes

B. Grigolo¹, L. Roseti¹, M. Fiorini¹, L. De Franceschi¹, A. Facchini²

¹Laboratorio di Immunologia e Genetica, Istituto di Ricerca Codivilla Putti, Istituti Ortopedici Rizzoli;

²Dipartimento di Medicina Interna e Gastroenterologia, Università degli Studi di Bologna

SUMMARY

Promising new therapies based on tissue engineering have been recently developed for cartilage repair. The association of biomaterials with autologous chondrocytes expanded in vitro can represent a useful tool to regenerate this tissue. The scaffolds utilised in such therapeutical applications should provide a pre-formed three-dimensional shape, prevent cells from floating out of the defect, have sufficient mechanical strength, facilitate uniform spread of cells and stimulate the phenotype of transplanted cells. Hyaff[®]-11 is a hyaluronic-acid based biodegradable polymer, that has been shown to provide successful cell carrier for tissue-engineered repair. From our findings we can state that human chondrocytes seeded on Hyaff[®]-11 are able to maintain in vitro the characteristic of differentiated cells, expressing and producing collagen type II and aggrecan which are the main markers of cartilage phenotype, down-regulating collagen type I. Moreover, it seems to be a useful scaffold for cartilage repair both in animal models and clinical trials in humans, favouring the formation of a hyaline-like tissue. In the light of these data, we can hypothesise, for the future, the use of autologous chondrocyte transplantation together with gene therapy as a treatment for rheumatic diseases such as osteoarthritis.

Reumatismo, 2002; 54(4):364-371

INTRODUZIONE

Un enorme progresso delle conoscenze nel campo della biologia cellulare e delle biotecnologie ha consentito, negli ultimi anni, lo sviluppo di tecnologie mirate alla coltivazione ed alla ricostruzione *in vitro* di tessuti o organi, definendo una nuova branca di scienze biomediche conosciuta con il termine di "ingegneria dei tessuti" (1, 2). Questa tecnologia permette di poter espandere cellule autologhe *ex vivo* e riutilizzarle nella riparazione di lesioni e rigenerazione di tessuti mediante coltura in matrici polimeriche biocompatibili tridimensionali (3). Modulando opportunamente le caratteristiche chimiche, meccaniche e fisiche di tali matrici è possibile teoricamente rigenerare *in vitro* tipi diversi di tessuti (4). Queste strutture bioartificiali

rappresentano la seconda generazione di sistemi di sostituzione di organi e tessuti. La prima generazione era essenzialmente costituita da organi artificiali tradizionali (reni, macchina cuore-polmoni, protesi valvolari cardiache, pacemakers cardiaci, protesi di articolazione ileo-femorale e ginocchio), la cui alternativa clinica è il trapianto di organi umani ottenuti da donatori. L'ingegneria tissutale rappresenta una evoluzione di tali interventi terapeutici consentendo la possibilità di associare la potenzialità del trapianto di cellule viventi con la tecnologia degli organi artificiali per la realizzazione di strutture funzionali. Tale strategia implica lo studio sia delle strutture dei costrutti e delle forze fisiche che su questi agiscono, sia dei fattori biochimici e molecolari della crescita e del differenziamento delle cellule e dei tessuti (4). I prodotti dell'ingegneria dei tessuti derivano direttamente da queste ricerche ed hanno lo scopo di condurre a dispositivi che associano le strutture artificiali con quelle viventi, rendendone disponibili le importanti funzioni. Si possono distinguere tre classi principali di tessuti artificiali:

Indirizzo per la corrispondenza:

Prof. Andrea Facchini, Laboratorio di Immunologia e Genetica Istituto di Ricerca Codivilla Putti, I.O.R.
Via di Barbiano 1/10, 40136 Bologna, Italy
E-mail: labimge@alma.unibo.it.

- 1) composti strutturali in grado di sostituire tessuti nell'organismo quali ad esempio gli equivalenti della cute o "pelle artificiale" per il trattamento di ulcere croniche o ustioni (5);
- 2) sistemi per la rigenerazione della cartilagine o del tessuto osseo (6);
- 3) impianti per la modulazione immunitaria e sistemi metabolici quali il pancreas endocrino-artificiale ed il fegato artificiale (7, 8) o impianti per il sistema nervoso centrale atti a rilasciare molecole bioattive e fattori di accrescimento con localizzazioni specifiche come ad esempio quelli per il trattamento del morbo di Parkinson e di Alzheimer (9).

