

Ocena wyników leczenia ubytków chrzęstno-kostnych stawu kolanowego rekonstruowanych za pomocą mezenchymalnych komórek macierzystych

Osteochondral Lesions of the Knee Reconstructed with Mesenchymal Stem Cells – Results

Jan Skowroński^(A,C,D,E,G), Marcin Rutka^(B,C,E,F)

Klinika Ortopedii i Traumatologii Uniwersytetu Medycznego, Białystok
Orthopaedic Surgery and Traumatology Department, Medical University of Białystok, Poland

STRESZCZENIE

Wstęp. Autorzy przedstawiają wyniki rekonstrukcji ubytków chrzęstno-kostnych leczonych przy pomocy zmodyfikowanej techniki „kanapkowej” z użyciem błony kolagenowej. Celem pracy był ocena oraz porównanie wyników klinicznych po rekonstrukcji ubytków chrzęstno-kostnych w dwóch grupach chorych zaopatrzonych z użyciem komórek macierzystych pozyskanych z krwi oraz za pomocą koncentratu komórek szpiku.

Materiał i metody. Materiał kliniczny stanowiło 46 pacjentów z ubytkami chrzęstno-kostnymi o różnej etiologii, potwierdzonymi w MRI, w dwóch grupach: 21 chorych zaopatrzonych z użyciem koncentratu komórek szpiku i 25 chorych leczonych za pomocą komórek mezenchymalnych uzyskanych z krwi obwodowej. Ocena przeprowadzono po 6 miesiącach, 1 roku i 5 lat po rekonstrukcji ubytku na podstawie skal: KOOS, Lysholma i VAS.

Wyniki. Autorzy uzyskali istotną poprawę we wszystkich skalach ocen u 40 operowanych pacjentów (86%). U 6 chorych odnotowano wynik zły. Wykazano istotną statystycznie różnicę w grupach porównywanych na korzyść chorych leczonych komórkami macierzystymi pozyskanymi z krwi. Ocena obrazów MRI, u chorych z wynikami dobrymi i bardzo dobrymi, wykazała zadowalającą odbudowę powierzchni chrzęstnej oraz dobrą integrację regeneratu. Po 5-ciu latach odnotowano niewielki spadek średniej ocen klinicznych w obu grupach chorych.

Wnioski. 1. Rekonstrukcja z użyciem zmodyfikowanej techniki kanapkowej jest skuteczną metodą leczenia głębokich ubytków chrzęstno-kostnych stawu kolanowego. 2. Nieco gorsze wyniki w grupie leczonej koncentratem komórek szpiku może mieć swą przyczynę w liczbie podanych komórek macierzystych.

Słowa kluczowe: choroby chrząstki, martwica chrzęstno-kostna, komórki macierzyste, chirurgia rekonstrukcyjna

SUMMARY

Background. We present the results of the treatment of osteochondral lesions with the modified sandwich technique with a collagen membrane. The aim of the study was to assess and compare clinical outcomes following the reconstruction of osteochondral lesions in two groups of patients treated with stem cells obtained from blood and with bone marrow concentrate.

Material and methods. The study group comprised 46 patients with MRI-confirmed osteochondral lesions of various aetiology. A group of 21 patients was treated with bone marrow concentrate and 25 patients were treated with mesenchymal cells obtained from peripheral blood. Patients were assessed with the use of KOOS, Lysholm and VAS scales at 6 months, and at 1 and 5 years following the reconstruction.

Results. We noted a significant improvement across all scales in 40 patients (86%). A poor outcome was noted in 6 patients. There was a statistically significant superiority of the group treated with stem cells obtained from blood. The analysis of MRI evidence in patients with good and excellent results showed satisfactory reconstruction of the cartilaginous surface and good regenerate integration. At 5 years, a slight decrease in mean clinical assessment scores was seen in both groups of patients.

Conclusions. 1. The modified sandwich reconstruction is an effective modality in the treatment of severe osteochondral lesions of the knee. 2. Slightly poorer outcomes in the group treated with bone marrow concentrate may have resulted from the number of injected stem cells.

Key words: cartilage disease, osteochondritis dissecans (OCD), stem cells, reconstructive surgical procedures

WSTĘP

Leczenie operacyjne głębokich ubytków chrzęstno-kostnych jest nadal dużym wyzwaniem dla chirurga ortopedy. Tkanka, która ma wypełnić ubytek powinna w sposób efektywny przenosić obciążenia, opierać się zużyciu podczas ruchów, a także skutecznie odżywiać i nawilżać staw [1]. Przy głębokim ubytku, w którym nie ma zachowanej warstwy podchrzęstnej kości, uzyskanie w/w efektów jest trudniejsze ze względu na uzupełnienie ubytku kostnego i odtworzenie kształtu kłykcia.

Przy niewielkich ubytkach (do 3–4 cm²) dobrym rozwiązaniem wydają się być autologiczne przeszczepy chrzęstno-kostne w postaci mozaikoplastyki [2]. W przypadku dużych ubytków (pow. 4 cm²) w grę wchodzi przeszczepy allogeniczne lub autologiczny przeszczep chondrocytów. Przeszczepy allogeniczne są rzadziej stosowane ze względu na procedury ich pozyskiwania.

Powszechnie akceptowaną metodą rekonstrukcji dużych ubytków chrzęstno-kostnych (pow. 4 cm²) jest autologiczny przeszczep chondrocytów z przeszczepem kostnym, ale jest to procedura 2-etapowa [3,4,5,6]. Po pobraniu chondrocytów istnieje konieczność ich namnożenia w laboratorium i następnie ich wszczepienia. Z uwagi na hodowlę w warunkach laboratoryjnych, jak i 2 seanse operacyjne, procedura ta jest wysoce kosztowna i bardziej kłopotliwa dla pacjenta.

Stosunkowo niedawno rozpoczęto stosowanie jednoetapowych procedur operacyjnych, gdzie hodowane chondrocyty zastąpiono mezenchymalnymi komórkami macierzystymi pozyskiwanymi najczęściej z krwi, szpiku lub tkanki tłuszczowej [7,8,9,10,11,12].

W naszym ośrodku do rekonstrukcji głębokich ubytków chrzęstno-kostnych stosowano koncentrat komórek szpiku kostnego oraz mezenchymalne komórki macierzyste pozyskane z krwi obwodowej.

Wstępne wyniki leczenia chorych były satysfakcjonujące w ocenie operatorów i inspirowały do dalszych obserwacji,

Celem pracy była ocena odległych wyników klinicznych po rekonstrukcji rozległych ubytków chrzęstno-kostnych w dwóch grupach chorych zaopatrzonych z użyciem mezenchymalnych komórek macierzystych z krwi lub koncentratu komórek szpiku.

MATERIAŁ I METODY

Materiał kliniczny stanowi 46 pacjentów z wśród 48 operowanych w latach (2002-2007) z ubytkami chrzęstno-kostnymi o różnej etiologii (Tab. 1), potwierdzonymi w RTG i MR. Do badania włączono 20 kobiet i 26 mężczyzn w wieku od 17 do 52 lat

BACKGROUND

Operative treatment of severe osteochondral lesions still poses a major challenge in orthopaedic surgery. Tissue used as lesion filling should transfer loads effectively and be wear-resistant during movement. Moreover, it should effectively nourish and moisturise the joint [1]. It is more difficult to obtain these effects in severe lesions where the subchondral layer of the bone is not preserved as it is necessary to fill the bone defect and restore the shape of the condyle.

In case of minor lesions (up to 3-4 cm²), autologous osteochondral transplantations (mosaicplasty) seem to bring positive results [2]. In case of more severe lesions (>4 cm²), the choice is between allografts and autologous chondrocyte transplantation. Allografts are used less commonly due to the procedures required to obtain them.

A widely accepted method of reconstruction of large osteochondral lesions (>4 cm²) is autologous chondrocyte transplantation with a bone graft. It is a two-stage procedure in which sampled chondrocytes need to be multiplied in the laboratory before being reimplanted [3,4,5,6]. With the laboratory multiplication and two surgeries, the procedure is very expensive and more troublesome for the patient.

One-stage surgical procedures have recently been introduced with chondrocyte multiplication replaced with mesenchymal stem cells most commonly obtained from blood, bone marrow or adipose tissue [7,8,9,10,11,12].

In our centre, severe osteochondral lesions were treated with bone marrow concentrate and mesenchymal stem cells obtained from peripheral blood.

Preliminary treatment results were satisfactory and they encouraged the operators to carry out further observations.

The aim of the study was to assess long-term clinical outcomes following the reconstruction of massive osteochondral lesions in two groups of patients treated with mesenchymal stem cells obtained from blood or with bone marrow concentrate.

MATERIAL AND METHODS

The study group comprised 46 out of 48 patients operated due to osteochondral lesions of various aetiology in the years 2002-2007 (Table 1). The lesions had been confirmed with MRI and X-ray examinations. The study group consisted of 20 female

Tab. 1. Etiologia ubytków chrzęstno-kostnych

Tab. 1. Aetiology of osteochondral lesions

Etiologia / Aetiology	Komórki Macierzyste Pozyskane z Krwi / Stem cells obtained from blood	Koncentrat Szpiku Kostnego / Bone marrow concentrate
Urazowa / Injury	7	6
Martwica chrzęstno – kostna / OCD	16	14
Idiopatyczna / Idiopathic	2	1

(średnia – 26 lat). Dwóch chorych nie zgłosiło się na badania kontrolne. Chorych przydzielono do dwóch grup: 21 chorych (9 ♀, 12 ♂) zaopatrzonych z użyciem koncentratu komórek szpiku i 25 chorych (11 ♀, 14 ♂) leczonych za pomocą komórek mezenchymalnych uzyskanych z krwi obwodowej po stymulacji jedną dawką Neupogenu (5µg/kg m.c.) 1 tydzień przed zabiegiem operacyjnym.