In campo ortopedico è stata dimostrata la possibilità di trapiantare condrociti umani autologhi o cellule mesenchimali staminali precursori degli osteoblasti, rispettivamente per la ricostruzione di cartilagine deteriorata a seguito di traumi o di patologie (quali osteocondrite dissecante o condromalacia patellare) e per favorire la formazione di nuovo tessuto osseo nel trattamento di anomalie dello scheletro, traumi e tumori ossei (6).

La necessità di ricercare strategie di riparazione della cartilagine articolare rappresenta un importante traguardo se pensiamo alla notevole frequenza di traumi e lesioni a cui è sottoposto questo tessuto in seguito ad incidenti stradali o sportivi. Il problema risulta ancora più complesso considerando la grande percentuale d'incidenza di patologie infiammatorie, reumatiche e degenerative cui la cartilagine va incontro con l'avanzare dell'età e che si verificano spesso come conseguenze post-traumatiche degli eventi sopra citati (10). A quanto sopra menzionato si aggiunga come il tessuto cartilagineo sia dotato di una limitata capacità di rigenerazione delle lesioni ad esso associate, in quanto il naturale processo di riparazione porta alla formazione di un tessuto fibrocartilagineo che non presenta le caratteristiche di resistenza e deformabilità al carico, tipiche della cartilagine ialina che ricopre la superficie articolare e che sono dovute alla sua particolare composizione biochimica (11, 12).

L'obiettivo della neocondrogenesi nasce e si giustifica quindi con l'opportunità di restaurare l'integrità strutturale e le funzioni del tessuto danneggiato attraverso un rigenerato istologicamente identico al precedente, in modo da risultare meccanicamente idoneo a sopportare i carichi fisiologici e a ridurre o evitare l'evoluzione artrosica della lesione iniziale (13, 14). La cartilagine ialina rappresenta un candidato ideale per essere sostituita con un tessuto strutturalmente complesso poi-

ché il suo trofismo non è dipendente dal flusso ematico, essendo assicurato direttamente dal liquido sinoviale, l'innervazione non appare necessaria e la capacità di riparazione intrinseca risulta molto limitata (12). Diverse terapie chirurgiche sono state sviluppate quale tentativo di rigenerazione della cartilagine articolare normale. Questi procedimenti comprendono, tecniche di "debridement" (15), perforazioni artroscopiche, microfratture o di abrasione artroplastica (16, 17), le quali portano ad un miglioramento in termini di riduzione del dolore e di incremento della mobilità, ma conducono alla formazione di un tessuto fibro-cartilagineo costituito principalmente da collagene di tipo I, che presenta la caratteristica di minore resistenza meccanica rispetto alla cartilagine ialina in cui predomina il collagene di tipo II (11, 12). Le tecniche basate sull'impianto di materiali dotati di potenzialità condrogenica quale pericondrio o periostio presentano anch'esse diversi limiti quali, in particolare la difficoltà di adesione tra il tessuto trapiantato e l'osso sub-condrale (18-21). Altri tipi di approcci in ambito di rigenerazione della cartilagine articolare sono i trapianti osteocondrali allo-genici i quali si sono dimostrati immunologicamente attivi soprattutto per quel che riguarda la componente sub-condrale (22).

Trapianto di condrociti autologhi

La strategia terapeutica del trapianto di condrociti autologhi per la riparazione di lesioni condrali ha fornito recentemente risultati soddisfacenti ed incoraggianti, rispetto alle metodiche fino ad ora utilizzate (23-25). L'approccio clinico nell'uomo ha interessato soprattutto la riparazione di lesioni a livello del ginocchio (26), anche se altre sedi quali ad esempio l'articolazione tibio-tarsica (27) ed il menisco sono oggetto di studio (28). Nella sua metodologia originale, il trapianto di condrociti si articola in varie fasi: dapprima si esegue un prelievo in artroscopia di tessuto cartilagineo sano preferibilmente in una zona di non carico. Successivamente il frammento viene sottoposto a digestione enzimatica seguita da isolamento e coltura delle cellule. Dopo un periodo di espansione di circa un mese in coltura monostrato i condrociti possono essere trapiantati. A tale scopo si procede per via artroscopica al prelievo attraverso un'incisione sulla superficie antero-mediale della tibia omolaterale, di un "patch" periostale delle stesse dimensioni del difetto condrale, il quale viene suturato sul sito della lesione e sigillato con colla di fibrina lasciando un piccolo foro attraverso il quale viene