Kryteria włączenia to: pojedynczy ubytek chrzęstno-kostny w kłykciu przyśrodkowym kości udowej wielkości powyżej 4cm² i głębokości powyżej 6 mm; prawidłowa oś mechaniczna kończyny; wiek do 55 lat.

Kryteria wyłączenia to: choroba systemowa, RZS, zmiany zwyrodnieniowe 2-óch i więcej przedziałów stawu kolanowego, schorzenia stawu biodrowego z zaburzeniami chodu, dna moczaniowa, chondrokalcynoza, angio i neuropatie, deformacje kończyny, BMI powyżej 30.

Przed zabiegiem operacyjnym każdego z chorych poddano funkcjonalnej ocenie w skali KOOS, Lysholma i VAS. Wykonywano również cyfrowy radiogram kończyn dolnych w pozycji stojącej oraz MRI stawu kolanowego w trzech płaszczyznach w sekwencjach T1, T2, PD, PD fatsat (Ryc 1).

W zależności od źródła pozyskania mezenchymalnych komórek macierzystych, chorzy zostali przydzieleni do jednej z dwóch grup. Grupa 1 – koncentrat komórek szpiku i Grupa 2 – mezenchymalne komórki macierzyste pozyskane z krwi.

Przed zabiegiem pacjentom z Grupy 1 pobierano z talerza kości biodrowej 27 ml szpiku kostnego do 3 ml antykoagulantu i wirowano przez 15 min przy 3200 obr/min (Marrow Stim, Biomet). Liczba komórek w koncentracie ze szpiku oscylowała od 450 000 do 2 650 000 w cm³.

W Grupie 2 cztery godziny przed zabiegiem operacyjnym każdy chory miał pobrane 40 ml krwi, którą przekazywano do laboratorium, gdzie komórki izolowano na separatorze CS 3000 plus, a następnie zagęszczano, zgodnie z metodą podaną wcześniej [9]. Liczba komórek w zawieszynie otrzymanej z krwi

and 26 male patients, aged 17-52 years (average age: 26 years). Two patients failed to present for their follow-up examination. The patients were assigned to two groups: 21 patients (9 females, 12 males) treated with bone marrow concentrate and 25 patients (11 females, 14 males) treated with mesenchymal cells obtained from peripheral blood following stimulation with one dose of Neupogen (5µg/kg of body weight) 1 week before the surgery.

Inclusion criteria were: the presence of a solitary osteochondral lesion in the medial femoral condyle (>4cm², >6mm deep), normal mechanical axis of the limb, age up to 55 years.

Exclusion criteria were as follows: systemic disease, rheumatoid arthritis (RA), bi- or tri-compartmental arthritis of the knee, hip diseases with gait disturbance, gout, chondrocalcinosis, angio- and neuropathy, limb deformity, BMI above 30.

Prior to the surgery all the patients were subjected to KOOS, Lysholm and VAS functional assessment. A standing digital radiograph of the lower limbs and T1-, T2-, PD- and PD fat sat-weighted MRI of the knee in three planes were also obtained preoperatively (Fig. 1).

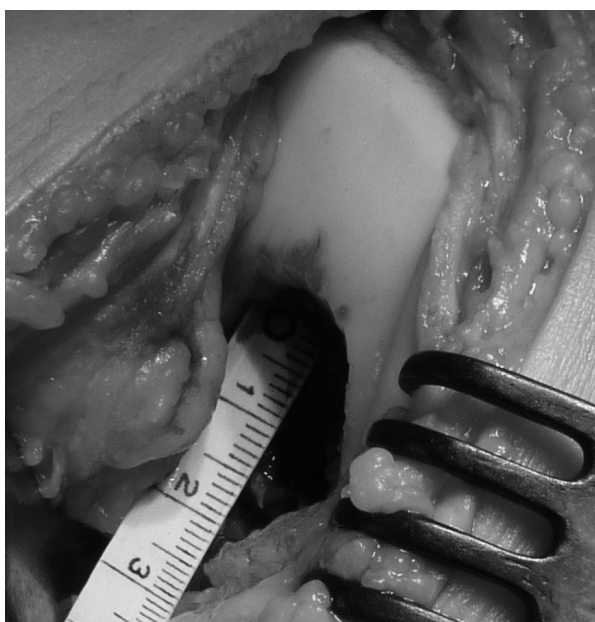
The patients were assigned to one of two groups depending on the source of mesenchymal stem cells: Group 1 – bone marrow concentrate and Group 2 – mesenchymal stem cells obtained from blood.

Prior to surgery, patients from Group 1 had 27 ml of bone marrow collected from the ilium, added to 3 ml of anticoagulant factor and centrifuged for 15 minutes at 3200 RPM (Marrow Stim, Biomet). The cell count in the bone marrow concentrate was in the region of 4.5 x 10⁵ to 2.65 x 10⁶.

In Group 2, 40 ml of blood was collected from each patient four hours before the procedure. The blood was transferred to a laboratory where cells were isolated on a CS3000 plus separator and then condensed (according to a previously described method [9]). The cell count in the suspension obtained from blood was 1.25 x 10⁶ to 5.2 x 10⁶ per cm³. In



Ryc. 1. Pacjent M.A. MR wyjściowy
Fig. 1. Patient M. A. – pre-operative MRI



Ryc. 2. Obraz ubytku po opracowaniu
Fig. 2. The lesion after debridement

oscylowała od 1 250 000 do 5 200 000 w cm³. Liczbę komórek w obu grupach chorych określano na cytometrze przepływowym w Zakładzie Diagnostyki Hematologicznej.

Zabiegi przeprowadzano w znieczuleniu dokanałowym. Procedurę rozpoczynano od artroskopii, oceniając ubytek i jeżeli korespondował on z obrazem w MR, wykonywano miniartrotomię z dostępu parapatelarnego przyśrodkowego.

both groups, the cell count was determined on a flow cytometer at the Haematology Diagnosis Division.

The procedures were performed under intrathecal anaesthesia. An arthroscopy was performed first to assess the lesion. If the lesion corresponded with the MRI result, a miniarthrotomy was performed from a medial parapatellar approach.

After a thorough debridement of the lesion and removal of sclerotic fragments of the bed to the



Ryc. 3. Obraz ubytku po implantacji membrany i komórek macierzystych

Fig. 3. The lesion after the implantation of membrane and stem cells

Po dokładnym oczyszczeniu ubytku oraz usunięciu sklerotycznych części dna do granicy zdrowej kości (Ryc. 2) wykonywano głębokie nawiercenia lub nakłucia oraz wypełniano ubytek kostny autologicznymi przeszczepami gąbczastymi pobranymi z talerza kości biodrowej odtwarzając kształt kłykcia. Korzystając z techniki rekonstrukcji „kanapkowej” zrezygnowano z jednej z błon kolagenowych oddzielających zawieszinę komórkową od przeszczepów kostnych i przykrywano ubytek pojedynczą łata z membrany Chondro-Gide (Geistlich); (Ryc. 3), dokładnie dopasowaną do ubytku i mocowaną szwami PDS 6-0 oraz klejem tkankowym (Tissucol, Baxter); (Ryc. 4). Po finalnym zamocowaniu membrany sprawdzano jej stabilność zginając i prostując kolano kilkakrotnie.

Następnie podawano zawieszinę komórkową koncentratu szpiku lub komórek mezenchymalnych krwi pod membranę aż do jej uwypuklenia. Ewentualne wycieki uszczelniano klejem fibrynowym.

Biorąc pod uwagę lokalizację ubytku na krzywiznie kłykcia dobierano odpowiedni zakres ruchu w ortezie z zegarem zgięcia, tak, aby nie obciążać obszaru rekonstrukcji podczas ćwiczeń czynnych. W tym samym czasie ćwiczenia bierne wykonywane były w zakresie bezbolesnym bez ortezy.

Czynne ćwiczenia pacjenci rozpoczynali po 2 tygodniach od zabiegu w bezbolesnym zakresie ruchu.

edges of intact bone (Fig. 2), the operators performed deep reaming or punctures and filled the bone lesion with autologous spongy bone grafts harvested from the ilium to restore the shape of the condyle. With the sandwich technique, it was possible not to use one of the collagen membranes separating the cell suspension and bone grafts and cover the lesion with a single patch of Chondro-Gide (Geistlich) membrane (Fig. 3), shaped to match the lesion and fastened with 6-0 PDS sutures and Tissucol fibrin sealant (manufactured by Baxter) (Fig. 4). After fastening, membrane stability was tested by performing several flexions and extensions of the knee.

Then a suspension of bone marrow concentrate or mesenchymal blood cells were injected under the membrane until it curved out. If a leakage occurred, it was sealed with fibrin glue.

Regarding the site of the lesion on the condyle curve, an appropriate range of motion was set on the knee orthosis with a ROM hinge so as not to load the reconstruction area during active exercises. At the same time passive exercises were performed in the painless range without the orthosis.

Active training within the painless range of motion was commenced 2 weeks post-surgery.