iniettato il pool di condrociti. Questo metodo è stato realizzato per la prima volta in Svezia da Brittberg e coll. i quali hanno riportato la loro esperienza riguardante l'utilizzo nell'uomo di trapianto di condrociti autologhi, per il trattamento di difetti dovuti a traumi o a patologie quali osteocondrite dissecante e condromalacia patellare (29). I risultati ottenuti hanno evidenziato la formazione di nuova cartilagine con caratteristiche del tutto simili alla cartilagine normale che esprime collagene di tipo II. Una delle critiche rivolte però all'utilizzo del trapianto di condrociti secondo il metodo utilizzato da Brittberg è relativo alla strategia di fissazione "in situ" dei condrociti la quale avviene, come sopra menzionato, mediante un disco di periosio (30, 31). Questo procedimento ha sollevato dubbi circa il fatto che la ricostruzione cartilaginea possa essere indotta da cellule mesenchimali periossee e non dai condrociti autologhi iniettati. Infatti i condrociti introdotti nella sede di lesione potrebbero non essere sempre in grado di indurre una rigenerazione tissutale o perché in numero esiguo e con modesta attività metabolica o per la mancanza di fattori locali in grado di influenzare il differenziamento e l'attività delle cellule staminali di origine vascolare che, sottoposte ad appropriati stimoli meccanici e segnali "molecolari", si differenziano in senso condrocitario.

Trapianto di condrociti autologhi veicolati da biomateriale

L'impiego di componenti cellulari, supportati da scaffolds o carriers adeguati, potrebbe condurre a risultati positivi nella riparazione del tessuto articolare consentendo un miglioramento della tecnica chirurgica (32). L'impiego di scaffolds o di carriers consente infatti di migliorare l'attecchimento e la riproduzione cellulare, di trattenere "fisicamente" le cellule nella zona da riparare e di dirigere l'orientamento spaziale dei componenti della matrice. Tali supporti tridimensionali devono avere le caratteristiche di essere biocompatibili, biodegradabili e devono consentire la moltiplicazione cellulare e la produzione della matrice, assicurandone contestualmente la nutrizione (33). Non meno importante nel caso di trapianto di cellule condrocitarie, devono permettere la riespressione del fenotipo originale che viene perso durante l'espansione in coltura monostrato (34). Allo stato attuale gli scaffolds in sperimentazione si possono raggruppare in quattro classi:

- a) naturali;
- b) sintetici;

- c) bioattivi;
- d) combinati.

L'abilità dell'industria a realizzare queste entità strutturali con diverse possibilità architettoniche rappresenta uno dei goals più ambiti nella strategia della rigenerazione cartilaginea. Numerosi materiali sono stati utilizzati quali scaffolds nel trapianto di condrociti, in particolare agarosio (35), gels di acido ialuronico (36), colla di fibrina (37), collagene (38) o alginato (39). Tuttavia questi sistemi non presentano sempre una adeguata stabilità meccanica per creare delle strutture cartilaginee appropriate e non risultano tutti idonei alla crescita di condrociti che mantengano il fenotipo nativo e non quello fibroblasticoide tipico della fibrocartilagine. Tra i biomateriali che hanno già trovato un'applicazione nel trapianto di condrociti per la riparazione di lesioni cartilaginee nell'animale e nell'uomo, troviamo un derivato esterificato dell'acido ialuronico denominato Hyaff®-11 (FIDIA Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italy) (40, 41). L'acido ialuronico è un polisaccaride lineare costituito da sequenze ripetute di acido glucuronico e N-acetil-glucosamina. È presente principalmente nella matrice extracellulare di molti tessuti come la pelle, la cartilagine, il cordone ombelicale, il fluido sinoviale e rappresenta il maggiore componente della matrice extracellulare nei tessuti embrionali. Esercita importanti funzioni biologiche collegate alle sue proprietà chimico-fisiche e può interagire con differenti tipi cellulari attraverso recettori di membrana. È stato dimostrato che l'acido ialuronico gioca un ruolo fondamentale in molti processi biologici quali l'idratazione dei tessuti, l'organizzazione dei proteoglicani, lo sviluppo embrionale, il differenziamento e la migrazione cellulare (42). È stato utilizzato con successo inizialmente nella chirurgia oftalmica (43) e attualmente nella terapia di viscosupplementazione a livello sinoviale per l'attenuazione del dolore nelle artropatie (44). I biomateriali derivati dall'esterificazione dell'acido ialuronico vengono impiegati con successo nella riparazione di lesioni della pelle (45, 46), nella ricostruzione del tessuto cartilagineo e osseo (6).