Loading of the operated limb was introduced after 4 weeks in a graded manner to achieve full loading after 6 weeks.



błona kolagenowa lub płat okostnowy / collagen membrane or periosteal flap
zawiesina komórek macierzystych / stem cell suspension
przeszczep kości gąbczastej / spongy bone graft

Ryc. 4. Schemat zmodyfikowanej techniki kanapkowej
Fig. 4. The scheme of modified sandwich technique



Ryc. 5. Pacjentka M. A. MR po roku od zabiegu
Fig. 5. Patient M. A. – MRI one year post surgery

Po 4 tygodniach rozpoczynano obciążanie operowanej kończyny stopniowo tak, aby po 6 tygodniach było ono pełne.

Ocenę kliniczną przeprowadzano w skalach KOOS, Lysholma i VAS po 6 miesiącach, 1 roku i 5 latach. W badaniu kontrolnym MR stosowano identyczne parametry jak przed rekonstrukcją ubytku (Ryc. 5).

Analizę statystyczną wyników w dwóch grupach przeprowadzono testem Wilcoxona – przed operacją, 6 miesięcy, 1 rok po zabiegu i 5 latach.

Clinical assessment according to the KOOS, Lysholm and VAS scales was conducted after 6 months, 1 and 5 years. Follow-up MRIs were obtained with the same parameters as before surgery (Fig. 5).

Statistical analysis of the results in both groups was performed with the Wilcoxon test before the surgery and at one and five years post-operatively.

Tab. 2. Średnie wartości w skalach oceny klinicznej i bólu przed operacją, 6 miesięcy, 1 rok i 5 lat po

Tab. 2. Mean values of clinical and pain scores pre-operatively, at 6 months, 1 year and 5 years

Skala / Scale	Komórki Macierzyste Pozyskane z Krwi / Stem cells obtained from blood				Koncentrat Szpiku Kostnego / Bone marrow concentrate			
	Przed operacją / Pre-operative	6 mies. po / 6 months	1 rok po / 1 year	5 lat po / 5 years	Przed operacją / Pre-operative	6 mies. po / 6 months	1 rok po / 1 year	5 lat po / 5 years
KOOS	61.3	82.1	93.8	91.3	58.3	83.6	94.5	90.2
Lysholm	54.7	80.6	91.8	89.2	52.4	82.7	91.3	88.9
VAS	5.9	1.5	1	1	6.1	1.4	1	1.2

WYNIKI

Wyniki leczenia po 6 miesiącach, 1 roku i 5 latach przedstawia Tabela 2.

U 40 chorych (86%) uzyskano poprawę w skalach klinicznych po 6 i 12 miesiącach w stosunku do wartości początkowych ($p=0,005 - 0,01$).

U 6 chorych odnotowano wynik zły. U wszystkich pozostałych chorych (40-tu) w badaniach MRI potwierdzono integrację regeneratu chrząstki z podłożem.

W grupie chorych otrzymujących koncentrat komórek szpiku odnotowano 4 wyniki złe, z czego 3 dotyczyły przebytej oddzielającej martwicy chrząstno-kostnej, a 1 przypadek przebytego urazu. Podany pod membranę koncentrat u w/w chorych zawierał stosownie 450 000, 680 000, 900 000 i 900 000 komórek w cm^3 . U dwóch chorych stwierdzono delaminację regenerującej tkanki z brzezną sklerotyzacją dna ubytku. U obydwu chorych wykonana reoperacja polegała na nieco rozleglejszej resekcji ubytku i zmianie źródła pozyskania mezenchymalnych komórek na krew. U dalszych dwóch chorych podczas artroskopii stwierdzono konglomerat łącznotkankowy wypełniający ubytek miejscami z ogniskami tkanki włóknisto-szklistej przy dobrym kształcie kłykcia. W miejscu powstania regeneratu wykonano shaving i mikroślamania, jako że przeszczep kostny dobrze wbudował się w podłoże

W grupie chorych, u których implantowano komórki mezenchymalne z krwi odnotowano 2 wyniki złe. W jednym przypadku prawdopodobna przyczyna to oderwanie membrany kolagenowej, a w drugim nie odtworzono dostatecznie dobrze kształtu kłykcia. Liczba implantowanych komórek w cm^3 wynosiła stosownie 2 200 000 i 2 400 000. Chorzy ci nie zdecydowali się na reoperację preferując przyszłą endoprotezoplastykę stawu.

Po pięciu latach średnia punktacja w skalach klinicznych uległa nieznacznemu pogorszeniu, lecz żaden wynik nie przesunął się do wyników złych (Tab. 2).

RESULTS

Treatment results at 6 months, one and five years post-operatively are presented in Table 2.

Improved clinical scores at 6 and 12 months compared to baseline values were noted in 40 patients (86%) ($p=0.005 - 0.01$).

A poor outcome was noted in 6 patients. In the 40 remaining patients, integration of the cartilage regenerate with native cartilage was confirmed with MRI examination.