In particolare, nel caso di trapianto di condrociti, lo Hyaff®-11 si è rivelato essere un carrier idoneo alla proliferazione ed al mantenimento del fenotipo condrocitario delle cellule da esso veicolate (47). Tramite indagini a livello molecolare si è visto infatti come condrociti umani isolati da cartilagine sana di pazienti donatori multiorgano espansi in coltura monostrato, seminati sulla matrice tridimensionale

Hyaff®-11 e processati a diversi tempi sperimentali riesprimano i messaggeri per il collagene di tipo II e per i proteoglicani (marcatori comunemente accettati del fenotipo condrocitario). Tali cellule sono in grado inoltre di produrre il collagene II come evidenziato da analisi immunostochimiche e di Western blotting. Immagini ultrastrutturali eseguite con microscopia FEISEM (Field Emission In Lens Scanning Electron Microscopy) hanno mostrato come la colonizzazione di tale materiale da parte dei condrociti si completi nell'arco di due settimane secondo una progressione continua. La secrezione da parte di tali cellule di strutture filamentose, le cui caratteristiche morfologiche sono compatibili con quelle di microfibrille collagene, inizia sin dagli stadi più precoci di colonizzazione. Caratteristicamente, tale produzione riguarda inizialmente anche la superficie dorsale della cellula, in concomitanza con l'osservazione sulla superficie di specializzazioni di membrana aventi le caratteristiche morfologiche di piccoli ondulo-podi e con l'aspetto fusiforme di tutto il soma cellulare (Fig. 1). Con il progredire della colonizzazione, tali caratteristiche scompaiono, portando le cellule a confluire strettamente tra loro, polarizzando la loro secrezione verso il filamento di Hyaff®-11 ed assumendo globalmente un aspetto che ricorda formazioni endoteliali. Nell'insieme, queste trasformazioni, pur facendo assumere alla popolazione cellulare un aspetto sensibilmente dissimile da quanto osservabile in carti-

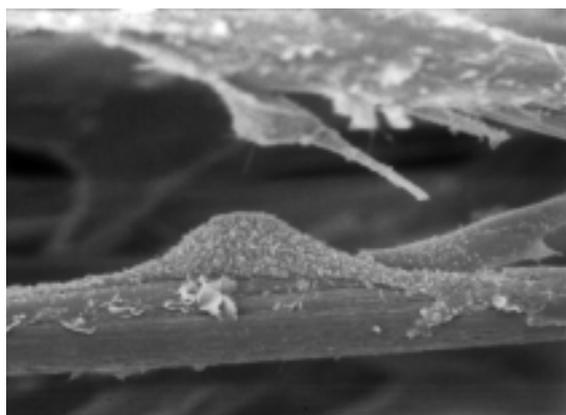


Figura 1 - Immagine di un condrocita a 24 ore dalla semina sul biomateriale Hyaff®-11 ottenuta mediante FEISEM (Field Emission in Lens Scanning Microscopy) (x2000). Si noti la forma cellulare rotondeggiante in corrispondenza del nucleo e la superficie cellulare dorsale ricoperta da specializzazioni aventi la forma di piccoli ondulo-podi. (Gentile concessione: Prof. G. Mazzotti, Dr P. Gobbi Unità Complessa di Scienze Anatomiche Umane e Fisiopatologia dell'Apparato Locomotore, Università degli Studi di Bologna).

lagini *ex vivo*, fanno ritenere che la cellula vada in contro a processi neo-differenziativi. Questi processi, dopo la sdifferenziazione legata al prelievo da donatore ed alla messa in coltura, sembrano legati principalmente alla interazione, dopo un periodo di circa due settimane dalla semina, con il substrato biotecnologico. Il risultato di queste modificazioni ha come prodotto una stabilizzazione della struttura del complesso Hyaff®-11/condrociti rendendolo idoneo a nuove manipolazioni quali ad esempio un reimpianto su paziente.

SPERIMENTAZIONI CLINICHE

Sperimentazione nell'animale

Il trapianto di condrociti autologhi per la riparazione di lesioni alla cartilagine articolare è attualmente utilizzato con successo in clinica. Tuttavia, sono in corso numerosi studi nell'intento di migliorare tale strategia terapeutica. Come sopra riportato sono stati proposti diversi tipi di biomateriali i quali risultano essere un valido supporto per la crescita cellulare e per l'impianto *in vivo* nell'uomo. In un recente lavoro in collaborazione con il Servizio di Chirurgia Sperimentale degli Istituti Ortopedici Rizzoli abbiamo voluto valutare l'utilizzo del biomateriale Hyaff®-11, nella riparazione di lesioni condrali previamente allestite in un modello sperimentale animale quale il coniglio (40). A tale scopo, dopo autorizzazione alla sperimentazione da parte del Ministero della Sanità, sono stati utilizzati conigli New Zealand di sesso maschile ai quali, previa anestesia generale, sono state create delle lesioni in entrambi i condili mediali femorali. Tali lesioni sono state quindi rispettivamente trattate con il biomateriale veicolante le cellule in un arto e con il biomateriale da solo nell'arto controlaterale. Un gruppo di animali è stato utilizzato quale gruppo di controllo, ovvero le lesioni sono state fatte riparare in maniera spontanea. Dopo 1, 3 e 6 mesi dall'intervento di trapianto gli animali sono stati sacrificati e la cartilagine è stata inclusa per le valutazioni istologiche. Alla nuova cartilagine neoformata nei vari gruppi di animali è stato dato uno score per ogni parametro utilizzato nella sua valutazione. Ciò ha consentito di poter effettuare un'analisi statistica e di verificare che il trapianto eseguito con il biomateriale veicolante i condrociti permette una migliore ricostruzione cartilaginea rispetto a quello eseguito con il biomateriale da solo o al gruppo di controllo, sia come quantità che come qualità di tessuto rigenerato.

Sperimentazione nell'uomo

Presso la IV Divisione degli Istituti Ortopedici Rizzoli sono stati eseguite delle sperimentazioni cliniche di trapianto di condrociti autologhi (48). In particolare sono stati ammessi allo studio 30 pazienti, di età compresa fra 18 e 55 anni, affetti da lesioni osteocondrali traumatiche con distacco di frammenti liberi osteocartilaginei, o lesioni degenerative della cartilagine articolare del ginocchio (grado IIB secondo Noyes-Stabler) (49). Tali pazienti sono stati suddivisi in due gruppi: il primo gruppo è stato trattato mediante trapianto di condrociti eseguito con il metodo di Brittberg-Peterson, ed il secondo gruppo mediante trapianto di condrociti veicolati sul biomateriale Hyaff®-11.

Sono stati esclusi dal progetto tutti i pazienti che presentavano malattie dismetaboliche, infiammatorie o malattie del tessuto connettivo in grado di influenzare il procedimento.

La prima fase del trattamento è stata analoga per entrambe le procedure operatorie. In particolare è stata eseguita per via artroscopica l'asportazione di frammenti liberi intraarticolari osteocartilaginei, l'abrasione della lesione ed il prelievo di frammenti di cartilagine per il programma di colture cellulari. La zona del prelievo, individuata in artroscopia, è rappresentata dalla superficie interna del condilo femorale mediale, nella porzione non interessata dal movimento di escursione articolare, e dalla gola intercondiloidea.

Dopo 3-4 settimane, necessarie alla crescita *in vitro* delle cellule, si sono effettuati in artrotomia i trapianti dei condrociti autologhi secondo le due diverse metodologie.

a) Nel caso di intervento mediante tecnica di Brittberg-Peterson si è proceduto come segue: è stata eseguita un'accurata regolarizzazione dei margini della lesione condrale con asportazione, con un piccolo cucchiaio, dei residui della cartilagine malacica, in modo da ottenere una cavità dai margini regolari. Si è quindi prolungata l'incisione cutanea sulla tibia prossimale ed è stato prelevato un lembo di periostio delle dimensioni della lesione articolare da trattare. Il periostio è stato suturato con filo riassorbibile 6-0 (Dexon o Vicryl) ai bordi della cavità cartilaginea precedentemente ottenuta in modo da creare una superficie di chiusura, lasciando libero un tramite attraverso cui iniettare la soluzione con i condrociti autologhi. Una volta verificata la stabilità della sutura ottenuta, rinforzata eventualmente con colla di fibrina (Tissucol®, Bayer, Leverkusen Germania), si è proceduto

quindi ad iniettare il preparato con le cellule chiudendo il tramite residuo con un ultimo punto di sutura.

b) Nel caso di intervento che prevede l'utilizzo del biomateriale la procedura operatoria è stata analoga per quanto riguarda la preparazione della lesione. Lo Hyaff®-11 veicolante le cellule è stato posto nella sede delle lesione e fissato con alcuni punti di sutura con filo riassorbibile 6-0.

In tutti i pazienti, indipendentemente dalla tecnica operatoria utilizzata, è stata eseguita una terapia antibiotica con cefalosporine per 48 ore e profilassi antitromboembolica con eparina a basso peso molecolare. La degenza media è risultata di 5-6 giorni.

Il giorno dopo l'intervento il paziente ha iniziato il programma di rieducazione funzionale con mobilizzazione passiva e progressiva dell'arto operato. Il processo riabilitativo utilizzato prevede l'esecuzione di esercizi attivi dopo 25-30 giorni dall'intervento, concessione progressiva del carico sull'arto operato dopo 30 giorni e completo al 3° mese con esercizi di rieducazione propriocettica e funzionale, ripresa dell'attività sportiva leggera dopo 5 mesi e ripresa dell'attività sportiva di contrasto dopo 1 anno. I pazienti sono stati controllati a distanza di 1, 2, 3, 6, 12, 18 e 24 mesi dall'intervento.