There were 4 poor results in the group treated with bone marrow concentrate. Three of the patients had a history of osteochondritis dissecans and one of an injury. In those patients the cell count in the concentrate injected under the membrane was 4.5×10^5 , 6.8×10^5 , 9×10^5 , 9×10^5 cells per cm^3 , respectively. There was tissue delamination with sclerosis of the lesion bed margins in two patients. Both patients underwent a repeat surgery consisting in a slightly more extensive lesion resection with the mesenchymal cells obtained from blood. During arthroscopy in the other two patients, we found a connective tissue conglomerate filling the lesion locally with fibro-hyaline tissue foci and normal shape of the condyle. Shaving and microfractures were performed at the site of regenerate development because the bone graft was well integrated with the application site.

Two poor results were noted in the group of patients with mesenchymal cells implanted from blood. The possible causes were collagen membrane laceration in one case and insufficient restoration of condyle shape in the other. The implanted cell count was 2.2×10^6 and 2.4×10^6 , respectively. Those patients did not consent to repeat surgery as they preferred arthroplasty in the future.

After 5 years the mean scores in the clinical scales deteriorated slightly, but not as far as the "poor" category (Tab. 2).

The group treated with mesenchymal cells isolated from blood demonstrated superior results

W porównaniu dwóch grup chorych, grupa z komórkami mezenchymalnymi izolowanymi z krwi prezentował lepsze wyniki, a różnice były istotne statystycznie ($p = 0,01 - 0,02$)

DYSKUSJA

Przedstawione wyniki leczenia po 5 latach pozwalają stwierdzić, że rekonstrukcja chrząstki w obu grupach chorych jest dość skuteczną metodą leczenia. Wyniki lepsze uzyskano w grupie chorych, gdzie komórki pozyskiwano z krwi (Grupa 2). Jedną z przyczyn tego stanu rzeczy można upatrywać w stymulacji jakiej zostali poddani chorzy z tej grupy przed zabiegiem operacyjnym. Technika operacyjna w obu grupach chorych była podobna. W obu grupach pole ubytku kości było odświeżane poprzez nawiercanie lub nakłuwanie w zależności od stopnia twardości podłoża. Nakłucia i nawiercenia były na tyle głębokie by wypływała z nich krew. Stąd u chorych stymulowanych w przebiegu pooperacyjnym krew, która wypływała w przeszczep gąbczasty i pod membranę posiadała prawdopodobnie wyższy odsetek komórek macierzystych niż w grupie otrzymującej koncentrat komórek szpiku. Ewentualną drugą przyczyną rozbieżności wyników jest liczba mezenchymalnych komórek macierzystych egzystujących w zawieszynie i podanych pod membranę. W przypadku chorych którzy otrzymali koncentrat szpiku liczba komórek w koncentracie wahała się od 450 000 do 2 650 000. Podczas gdy liczba komórek w zawieszynie pochodzącej z krwi najczęściej był 2 razy wyższy.

Oczywistym jest, że dla każdej z metod prawdopodobnie istnieje optymalna liczba mezenchymalnych komórek macierzystych w cm^3 , przy której chondro czy osteogeneza ma najbardziej sprzyjające warunki, co sugerowali inni [13].

Nie bez znaczenia jest również fakt, jak wiele w obu zawieszinach komórkowych jest płytek krwi, które są nośnikiem rozmaitych czynników stymulujących chondrogenezę [13,14].

Opinia na ten temat wymaga odrębnych badań szczegółowych, co do ilości komórek w poszczególnych liniach komórkowych, liczby płytek, jak i znalezienia korelacji tych danych z wynikami klinicznymi.

Badania takie wymagałyby znacznie większej liczby chorych, jak i szczegółowej oceny zawiesin komórkowych, co przekracza ramy niniejszej pracy.

Powyższe rozważania znajdują również swoje uzasadnienie w analizie niepowodzeń klinicznych.

Otóż przedstawione w grupie koncentratu szpiku, wyniki złe to przypadki, w których liczba komórek oscylowała pomiędzy 450 000 a 900 000.

compared with the other group. The differences were statistically significant ($p = 0.01 - 0.02$).

DISCUSSION

Treatment outcomes at 5 years show that cartilage reconstruction is quite an effective modality in both groups of patients. Superior results were noted in the group where cells were obtained from blood (group 2). This may be partially attributed to the stimulation which those patients had undergone prior to the surgery. The operative technique was similar in both groups. In both groups the lesion site was refreshed by reaming or puncturing depending on the hardness of the site. The reams and punctures were deep enough to bleed. Therefore, in the stimulated patients, the blood which flew into the spongy graft and under the membrane after the surgery probably had a higher stem cell count than in the group treated with bone marrow concentrate. Another possible reason for the difference in outcomes may be the count of mesenchymal stem cells present in the suspension and injected under the membrane. In the group treated with bone marrow concentrate, the cell count in the concentrate was between 4.5×10^5 and 2.65×10^6 , while it was usually twice as high in the suspension obtained from blood.