È stata utilizzata una scheda clinica atta a valutare i parametri soggettivi ed obiettivi del paziente, con particolare riferimento alla presenza di dolore, al ripristino dell'articolazione e del trofismo muscolare, alla ripresa delle normali attività quotidiane e dell'attività sportiva. A sei mesi dal trapianto è stata eseguita un'indagine mediante RMN dell'articolazione del ginocchio per verificare le condizioni della cartilagine e dell'osso subcondrale. Ad un anno dall'intervento solo 5 pazienti trattati con ciascuna delle due tecniche utilizzate sono stati sottoposti ad artroscopia di controllo con prelievo biotico della zona cartilaginea trattata. Il materiale prelevato è stato sottoposto ad analisi istochimica ed immunoistochimica per la valutazione morfologica della cartilagine neofornata e per l'evidenziazione del collagene di tipo II, marker riconosciuto del fenotipo cartilagineo "normale" articolare. In particolare sono state effettuate colorazioni con ematossilina ed eosina, Safranina-O, Alcian blu e mediante anticorpi monoclonali è stata messa in evidenza la presenza/assenza di collagene di tipo II. Nei rimanenti pazienti, in considerazione dei buoni risultati ottenuti precedentemente con entrambe le metodiche, non si è ritenuto op-

portuno effettuare per motivi etici un'indagine invasiva quale l'artroscopia di controllo. I pazienti quindi sono stati sottoposti periodicamente a controlli clinici.

Dal punto di vista clinico i risultati funzionali valutati secondo Lysholm-Tegner (50) e con la scheda di Cincinnati (51) hanno mostrato un progressivo ripristino dell'articolazione con scomparsa del dolore in entrambe le casistiche analizzate. L'analisi statistica effettuata all'interno di ciascun gruppo ha evidenziato un incremento significativo di tale condizione nei primi 12 mesi seguito da una stabilizzazione nel periodo successivo. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a 6 mesi a RMN che ha dimostrato un'iniziale formazione di tessuto cartilagineo di riparazione senza differenze significative tra i due gruppi in esame. L'analisi istologica effettuata a 12 mesi ha evidenziato la formazione di tessuto cartilagineo simil-ialino con presenza variabile di collagene di tipo II e la scomparsa del biomateriale che presenta *in vivo* un tempo di degradazione di circa 5 mesi. Le diverse analisi istologiche effettuate nei pazienti che si sono sottoposti ad artroscopia ha mostrato in tutti i casi una precoce organizzazione strutturale con caratteristiche di un tessuto simil-ialino come evidenziato dalla presenza di collagene II in entrambi i gruppi. Le indagini strumentali (RMN, artroscopia e bio-

psia) hanno confermato in generale i risultati clinici ottenuti. Da un punto di vista chirurgico, l'utilizzo del biomateriale semplifica la tecnica di impianto riducendo il tempo ed i costi operatori. Il successivo miglioramento tecnico consentirà verosimilmente di eseguire questo tipo di metodica esclusivamente per via artroscopica riducendo ancora i tempi operatori e rendendo tale tecnica fruibile in regime di day hospital.

CONCLUSIONI

Alla luce di quanto finora esposto risulta evidente come la tecnica di trapianto di cellule autologhe ed in particolare di condrociti sia divenuto un valido approccio terapeutico nella riparazione di danni alla cartilagine articolare. L'utilizzo di supporti biocompatibili sta inoltre rendendo tale metodica semplice, affidabile, garantendo al tempo stesso l'impianto di cellule differenziate in grado di ricostruire una cartilagine con struttura simil-ialina. Il futuro è rappresentato dalla possibilità di trapiantare condrociti autologhi per il trattamento di lesioni in corso di patologie quali l'osteoartrosi. La possibilità di associare al trapianto tecniche di terapia genica consentirà inoltre di poter contrastare l'instaurarsi e/o l'evolversi della malattia.