It is obvious that for each modality there is an optimal count of mesenchymal stem cells per cm^3 which offers the most favourable conditions for chondro- or osteogenesis, as suggested by other authors [13].

Another important issue is the blood platelet count in both cell suspensions, as platelets are carriers of various factors stimulating chondrogenesis [13,14].

To formulate conclusions in this regard, a detailed study should be conducted to obtain cell counts in individual cell lines and a platelet count and then finding correlations with clinical outcomes.

Such a study would require a much larger study group and detailed examinations of cell suspensions, all of which exceeds the scope of this article.

The above conclusions are also valid as regards the analysis of clinical failures.

Poor results in the group treated with bone marrow concentrate were noted in patients who were injected with 4.5×10^5 and 9×10^5 cells.

Regardless of the method of obtaining mesenchymal stem cells, the treatment results may be viewed as satisfactory, as there were over 80% good and excellent results. The results are approx. 10-15% in-

Niezależnie od sposobu pozyskania mezenchymalnych komórek macierzystych wyniki leczenia można uznać za satysfakcjonujące – ponad 80% wyników dobrych i bardzo dobrych. Wyniki te są o około 10-15% gorsze od autologicznego przeszczepu chondrocytów I-szej i II-giej generacji [3-6,15]. Niewielkie pogorszenie się wyników po 5 latach nie jest znaczne, ale wymaga dalszej obserwacji. To pogorszenie po 5 latach może mieć swoją przyczynę w stopniowej degradacji regeneratu chrząstki [16]. W podobnym czasie pogorszenie się wyników odnotowała Kohn w mikrozłamaniach, lecz było one bardziej znaczne, podczas gdy w przypadku autologicznego przeszczepu chondrocytów depresji wyników nie było [17]

Warto również dodać, że plusem leczenia w obu grupach jest jednoetapowość i nieporównywalnie niższe koszty w porównaniu do 2 etapowej autologicznej transplantacji chondrocytów.

Stosowana przez nas technika kanapkowa pozwala na rezygnację z jednej membrany (oddzielającej przeszczep kostny) dzięki mezenchymalnym komórkom macierzystym, które w zależności od środowiska, w którym zaczynają egzystować, różnicują się i dojrzewają w chondrocyty na powierzchni ubytku (w membranie i jej sąsiedztwie) lub w osteocyty w środowisku przeszczepu i dnie ubytku.

Komentując przedstawione wyniki złe należy zaznaczyć, iż przyczyna ich może posiadać kilka składowych. Oprócz liczby podanych komórek, na wynik wpływ mogły mieć uchybienia techniczne w operacjach (mocowanie membrany), procesy integracji i rewaskularyzacji przeszczepu kostnego. Ta ostatnia kwestia może szczególnie dotyczyć chorych z oddzielającą martwicą chrzęstno-kostną. Pełną ocenę prezentowanej metody będzie można uzyskać w badaniach klinicznych porównujących poszczególne metody, jak opublikowali to inni [17-19]. Niewątpliwie leczenie ubytków chrzęstno-kostnych czy chrząstki za pomocą mezenchymalnych komórek macierzystych ma ogromną przyszłość ze względu na plastyczność i ogromny potencjał [20].

WNIOSKI

1. Rekonstrukcja z użyciem zmodyfikowanej techniki kanapkowej jest skuteczną metodą leczenia głębokich ubytków chrzęstno-kostnych stawu kolanowego.
2. Nieco gorsze wyniki w grupie leczonej koncentratem komórek szpiku może mieć swą przyczynę w liczbie podanych komórek macierzystych.

ferior to those seen with 1st and 2nd generation autologous chondrocyte transplantation [3-6,15]. A slight deterioration of the assessment scores at 5 years is not significant but further monitoring is necessary. Such deterioration after 5 years may result from gradual degradation of the cartilage regenerate [16]. Kohn noted a more marked deterioration of results after a similar period following a microfracture procedure. In the case of autologous chondrocyte transplantation no deterioration was observed [17].

Moreover, the fact that this approach involves a one-stage procedure and, most importantly, its low cost compared to 2-stage autologous chondrocyte transplantation are two notable advantages of this method.

The sandwich technique has made it possible to discard one of the membranes separating the bone graft thanks to mesenchymal stem cells, which, depending on the environment, differentiate and grow into chondrocytes on the surface of the lesion (in the membrane and its vicinity) or osteocytes in the graft environment and the bed of the lesion.

As regards the poor results, it needs to be noted that they may be due to several factors combined. Apart from the count of injected cells, the outcome might have been altered by technical faults during surgery (e.g. membrane fastening) and by bone graft integration and revascularization processes. This latter issue may be particularly relevant in the case of patients with osteochondritis dissecans. Full assessment of the method may be performed during a clinical study comparing individual techniques, as described by other authors [17-19]. The treatment of osteochondral or cartilage lesions with mesenchymal stem cells is a promising approach due to its plasticity and a substantial potential [20].

CONCLUSIONS

1. The modified sandwich reconstruction is an effective modality in the treatment of severe osteochondral lesions of the knee.
2. Slightly poorer outcomes in the group treated with bone marrow concentrate may have resulted from the differences in the count of injected stem cells.

PISMIENICTWO / REFERENCES

1. Hendrich Ch. Cartilage injury and repair. In: Cartilage surgery and future perspectives. Hendrich Ch., Noth U., Eulert J. edit., Springer 2003, p. 9-15.
2. Berta A, Hangody L. Osteochondral grafting in cartilage repair. Brittberg M et al editors DJO Publication 2012 p. 33-48.
3. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331(14): 889-95.
4. Behrens P, Bitter T, Kurz B, Russlies M. Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI): 5-year follow-up. *Knee* 2006; 13(3): 194-202.
5. Peterson L, Vasiliadis HS, Brittberg M, Lindahl A: Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med* 2010; 38(6): 1117-24.
6. Henderson I, Francisco R, Oakes B, Cameron J. Autologous chondrocyte implantation for treatment of focal chondral defects of the knee: a clinical, arthroscopic, MRI and histologic evaluation at 2 years. *Knee* 2005; 12(3): 209-16.
7. Skowroński J, Jancewicz P, Skowroński R, Długosz J: Surgical treatment of large cartilage defects with use of autologous blood stem cells. *Knee Surgery Sports Traum. Arthroscop.*, 2008, vol. 16, suppl. 1: 28
8. Jancewicz P, Dzienis W, Pietruczuk M, Skowroński J, Bielecki M. Osteochondral defects of the talus treated by stem cells implantation – early results. *Annals Academi Med Bialostocensi* 2004 vol.49; Supl.25-27
9. Gobbi A, Karnatzikos G, Scotti C, Mahajan V, Mazzucco L, Grigolo B. One step cartilage repair with bone marrow aspirate concentrated cells and collagen matrix in full-thickness knee cartilage lesions; results at 2 years follow-up. *Cartilage* 2011, 2(3) 286-299.
10. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10(3): 199-206.
11. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: the past, the present, the future. *Cartilage*. 2010, 1(1): 6-9.
12. Skowroński J. Możliwości rekonstrukcji tkanek narządu ruchu za pomocą komórek macierzystych. Postępy w zakresie epidemiologii, stanu profilaktyki, diagnostyki i leczenia chorób układu kostno-stawowego w Polsce i na świecie w okresie dekady 2000-2010 red. Kruczyński J; Warszawa 2010: 67-69.
13. Gobbi A. Biological approaches for cartilage repair. *J Knee Surg* 2009; vol. 22 No: p. 36-44.
14. Zeslav K, McAdams T, Scopp J, Theosadakis J, Mahajan V, Gobbi A. New frontiers for cartilage repair and protection. *Cartilage* 2012 3(Suppl. I) 775-865.
15. Peterson L, Vasiliadis HS, Brittberg M, Lindahl A: Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med* 2010; 38(6): 1117-24.
16. Peterson L, Brittberg M, Kivirant I, Akerlund E.L, Lindahl A: Autologous chondrocyte transplantation: biomechanics and long-term durability . *Am J Sport Med* 2002; 30(1): 2-12.
17. Kon E, Gobbi A, Filardo G, Delcogliano M, Zaffagnini S, Marcacci M: Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation compared with microfracture for chondral lesions of the knee: prospective nonrandomized study at 5 years. *Am J Sports Med* 2009; 37(1): 33-41.
18. Giannini S, Buda R, Cavallo M et al. Cartilage repair evaluation in post-traumatic osteochondral lesions of the talus: from open field autologous chondrocyte to bone-marrow-derived cells transplantation. *Injury Int J Care. Injured* 41, 2010: 1196-1203.
19. Fortier LA, Potter HG, Rickey EJ et al. Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with microfracture in the equine model. *J Bone J Surg Am* 2010; 92:1927-37.
20. Lubis AMT, Lubis VK Adult bone marrow stem cells in cartilage therapy *Acta Med Indones – Indones J Intern Med* 2012, Vol 44 No 1, 62-68

Pracę zrealizowano w ramach projektu KBN nr N N403 170437

The paper was realized within the KBN project: N N403 170437

Liczba słów/Word count: 4961

Tabele/Tables: 2

Ryciny/Figures: 5

Piśmiennictwo/References: 20

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Prof. Jan Skowroński. Klinika Ortopedii i Traumatologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku, 15-276 Białystok, ul. M. C. Skłodowskiej 24a

Tel. 85 746 82 82; Fax: 85 746 86 23, e-mail: ortopamb@o2.pl

Otrzymano / Received 13.09.2013 r.
Zaakceptowano / Accepted 01.07.2013 r.