RIASSUNTO

Nuove e promettenti terapie basate sull'ingegneria tissutale sono state sviluppate per la riparazione di lesioni alla cartilagine. L'associazione fra biomateriali e cellule autologhe può rappresentare infatti un utile strumento per la rigenerazione di questo tessuto. Gli scaffolds utilizzati devono possedere delle caratteristiche particolari, quali una struttura tridimensionale, prevenire la fuoriuscita delle cellule dalla sede della lesione facilitandone una distribuzione uniforme nella medesima, avere un'adeguata resistenza meccanica ed in particolare supportare il mantenimento del fenotipo cellulare originale. Lo Hyaff®-11 è un polimero biodegradabile a base di acido ialuronico, il quale si è dimostrato un valido carrier nella riparazione di vari tipi di tessuti. Nella nostra esperienza abbiamo potuto verificare che condrociti umani veicolati da tale biomateriale siano in grado di mantenere il fenotipo originale come testimoniato dall'espressione e dalla sintesi del collagene di tipo II e dell'aggrecano, molecole specifiche della cartilagine, riducendo al contempo la sintesi del collagene di tipo I. Inoltre, il suddetto polimero risulta essere un utile supporto per la riparazione di lesioni cartilaginee sia in modelli animali che in trials clinici nell'uomo, favorendo la formazione di un tessuto simil-ialino. Alla luce di questi dati possiamo ipotizzare per il futuro l'uso del trapianto di condrociti autologhi associato alla terapia genica negli approcci terapeutici di alcune patologie reumatiche quali ad esempio l'osteoartrosi.

Parole chiave - Trapianto, condrociti autologhi, biomateriale.

Key words - Transplantation, autologous chondrocytes, biomaterial.

BIBLIOGRAFIA

1. Griffith LG, Naughton G. Tissue Engineering-current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002; 295: 1009-14.
2. Vacanti CA, Vacanti JP. The science of tissue engineering. *Orthop Clin North Am* 2000; 31: 351-6.
3. Sitterling M, Bujia J, Rotter N, Reitzel D, Minuth WW, Burmester GR. Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. *Biomaterials* 1996; 17: 237-42.

4. Altman GH, Horan RL, Martin I, Farhadi J, Stark PR, Volloch V, et al. Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J* 2002; 16: 270-2.
5. Philips TJ. Cultured skin grafts. Past, present and future. *Arch Dermatol* 1988; 124: 1035-8.
6. Boyan BD, Lohmann CH, Romero J, Schwartz Z. Bone and cartilage tissue engineering. *Clin Plast Surg* 1999; 26: 629-45.
7. Hunkeler D, Rehor A, Ceausoglu I, Schuldt U, Canaple L, Bernard P, et al. Objectively assessing bioartificial organs. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 944: 456-71.
8. Strain AJ, Neuberger JM. A bioartificial liver. State of the art. *Science* 2002; 295: 1005-9.
9. Tresco PA. Tissue engineering strategies for nervous system repair. *Prog Brain Res* 2000; 128: 349-63.
10. Buckwalter JA, Martin J, Mankin HJ. Synovial joint degeneration on the syndrome of osteoarthritis. *Instr Course Lect* 2000; 49: 481-9.
11. Mankin HJ. Current concepts review: the response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg (Am)* 1982; 64: 460-6.
12. Buckwalter JA, Rosenberg LC, Hunzinker EB. Articular cartilage: composition, structure, response to injury and methods of repair. In: Ewing JR, Eds. *Articular cartilage and knee joint function: basic science and arthroscopy*. New York: Raven Press, 1990, pp. 19-56.
13. Buckwalter JA. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther* 1998; 28: 192-202.
14. O'Driscoll SW. The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 1998; 80: 1795-812.
15. Baumgaertner MR, Cannon WD, Vittori JM, Schmidt ES, Maurer RC. Arthroscopic debridement of the arthritic knee. *Clin Orthop* 1990; 253: 197-202.
16. Mitchell N, Shepard N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J Bone J Surg (Am)* 1976; 58: 230-3.
17. Johnson LL. Arthroscopic abrasion in arthroplasty. In: McGinty JB, Ed *Operative Arthroscopy*. New York: Raven Press 1991: 341-60.
18. Homminga GN, van der Linden TJ, Terwindt-Rouwenhorst EAW, Drukker J. Repair of articular defects by perichondrial grafts. Experiments in the rabbit. *Acta Orthop Scand* 1989; 60: 326-9.
19. Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PSM, van der Linden AJ. Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg (Br)* 1990; 72: B1003-7.
20. O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological 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 (Am)* 1986; 68: A1017-35.
21. Vachon AM, McIlwraith CW, Trotter GW, Norrdin PW, Powers BE. Morphologic study of induced osteochondral defects of the distal portion of the radial carpal bone in horses by use of glued periosteal autografts. *Am J Vet Res* 1991; 52: 317-27.
22. Kawabe N, Yoshinai M. The repair of full-thickness articular cartilage defects. Immune responses to reparative tissue formed by allogeneic growth plate chondrocyte implants. *Clin Orthop Rel Res* 1991; 268: 279-93.
23. Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindhal A. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med* 2002; 30: 2-12.
24. Lindhal A, Brittberg M, Peterson L. Health economics benefits following autologous chondrocyte transplantation for patients with focal chondral lesions of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2001; 9: 358-63.
25. Brittberg M, Tallheben T, Sjogren-Jansson B, Lindhal A, Peterson L. Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clin Orthop* 2001; 391: 337-48.
26. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson B, Lindhal A. Two-to 9- year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop* 2000; 374: 212-34.
27. Koulalis D, Schultz W, Heyden M. Autologous chondrocyte transplantation for osteochondritis dissecans of the talus. *Clin Orthop* 2002; 395: 186-92.
28. Szomor ZL, Martin TE, Bonar F, Murrell GA. The protective effects of meniscal transplantation on cartilage. An experimental study in sheep. *J Bone Joint Surg (Am)* 2000; 82: 80-8.
29. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 889-95.
30. Trippel SB. Autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1995; 332: 539-40.
31. Wright JG. Autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1995; 332: 540.
32. Sittinger M, Perka C, Schultz O, Haupt T, Burmester GR. Joint cartilage regeneration by tissue engineering. *Z Rheumatol* 1999; 58: 130-5.
33. Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Barlow SK, et al. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Bio/Technol* 1994; 12: 689-95.
34. Rahman MS, Tsuchiya T. Enhancement of chondrogenic differentiation of human articular chondrocytes by biodegradable polymers. *Tissue Eng* 2001; 7: 781-90.
35. Benya PD, Schaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982; 30: 215-24.
36. Robinson D, Halperin N, Nevo Z. Regenerating hyaline cartilage in articular defects of old chickens using implants of embryonal chick chondrocytes embedded in a new natural delivery substance. *Calcif Tissue Int* 1990; 46: 246-53.
37. Homminga GN, Buma P, Koot HWJ, van der Kraan PM, van der Berg WB. Chondrocyte behaviour in fibrin glue in vitro. *Acta Orthop Scand* 1993; 64: 441-5.
38. Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N, et al. Repair of articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J. Bone Joint Surg.* 1989; 71B: 74-80.

39. Grandolfo P, Dandrea P, Paoletti M, Martina M, Sivestrini E, Bonucci E, et al. Culture and differentiation of chondrocytes entrapped in alginate beads. *Calc Tissue Int* 1993; 52: 42-8.
40. Grigolo B, Roseti L, Fiorini M, Fini M, Giavaresi G, Nicoli Aldini N, et al. Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (Hyaff®-11) into cartilage defects in rabbit. *Biomaterials*. 2001; 22: 2417-24.
41. Aigner J, Tegeler J, Hutzler P, Campoccia D, Pavesio A, Hammer C, et al. Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester. *Biomed Mater Res* 1998; 42: 172-81.
42. Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *FASEB J* 1992; 6: 2397-404.
43. Glasser DB, Osborn DC, Joanne FN, Yvan-I M. Endothelial protection and viscoelastic retention during phaco-emulsification and intraocular lens implantation. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 1438-40.
44. Wright KE, Maurer SG, Di Cesare PE. Viscosupplementation for osteoarthritis. *Am J Orthop* 2000; 29: 88-9.
45. Andreassi L, Casini L, Trabucchi E, Diamantini S, Rastrelli A, Donati L, et al. Human keratinocytes cultured on membranes composed of benzyl ester of hyaluronic acid suitable for grafting. *Wounds* 1991; 3:116-26.
46. Donati L, Marazzi M, Veronesi AM, Ordanini MN, Falcone L, Ferrone M, et al. Treatment of cutaneous wound with cultured human keratinocytes on hyaluronic acid membrane. *Wound Repair Regen* 1995; 3: 363.
47. Grigolo B, Lisignoli G, Piacentini A, Fiorini M, Gobbi P, Mazzotti G, et al. Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (Hyaff®-11): Molecular, Immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials* 2002; 23: 1187-95.
48. Gualtieri G, Ferruzzi A, Calderoni P, Andreoli I, Grigolo B, Facchini A. Autologous chondrocyte transplantation in the treatment of articular cartilage lesions of the knee. *GIOT* 2001; 27: 57-63.
49. Noyes FR, Stabler CL. A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy. *Am J Sports Med* 1989; 17: 505-13.
50. Tegner Y, Lysholm J. Rating system in the evaluation of knee legament injuries. *Clin Orthop* 1985; 198: 43-9.
51. Barber-Westin Sd, Noyes FR, McCloskey JW. Rigorous statistical reliability, validity, and responsiveness testing of the Cincinnati Knee Rating system in 350 subjects with uninjured, injured, or anterior cruciate ligament-reconstructed knees. *Am J Sports Med* 1999; 27: 402-26.